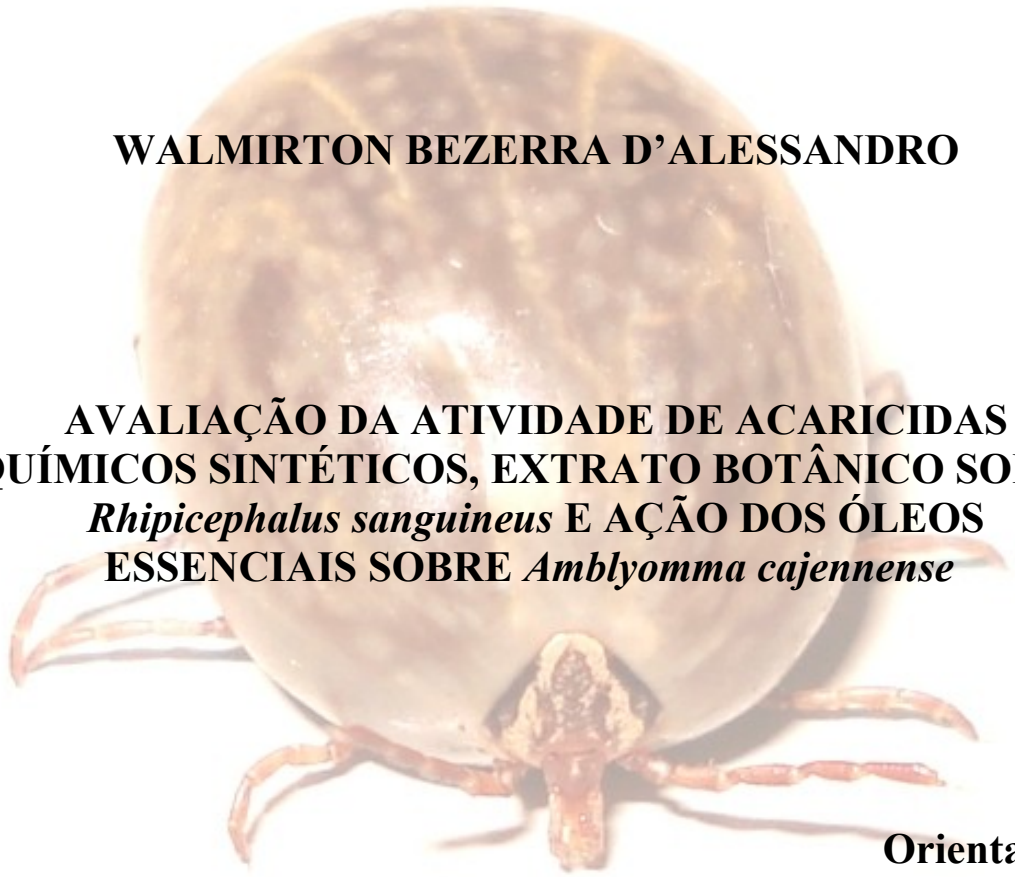
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

WALMIRTON BEZERRA D'ALESSANDRO



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ACARICIDAS QUÍMICOS SINTÉTICOS, EXTRATO BOTÂNICO SOBRE *Rhipicephalus sanguineus* E AÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE *Amblyomma cajennense*

Orientador:

Prof. Dr. Fernando de Freitas Fernandes

Dissertação de Mestrado

Goiânia – Goiás, 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

WALMIRTON BEZERRA D'ALESSANDRO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ACARICIDAS QUÍMICOS SINTÉTICOS, EXTRATO BOTÂNICO SOBRE *Rhipicephalus sanguineus* E AÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE *Amblyomma cajennense*

Orientador:

Prof. Dr. Fernando de Freitas Fernandes

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Goiânia–GO como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Tropical, área de concentração em Parasitologia.

Goiânia – Goiás, 2008.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

(GPT/BC/UFG)

D'Alessandro, Walmirton Bezerra.
D141a Avaliação da atividade de acaricidas químicos sintéticos, extrato botânico sobre *Rhipicephalus sanguineus* e ação dos óleos essenciais sobre *Amblyomma cajennense* [manuscrito] / Walmirton Bezerra D'Alessandro . – 2008.
xvii, 146 f.: il., figs., tabs.

Orientador: Prof. Fernando de Freitas Fernandes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2008.

Bibliografia: f.109-146.
Inclui listas de abreviaturas, nomeclatura de termos biológicos, tabelas e de figuras.
Anexos.

1. *Rhipicephalus sanguineus* 2 *Amblyomma cajennense* 3. *Piper hispidinervum* 4. Acaricidas botânicos 5. Carrapato - Controle I. Fernandes, Fernando de Freitas II. Universidade Federal de Goiás**, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública** III. Título.

CDU:595.42

Dedico aos meus pais Walmirton Thadeu e Celina Barbosa, meu esforço, coragem, determinação e discernimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus o qual me mostrou a direção de caminhar com o aprendizado, paz, esperança e humildade.

Ao Prof. Dr. Fernando de Freitas Fernandes, pela paciência, atenção e incentivo no processo de crescimento pessoal e profissional, além da exepcional dedicação a esta pesquisa.

Ao Laboratório de Artropodologia Médica e Veterinária (LAMV) do IPTSP/UFG, pelo espaço físico e equipamentos utilizados na realização dos bioensaios.

A FUNAPE/UFG pelo auxílio financeiro a qual me foi concedido no período de abril/2006 a fev/2008, sendo de extrema importância para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao CNPq pelo investimento na compra de materiais e equipamentos utilizados neste estudo.

Aos meus pais, Walmirton Thadeu D'Alessandro e Celina Barbosa Bezerra D' Alessandro que me deram força para realização deste trabalho, observando diretamente meu esforço e persistência na procura de *Ambyomma cajennense* para o desenvolvimento da pesquisa.

A minha namorada Aline Almeida Barbaresco, pela paciência, dedicação, amor e companheirismo referente às coletas de *Amblyomma cajennense*, nos bons e nos maus momentos.

Ao Professor Doutor, Murilo Fazolin, pela obtenção do óleo essencial de *P. hispidinervum*.

A Professora Doutora Wilia Marta Elsner Diederichsen de Brito pela realização dos ensaios sorológicos respectivos de anemia infecciosa eqüina, proveniente para liberação dos cavalos (Guia de transporte animal - GTA).

A Doutora Rosângela e Doutor Geraldo pela doação dos cavalos (Centro de Zoonoses de Goiânia) utilizados no presente estudo.

Ao Valdivino Lopes da Silva (conhecido por Divino) *in memoriam*, meu companheiro, amigo o qual me ajudou nos cuidados sobre os cavalos infestados artificialmente por carrapatos.

Aos funcionários do IPTSP. Em especial Jose Clementino (Zezinho) e Kariny pelo carinho e atenção.

"Meus ouvidos tinham escutado falar de ti, mas agora meus olhos te viram".

Jó 42,5

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....ix
LISTA DE NOMECLATURA DE TERMOS BIOLÓGICOS.....x
LISTA DE FIGURAS.....xi
LISTA DE TABELAS.....xiii
RESUMO.....xiv
ABSTRACT.....xvi

1- INTRODUÇÃO.....18
1.1- Posição sistemática de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) e *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787).....19
1.2- Os ixodídeos e a transmissão de patógenos.....20
1.2.1- Epidemiologia da Febre Maculosa no Brasil.....22
1.3- Ciclos Biológicos de *R. sanguineus* e *A. cajennense*.....24
1.3.1- Ciclo Biológico de *R. sanguineus*.....24
1.3.2- Ciclo Biológico de *A. cajennense*.....26
1.4- Morfologia de *R. sanguineus* e *A.cajennense*.....28
1.4.1- Morfologia de *R. sanguineus*.....28
1.4.2 - Morfologia de *A. cajennense*.....30
1.5- Mecanismos de ação dos acaricidas químicos sintéticos.....32
1.6- Manifestações clínicas, fisiológicas e variabilidade de toxicidade no homem..33
1.6.1- Inorgânicos (muito tóxico).....33
1.6.2- Organossintéticos (toxicidade variável).....33
1.6.2.1- Organoclorados.....33
1.6.2.2- Organofosforados e Carbamatos.....35
1.6.2.3- Piretróides.....37
1.7- Detecção de mudança de suceptibilidade aos acaricidas químicos sintéticos.....38
1.8- Resistência de *R. sanguineus* e *A. cajennenses* à acaricidas químicos sintéticos.....39
1.9- Extratos vegetais como alternativa no controle de ácaros e insetos 40
1.10-. Obtenção de compostos farmacologicamente ativos contra ácaros e insetos a partir de plantas.....41

1.11- Plantas estudadas.....43
1.12- *Piper hispidinervum* C.DC. (Piperaceae).....43
1.13- *Carapa guianensis* (Meliaceae).....44
1.14- *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae).....46

2- JUSTIFICATIVAS.....47

3- OBJETIVOS.....49
3.1- Objetivo Geral.....50
3.2- Objetivos Específicos.....50

4- MATERIAL E MÉTODOS.....51
4.1.- Origem das amostras botânicas.....52
4.2.- Obtenção dos óleos essenciais de *P. hispidinervum* e *C. guianensis*.....52
4.3.- Obtenção do extrato de *M. pubescens*.....53
4.4.- Preparação das soluções botânicas para os bioensaios.....54
4.5- Escolha dos solventes a serem utilizados.....54
4.6- Coleta de *R. sanguineus* e *A. cajennense*.....55
4.7- Avaliação da bioatividade das plantas testadas sobre *A. cajennense* e *R. sanguineus* e ação dos acaricidas químicos sintéticos sobre *R. sanguineus*.....56
4.7.1- Sensibilidade larval pela metodologia de papéis impregnados (Fernandes et al. 2007).....56
4.8- Cálculo das Concentrações Letais (CLs).....58

5- MANUSCRITO 1: Avaliação do potencial de resistência sobre as larvas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) à diferentes acaricidas químicos sintéticos.....59

6- MANUSCRITO 2: Avaliação do potencial larvicida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C.DC. (Piperaceae) e *Carapa guianensis* AUBLET. (Meliaceae) para controle de *Amblyomma cajennenses* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae).....77

7- ARTIGO 1: Toxicity of Extract of *Magonia pubescens* (Sapindales: Sapindaceae) St. Hil. To Control the Brown Dog Tick, *Rhipicephalus sanguinneus* (Latreille) (Acari: Ixodidae)……..100

8- CONCLUSÕES.....105

9- CONSIDERAÇÃO FINAL.....107

10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....109

11- ANEXOS.....122

11.1- Roteiro para preparação de Dissertação de Mestrado e Tese de Doutorado no PPGMT.....123

11.2- Normas adotadas pelo Periódico Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.....125

11.3- Normas para Publicação no Periódico Científico: *Experimental and Applied Acarology*.....130

11.4- Normas para Publicação no Periódico Científico: *Veterinary Parasitology*..135

11.5- Normas para Publicação no Periódico Científico: Neotropical Entomology.....144

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA..... Análises de Variação

ATPase..... Adenosina Trifosfatase

BHC..... Hexa-Cloro Benzeno

BOD..... Biological Oxygen Demand

CL_{50} ..... Concentração capaz de matar 50% das larvas testadas

CL_{99} ..... Concentração capaz de matar 99% das larvas testadas

CLs..... Cálculo das Concentrações letais

cm..... Centímetro

CPA/Acre..... Centro de Pesquisa Agroflorestal-Embrapa/Acre

DDT..... Dicloro-Difenil-Tricloroetano

DNA..... Ácido desoxirribonucleico

DMSO..... Dimetilsulfóxido

e.b.e..... Extrato Bruto Etanólico

IFI..... Imunofluorescência Indireta

IPTSP..... Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

LAMV..... Laboratório de Artropodologia Médica e Veterinária

LPT..... Larval Packet Test

MEV..... Microscopia Eletrônica de Varedura

ml..... Mililítro

mm..... Milímetro

Na^+..... sódio

PCR..... Reaction Chain Polimerase

PPGMT..... Programa de Pós-Graduação em Medicinal Tropical

ppm..... Partes por milhão

R^2..... Coeficiente de determinação

SAEG® ..... Sistema para Análises Estatísticas

SVS/MS..... Secretaria da Vigilância da Saúde do Ministério da Saúde

UFG..... Universidade Federal de Goiás

v/v.....volume/volume

α..... alfa

LISTA DE NOMECLATURA DE TERMOS BIOLÓGICOS

Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)

Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae)

Amblyomma variegatum (Fabricius, 1794) (Acari: Ixodidae)

Anocentor nitens (Neumann, Schulze, 1937) (Acari: Ixodidae)

Azadirachta indica (A. Juss, 1830) (Sapindales: Meliaceae)

Babesia canis (Piana & Galli-Valerio, 1895) (Piroplasminda: Babesiidae)

Babesia caballi (Nuttall & Strickland, 1912) (Piroplasminda: Babesiidae)

Babesia equi (Laveran, 1901) (Piroplasminda: Babesiidae)

Boophilus microplus (Canestrini, 1887) (Ixodida: Ixodidae)

Carapa guianensis (Aublet, 1775) (Sapindales: Meliaceae)

Carapa nicaraguensis (C.DC., 1858) (Sapindales: Meliaceae)

Cariniana estrellensis ((Raddi) Kuntze, 1898) (Ericales: Lecythidaceae)

Chrysanthemum sp. (L.,1753) (Asterales: Asteraceae)

Copaifera reticulata (Ducke, 1915) (Leguminosae: Caesalpinoideae)

Culex quinquefasciatus (Say, 1823) (Diptera: Culicidae)

Ehrlichia canis (Donatien &Lestoquard, 1935) (Rickettsiales: Anaplasmataceae)

Eucalyptus grandis (W. Hill ex Maid, 1903) (Myrtales: Myrtaceae)

Guazuma tomentosa (H. B. K) (Malvales: Sterculiaceae)

Hepatozoon canis (James, 1905) (Adeleida: Hepatozoidae)

Leishmania chagasi (Cunha & Chagas, 1937) (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)

Magonia pubescens (St. Hil.) (Sapindaceae)

Piper hispidinervum (C.DC. 1917) (Piperales: Piperaceae)

Rhipicephalus (*Boophilus*) *microplus* (Canestrine, 1887) (Acari: Ixodidae)

Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae)

Rickettsia rickettsii (Rickettsiales: Rickettsiaceae)

Sapindus saponaria (L.1753) (Sapindales: Sapindaceae)

Sitophilus zeamais (Motschulsky, 1855) (Coleoptera, Curculionidae)

Spodoptera frugiperda (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)

*Trichilia pallida (*Swartz, 1788) (Sapindales: Meliaceae)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Posição sistemática de *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma cajennense* na classificação taxonômica.....19

Figura 2. Aparelho bucal de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) observado através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Fonte: <www.sofawolf.de/vetmed/zecken.htm>).....20

Figura 3. Ciclo Biológico de *Rhipicephalus sanguineus*, demosntrando seus estágios de ovo, larva, ninfa e adulto com seus respectivos intervalos de desenvolvimento (Fonte: <adaptado de www.merial. com.br/.../ciclo_carrapato.asp>).....25

Figura 4. Ciclo Biológico de *Ammblyoma cajennense*, mostrando a sazonalidade deste ectoparasito com seus respectivos estágios de desenvolvimento (adaptado de Pereira & Labruna 1998).....27

Figura 5. Dorso (A) e ventre (B) do macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Fonte: Neves, D.P. *Parasitologia Humana*. Cap 51. 10ª ed, São Paulo: editora Atheneu, 2005).....29

Figura 6. Dorso (A) e ventre (B) da fêmea de *Rhipicephalus sanguineus* (Fonte: Neves, D.P. *Parasitologia Humana*. Cap 51. 10ª ed, São Paulo: editora Atheneu, 2005).....29

Figura 7. Dorso (A) e ventre (B) do macho de *Amblyomma cajennense* (notar o escudo dorsal cobrindo todo o dorso), (Fonte: Neves, D.P. *Parasitologia Humana*. Cap 51. 10ª ed, São Paulo: editora Atheneu, 2005).....30

Figura 8. Dorso (A) do macho de *Amblyomma cajennense*, apresentando festões de 1 a 6 (observar que o escudo dorsal cobre todo o corpo), barra 2mm, Fc: Festão central, Sm: sulco marginal, (B) Tarso do primeiro par de patas evidienciando o Órgão de Haller. CHO: cápsula de Haller, Cph: cerdas pré-halerais, barra 100 micrometros. (Fonte: Barros-Battesti et al. 2006).....31

Figura 9. Dorso (A) da fêmea de *Amblyomma cajennense* (observar a indicação da seta que o escudo dorsal não cobre todo o corpo) lateral (B) (observar na seta a presença do peritrema).....31

Figura 10. Representação geral de separação provável dos principais metabólicos secundários presentes em plantas. (Fonte: Chechinel Filho & Yunes, 1998 adaptado).....42

Figura 11. Esquema geral para obtenção de extratos diretamente da planta. (Fonte: Chechinel Filho & Yunes, 1998 adaptado).....42

Figura 12. (A) Folhas e ramos secundários, (B) óleo essencial de *P. hispidineruvm*.....43

Figura 13. (A) Árvore de *Carapa guianensis* (Fonte: <www.inova.unicamp.br/ inventabrasil/andiroba.htm >). Fruto (B) e Sementes (C) de *Carapa guianensis* (Fonte: <http://www.plantamed.com.br/plantaservas/generos /index.html.>). (D) Madeira de *Carapa guianensis* (Fonte: <http://dendro.cnptia.embrapa.br/Agencia1/AG01/arvore/ AG01_34_309200411812.html>) (E) Flores de *Carapa guianensis* (Fonte: <picasaweb.google.com/.../h4yKl0BKGdjHL_ZBqAJz6A>).....45

Figura 14. Árvore (A) em seu bioma natural, Cerrado (B) Folhas e frutos (C) Casca do caule de *Magonia pubescens* 46

Figura 15. Secador solar de biomassa de pimenta longa. (Fonte: <http://www.cpafac. embrapa.br/pdf/comunicado98.pdf>).....53

Figura 16. Extrator de óleo essencial de pimenta longa com sistema de caldeira aquecida. (Fonte: <http://www.cpafac.embrapa.br/pdf/comunicado97. pdf>).....53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Representação dos compostos químicos a base de organoclorados.....34

Tabela 2: Representação dos compostos químicos a base de organofosforados.....36

Tabela 3: Representação dos compostos químicos a base de carbamatos.....37

Tabela 4: Representação dos compostos químicos a base de piretróides.....38

RESUMO

Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) (Acari, Ixodidae) conhecido como "carrapato-estrela", é um ixodídeo heteroxeno encontrado com muita freqüência em eqüídeos. Têm pouca especificidade parasitária, principalmente nos estágios de larva e ninfa, sendo considerado o ixodídeo mais importante na transmissão da febre maculosa para os humanos no Brasil. *Rhipicephalus sanguineus,* carrapato ectoparasita principalmente dos cães domésticos em áreas urbanizadas, mas que também parasita outros mamíferos, aves e répteis, é responsável pela transmissão de patógenos aos seus hospedeiros. Por se desenvolver em ambientes sinantrópicos, com seus estágios imaturos, parasitando ocasionalmente o homem, este ixodídeo poderá vir a causar aumento na incidência de erliquiose, babesiose e febre maculosa no homem. As dificuldades existentes no controle dos ixodídeos, incluindo o desenvolvimento de resistência a alguns acaricidas químicos sintéticos, principais produtos utilizados em seu controle, incitam estudos para desenvolvimento de medidas alternativas, mais eficientes e de menor impacto ambiental. O objetivo do presente trabalho foi monitorar a susceptibilidade e/ou resistência de *R. sanguineus* a 14 produtos inseticidas/acaricidas, dentre os mais comercializados em Goiás para controle de ectoparasitos de importância médica e veterinária, e verificar a potencialidade de substâncias extraídas das plantas *Carapa guianensis* AUBLET (Meliaceae), *Piper hispidinervum* C.DC. (Piperaceae) e *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae), na prospecção de acaricidas botânicos para controle de *A. cajennense* e *R. sanguineus*. As teleóginas de *R. sanguineus* foram coletadas, em ambientes naturalmente infestados, freqüentados por cães, de diferentes bairros e municípios de Goiânia. Teleóginas de *A. cajennense* foram coletadas em cavalos oriundos de propriedades rurais de diferentes bairros e municípios circunvizinhos de Goiânia. No laboratório, as teleóginas foram lavadas com água destilada, secas em papel toalha e acondicionadas em incubadoras B.O.D., para realizarem a oviposição. Foram utilizados envelopes de papel filtro impregnados com diferentes concentrações dos acaricidas químicos sintéticos, óleo essencial provenientes das folhas e ramos secundários de *P. hispidinervum*, óleo essencial provindo das sementes de *C. guianensis* e o extrato bruto etanólico da casca do caule de *M. pubescens*. No grupo controle utilizou-se apenas água destilada e solvente. Os bioensaios foram realizados em quadruplicata. No primeiro estudo, Concentrações Letais, CL_{50} e CL_{99}, após 24 h e 48 h de exposição foram calculadas para os produtos que

proporcionaram um quadro de resistência ou possível resistência larvicida para *R. sanguineus,* segundo critérios da OMS. Observou-se resistência para as larvas de *R. sanguineus* produtos que apresentaram mortalidades a base de Cipermetrina (58,36%), Cipermetrina + Butóxido de Piperolina (PBO) (71,36%), Deltametrina (48,7%), Permetrina (64,5%) e Amitraz (77,8%) nas 24 h, correspondendo a 36% dos produtos testados. Em 48 h de exposição ao Amitraz a mortalidade foi de 88%, apresentando um quadro de possível resistência, correspondendo a 0,07% dos produtos testados. As concentrações letais CL_{50} e CL_{99} encontradas foram: Cipermetrina (0,06% e 7,04%), Cipermetrina + PBO (0,06% e 2,1%), Deltametrina (0,06% e 1,57%), Permetrina (0,06% e 0,3%), Amitraz 24 h (0,025% e 0,73%) e Amitraz 48 h (0,06% e 0,31%). Os produtos Deltametrina, Cipermetrina, Permetrina, Cipermetrina + PBO e Amitraz (24 e 48 h de exposição), foram 35,2; 21; 7,85; 3; 3,65; 1,55 vezes, respectivamente, maiores do que as dosagens recomendadas pelos fabricantes. No segundo estudo observou-se o efeito letal do óleo essencial de *C. guianensis* sobre as larvas de *A. cajennense* ocasionando nas 24 h, mortalidade não superior a 10% para concentração 35%, nas 48 h de exposição obtiveram-se as CL_{50} de 7,38% e CL_{99} de 45,45%. O óleo essencial de *P. hispidinervum* ocasionou nas 24 h de exposição CL_{50} de 0,42% e CL_{99} de 0,88%, nas 48 h de exposição CL_{50} de 0,45% e CL_{99} de 1,06%. Observou-se o efeito *Knock down* sobre as larvas de *A. cajennense* pelo óleo essencial de *P. hispidinervum,* influenciando significativamente na mortalidade média. No terceiro estudo observou-se a ação letal do extrato bruto etanólico da casca do caule de *M. pubescens* sobre *R. sanguineus*, em 48 h a CL_{50} e CL_{99} foi de 0,15% e 0,99%, respectivamente. Os óleos essenciais e extrato estudados demonstraram como método alternativo para a prospecção de acaricidas vegetais, de menor impacto ambiental, a serem utilizados como nova estratégia para controle de *R. sanguineus* e *A. cajennense*.

Palavras-chave: *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma cajennense*, acaricidas químicos sintéticos, *Piper hispidinervum*, *Carapa guianensis* e *Magonia pubescens*.

ABSTRACT

Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) (Acari, Ixodidae) known as "tick-star", is a ixodid heteroxenous tree-host found too often in horses. Have little specific parasite, particularly in periods of larvae and nymph, is considered the most important in ixodid transmission of spotted fever to humans in Brazil. *Rhipicephalus sanguineus*, tick ectoparasite mainly from domestic dogs in urban areas, but also parasite other mammals, birds and reptiles, is responsible for the transmission of pathogens to their hosts. By developing in synanthropic environments, with their immature stages occasionally infecting man, this ixodídeo could cause increased incidence of erliquiosis, babesiosis and spotted fever in humans. The difficulties in controlling these ixodids, including the development of resistance to some acaricides chemicals synthetic main products used in their control, studies to encourage development of alternative measures, more efficient and less environmental impact. The objective of this work was monitoring the susceptibility and/or resistance of *R. sanguineus* to 14 insecticide products/acaricides, among the most acaricide sold in Goiás for control of ectoparasites of medical and veterinary importance, and verify the potential of substances extracted from plants, *Carapa guianensis* AUBLET (Meliaceae), *Piper hispidinervum* C.DC. (Piperaceae) and *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) in botanical exploration of acaricides for control of *A. cajennense* and *R. saguineus*. Engorged female of *R. sanguineus* were collected in environments naturally infested frequented by dogs in different districts and municipalities of Goiânia. Engorged female of *A. cajennense* were collected on horses from rural farms of different neighborhoods and surrounding municipalities of Goiânia. In the laboratory they were washed with distilled water, dried with paper towel and put in incubators B.O.D., to conduct the oviposition. Envelopes were used to filter paper impregnated with different concentrations of synthetic chemical acaricides, of essential oils from the leaves and branches side of *P. hispidinervum*, essential oil coming seeds of *C. guianensis* and stem bark of *M. pubescens*. In the control group used up only distilled water and solvent. Bioassays were made in quadruplicate. In the first study, Lethal Concentrations, CL_{50} and $CL_{99,}$ after 24 h and 48 h of exposure were calculated for the products that caused a framework for possible resistance or resistance to larvicidal *R. sanguineus*, according to WHO criteria. There was a framework of resistance to the basic products of Cypermethrin, Cypermethrin + Piperonyl Butoxide (PBO), Deltamethrin, Permethrin and Amitraz in

24 h presenting mortalities of 58.36%, 71.36%, 48.7%, 64.5% and 77.8%, respectively. In 48 h of exposure to Amitraz the mortality rate was 88%, presenting a framework for possible resistance accounting for 0.07% of the products tested. The lethal concentrations CL_{50} and CL_{99} were: Cypermethrin (0.06% and 7.04%), Cypermethrin + PBO (0.06% and 2.1%), Deltamethrin (0.06% and 1.57%); Permethrin (0.06% and 0.3%), Amitraz 24 h (0025% and 0.73%) and Amitraz 48 h (0.06% and 0.31%). The products Deltamethrin, Cypermethrin, Permethrin, Cypermethrin + PBO and Amitraz (24 and 48 h of exposure) were 35.2, 21, 7.85, 3, 3.65, 1.55 times, respectively, higher than the dosages recommended by manufacturers. In the second study noted that the essential oil of *C. guianensis* on the larvae of *A. cajennense* resulted in 24 h, mortality not exceeding 10% for 35% concentration in 48 h of exposure received at the CL_{50} of 7.38% and 45.45% of CL_{99}, the essential oil of *P. hispidinervum* shown in 24 h of exposure CL_{50} of 0.42% and CL_{99} of 0.88%, in 48 h of exposure CL_{50} of 0.45% and CL_{99} of 1.06%. There was *Knock down* the effect on the larvae of *A. cajennense* the essential oil of *P. hispidinervum*, significantly influencing mortality average. In the third study there was the lethal action of ethanol crude extract of stem of bark *M. pubescens* on *R. sanguineus*, in the reading of 48 h LC_{50} and CL_{99} was 0.15% and 0.99%, respectively.The plants showed larvicidal effect on *A. cajennense* and *R. sanguineus*. The essential oils and extracts studied demonstrated greatest potential for the exploration of acaricides plants, with less environmental impact, to be used as a strategy for control of *R. sanguineus* and *A. cajennense*.

Key words: *Rhiphicephalus sanguineus*, *Amblyomma cajennense*, acaricides plants, *Piper hispidinervum*, *Carapa guianensis* e *Magonia pubescens*.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Posição sistemática de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) e *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787)

Rhipicephalus sanguineus e *Amblyomma cajennense* são classificados no filo Artropoda, classe Arachinda ordem Acari, subordem Ixodides, família Ixodidae, gênero *Rhipicephalus* e *Amblyomma*, cuja as espécies são *R. sanguineus* e *A. cajennense* (Figura 1). A ordem Acari compreende artrópodes que apresentam como características corpo fundido, achatado dorsoventralmente, peças bucais situadas na falsa cabeça ou gnatossoma e os estigmas ou aberturas traqueais são geralmente abdominais. Estes incluem os carrapatos, os ácaros das sarnas, dos grãos e do pó domiciliar e também os "micuins" e "piolhinhos" de ninhos de aves (Costa & Botelho 2005).

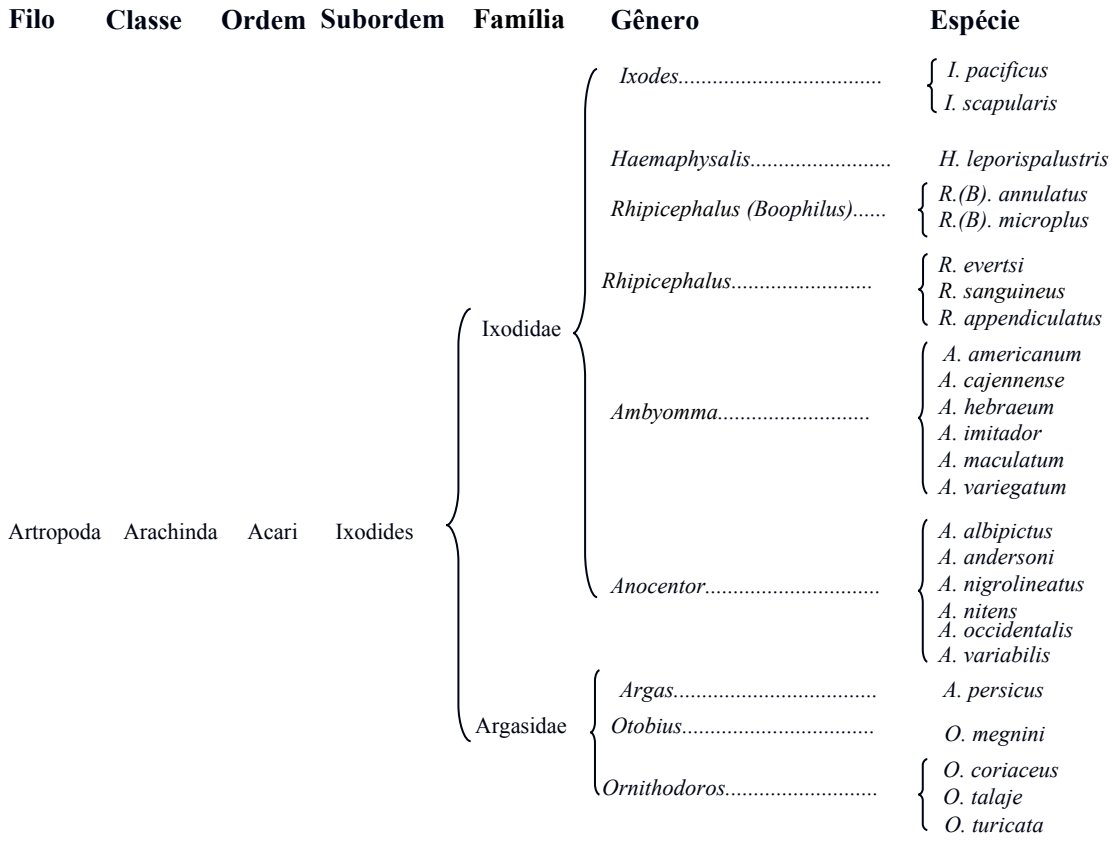
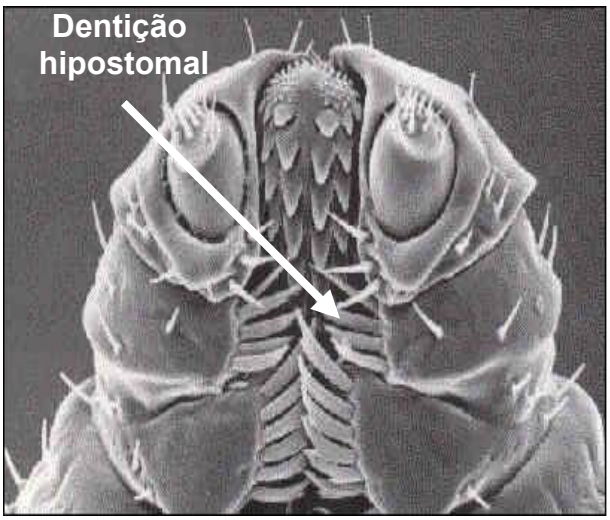


Figura 1. Posição sistemática de *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma cajennense* na classificação taxonômica.

1.2- Os ixodídeos e a transmissão de patógenos

Os ixodídeos (Acari: Ixodidae) são ectoparasitos que hematofagiam vertebrados, principalmente mamíferos, mas também aves, répteis e anfíbios. São conhecidos como carrapatos duros, pela presença de escudo dorsal. São responsáveis pela espoliação sangüínea dos hospedeiros através de seu aparelho bucal (Figura 2), o qual pode ocasionar anemias, algumas vezes fatais em parasitismos mais severos. Dentre os ixodídeos, as espécies *R. sanguineus*, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, *Anocentor nitens* e *A. cajennense* são os mais comumentes encontrados no Brasil. São estes responsáveis por grandes prejuízos, tanto no meio veterinário infectando eqüídeos, ovinos, caprinos, animais silvestres entre outros, quanto no meio médico, infectando hospedeiros humanos (Lemos et al. 2002, Martins et al. 2004, Neves 2005).



asd

Figura 2. Aparelho bucal de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) observado através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Fonte: <www.sofawolf.de/vetmed/zecken.htm>).

Os carrapatos podem veicular patógenos como riquétsias, bactérias, vírus, protozoários, espiroquetas e filárias, que são agentes etiológicos de enfermidades humanas e animais como a Febre Maculosa (Pereira & Labruna 1998, Lemos et al. 1997, 2002), Erliquiose (Almonsny & Massard 1999), Babesiose (Thompson et al. 2001), Doença de Lyme (Joppert et al. 2001, Fonsesa et al. 2005, Mantovani et al. 2007) e Hepatozoonose (O' Dwyer & Massard 2001). Os carrapatos, durante o hematofagismo injetam com a saliva toxinas que afetam o metabolismo do hospedeiro, podendo

ocasionar astenia, hipersensibilidade, decréscimo do hematócrito, paralisias e até a morte dos animais. Além disto, são responsáveis por danos às peles e couros dos hospedeiros, ocasionados pela cicatrização nas áreas de fixação dos carrapatos (Flechtmann 1973, Marcondes 2001, Costa & Botelho 2005).

R. sanguineus é o principal vetor biológico e reservatório da *Ehrlichia canis* (Andereg & Passos 1999), podendo transmitir também *Babesia canis*, *B. caballi* e *B. equi* (Hoogstraal 1967), *Hepatozoon canis* e *Haemobartonella canis* (Woldehiwet & Ristic 1993). *Rickettsia* do grupo etiológico da febre maculosa foi diagnosticada em 18,8% dos espécimes deste carrapato coletados em cães domésticos do centro e norte do Mississipi e de Chicago, EUA (Burgdorfer et al. 1975). Segundo Coutinho et al. (2005), macerados de *R. sanguineus*, retirados de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*, transmitiram o protozoário para hamster experimentalmente inoculados, evidenciando a transmissão mecânica do protozoário para o cão, pois este animal ingere carrapatos.

Recentemente comprovou-se no exterior e no Brasil que este ixodídeo, vem alimentando, principalmente, através de suas formas imaturas, em humanos mais freqüentemente do que antes se supunha (Clarck et al. 1996, Felz et al. 1996, Dantas-Torres et al. 2005, 2006). Acredita-se na provável tendência das cepas brasileiras de *R. sanguineus* ixodídeo aumentarem sua adaptação ao homem como hospedeiro, a exemplo do acontecido com cepas de outros países, como no México, onde ele é considerado o principal vetor da febre maculosa (Barros-Battesti et al. 2006).

Por desenvolver-se em ambientes sinantrópicos de várias cidades do Brasil, onde ocorre em altas densidades, este carrapato poderá vir a causar aumento na incidência de erliquiose, babesiose e febre maculosa, como antropozoonoses emergentes (Hoogstraal 1967, Burgdorfer et al. 1975, Harrison et al. 1997, Andereg & Passos 1999, Costa & Botelho 2005). A semelhança na sintomatologia e a carência de especificidade nos métodos de diagnóstico permitem que tais enfermidades sejam confundidas com várias outras doenças de mesmo perfil clínico, levando ao diagnóstico tardio, e muitas vezes até a morte do paciente (Hoogstraal 1967, Veronesi 1982, Harrison et al. 1997).

No Brasil o principal vetor da febre maculosa é o *A. cajennense*. Esta espécie é considerada a mais importante no que se diz a respeito de transmissão de doenças para os humanos. Quando o carrapato está infectado, injeta juntamente com sua saliva a bactéria gram-negativa *Rickettsia rickettsii* durante o hematofagismo. Para que ocorra a transmissão é necessário que o artrópode permaneça aderido ao hospedeiro, no mínimo

4 a 6 horas. Os carrapatos permanecem infectados durante toda a vida, em geral 18 meses. A partir de um carrapato infectado, outros podem tornar-se infectados, através da transmissão vertical (transovariana), transmissão estádio-estádio (transestadial) ou transmissão através da cópula, além da possibilidade de alimentação simultânea de carrapatos infectados com não-infectados em animais com suficiente rickettsemia (SVS/MS 2005).

A. cajennense além de ser um potencial vetor na transmissão da febre maculosa se mostra como o transmissor da *Síndrome infecto-reacional Lyme símile*, enfermidade infecciosa e emergente presente no Brasil, associada com microorganismos de comportamento latente, na qual ocorrem manifestações semelhantes às observadas na Doença de Lyme. Os sinais clínicos incluem erupções de pele no local de fixação do carrapato, seguida, na ausência de tratamento, por artrite, dor muscular e anormalidades cardíacas ou neurológicas. No Brasil tem sido raro o encontro de processos cardiopatológicos sendo observado em apenas 5% dos casos estudados, apresentando diagnóstico em pacientes com cardiomegalia e arritmia. O tratamento da *Síndrome infecto-reacional Lyme símile* no Brasil é semelhante ao recomendado no EUA e Europa, porém um pouco mais prolongado com intuito de prevenir recorrências (Mantovani et al. 2007).

1.2.1- Epidemiologia da Febre Maculosa no Brasil

A ocorrência da febre maculosa tem sido registrada em diversos estados brasileiros, tais como Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e mais recentemente, em Santa Catarina. No período entre 1995-2003, foram registrados 263 casos da doença, com taxa de letalidade de 28%. Em Minas Gerais, neste período, foi observado o registro de 106 casos com freqüência maior no sexo masculino (76%), na faixa etária de 15 a 30 anos, letalidade média de 18% tendo maior incidência no mês de outubro. Esta sazonalidade parece ter relação com o ciclo evolutivo (ninfa e adulto) dos carrapatos, já que as formas infectantes são mais encontradas neste período. As regiões com maior número de casos no Estado são as do vales do Rio Doce, Mucuri e Jequitinhonha, localizados na região nordeste de Minas Gerais. Em São Paulo, neste mesmo período foram registrados 83 casos com maior freqüência no sexo masculino (73%), na faixa etária de 20 a 30 anos e letalidade média de 47%. As regiões de Campinas e Pedreira tinham apresentaram o maior número de casos no estado. No

Estado do Rio de Janeiro, no período de 1980-2003, foram registrados 57 casos, com taxa de letalidade de 23%. Neste Estado, os casos tinham ocorrido com maior freqüência na região de Barra do Piraí. No Estado do Espírito Santo têm ocorrido surtos nos municípios de Pancas, Barra de São Francisco e Nova Venécia. Em Santa Catarina, a partir de outubro de 2003 até abril de 2004 foram notificados 11 casos da doença, ocorridos na região do médio Vale do Itajaí, sem registro de óbitos (SVS/MS 2005).

Guercio et al. (1997) realizaram no Município de Pedreira, Estado de São Paulo, Brasil, um inquérito sorológico de 473 pessoas sendo estes indivíduos moradores e funcionários de uma indústria de louças. As amostras de sangue foram coletadas e analisadas através do exame de Imunofluorescência Indireta (IFI), com o objetivo de verificar a titulação de anticorpos. Destas, 5,3% foram tidas como amostras positivas sendo mais predominantes em indivíduos do sexo feminino. Como se sabe, o comportamento do *A. cajennense* é eclético, variando muito também as especificidades dos tipos de ocupação do espaço geográfico pelas populações humanas. Em decorrência disso, pode-se encontrar diversos perfis epidemiológicos que estão relacionados às diversas condições geográficas, diversas condições de organização socioeconômicas, etc.

1.3- Ciclo Biológico de *R. sanguineus* e *A. cajennense*

1.3.1- Ciclo Biológico de *R. sanguineus*

R. sanguineus é conhecido como "carrapato vermelho" do cão, considerado um dos mais amplamente distribuídos pelo mundo, e que parasita principalmente o cão doméstico e secundariamente outros mamíferos, aves e répteis (Flechtmann 1973).

Seu ciclo biológico corresponde a um ciclo trioxeno (Figura 3), ou seja, necessita de três hospedeiros, para desenvolver seus estágios biomorfológicos. Primeiramente, as fêmeas após destacarem do hospedeiro, procuram um abrigo próximo ao solo, onde deposita de 1000 a 3000 ovos (Labruna 2004). Estes ovos são pequenos, esféricos de coloração castanha. O período de ovipostura dura de 8 a 67 dias (Neves 2005).

O desenvolvimento do ovo até adulto depende muito das condições de temperatura, geralmente em baixas temperaturas ocorrem situações de retardamento dos estágios de desenvolvimento (Koch & Tuck 1986, Bellato & Daemon 1997, Carneiro & Daemon 2003).

As larvas possuem 3 pares de patas (hexápodes) e ao eclodirdo ovo (19 a 142 dias) vão procurar abrigo em arbustos e frestas das paredes até a passagem do hospedeiro. Após sugar sangue do hospedeiro à larva cai para o solo sofre ecdise e se transforma no estágio seguinte, que é a ninfa. Este processo durar entre 3 a 7 dias. A nifa é octópoda e após alguns dias ocorre enrijecimento do tegumento, ingurgita-se novamente de sangue do seu hospedeiro, dando origem posterior ao adulto, entre 12 a 129 dias. As fêmeas repletas de sangue se desprendem do hospedeiro e vão para o solo e após um período de pré-postura iniciam a oviposição (Figura 3) (Labruna 2004).

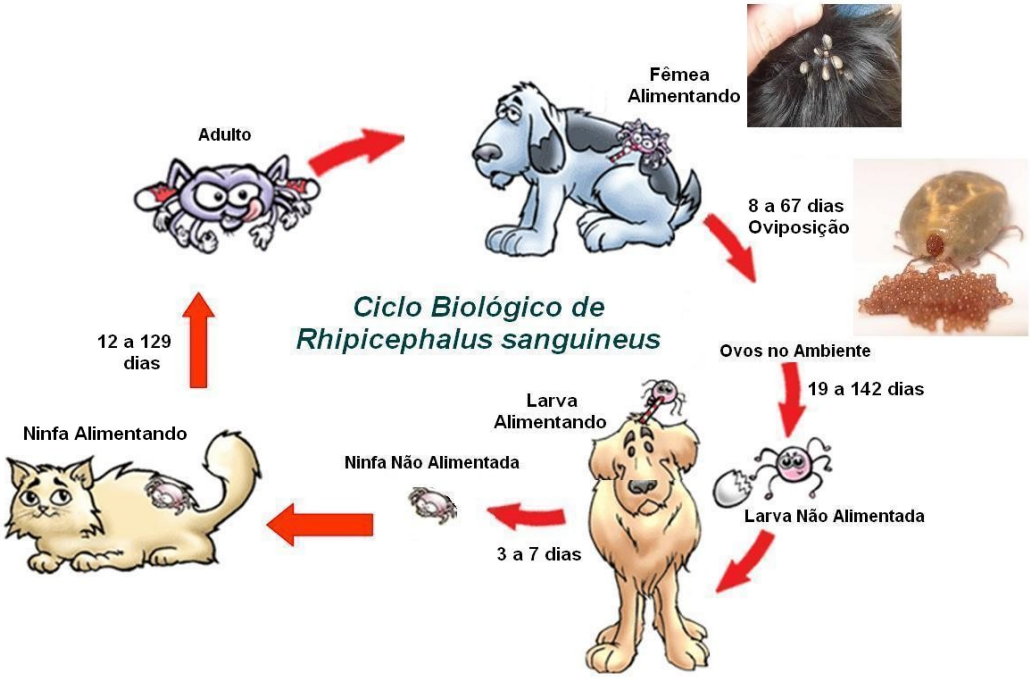


Figura 3. Ciclo Biológico de *Rhipicephalus sanguineus*, demonstrando seus estágios de ovo, larva, ninfa e adulto com seus respectivos intervalos de desenvolvimento (Fonte: adaptado de <www.merial.com.br/ ciclo_carrapato.asp>).

1.3.2- Ciclo Biológico de *A. cajennense*

O *A. cajennense* é conhecido na fase adulta como "carrapato-estrela" ou "roduleiro", devido a sua ornamentação do escudo dorsal, na fase de ninfa (estádio intermediário entre fase larval e adulta), por "vermelhinhos" e as larvas, por "carrapatinhos" ou "micuins" (Neves 2005).

Esta espécie também necessita de três hospedeiros para completar seu ciclo (trioxeno). As teleóginas, depois de fecundadas e ingurgitadas desprendem-se do hospedeiro, caindo no solo para realizar postura única em torno de 6 a 8 mil ovos antes de morrer. Após o período de incubação de 30 dias à temperatura de 25ºC, ocorre a eclosão das larvas hexápodes (possuindo três pares de patas). Elas sobem pelas gramíneas, arbustos e até em árvores, esperando a passagem dos hospedeiros. Após sugar o sangue do hospedeiro por um período que varia de 3 a 6 dias, desprendem-se caem no solo onde, ocorre a ecdise (18 a 26 dias), transformando-se no estágio seguinte que é a ninfa octópode (possuindo quatro pares de patas). As ninfas fixam-se em um novo hospedeiro e em 6 dias ingurgitam-se de sangue, volta ao solo e após 23 a 25 dias, sofrem nova ecdise, transformando-se no carrapato adulto (Neves 2005). *A. cajennense* completa apenas uma geração por ano, com os três estágios parasitários marcadamente distribuídos ao longo do ano (Oliveira et al. 2000, Labruna et al. 2002). As larvas predominam nos meses de março a julho, as ninfas de julho a novembro e os adultos, meses quentes e chuvosos, de novembro a março (Camargo-Neves et al. 2004) (Figura 4).

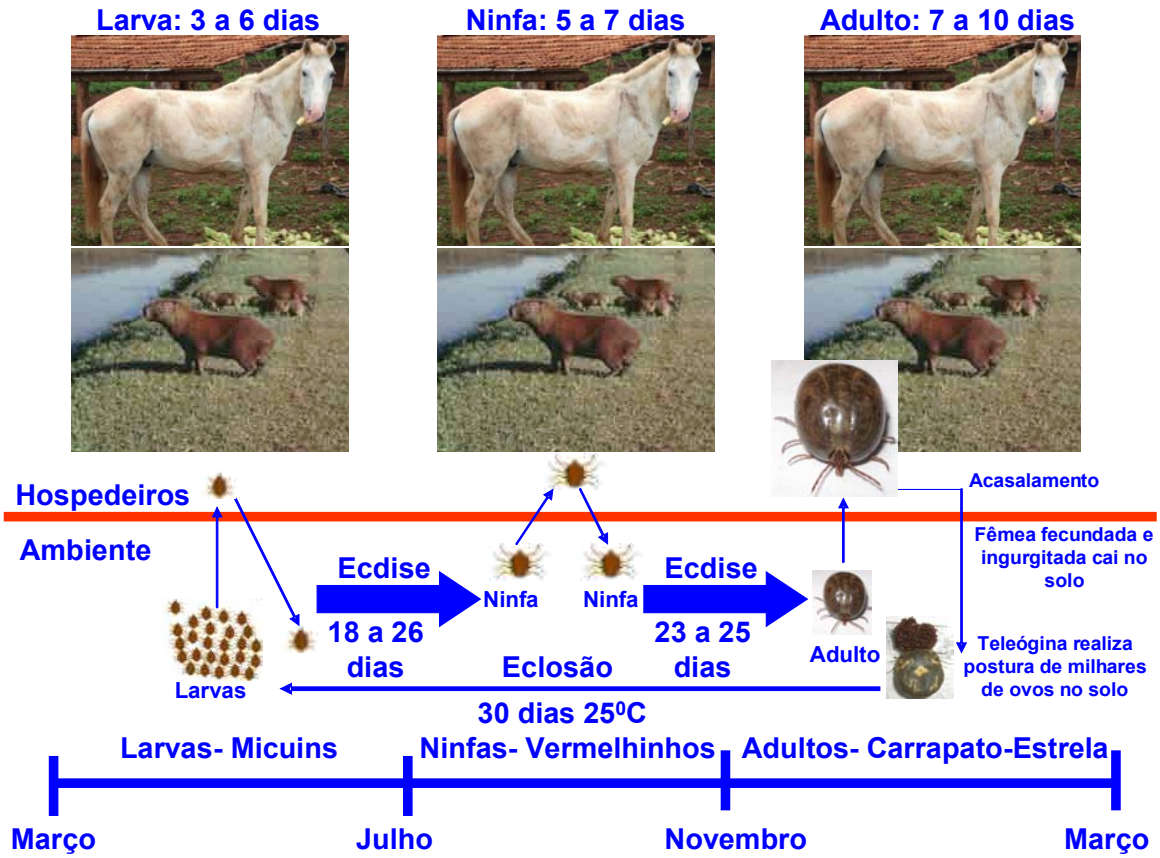


Figura 4. Ciclo Biológico de *Ammblyoma cajennense*, mostrando a sazonalidade deste ectoparasito com seus respectivos estágios de desenvolvimento (adaptado de Pereira & Labruna 1998).

O cavalo, que se encontra em ambiente rural, é considerado o hospedeiro com maior afinidade parasitária. Porém a nível silvestre o hospedeiro mais comumente encontrado infestadopor este carrapato, é a capivara. *A. cajennense* parasita também animais domésticos, como cão e gato, e animais silvestres como gambás, ratos, coelhos e aves em geral, no qual se pode observar a baixa especificidade parasitária desta espécie de carrapato (Lopes et al. 1998, Oyafuso et al. 2002, Martins et al. 2004).

O homem é intensamente atacado pelas larvas e ninfas e o seu tamanho dificulta a observação, porém, os adultos são relativamente grandes, o que facilita a sua localização e sintomatologicamente, suas picadas são extremamente doloridas (Camargo-Neves et al. 2004).

1.4- Morfologia de *R. sanguineus* e *A. cajennense.*

1.4.1- Morfologia de *R. sanguineus*

Este ixodídeo possue rostro curto, palpos cônicos, base do capítulo hexagonal e com ângulos projetando-se lateralmente. São providos de olhos e festões. Os estigmas têm forma de vírgula. Os machos apresentam placas adanais em número de 1 par (Rey 2002), medem 3,5 por 1,5 mm, possuem escudo marrom-avermelhado. As fêmeas apresentam o corpo elíptico, atingindo 11 mm de comprimento por 7 mm de largura, possuem coloração marrom-avermelhada a amarelada. Os peritremas são em forma de vírgula (Flechtmann 1973). As larvas apresentam seis pernas (hexápoda), enquanto ninfas e adultos apresentam oito (octópoda) (Flechtmann 1973, Lord 2005), sendo que os adultos podem viver aproximadamente um ano, prolongando-se nas regiões de clima frio (Rey 2002).

Após o quarto par de patas, *R. sanguineus* apresenta um par de estigmas respiratórios, abrindo-se em peritremas. O capítulo ou falsa cabeça encaixa-se numa chanfradura do idiossoma chamada camerótomo. As peças bucais implantadas no capítulo são constituídas por quelíceras, hipóstomo e palpos. Na face dorsal do idiossoma do carrapato encontra-se escudo dorsal que nos machos cobre todo o corpo e nas larvas, ninfas e fêmeas cobre apenas uma pequena região anterior do dorso. O escudo pode apresentar-se ornamentado por manchas. Na linha mediana da face ventral encontram, respectivamente, nos terços anterior e posterior, os orifícios genital e anal (Figuras 5 e 6) (Neves 2005).

O sistema digestivo é seguido de uma faringe muscular, que funciona como órgão de sucção, um esôfago em "S" e glândulas salivares. O intestino médio é representado pelo estômago provido de numerosos divertículos, que vão aumentando de volume durante a sucção sanguínea. O intestino posterior é formado pelo reto e vesícula. O sistema excretor é constituído por um par de tubos de Malpighi. O sistema reprodutor masculino é constituído por dois testículos que partem de canais deferentes que se unem para formar a vesícula seminal. Não há órgão copulador. O macho, com auxílio do rostro, introduz o espermatóforo contendo os espermatozóides, no orifício genital femino. O sistema reprodutor feminino é constituído de um ovário com um par de ovidutos que se unem formando um útero. O sistema circulatório é responsável pelo funcionamento da manutenção e circulação da hemolinfa deste artrópode (Neves 2005).

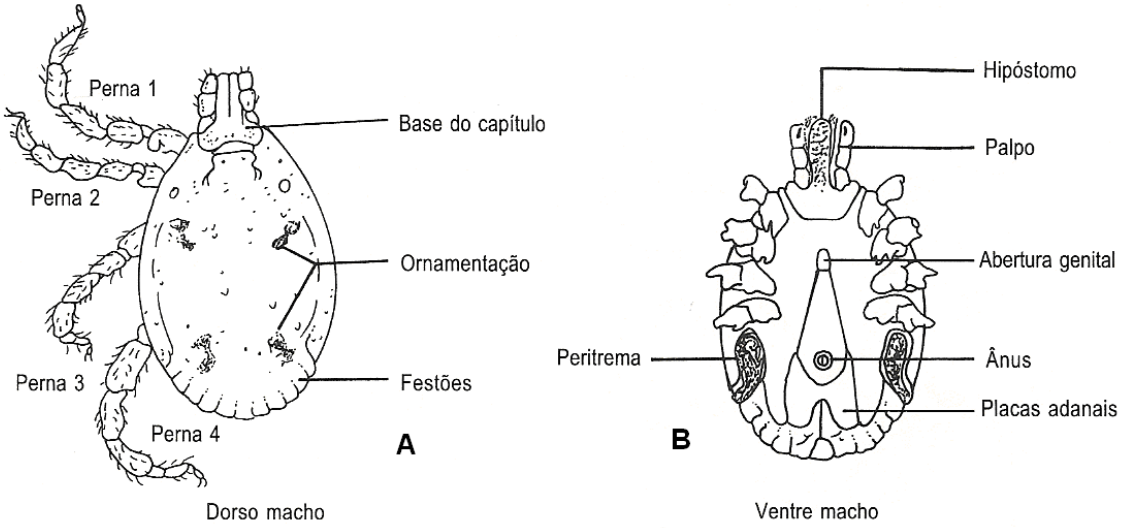


Figura 5. Dorso (A) e ventre (B) do macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Fonte: Neves, D.P. *Parasitologia Humana*. Cap 51. 10ª ed, São Paulo: editora Atheneu, 2005).

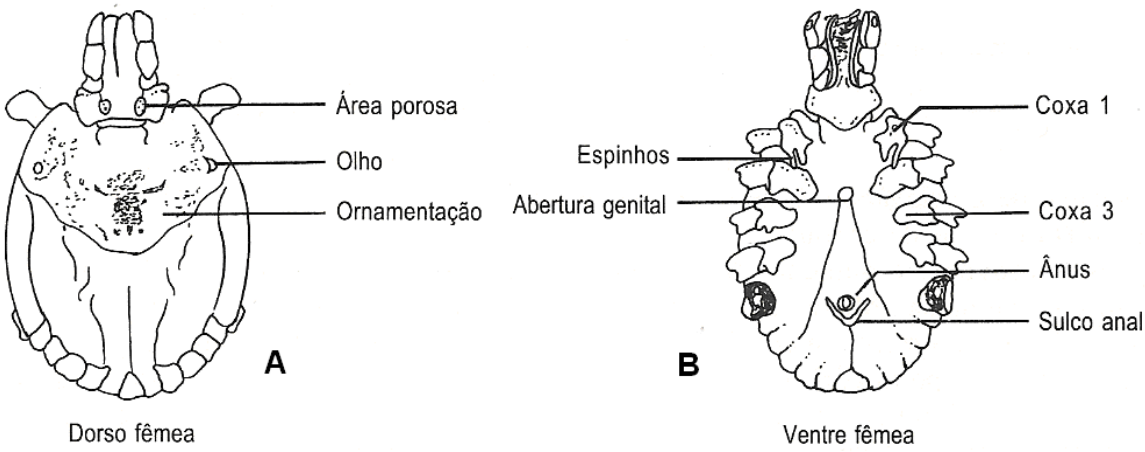


Figura 6. Dorso (A) e ventre (B) da fêmea de *Rhipicephalus sanguineus* (Fonte: Neves, D.P. *Parasitologia Humana*. Cap 51. 10ª ed, São Paulo: editora Atheneu, 2005).

1.4.2- Morfologia de *A. cajennense*.

Os machos apresentam um sulco marginal distinto, limitando posteriormente os festões. As coxas do primeiro par de patas apresentam dois espinhos desiguais, às do quarto par de patas, que é um espinho longo (Fig. 7A e B).

O escudo dorsal é castanho com faixas esbranquiçadas ou acobreadas e que dão á região anterior o aspecto de um pseudo-escudo (Fig. 8A) (Flechtmann 1973). Nos tarsos do primeiro par de patas localizam-se o órgão de Haller, que possui células olfatórias receptoras no qual detectam a umidade, odores estimulantes ao ácaro, CO_2 e presença de feromônios (Fig. 8B) (Neves 2005).

As fêmeas apresentam um escudo dorsal subtriangular, sem vestígios de depressões laterais, de coloração castanho-escura e com manchas esbranquiçadas ou acobreadas, contínuas na parte médio-posterior (Fig. 9A). As coxas do primeiro par de patas apresentam dois espinhos subiguais e as do quarto par de patas um espinho. Atrás do quarto par de patas apresenta-se o estigma respiratório, abrindo-se em peritrema (Fig. 9B). O hipostômio mostra 3 fileiras de dentes (Flechtmann 1973).

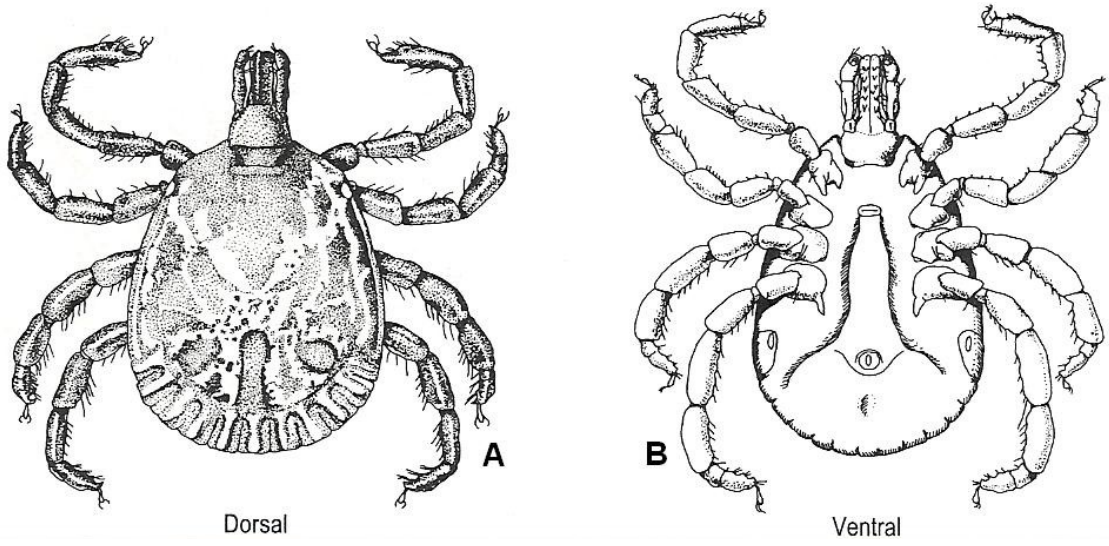
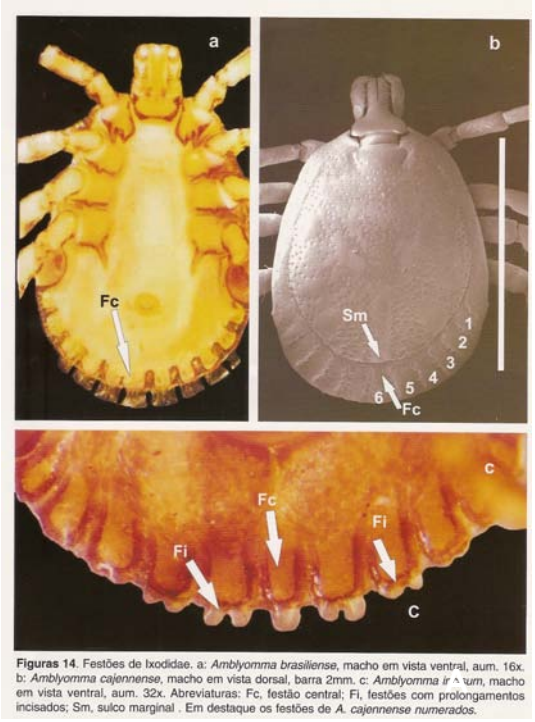
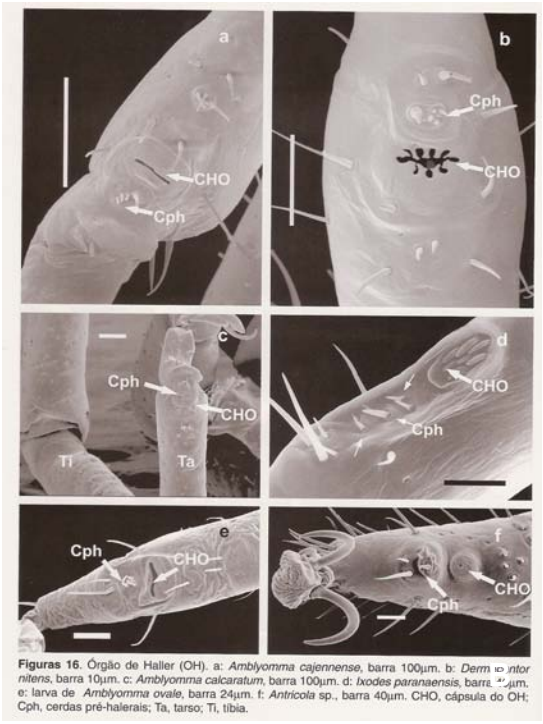


Figura 7. Dorso (A) e ventre (B) do macho de *Amblyomma cajennense* (notar o escudo dorsal cobrindo todo o dorso), (Fonte: Neves, D.P. *Parasitologia Humana*. Cap 51. 10ª ed, São Paulo: editora Atheneu, 2005).



Figuras 14. Festões de Ixodidae. a: *Amblyomma brasiliense*, macho em vista ventral, aum. 16x. b: *Amblyomma cajennense*, macho em vista dorsal, barra 2mm. c: *Amblyomma ir ˄ um*, macho em vista ventral, aum. 32x. Abreviaturas: Fc, festão central; Fi, festões com prolongamentos incisados; Sm, sulco marginal . Em destaque os festões de *A. cajennense numerados.*



Figuras 16. Órgão de Haller (OH). a: *Amblyomma cajennense*, barra 100µm. b: *Derm ꝏ ntor nitens*, barra 10µm. c: *Amblyomma calcaratum*, barra 100µm. d: *Ixodes paranaensis*, barra ‴µm. e: larva de *Amblyomma ovale*, barra 24µm. f: *Antricola* sp., barra 40µm. CHO, cápsula do OH; Cph, cerdas pré-halerais; Ta, tarso; Ti, tíbia.

Figura 8. Dorso (A) do macho de *Amblyomma cajennense*, apresentando festões de 1 a 6 (observar que o escudo dorsal cobre todo o corpo), barra 2mm, Fc: Festão central, Sm: sulco marginal, (B) Tarso do primeiro par de patas evidenciando o Órgão de Haller. CHO: cápsula de Haller, Cph: cerdas pré-halerais, barra 100 micrometros. (Fonte: Barros-Battesti et al. 2006).

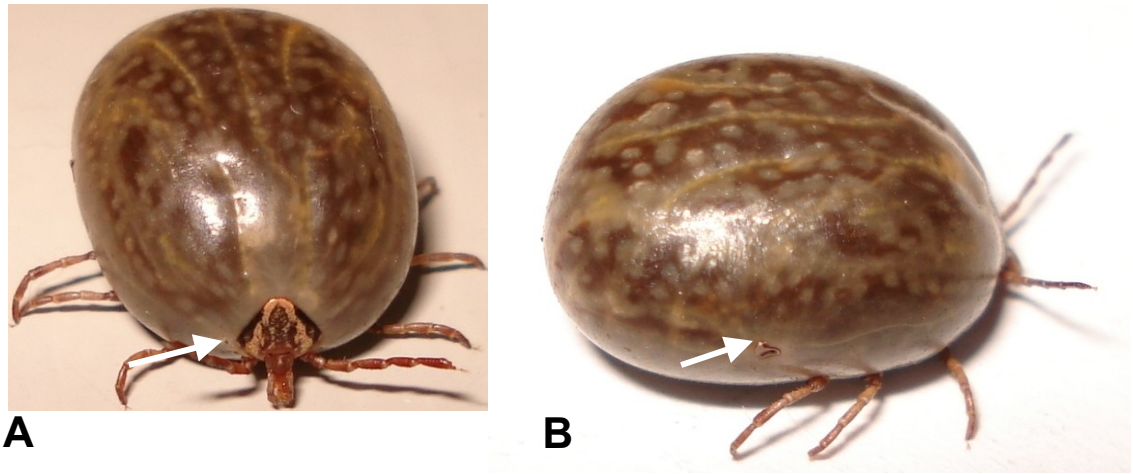


Figura 9. Dorso (A) da fêmea de *Amblyomma cajennense* (observar a indicação da seta que o escudo dorsal não cobre todo o corpo) lateral (B) (observar na seta a presença do peritrema)

1.5- Mecanismos de ação dos acaricidas químicos sintéticos

Geralmente, os inseticidas organoclorados atuam estimulando um aumento excessivo na excitabilidade (isto é, sensibilidade à despolarização) dos neurônios, ocasionado pela abertura dos canais de Na^+ por um período muito longo. Isto causa uma rápida e repetitiva "queima" de neurônios, manifestada por tremores, hiperexcitabilidade, convulsões e eventual paralisia (morte) dos insetos (Eto 1990, Craig & Stitzel 1996).

Os mecanismos envolvidos na transmissão de impulsos nervosos em insetos são muito semelhantes àqueles operantes em mamíferos, aves e peixes. Por isso, muitos inseticidas neurotóxicos são tóxicos também a esses organismos não-alvo, incluindo os seres humanos, quando não respeitado a suas dosagens (Barrionuevo & Lanças 2001).

Muitos organofosforados sofrem ativação metabólica através de dessulfuração e oxidação do fosfato e geram uma substância que reage com o resíduo de serina no local ativo da acetilcolinesterase. Esta reação é irreverssível quando a acetilcolinesterase sofre um processo de envelhecimento. Nos compostos a base de carbamatos ocorre também à inibição da acetilcolinesterase, só que diferentemente, da reação dos organosfosforados está e reversível (Craig & Stitzel 1996).

O mecanismo de ação dos inseticidas piretróides (Deltametrina, Cipermetrina e Permetrina) está relacionado à ligação de proteínas associadas ao canal de Na^+ (Sódio), impedindo o seu fechamento. Como conseqüência, o neurônio não consegue voltar à condição de repouso e, portanto, ocorre um bloqueio na transmissão de impulsos nervosos (efeito "knock down" ou de rápida paralisia nos insetos) (Seize 2003).

Dependendo do acaricida e da dose se têm um determinado efeito no sistema nervoso do inseto, isto é observado quando se utiliza a cipermetrina que age por contato e ingestão, atuando nos canais de Na^+ da membrana dos axônios, diminuindo e retardando a condutância de Na^+ para o interior da célula, suprimindo assim, o refluxo de potássio. Também pode inibir a adenosina trifosfatase (ATPase), o que afeta a condução de cátions na membrana axonal. O resultado final é uma diminuição do potencial de ação e a geração de impulsos nervosos repetitivos (Seize 2003).

1.6- Manifestações clínicas, fisiológicas e variabilidade de toxicidade no homem

1.6.1- Inorgânicos (muito tóxico)

Os inorgânicos mais utilizados como acaricidas foram os arseniatos de cálcio e chumbo (verde Paris), cupratos (calda bordalesa), enxofre em pó, sulfatos, cal, fluorsilicato de bário, aminosselenossulfito de potássio (criolite) e óleos minerais. Destes, os arseniatos mostravam-se extremamente tóxicos ao homem, animais superiores e ambiente como um todo, tornando-se portanto em desuso atualmente (Vieira & Fernandes 1999, Viegas Júnior 2003).

As toxicidades observadas por envolvimento de inseticidas inorgânicos podem provocar lesões a nível renal, irritação da cavidade oral e via gastrointestinal. Em geral, a toxicidade está relacionada à forma do metal, a via de exposição e a via de excreção. Uma das exceções a este principio é o chumbo, que se concentra nos ossos, mas não apresenta toxicidade neste tecido. Existem evidências que o arsênio, cromo, níquel, cádmio e o berílio possam causar câncer em seres humanos (Craig & Stitzel 1996).

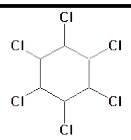
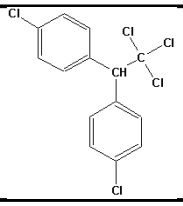
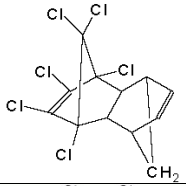
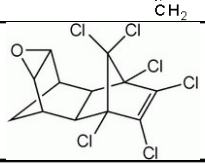
1.6.2- Organossintéticos (toxicidade variável)

1.6.2.1 Organoclorados

São compostos químicos sintéticos à base de carbono, com radicais de cloro, derivados do clorobenzeno, do ciclo-hexano ou do ciclodieno. Foram muito utilizados na agricultura, como inseticidas, porém seu emprego tem sido progressivamente restringido ou mesmo proibido (Seize 2003).

Os organoclorados como, DDT, BHC, Aldrin, Dieldrin são inseticidas que possuem alto poder residual nos ecossistemas, tendo a capacidade de se acumular no meio ambiente com tempo de 4 a 30 anos, 3 a 10 anos, 1 a 6 anos e 2 a 39 anos, respectivamente, demostrando suas atividades inseticida duradoura ao longo do tempo (Neves 2005, Gerritse 1988) (Tabela 1).

Tabela 1: Representação dos compostos químicos a base de organoclorados.

Nome químico	Peso molecular (g/mol)	Fórmula molecular	Fórmula estrutural
BHC	290,83	$C_6 H_6 Cl_6$	
DDT	354,5	$C_{14}H_9Cl_5$	
Aldrin	364,91	$C_{12}H_8Cl_6$	
Dieldrin	380,93	$C_{12} H_8 Cl_6 O$	

Os organoclorados causam sérias lesões hepáticas e renais, devida a sua lipossolubilidade, que combinando facilmente com o tecido adiposo e neural. Alguns produtos desse grupo lesam o cérebro, músculo cardíaco, medula óssea, córtex supra-renal e também o DNA. A atividade estrogênica, estimulando a testosterona e propiciando a puberdade precoce, foi comprovada para o DDT. Alguns estudos têm evidenciado a atividade imunossupressora de certos produtos desse grupo e alterações na conduta de indivíduos (Guerra & Sampaio 1991, Pinheiro & Monteiro 1992). Casos de câncer em órgãos do aparelho digestivo, pulmão e rim foram registrados em pessoas contaminadas com BHC (Oliveira & Adeodato 1997).

1.6.2.2- Organofosforados e Carbamatos

Os organofosforados são compostos orgânicos derivados do ácido fosfórico, do ácido tiofosfórico ou do ácido ditiofosfórico, eos carbamatos são derivados do ácido carbâmico (Seizi 2003).

Os organofosforados (Malathion, Paratiom e Diazinon) e carbamatos (Aldicarbe e Carbaril) são inseticidas que possuem alto poder residual nos ecossistemas não tendo atividade inseticida rápida (Tabela 2 e 3) (Seizi 2003).

O mecanismo de ação dos organofosforados (Malathion, Diclorvos (DDVP), Diazinon) e carbamatos (Carbaril, Aldicarbe, Carbofuram) basea-se na forte ligação à enzima acetilcolinesterase, impedindo que esta degrade a acetilcolina. O acúmulo de acetilcolina nas sinapses provoca uma hiperatividade nervosa e conseqüente colapso do sistema nervoso dos insetos (Seizi 2003).

Diversas intoxicações por organofosforados e carbamatos têm sido diagnosticadas no Brasil e no mundo, tanto em animais domésticos como em seres humanos. Estas em geral são graves, com elevados índices de mortalidade, (Singh et al. 1995, Moraes 1999), podendo chegar a 20% dos pacientes (Tsao et al. 1990, Nouira et al. 1994). A alta mortalidade tem sido relacionada ao diagnóstico tardio e à conduta inadequada (Zwiener & Ginsburg 1988, Tsao et al. 1990, Singh et al. 1995). Os médicos tendem a administrar doses insuficientes do antídoto, a atropina (Zwiener & Ginsburg, 1988), uma vez que as doses preconizadas são cinco a 10 vezes maior do que as utilizadas com outras finalidades terapêuticas (Milby 1971, Moraes 1999). A abordagem médica inicial deve ser rápida e adequada, pois a rapidez no diagnóstico e precocidade do tratamento é determinante na evolução dos casos (Singh et al. 1995).

Tabela 2: Representação dos compostos químicos a base de organofosforados.

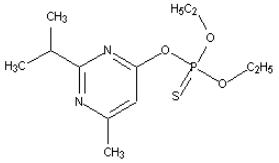
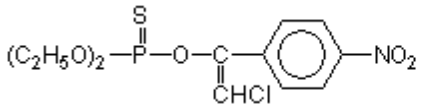
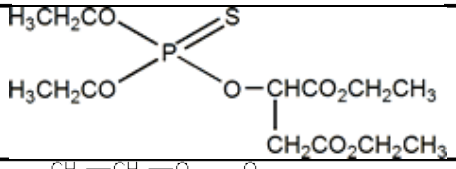
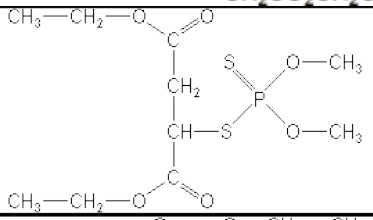
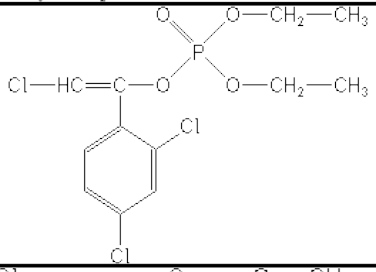
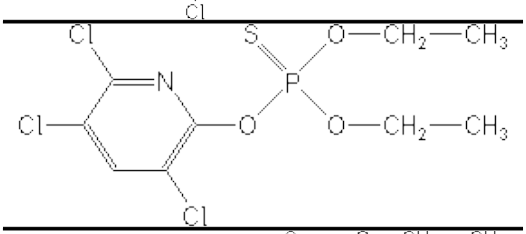
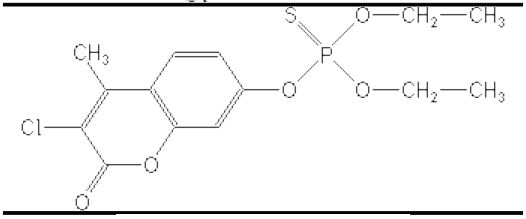
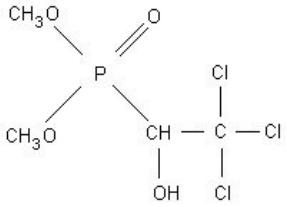
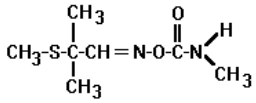
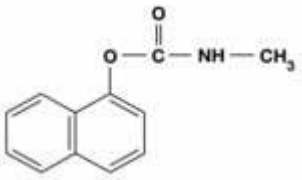
Nome químico	**Peso molecular (g/mol)**	**Fórmula molecular**	**Fórmula estrutural**
Diazinon	304,346	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	
Paratiom	291,27	$C_{10}H_{14}NO_5PS$	
Malatiom	330,36	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	
Diclorvós	220,98	$C_4H_7Cl_2O_4P$	
Clorfenvinfos	359,56	$C_{12}H_{14}Cl_3O_4P$	
Clorpirifos	327,5	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	
Cumafós	362,77	$C_{14}H_{16}ClO_5PS$	
Triclorfone	257,4	$C_4H_8Cl_3O_4P$	

Tabela 3: Representação dos compostos químicos a base de carbamatos.

Nome químico	Peso molecular (g/mol)	Fórmula molecular	Fórmula estrutural
Aldicarbe	190,29	$C_7H_{14}N_2O_2S$	
Carbaril	201,22	$C_{12}\ H_{11}\ N\ O_2$	

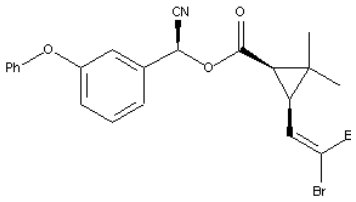
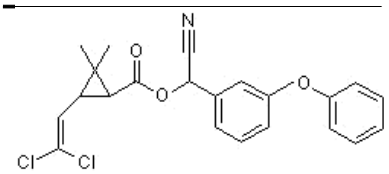
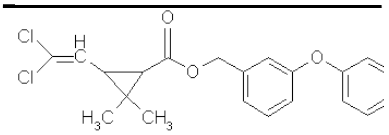
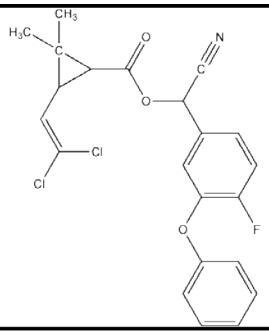
1.6.2.3- Piretróides

Os piretróides é um outro grupo de inseticida que vem sendo muito utilizado no controle de diversos insetos, sejam nas áreas de agricultura, médica ou veterinária. São compostos sintéticos que apresentam estruturas semelhantes à piretrina, substância existente nas flores do gênero *Chrysanthemum* (Viegas Júnior 2003). Apresentam uma menor toxicidade para os mamíferos, pois a biotransformação desses compostos é muito rápida.

Embora pouco tóxicos do ponto de vista agudo, são irritantes para os olhos e mucosas, causando alergias de pele, coceira intensa e manchas. Crises como de asma brônquica, vem acarretar na dificuldade respiratória, espirros, secreção e obstrução nasal (Craig & Stitzel 1996).

Os piretórides como deltametrina, cipermetrina e permetrina, são os compostos inseticidas a base de piretróide mais utilizados (Tabela 4).

Tabela 4: Representação dos compostos químicos a base de piretróides.

Nome químico	Peso molecular (g/mol)	Fórmula molecular	Fórmula estrutural
Deltametrina	505,2	$C_{22}H_{19}Br_2NO_3$	
Cipermetrina	416,30	$C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$	
Permetrina	391,3	$C_{21}H_{20}Cl_2O_3$	
Ciflutrina	453.3	$C_{22}H_{18}Cl_2NO_3$	

1.7- Detecção de mudança de suceptibilidade aos acaricidas químicos sintéticos

A utilização indiscriminada de acaricidas químicos sintéticos sem dosagens corretas e administração errônea favorece o desenvolvimento de resistência por parte dos insetos (Furlong & Martins 2000).

Acaricidas como deltametrina e cipermetrina, com formulações para uso exclusivo em bovinos, eqüinos ou domiciliares, estão sendo administrados aos cães sem prévio estudo científico, sob formas e dosagens variadas. Essa prática resulta em ineficiência do acaricida, desenvolvimento de alelos resistentes nessa população de carrapatos, prejuízos econômicos aos criadores, intoxicação dos animais e impacto ambiental pelo efeito residual destes na natureza (Furlong & Martins 2000).

Pode-se determinar de uma maneira bastante concisa, a resistência em carrapatos aos acaricidas através, de diferentes testes biológicos no campo ou em laboratório. Um

dos testes baseia-se na utilização do carrapaticida em diferentes concentrações e no índice de sobrevivência de larvas expostas a estas concentrações. Este teste é conhecido como LPT.

Guerrero et al. (2002) avaliaram a resistência de cepas mexicanas do carrapato *R.* (B) *microplus* através de técnica de PCR. E esta resistência estava envolvida na substituição de dois aminoácidos em uma proteína do canal de Na^+. As mutações, com a substituição de Phe (Fenilalanina) por IIe (isoleucina) e Asp (Aspártico) por Asn (Asparagina), demonstram o motivo desta linhagem de carrapato ser resistente a piretróides.

1.8- Resistência de *R. sanguineus* e *A. cajennenses* à acaricidas químicos sintéticos

Grande soma de recursos financeiros têm sido consumidos no emprego de acaricidas químicos que constituem a principal forma de combate aos ixodídeos. No entanto, o desenvolvimento de resistência a esses produtos tem progredido muito rapidamente. No Brasil, embora informações sobre a resistência de *R. sanguineus* aos acaricidas sejam ainda escassas, os primeiros estudos foram realizados em Goiás (Fernandes et al. 1997, 1998, 2001, Fernandes 2000, Fernandes & Freitas 2001), conforme citado por Guimarães et al. (2002). Estes estudos demonstraram dentre outros fatores a baixa eficiência de alguns piretróides em ensaios com larvas deste carrapato (Fernandes 2000), e ineficácia de fenthion a 15% em ensaios de campo com cães, sobre diferentes estádios deste carrapato (Fernandes & Freitas 2001).

Resistência de *R. sanguineus* aos acaricidas arseniciais (Gladney & Dawkins 1976), organofosforados (Barros et al. 2001), carbamatos (Polyakav & Smirnova 1976) e organoclorados (Belot & Mishra 1979) tem sido constatada também no exterior. Baixa eficiência de cumafós sobre fêmeas adultas foi observada na Venezuela (Conrado & Mujica 1998). No Panamá, *R. sanguineus* mostrou-se resistente à permetrina, DDT e amitraz (Miller et al. 2001).

Ao realizar testes "in vivo" e "in vitro" verificaram que *A. cajennense* foi suceptivel a três produtos a base de piretóides, porém as concentrações observadas são superiores as utilizadas para *R.* (*B*) *microplus* (Pinheiro 1987, Pinheiro et al. 1989).

Atualmente, no Brasil, o controle de *A. cajennense* tem sido feito indiscrimidamente, através do uso de produtos carrapaticidas encontrados no comércio. São usados acaricidas a base de organofosforados, carbamatos, amidinas e mais

recentemente piretroídes sintéticos, em concentrações recomendadas para o controle do carrapato de bovinos. As concentrações dos diferentes piretróides utilizadas no controle de *R*. (*B*) *microplus* não têm mostrado boa eficiência no controle do *A*. *cajennense*, demonstrando que este ixodídeo exige concentrações mais elevadas e intervalos entre banhos estratégicos, para se obter sucesso no seu controle. Outros pesquisadores recomendam que seja utilizado no controle químico de *A. cajennense* doses de 1,8 vezes maiores do que as recomendadas para controle de *R.* (*B.*) *microplus* (Barros-Battesti et al. 2006, Martins et al. 2006).

1.9- Extratos vegetais como alternativa no controle de ácaros e insetos

Certas plantas têm demonstrado, a nível experimental, potencial para desenvolvimento de inseticidas e/ou acaricidas. Plantas como *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae), testada sobre o mosquito transmissor da dengue, *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) (Diptera, Culicidae) (Silva et al. 2004), *Copaifera reticulata*, avaliada sobre o mosquito transmissor da filariose bancrofitiana *Culex quinquefasciatus*, (Diptera, Culicidae) (Silva et al. 2003), *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae) e *Carapa guianensis* Aubl. (Meliaceae), foram ambas estudadas sobre o carrapato *R.* (*B.*) *microplus* (Canestrine 1887), (Fernandes et al. 2007) (Farias et al. 2007), *Piper hispidinervum* C.DC. (Piperaceae), a qual demonstrou promissora ação inseticida sobre caruncho de cereais, *Sitophilus zeamais* (Motschulsky 1855) (Coleoptera, Curculionidae) (Estrela et al. 2006) e *Trichilia pallida* Swartz, demonstrou atividade letal contra *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) (Roel & Vendramim 2006).

É importante lembrar que a toxicidade de uma determinada substância química do extrato vegetal não qualifica necessariamente como um inseticida. Diversas propriedades devem estar associadas à atividade, tais como eficácia, mesmo em baixas concentrações, ausência de toxicidade frente a mamíferos e animais superiores não sendo acumulativa no tecido adiposo de humanos e de animais domésticos, ausência de fitotoxicidade, fácil obtenção, manipulação, aplicação e viabilidade econômica. Diversos estudos devem-se ramificar para verificar de forma abrangente os seus benefícios, podendo assim de forma objetiva indicar tal extrato como eficiente farmacologicamente.

1.10- Obtenção de compostos farmacologicamente ativos contra ácaros e insetos a partir de plantas

Existem várias metodologias descritas para a preparação de extratos vegetais, visando o isolamento de seus constituintes químicos. Um dos métodos mais adequados para a análise químico-farmacológica é a preparação de um extrato hidroalcóolico (etanol/ água 50/50, v/v). Caso o extrato apresente efeitos biológicos de interesse, deve-se proceder a um método sistemático de estudo. Neste caso, o solvente mais adequado para obtenção do extrato bruto é o metanol, pois permite a extração de um número maior de compostos. Posteriormente, este extrato deve ser submetido a um processo de partição líquido-líquido, com solvente de polaridades crescentes, como hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, visando uma semi-purificação das substâncias através de suas polaridades. Outros solventes de polaridade similar também podem ser utilizados. No sentido de se localizar os princípios ativos, todos os extratos semi-puros devem ser testados e aquele que apresentar efeito biológico de interesse, deverá ser submetido aos procedimentos cromatográficos para o isolamento e a purificação dos compostos. Recomenda-se sempre utilizar grandes quantidades de planta, pois este fato possibilita determinar também os constituintes presentes em baixas concentrações. A figura 10 aponta os procedimentos descritos e indica as prováveis classes de compostos separados (Cechinel Filho & Yunes 1998).

Métodos alternativos podem ser utilizados para a obtenção de extratos, na qual consiste em macerar a planta em estudo durante vários dias diretamente com solventes de polaridade positiva conforme se observa na figura 11 (Cechinel Filho & Yunes 1998).

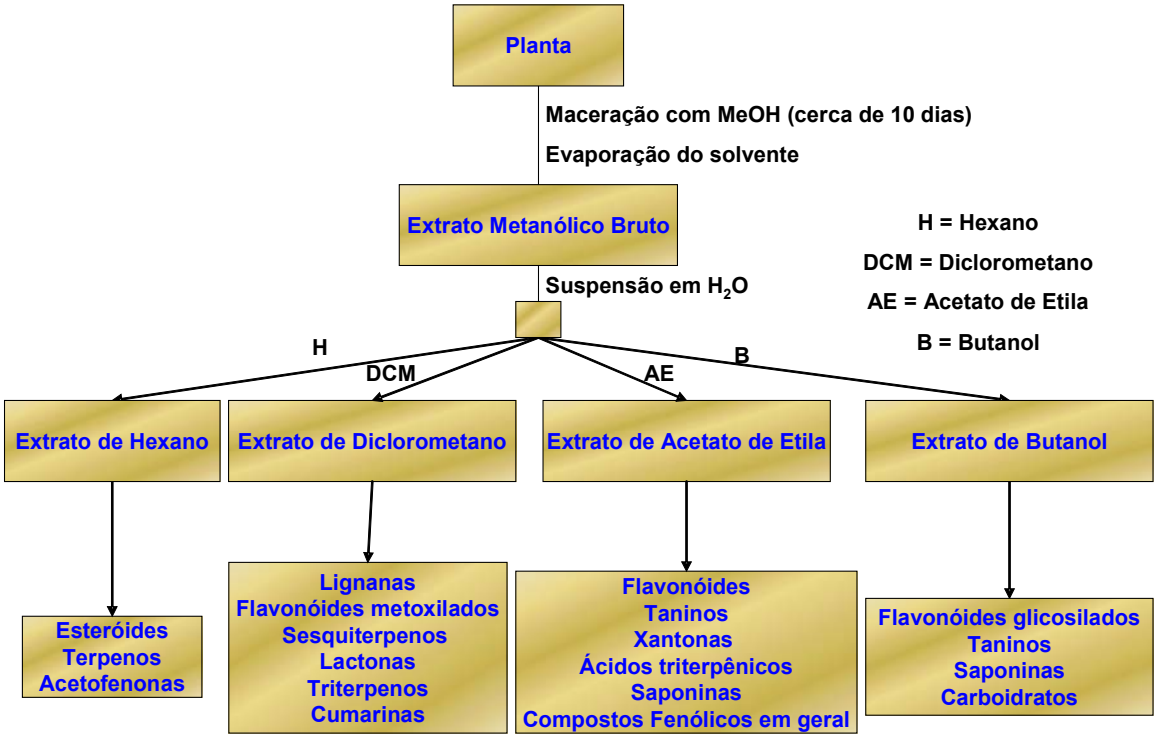


Figura 10. Representação geral de separação provável dos principais metabólicos secundários presentes em plantas. (Fonte: Chechinel Filho & Yunes 1998 adaptado).

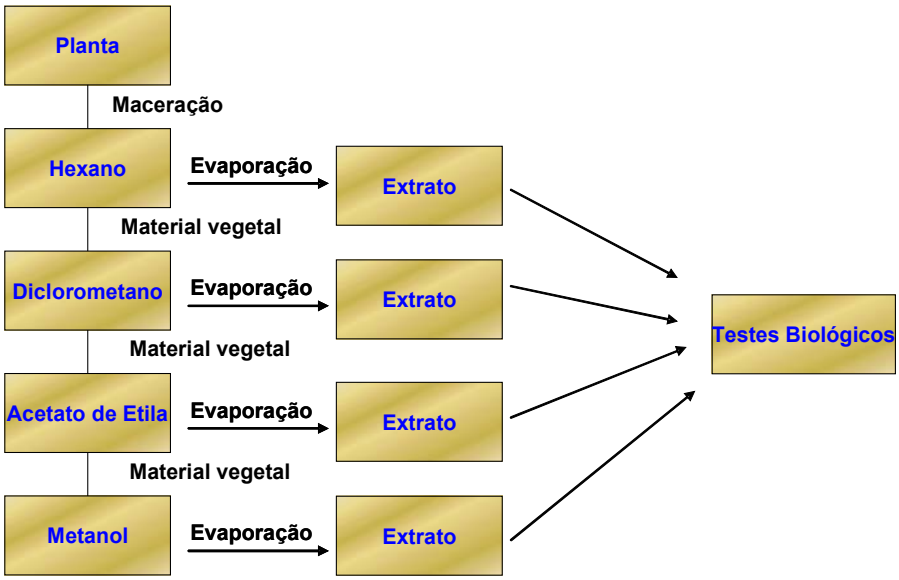


Figura 11. Esquema geral para obtenção de extratos diretamente da planta. (Fonte: Chechinel Filho & Yunes 1998 adaptado).

1.11-Plantas estudadas

1.12- *Piper hispidinervum* C.DC. (Piperaceae)

A família Piperaceae é representada por plantas herbáceas, arbustos e raramente, árvores. Dentre as espécies aromáticas da família Piperaceae, destaca-se *P. hispidinervum* conhecida como "pimenta longa", planta pioneira encontrada naturalmente como vegetação secundária nos campos de pastagens no Estado do Acre (Rocha Neto et al. 1999) (Fig. 1A).

Os solos das áreas de ocorrência natural de *P. hispidinervum* são caracterizados como Podzólico Vermelho-Amarelo álico, de textura argilosa, pouco compactado, com pH variando de 4,8 a 7,1 (Cordeiro et al. 1999).

Um grande número de componentes tem sido isolado de plantas do gênero Piper. Muitos são terpenos, fenilpropanóides, ligninas, outros fenólicos e uma série de alcalóides (Hegnauer 1990, Jensen et al. 1993).

Recentemente, o interesse por esta planta foi despertado por parte das indústrias de cosméticos e inseticidas devido ao safrol obtido do óleo essencial extraído de suas folhas e ramos finos (Wadt 2001) (Fig. 1B). A molécula metilenodioxibenzeno butóxido de piperonil, são incorporadas ás formulas dos inseticidas para reduzir a taxa de inativação dos inseticidas pelo inseto. Este composto é denominado sinergista de inseticida (Craig & Stitzel 1996).

A planta originalmente fornecedora de safrol era a canela sassafrás (Ocotea pretiosa Mezz). No entanto, foi proibida a sua exploração, pois o processo era destrutivo e a espécie encontrava-se em vias de extinção (Pimentel et al. 1998).

Figura 12. (A) Folhas e ramos secundários, (B) óleo essencial de *P. hispidinervum*.

1.13- *Carapa guianensis* (Meliaceae)

É uma árvore de grande porte, podendo atingir até 55m de altura, com caule cilíndrico e reto de 20 a 30m (Fig. 13 A). A casca é grossa e amarga, de cor avermelhada ou acinzentada e desprende-se em grandes placas. A planta é monóica. O fruto é uma cápsula com quatro valvas, de forma globosa ou sub-globosa, medindo geralmente entre 5 e 11cm de diâmetro e pesando entre 90 e 540g (Fig. 13 B). Cada fruto pode conter entre 1 e 16 sementes. As sementes, de cor marrom, podem apresentar grande variação de forma e tamanho, sendo encontradas sementes pesando entre 1 e 70g e medindo entre 1 e 6 cm de comprimento (Fig. 13 C). *C. guianensis* conhecida popurlamente, por andiroba e uma espécie de uso múltiplo. Esta árvore tem como sinônimo botânico *C. nicaraguensis*. A madeira e o óleo extraído das sementes são dois dos produtos mais importantes. Entre as espécies nativas da Amazônia, a madeira da andiroba, é uma das mais apreciadas, sendo considerada nobre e sucedânea do mogno (Fig. 13 D). O óleo é usado na preparação de sabão e de cosmético. A Fundação Oswaldo Cruz lançou no mercado velas de andiroba que são indicadas para repelir mosquitos transmissores de doenças, como dengue e malária. Alguns grupos indígenas e populações tradicionais utilizam o óleo como repelente de insetos e no tratamento de artrite, distenções musculares e alterações dos tecidos cutâneos. Popularmente, o chá da casca das flores é usado como remédio para combater infecções bacterianas e o chá do cerne como fungicida (Fig. 13 E) (Ferraz 2003).

Atualmente, a família Meliaceae, vem se mostrando, dentre as demais famílias botânicas, como uma das mais importantes fontes de produtos inseticidas, devido ao número de espécies com eficiência de seu extrato sobre diversos insetos. A afinidade taxonômica, de pertencer à mesma família foi um dos motivos para escolha da Meliacea *C. guianensis* para o presente estudo.

Champagne et al. (1992) tentou estabelecer algumas relações estrutura-atividade inseticida, concluindo-se que, contra determinados insetos, os limonóides como o anel C-seco é os mais ativos. Entre estas plantas se encontra a *Azadirachta indica* A. Juss e *Melia azedarach* L., possuidoras deste anel C-seco.

Ndumu et al. (1999) demonstrou existir efeitos toxicológicos do óleo puro da planta *A. indica*, sobre o carrapato, *A. variegatum*, nativo da Nigéria, verificando a mortalidade de 100% das larvas do carrapato após 48 horas, com CL_{50} de 66,7% (66700 ppm).

Figura 13. (A) Árvore de *Carapa guianensis* (Fonte: <www.inova.unicamp.br/ inventabrasil/andiroba.htm >). Fruto (B) e Sementes (C) de *Carapa guianensis* (Fonte: <http://www.plantamed.com.br/plantaservas/generos /index.html.>). (D) Madeira de *Carapa guianensis* (Fonte: <http://dendro.cnptia.embrapa.br/Agencia1/AG01/arvore/ AG01_34_309200411812.html>) (E) Flores de *Carapa guianensis* (Fonte: <picasaweb.google.com/.../h4yKl0BKGdjHL_ZBqAJz6A>).

1.14- *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae)

M. pubescens é uma planta do grupo das dicotiledôneas típica da savanna Brasileira "Cerrado" sendo conhecida popularmente como "tingui" (Fig. 14A), onde ocorre nos estados de Goiás, Distrito federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo. E encontrado em países como Bolívia e Paraguai. Ela se adapta a qualquer tipo do solo, desde ao solo mais rico ou pobre em nutrientes. As frutas se distinguem facilmente das demais, tendo características marcantes por ser grande e de cor marrom (Fig. 14B). As árvores são caracterizadas de médio a grande porte, e sua madeira é usada em construção civil, aproveitamento como postes para colocação de cerca de arame (Lorenzi 1992), e útil para o carvão metalúrgico (Fig. 14C). Suas flores são usadas pelas abelhas, embora conduzam um mel ligeiramente tóxico e as sementes são usadas em arranjos ornamentais e na produção de sabão (Pott & Pott 1994).

Segundo Campos et al. 2006 *M. pubescens* tende a ser mais abundante nas áreas com valores mais elevados de pH, Ca, Mg e H + Al, sendo encontrada em grande números de espécimes na floresta de Paraopeba, Minas Gerais.

Os princípios químicos como liguininas e ou taninos podem ser encontrados na semente de *M. pubescens* ajudando assim, a desmistificar o porquê de determinadas espécies de insetos não promover a depredação da árvore e seus anexos arbóreos (Oliveira et al. 2001).

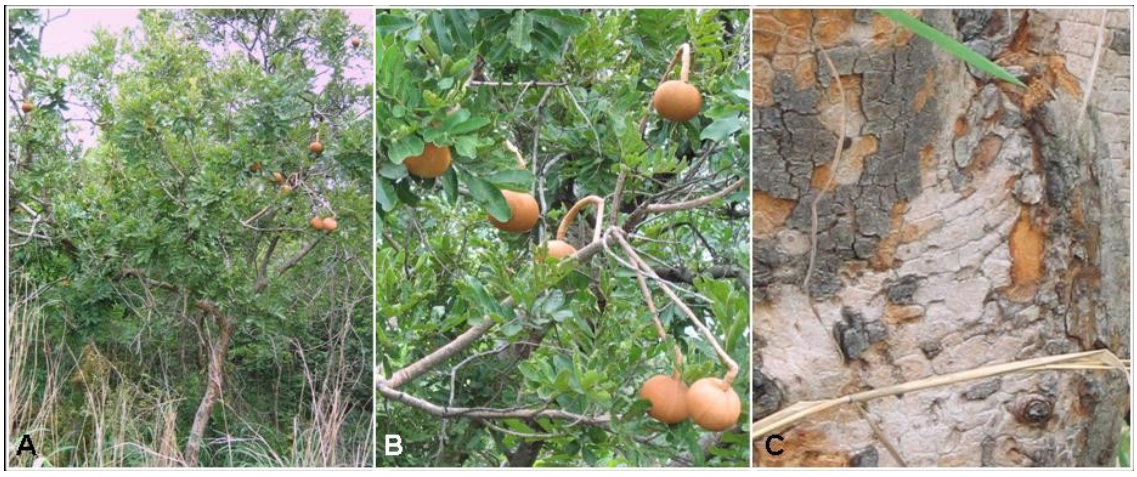


Figura 14. Árvore (A) em seu bioma natural, Cerrado (B) Folhas e frutos (C) Casca do caule de *Magonia pubescens*.

2- JUSTIFICATIVAS

Os altos gastos com acaricidas químicos sintéticos, os quais constituem a principal forma de combate aos carrapatos *R. sanguineus* e *A. cajennese*, somados ao crescente número de relatos de resistência aos mesmos, bem como a prevalência e dispersão desses artrópodes por todo o país, causando significativos prejuízos econômicos e sanitários, justificam a realização do presente estudo.

As dificuldades no combate de *R. sanguineus* e *A. cajennese*, pelos métodos tradicionais suscitam esforços para o desenvolvimento de estratégias de controle alternativos, mais eficientes, mais econômicos, menos tóxicas ao homem e aos animais e de menor impacto ambiental.

A utilização de substâncias extraídas de plantas, com propriedades acaricidas e/ou inseticidas, baseado em resultados promissores obtidos a nível experimental no controle de artrópodes de importância médica, veterinária e agrícola, coloca-se como uma promissora alternativa para o controle de carrapatos, merecedora de futuros estudos.

Estudos similares ao proposto, envolvendo as espécies de plantas e carrapatos, até o presente momento não foram evidenciados na literatura científica.

3- OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Monitorar a susceptibilidade e/ou resistência das larvas de *R. sanguineus* aos principais produtos utilizados para controle de ectoparasitos, os acaricidas químicos sintéticos e analisar o potencial das plantas *P. hispidinervum*, *C. guianensis* e *M. pubescens* sobre *A. cajennense* e *R. sanguineus*, para prospecção de acaricidas botânicos, de menor impacto ambiental.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar a eficiência ou ineficácia de quatorze dos principais produtos acaricidas químicos sintéticos comercializados em Goiás no combate de *R. sanguineus.*

- Analisar a bioatividade do óleo essencial extraído das sementes de *C. guianensis*, do óleo essencial extraído das folhas e ramos secundários de *P. hispidinervum* sobre as larvas de *A. cajennense* e do extrato bruto etanólico da casca do caule de *M. pubescens* sobre *R. sanguineus.*

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Origem das amostras botânicas

Amostras vegetais da casca do caule de *M. pubescens* foram coletadas no município de Fransisco de Sá em Minas Gerais.

No estado do Acre, amostras das folhas e ramos secundários de *P. hispidinervum*, foram coletadas e encamianhadas para o Centro de Pesquisa Agroflorestal-Embrapa/Acre, para processamento do seu óleo essencial (Pimentel & Silva 2000).

Amostras da semente de *C. guianensis* foram coletadas em áreas da Floresta Amazônica, do município de Belém do Pará, e encaminhadas ao laboratório de fitoquímica, para a extração de seu óleo essencial.

As amostras vegetais foram acondicionadas em caixas térmicas de poliestireno, embaladas e enviadas para processamento nos laboratórios parceiros do LAMV/IPTSP/UFG (Laboratório de Artropodologia Médica e Veterinária do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás).

4.2- Obtenção dos óleos essenciais de *P. hispidinervum* e *C. guianensis*

A biomassa de *P. hispidinervum* foi triturada, submetida à secagem e posteriormente, compactada em um destilador (Figura 15 e 16). A extração do óleo essencial foi feita por meio de arraste de vapor d'água, utilizando sistema de caldeira aquecida. A condensação deste foi realizada por refrigeração utilizando água a cerca de 25°C. Em seguida, este foi submetido ao processo de destilação, segundo Pimentel & Silva (2000). Amostras da semente de *C. guianensis* foram encaminhadas ao laboratório de fitoquímica para a extração de seu óleo essencial, de forma semelhantemente à supracitada. O óleo essencial permaneceu em frascos de vidro âmbar, no dessecador contendo sílica gel com indicador azul, até a realização dos bioensaios.

Figura 15. Secador solar de biomassa de pimenta longa (Fonte:<http://www.cpafac.embrapa.br/pdf/comunicado98.pdf>).

Figura 16. Extrator de óleo essencial de pimenta longa com sistema de caldeira aquecida (Fonte:< http://www. cpafac.embrapa.br/pdf/comunicado97. pdf>).

4.3- Obtenção do extrato de *M. pubescens*

Extratos brutos em etanol de *M. pubescens* foram obtidos a partir da casca do caule, que após ser dessecado em estufa de ventilação forçada a temperatura de 40°C, foi triturado em moinho elétrico de facas até atingir baixa granulometria, pesado e percolado a frio. Cerca de 800 g do pó obtido foi colocado num béquer com capacidade para 2000 mL, no qual foi adicionado 1 litro de etanol absoluto (solvente), misturando-

se com agitador mecânico até completa homogeneização, deixando em repouso por 72 h, protegido da luz. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em papel filtro qualitativo. Após cada filtragem o volume do béquer foi completado com álcool para a seguinte percolação, repetindo-se este procedimento por 4 vezes. O filtrado foi concentrado em evaporador rotativo e o extrato bruto etanólico (e.b.e) obtido, foi colocado em placas de petri para secagem, numa capela de exaustão, em temperatura ambiente. Em seguida o e.b.e. foi acondicionado em frascos de vidro âmbar e armazenado em dessecador até a utilização (Arruda et al. 2003).

4.4- Preparação das soluções botânicas para os bioensaios

Os óleos essencias foram, acondicionados em frascos de vidro de cor âmbar, e enviados para o LAMV, onde permaneceram armazenados em dessecador até sua utilização nos bioensaios com os artrópodes. Soluções estoques foram preparadas em concentração maior ou igual a 7000 e 350000 ppm para *P. hispidinervum* e *C. guianensis*, respectivamente. Para isto a substância botânica a ser testada (óleo essencial) foi pesada em balança analítica, com precisão de 0,0001g. Em seguida, foi dissolvida em água destilada, e quando necessário, em solventes (pré-selecionados após bioensaios de tolerância dos artrópodes aos mesmos), permanecendo em repouso por cerca de 1h, para facilitar a dissolução. Posteriormente foram homogeneizadas em agitador magnético por cerca de 15 minutos e o volume ajustado com água destilada. As soluções foram preparadas 24 h antes da realização dos testes (Arruda et al. 2003). A partir das soluções estoque foram obtidas soluções com concentrações menores desejadas, por uma série de diluições em água destilada.

4.5- Escolha dos solventes a serem utilizados

Objetivando encontrar os solventes ideais para processamento de cada uma das substâncias botânicas estudadas diferentes tipos de solventes foram testados. Buscou-se selecionar solventes menos tóxicos para os artrópodes, além de menos dispendiosos e mais práticos, quanto à solubilização das substâncias botânicas e quanto à tolerância das larvas de *R. sanguineus* e *A. cajennense*. Os testes propicionaram a escolha dos solventes adequados e a determinação das concentrações máximas possíveis de serem

utilizadas, sem serem letais ou danosas para os artrópodes. Foi possível avaliar de forma apurada a atividade acaricida das substâncias extraídas das plantas, sem interferência dos solventes. Para isto, os solventes e os carrapatos foram submetidos ao método de *papéis impregnados*, adaptado de metodologias previamente desenvolvidas (Leite 1988, FAO 1995, 2004, Fernandes 2000, 2001), com adaptações (Fernandes et al. 2007, Fernandes & Freitas, 2007). Os solventes que demonstraram ser menos tóxicos para as larvas de *R. sanguineus* e *A. cajennense* proporcionando solução mais homogênea dos óleos essenciais de *P. hispidinervum* e *C. guianensis* foram acetona e DMSO sob o extrato bruto etanólico da casca do caule de *M. pubescens*.

4.6- Coleta de *R. sanguineus* e *A. cajennense*

Teleóginas de *R. sanguineus* foram coletadas nas superfícies do piso, paredes e teto de canis e em outros ambientes habitados por cães naturalmente infestados por este carrapato, de diversos bairros de Goiânia-GO (Fernandes 2000). As teleóginas foram acondicionadas em recipientes descartáveis e encaminhadas ao LAMV. No laboratório, foram lavadas com água destilada e secas em papel toalha. Em seguida foram acondicionadas em incubadoras do tipo B.O.D., climatizadas a 27 ± 1 ºC e UR ≥ 80%, fixadas pelo dorso com fita adesiva dupla-face em placas de vidro, disposta sobre a base de uma placa de petri, para realizarem a oviposição (FAO 1995, 2004). Para obtenção de larvas com idade uniforme, diariamente foram recolhidas todos os ovos em um único tubo de polietileno com tampa enroscável (3 x 9cm). Após a eclosão, o tubo foi vedado com fita adesiva do tipo crepe para evitar o escape de larvas (Fernandes et al. 2001).

As teleóginas de *A. cajennense* foram coletadas em vários cavalos naturalmente parasitados, em fazendas, nos municípios de Hidrolândia, Teresópolis e Goianápolis do Estado de Goiás. Teleóginas foram processadas para obtenção de larvas de forma semelhante à descrita anteriormente (Fernandes et al. 2007, Fernandes & Freitas 2007).

4.7- Avaliação da bioatividade das plantas testadas sobre *A. cajennense* e *R. sanguineus* e ação dos acaricidas químicos sintéticos sobre *R. sanguineus.*

4.7.1- Sensibilidade larval pela metodologia de papéis impregnados (Fernandes et al. 2007).

Para a verificação da sensibilidade larval utilizou-se a metodologia de papéis impregnados *larval packet test (lpt)* desenvolvida por Fernandes & Freitas (2007), com base em metodologias pré-existentes (FAO 1995, 2004, Fernandes 2000, 2001, Fernandes et al. 2007), incorporando algumas modificações, objetivando conferir maior praticidade e diminuição de custos, sem prejuízo da eficiência. Os bioensaios foram realizados em uma câmara climatizada a 27º±1ºC, UR>80%, com fotofase natural de 12 h, especialmente construída para realização de bioensaios com acaricidas. Foram utilizados nos bioensaios, larvas com 14 a 21 dias de idade, oriundas de tubos de polietileno (8,5 x 2,5 cm) com pool de larvas com as maiores taxas de eclosão (90 a 100%). Selecionado o tubo, para evitar a fuga de larvas, este era colocado sobre um frasco de vidro invertido (7 x 2,5 cm), disposto no centro de uma placa de petri com água, sendo então aberto. Uma alíquota destas larvas foi colocada no centro de uma folha de papel branco, fixada sobre a bancada com fita dupla-face. Cada envelope recebeu 2ml de solução a ser testada, distribuída uniformemente em suas superfícies internas, com auxílio de uma pipeta. Este volume foi calculado com base na área do papel filtro, equivalendo proporcionalmente ao utilizado por Leite (1988).

Na verificação da bioatividade das plantas testadas sobre *A. cajennense*, imediatamente após o envelope de papel filtro ter sido umedecido pela solução teste, pelo menos 50 larvas com boa motilidade foram içadas com um pincel n° 4 de pêlos claros e colocadas dentro de cada envelope. As demais larvas foram eliminadas com fita crepe. Os envelopes foram fisicamente vedados, dobrando-se a sua abertura (borda com 1 à 2 cm) e prendendo-se a mesma com auxílio de prendedores metálicos. Estes foram pendurados em suportes de forma a deixar suspensos ao ar os envelopes, sem contato com nenhuma superfície, a fim de evitar perdas da solução ou contaminação. Sob os envelopes, nas bancadas, foram colocados umidificadores para manter a umidade adequada aos bioensaios.

Os bioensaios foram realizados em quadruplicata e todos os experimentos foram acompanhados de uma série de controle, contendo o mesmo número de larvas no

solvente utilizado e água destilada. Os envelopes foram posteriormente inspecionados com auxílio de um estereoscópio, para o registro das larvas vivas e mortas e os efeitos toxicológicos observados. Para uma análise mais precisa da bioatividade de cada solução testada, os efeitos toxicológicos das plantas sobre os carrapatos, nos horários de observação (24 e 48 h) foram anotadas em separado, as quantidades de larvas: 1. Viva com capacidade locomotora, 2. Viva, porém sem locomoção e 3. Mortas. Além disto, quaisquer efeitos toxicológicos observados nas larvas nestes horários foram anotados, tais como: movimentação repetitiva, desprendimento de membros, crescimento de bolhas de gás ou líquido no idiossoma, presença de fungos, etc. Todavia, para possibilitar a comparação dos resultados com os de outros autores (Leite 1988, FAO 1995), os percentuais médios de mortalidade foram calculados considerando mortas também às larvas sem capacidade locomotora, da seguinte forma:

$$\text{Mortalidade (\%)} = \frac{\text{Larvas mortas x 100}}{\text{Total de Larvas}}$$

$$\text{Mortalidade Média (\%)} = \frac{\text{Mortalidade da repetição (Mr) 1 + Mr 2+ Mr 3 + Mr 4}}{4}$$

Não foram feitas correções quando a mortalidade do controle oscilava entre 0 e 5% e a mortalidade do teste for de 0 ou 100%. Em testes com mortalidade no grupo controle entre 5 e 10%, cada mortalidade média foi corrigida pela fórmula de Abbott. Não foram aproveitados resultados de testes que produziram mortalidade no grupo controle superiores a 10% (FAO 2004).

Em relação aos bioensaios preparados com os acaricidas químicos sintéticos sobre *R. sanguineus*, estes foram realizados em quadruplicata. Para cada repetição uma nova solução estoque de cada acaricida foi preparada. Em cada bioensaio foram preparados quatro envelopes de papel-filtro para cada concentração testada. Os envelopes foram impregnados com 2 ml de cada solução teste, uniformemente distribuídos em sua superfície interna e deixados em repouso durante 6 h, para aderência dos cristais formados pelos acaricidas, ao papel filtro. O grupo teste foi submetido a envelopes impregnados com as soluções acaricidas químicas. O grupo controle foi submetido a: 1. Envelope seco (sem tratamento) e, 2. Envelopes

umedecidos internamente com 2 ml de água destilada. Cerca de 50 ou mais larvas eram cuidadosamente içadas do papel branco sobre a bancada, com o pincel umedecido e, colocadas ao fundo de cada envelope. Os envelopes eram então imediatamente fechados, dobrando-se em sua abertura uma borda com cerca de 10 mm e, lacrando-se esta com um prendedor metálico. Os envelopes eram então suspensos pelos prendedores em suportes, a fim de evitar contaminação ou perda de solução por contato com a bancada. Os envelopes foram abertos e as leituras das mortalidades foram feitas ao estereoscópio após 24 h de exposição, com exceção do produto amitraz que foi feita leitura adicional de 48 h, em atendimento às recomendações da FAO (2004).

Acatando os critérios preconizados pela WHO (1970, 1998), os acaricidas que determinaram mortalidade média menor que 80% das larvas de *R. sanguineus* na concentração comercial recomendada foram considerados ineficientes, por caracterizar quadro ou "*status* de resistência". Aqueles que ocasionaram mortalidade média entre 80% a 95%, configuraram um "*status* de provável resistência" e, por último, aqueles acaricidas que determinaram mortalidade média ≥ 80%, caracterizaram um "*status* de susceptibilidade".

4.8- Cálculo das Concentrações letais (CLs)

As concentrações letais (CLs), especialmente CL_{50} e CL_{99} com seus respectivos intervalos de confiança a 95% (IC 95%) e seus coeficientes de determinação (R^2) foram determinadas para os produtos que se mostraram ineficientes. Esses foram calculados interpolando-se os índices médios de mortalidades proporcionados pelas diferentes concentrações testadas, por meio da análise de *Probit*, empregando o *software* "*Sistema para Análises Estatísticas e Genética*" (SAEG® *software* v. 9.0). Diferenças significativas (**α**= 5%) entre as mortalidades determinadas pelos acaricidas em suas respectivas dosagens recomendadas pelos fabricantes foram avaliadas pelo teste estatístico ANOVA seguido do teste estatístico *Scott-Knott*. Para tal utilizou-se o *software Assistat*® v. 7.4.

5- Manuscrito 1: Avaliação do potencial de resistência sobre as larvas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) à diferentes acaricidas químicos sintéticos.

Manuscrito a ser submetido para publicação à revista Experimental and Applied Acarology: Qualis B Internacional, indexado no Web of Science. Fator de impacto: 0,716.

Avaliação do potencial de resistência das larvas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) à diferentes acaricidas químicos sintéticos.

Walmirton Bezerra D'Alessandro [1], Edméia de Paula e Souza Freitas [2]; Fernando de Freitas Fernandes [3*]

Resumo – *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) é um dos mais importantes ectoparasitos do cão doméstico. Este ixodídeo pode transmitir enfermidades como erliquiose, babesiose e febre maculosa. Avaliou-se a susceptibilidade das larvas desse carrapato a 14 formulações acaricidas diferentes. Larvas com idade entre 14 a 21 dias, em jejum foram obtidas, a partir de teleóginas ingurgitadas, sem resíduos acaricidas. Para a realização dos bioensaios às larvas foram contidas em papel filtro, previamente impregnados com 2 mL das soluções acaricidas do grupo teste e água destilada no caso do grupo controle. As leituras de mortalidade foram realizadas com auxílio de estereoscópio após 24 h de exposição, com exceção do Amitraz após 48 h de exposição. Todos os bioensaios foram realizados em câmara biológica com temperatura, umidade e fotoperíodo controlados a 27ºC, UR≥80% e luz 12:12, respectivamente. Nas avaliações larvais foram encontrados quadro de resistência para Cipermetrina, Cipermetrina + Butóxido de Piperolina, Deltametrina, Permetrina e Amitraz na 24 h apresentando mortalidades médias ($\overline{MX}$) de 58,36%; 71,36%; 48,7%; 64,5% e 77,8%, respectivamente. Na 48 h de exposição ao Amitraz a $\overline{MX}$ das larvas foi de 88%, apresentando um quadro de possível resistência. As larvas de *R. sanguineus* apresentou o efeito deletério a diferentes produtos acaricidas.

Palavras chave: *Rhipicephalus sanguineus*, acaricidas, resistência, carrapatos, Ixodidae.

[1] Aluno de Mestrado do Programa de Pós-graduação do IPTSP/UFG e Bolsista da FUNAPE-UFG, LAMV, IPTSP, UFG, walmirton@gmail.com; [2] Bolsista de Iniciação Tecnológica Industrial do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), LAMV, IPTSP, UFG;[3*] Professor do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Lababoratório de Artropodologia Médica e Veterinária (LAMV), Setor de Entomologia, , Universidade Federal de Goiás- UFG, 74.605-050, C. postal 131, Goiânia, GO, fernandes@pequisador.cnpq.br.

Abstract- *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) is one of the most important ectoparasite of the dog home. This ixodid can cause diseases such as erliquiosis, babesiosis and spotted fever. It was evaluated the susceptibility of this tick larvae to 14 different formulations acaricides. The larvae obtain age of 14 to 21 days in fasting, which were obtained from engorged female without waste acaricides. To achieve the bioassays ace larvae were contained in paper filter, previously impregnated with 2 mL of acaricides solutions for the test group and distilled water for the control group. The readings of death were made with the aid stereomicroscope after 24 h of exposure, except for Amitraz 48 h of exposure. All bioassays were held in camera with biological temperature, humidity and controlled photoperiod to 27ºC, UR≥80% and light 12:12, respectively. In the evaluations were found larval framework of resistance to Cypermethrin, Cypermethrin + Piperonyl Butoxide (PBO), Deltamethrin, Permethrin and Amitraz in 24 h presenting mortalities average ($\overline{MX}$) of 58.36%, 71.36%, 48.7%, 64.5% and 77.8%, respectively. In the 48 h of exposure to Amitraz of $\overline{MX}$ the larvae was 88%, presenting a framework for possible resistance. The *R. sanguineus* larvae presented the deleterious effects of different products acaricides.

Key words: *Rhipicephalus sanguineus*, acaricides, resistance, ticks, Ixodid.

Introdução

Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) é um carrapato de ciclo trioxeno. Tem origem possivelmente africana, apresentando, nos dias atuais, distribuição cosmopolita. Este carrapato encontra-se amplamente distribuído por todo país, em alta densidade populacional, em cães domésticos em ambientes sinantrópicos freqüentados pelos mesmos. Parasita principalmente do cão doméstico, sobretudo em áreas urbanizadas, este ixodídeo pode, contudo parasitar outros mamíferos, aves e répteis, o que em parte explica sua grande dispersão (Flechtmann 1973; Fernandes 2000; Barros-Battesti et al. 2006).

Pesquisas têm demonstrado que este carrapato, principalmente em suas formas imaturas, tem o hábito de se alimentar do homem mais comumente do que antes se supunha (Clarck et al. 1996; Felz et al. 1996; Harrison et al. 1997; Dantas-Torres et al. 2005, 2006), propiciando a transmissão de enfermidades emergentes ao homem, tais como babesiose, erliquiose e febre maculosa (Hoogstraal et al. 1967; Burgdorfer et al. 1975; Harrison et al. 1997; Andereg and Passos 1999; Costa and Botelho 2005).

No Brasil os primeiros estudos de Brasil por *R. sanguineus* à acaricidas químicos sintéticos, inclusive à piretróides, foram feitos em Goiás, no Laboratório de Artropodologia Médica e Veterinária (LAMV), do IPTSP, UFG, por Fernandes (2000). Em outros países, resistência de *R. sanguineus* a organofosforados e carbamatos (Polyakov and Smirnova 1976), organofosforados e arsenicais (Gladney and Dawkins 1976), organofosforados e organoclorados (Belot and Mishra 1979) foi também notificada. Na Venezuela, baixa eficiência de cumafós sobre fêmeas adultas foi observada (Conrado and Mujica 1998). No Panamá, *R. sanguineus* mostrou-se resistente a este produto, assim como ao DDT, amitraz e à permetrina (Miller et al. 2001).

Diversos fatores são apontados como atuantes no aumento da pressão seletiva sobre a população de carrapatos, podendo acelerar o processo de desenvolvimento de resistência acaricida nestes parasitos. Os principais fatores constituem na utilização errônea por parte dos aplicadores, empregando as formulações de maneira inadequada, não respeitando as dosagens recomendadas e intervalos seguros de aplicação ou ainda, utilizando produtos de baixa qualidade, formulados de forma inadequada (FAO 2003).

Os mecanismos de desenvolvimento de resistência acaricida incluem desde fatores genéticos mutacionais até fatores fisiológicos. Aumento da detoxificação por enzimas do complexo Citocromo P-450 e diminuição da sensibilidade da enzima

acetilcolinesterase (resistência a organofosforados). Mutações em canais de sódio e aumento da atividade enzimática das esterases (resistência a piretróides e ao DDT). Resistência à formamidina amitraz também deriva-se de um aumento da atividade das enzimas esterases, embora acredita-se que existam também mecanismos moleculares ainda não esclarecidos relacionados a resistência por parte dos carrapatos a essa base acaricida (Miller et al. 2001; Foil et al. 2004).

Ainda são poucos os trabalhos feitos relacionando o índice de resistência aos acaricidas atuais, no qual o presente trabalho vem demonstrar a relação destes acaricidas sobre *R. sanguineus*, fomentando medidas de controle mais eficientes, reduzindo a utilização errônea destes produtos e diminuindo assim o impacto ambiental.

Este trabalho teve como objetivo verificar a possibilidade de resistência a 14 diferentes bases acaricidas para as larvas de *R. sanguineus*.

2. Material e Métodos

Obtenção das larvas do ixodídeo: Teleóginas de *R. sanguineus* foram coletadas em ambientes freqüentados por cães naturalmente infestados, provenientes de diversos bairros de Goiânia. As teleóginas coletadas foram armazenadas em frascos de vidro e encaminhadas até ao LAMV. Estas foram lavadas com água destilada e secas em papel toalha. Com o auxílio de um estereoscópio, foram selecionadas somente teleóginas em perfeitas condições anatômicas e de motilidade. Para realizarem a oviposição, estas foram aderidas dorsalmente por uma fita dupla face a lâminas de vidro, inversamente dispostas sobre a base de uma placa de petri. Em seguida foram acondicionadas em incubadoras do tipo B.O.D., climatizadas a 27º±1ºC, UR>80% e fotoperíodo de 12:12 h. Para obtenção de larvas com idade uniforme, os ovos eram diariamente recolhidos e reunidos em um único tubo de polietileno (3 x 9 cm) com tampa enroscável, constituindo um *pool* de ovos. Após a eclosão, cada tubo de polietileno foi vedado com fita crepe para evitar o escape de larvas (Fernandes 2000, 2001; Fernandes et al. 2005, 2007; Fernandes and Freitas 2007).

Preparação das soluções a serem testadas: Foram avaliados 14 formulações acaricidas diferentes, usualmente comercializadas (Tabela 1). Os bioensaios foram feitos em quadruplicata. Para cada um destes foram preparadas novas soluções estoque, em diversas concentrações, de acordo com o acaricida a ser avaliado. Da solução estoque, soluções com menores concentrações, incluindo às concentrações recomendada pelo fabricante, foram obtidas por diluição em água destilada, objetivando a avaliação dos acaricidas.

Bioensaios para avaliação da sensibilidade larval: Empregou-se a metodologia de papéis impregnados, também conhecida como *larval packet test (lpt)*, desenvolvida por Fernandes and Freitas (2007) a partir de métodos previamente descritos, principalmente os da FAO (1995, 2004), Fernandes (2000, 2001), Fernandes et al. (2005, 2007). Estas metodologias foram adaptadas objetivando o incremento da praticidade e a diminuição de custos, sem contudo, perder da eficiência.

Os bioensaios foram realizados em uma câmara climatizada a 27º±1ºC, UR>80%, com fotoperíodo natural de aproximadamente 12 h, especialmente construída para estudos com acaricidas. Apenas larvas provenientes de tubos com *pool* de ovos com as maiores taxas de eclodibilidade (> 90%) foram utilizadas nos bioensaios.

Selecionado o tubo, para evitar a fuga de larvas, este foi colocado sobre um frasco de vidro invertido (10 cm x 5 cm), disposto no centro de uma placa de petri com água, sendo então aberto. Do tubo, uma alíquota das larvas foi cuidadosamente içada com um pincel n° 4, umedecido com água destilada e, então disposta ao centro de uma folha de papel branco (21 cm x 29,7 cm), fixada sobre a bancada com fita adesiva do tipo crepe. Sobre as extremidades desta folha de papel foi fixada uma fita adesiva dupla face, objetivando evitar a fuga de larvas. Apenas larvas com boa motilidade foram selecionadas para os bioensaios (Fernandes and Freitas 2007).

Para a contenção e exposição das larvas às soluções testadas nos bioensaios, foram utilizados envelopes de papel filtro (≈ 327 cm^2) contendo microporos, para prover melhor aeração em seu interior. As superfícies internas de cada envelope foram impregnadas com 2 mL de cada solução testada, distribuídos uniformemente com auxílio de uma pipeta. Os envelopes foram deixados em repouso durante 6 h, para aderência dos cristais formados pelos acaricidas ao papel-filtro. O grupo teste foi submetido a envelopes impregnados com as soluções acaricidas. O grupo controle foi composto por envelopes sem tratamento e envelopes umedecidos internamente com 2 mL de água destilada. Os bioensaios foram realizados em quadruplicata, em datas variadas. Em cada bioensaio (réplica) foram preparados quatro envelopes para cada concentração testada.

Cerca de 50 ou mais larvas eram agilmente içadas do papel branco fixado sobre a bancada, com um pincel umedecido com a solução teste (grupo teste) ou com água destilada (grupo controle) e colocadas ao fundo de cada envelope. Os envelopes eram imediatamente vedados, dobrando sua abertura, uma borda de 1 cm e lacrando-a mesma com auxílio de um prendedor metálico. Os envelopes eram então dependurados em suportes, de forma a ficarem suspensos ao ar, sem contato com nenhuma superfície, a fim de evitar perdas de solução ou contaminação. Sob os envelopes nas bancadas eram dispostos umidificadores para manter adequada a climatização da câmara biológica (Fernandes and Freitas 2007).

Para a leitura da mortalidade, os envelopes foram abertos e inspecionados ao estereoscópico nas 24 h de exposição ao acaricida. Apenas envelopes com a Formamidina (Amitraz) e Formamidina + Organofosforado (Amitraz + Clorpirifós) foram inspecionados em dois horários de observação, após 24 e 48 h de exposição, em atendimento às recomendações da FAO (2004). Para possibilitar a comparação dos resultados com os de outros autores, os percentuais médios de mortalidade ($\overline{MX}$) foram

calculados considerando mortas também larvas sem capacidade locomotora (FAO 1995, 2004).

Diretrizes preconizadas para o diagnóstico do status de resistência acaricida: No presente estudo a interpretação dos resultados de mortalidade para diagnóstico do status de resistência e/ou susceptibilidade considerou os critérios preconizados pela Organização Mundial de Saúde (WHO 1970, 1998): acaricidas que promoveram $\overline{MX}$ < 80% das larvas do carrapato, pela concentração recomendada pelo laboratório fabricante, foram considerados ineficientes, caracterizando o *status de resistência*. Acaricidas que ocasionaram $\overline{MX}$ ≥ 80% caracterizaram um *status de susceptibilidade*. Contudo, acaricidas que determinaram $\overline{MX}$ entre 80% a 97%, configuraram um *status de provável desenvolvimento de resistência*. Além destes critérios, considerou-se também as diretrizes do Ministério da Agricultura Brasileiro que preconizou 95% como o mínimo de $\overline{MX}$ obtida pela ação de um acaricida, para que este possa ser recomendado para controle de carrapatos. Em síntese, no presente trabalho adotou-se os seguintes critérios para interpretação do desempenho dos acaricidas e/ou da sensibilidade da cepa testada (Tabela 1)

Análises estatisticas: Foi utilizado ANOVA seguida do teste Scott-Knott, para verificar diferenças significativas entre as mortalidades determinadas pelos acaricidas em suas respectivas dosagens recomendadas pelo fabricante, para tal utilizou-se o programa *Assistat* v. 7.4. As concentrações letais (CLs), especialmente CL_{50} e CL_{99} com seu respectivos intervalos de confiança a 95% (IC 95%) e seus coeficientes de determinação (R^2) foram determinadas para os produtos que se mostraram ineficiente, interpolando-se os índices de mortalidades proporcionados pelas diferentes concentrações testadas, por meio da análise de *Probit*, empregando o "*Sistema para Análises Estatísticas e Genética"* (SAEG® *software* v. 9.0)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As larvas de *R. sanguineus* responderam de forma heterogênia frente aos quatorze produtos analisados (ANOVA: $F_{14, 30} = 9,23$; $p<0,01$). Os produtos analisados Cipermetrina, Cipermetrina + Butóxido de Piperolina (PBO), Deltametrina, Permetrina e Amitraz (24 h de exposição) apresentaram $\overline{MX}$ inferior a 80% caracterizando quadro de resistência por parte das larvas de *R. sanguineus*. É importante salientar que o Amitraz mesmo não caracterizando um quadro de resistência na 48 h de exposição, determinou um quadro de possível resistência apresentando $\overline{MX}$ = 88% (WHO 1998). Os produtos restantes (Diclorvós + Cipermetrina, Clorfenvinfos + Diclorvós + Alquil + Xilol, Clorpirifós + Cipermetrina hi-cis, Fipronil, Clorpirifós, Cipermetrina + Clorpirifós + Citronelal, Triclorfone + Cumafós + Ciflutrina e Diazinon) avaliados não se verificou resistência das larvas de *R. sanguineus* (Tabela 2) (WHO 1998).

Os produtos que se mostraram ineficazes tiveram as suas respectivas concentrações letais calculadas. As dosagens ideais para matar 99% (CL_{99}) das larvas de *R. sanguineus* referentes aos produtos Deltametrina, Cipermetrina, Permetrina, Cipermetrina + PBO e Amitraz (24 e 48 horas de exposição), foram 35,2; 21; 7,85; 3; 3,65;1,55 vezes, respectivamente, maiores do que as dosagens recomendadas pelos fabricantes (Tabela 3). É importante salientar, no entanto, que a posologia proposta pelos fabricantes dos carrapaticidas deve ser sempre seguida de forma rigorosa no tratamento dos bovinos, a fim de evitar intoxicações destes hospedeiros e do homem, aplicador do carrapaticida nesses animais. Para verificar o grau de relação entre as concentrações e a mortalidade foi calculado o coeficiente de determinação (R^2) que representa o resultado da variação existente entre as variáveis independentes (Concentrações) e varáveis dependentes (Mortalidade), ou seja, quanto mais próxima de 0,1 (100%), maior será a relação de homogeneidade das concentrações com as respectivas mortalidades (Atkins et al. 1973). Ao analisar os valores de R^2 obtidos verificou-se que o aumento das concentrações dos acaricidas, Deltametrina, Cipermetrina, Permetrina, Cipermetrina + PBO e Amitraz, relativo a 24 h de exposição, interfere em 92,87%; 92,71%; 86,72%; 82,85%; 94,81%, respectivamente, na mortalidade das larvas de *R. sanguineus*, em 48 h de exposição referente ao Amitraz foi de 97,86% (Tabela 3 e Figura1).

Observou-se no presente trabalho a ineficácia de todos os produtos compostos apenas por piretróides. Isto torna-se um obstáculo para a escolha de carrapaticidas menos tóxicos para os cães e para o homem para combate das cepas testadas, visto que os piretróides são considerados, dentre os demais grupos toxicológicos, os de menor toxicidade para mamíferos e, portanto, de utilização mais segura. Estes dados são concordantes aos de Fernandes (2001), que já havia observado o desenvolvimento de resistência acaricida aos piretróides deltametrina ($\overline{MX}$ = 78%) e cipermetrina ($\overline{MX}$ = 77,6%) por larvas de *R. sanguineus* provenientes de cepas do município de Goiânia, Goiás. Este autor também observou na época um provável desenvolvimento de resistência ao piretróide permetrina ($\overline{MX}$ = 86,2%), ora confirmado com os resultados do presente trabalho.

O produto a base de fipronil apesar de ter demonstrado eficiência acaricida, apresenta como obstáculo ao seu uso o custo muito elevado. O carrapaticida contendo cumafós, ou a associação de Clorpenvinfos e Diclorvós, apesar de eficientes, deveriam ser evitados por sua alta toxicidade aos mamíferos, caracterizados como altamente perigosos pela WHO (2005), e acúmulo residual na cadeia alimentar e meio ambiente (Balluz et al. 2001; Sogorb and Vilanova 2002). No entanto, produtos com formulações compostas por associações de bases acaricidas, organofosforados e piretróides, mostraram-se, como uma alternativa razoável para o controle químico, uma vez constatado resistência às formulações contendo apenas piretróides. Isso porque determinaram a $\overline{MX}$ de 100% das larvas de forma menos tóxica do que as formulações constituídas exclusivamente por organofosforados, além de apresentarem um custo acessível. Estes resultados são concordantes ao relatado pela FAO (2003), que mostrou os diferentes mecanismos de ação e metabolismo dessas duas classes de acaricidas, promovendo uma potencialização da ação do piretróide pela presença do organofosforado (FAO 2003).

O crescente número de registros de ineficácia dos acaricidas químicos comerciais em conseqüência ao desenvolvimento de resistência dos carrapatos a diversas bases acaricidas como os piretróides, formamidinas, organoclorados e organofosforados tem sido uma realidade no Brasil, na América Latina e em vários outros países (Fernandes 2001; Miller et al. 2001; FAO 2003, 2004).

Casos de resistência por parte dessa espécie a diversas bases acaricidas já foram notificados, com destaque aos piretróides Cipermetrina, Deltametrina e Permetrina, os quais foram também caracterizados como ineficazes no presente estudo. Pesquisas de

Fernandes (2000, 2001) já apresentavam casos de resistência de *R. sanguineus* a Cipermetrina, Deltametrina e Permetrina no estado de Goiás, quadro este condizente com os resultados encontrados na presente pesquisa, o que vem a ratificar a ineficácia desses acaricidas nestas concentrações para o controle de *R. sanguineus*. Entretanto, diversos estudos, (Bicalho et al. 2001; Silva et al. 2005; Estrada-Peña 2005) tem apresentado o amitraz como uma base acaricida de excelente atividade no controle do carrapato canino, fato este destoante do encontrado em nossos estudos que observou-se uma ineficácia do produto em sua 24 h de exposição e uma baixa eficiência após 48 h de exposição, resultados estes concordantes com os apresentados por Miller et al. (2001) com cepas de *R. sanguineus* oriundas do Panamá, resistentes a permetrina e ao amitraz.

Todos os resultados indicam um quadro bastante preocupante da perda de eficiência do controle químico, que é ainda hoje o método mais utilizado para combate ao carrapato do cão. Outra estratégia de controle alternativo aos acaricidas químicos sintéticos é a vacinação anti-carrapato. No mercado encontram-se vacinas (Bm86) com antígenos relacionados a proteínas de membrana intestinais do carrapato do boi, no entanto, apresentam baixa letalidade aos estádios adultos (20 - 30%) e, ainda são de custo elevado para o produtor. Estes fatores têm dificultado a sua viabilidade prática em países da América Latina (FAO 2003). Contudo, pesquisas têm apontado novos caminhos para o desenvolvimento de vacinas mais eficientes do que as disponíveis no mercado, empregando a inibição de genes responsáveis pela síntese de agentes anti-hemostáticos presentes na saliva dos carrapatos, essenciais para o sucesso alimentar e sobrevivência do carrapato (Martitz-Olivier et al. 2007*)*, ou através da interferência no RNA para métodos de manipulação genética de carrapatos (De la Fuente et al. 2007).

Ainda de forma alternativa ao controle químico convencional, destacam-se resultados promissores obtidos com o emprego de substâncias organonaturais no controle de ácaros de importância médica e veterinária, inclusive no de *R. sanguineus*. Substâncias botânicas com propriedades acaricidas vêm ao encontro da necessidade de compostos menos poluentes e biodegradáveis, o que acarreta na diminuição à agressão ao meio ambiente exercida pelos acaricidas químicos convencionais e, proporcionam uma conscientização ambiental da necessidade de preservação dos recursos naturais (Fernandes et al. 2007).

Tabela 1. Critérios para interpretação do desempenho dos acaricidas químicos sintéticos referente à sensibilidade das larvas de *R. sanguineus* e o diagnóstico de utilização.

Mortalidade média (%)	**Status das larvas de *R. sanguineus* submetidas aos acaricidas químicos**	**Diagnóstico dos acaricidas químicos para as larvas de *R. sanguineus***
< 80	Resistência	Ineficaz – não recomendado.
80 – 97	Provável resistência ou desenvolvendo resistência	Tolerável – ainda utilizável.
≥ 97	Susceptível	Eficaz – recomendável.

Tabela 2. Compostos ativos, grupos químicos e mortalidades das larvas de *R. sanguineus* em suas respectivas dosagens recomendadas.

Composto Ativo	Grupo Químico	Mortalidade Média (%)
Diclorvós + Cipermetrina	Organofosforado + Piretróide	96,00 a
Clorfenvinfos + Diclorvós + Alquil + Xilol	Organofosforado	100 a
Clorpirifós + Cipermetrina hi-cis	Organofosforado + Piretróide	100 a
Cipermetrina	Piretróide	58,36 c
Amitraz 24 horas	Formamidina	77,80 b
Amitraz 48 horas	Formamidina	88,00 a
Fipronil	Fenilpirazolona	100 a
Cipermetrina + Butóxido de piperolina	Piretróide + Sinergista	71,63 b
Clorpirifós	Organofosforado	100 a
Cipermetrina + Clorpirifós + Citronelal	Piretróide + Organofosforado + Sinergista	100 a
Deltametrina	Piretróide	48,7 c
Triclorfone + Cumafós + Ciflutrina	Organofosforado + Piretróide	100 a
Diazinon	Organofosforado	100 a
Permetrina	Piretróide	64,50 b
Clorpirifós + Amitraz 24 horas	Organofosforado + Formamidina	100a
Clorpirifós + Amitraz 48 horas	Organofosforado + Formamidina	100a

Letras iguais na mesma coluna indicam ausência de diferença significativa nas mortalidades encontradas entre os produtos em suas respectivas concentrações recomendadas pelo fabricante (ANOVA seguido de teste de Scott-Knott α=5%).

Tabela 3. Produtos que demonstraram resistência por parte das larvas de *R. sanguineus*, com suas respectivas concentrações (%) recomendadas pelo fabricante, CL_{50},CL_{99}, R^2.

Produto	Concentração recomendada (%)	CL_{50} (IC 95%)	CL_{99} (IC 95%)	R^2
Deltametrina	0,2	0,06 (0,05 - 0,07)	7,04 (3,64 - 17,4)	0,9287
Cipermetrina	0,1	0,06 (0,05 - 0,07)	2,1 (1,22 - 4,51)	0,9271
Permetrina	0,2	0,14 (0,13 - 0,17)	1,57 (1,00 - 3,11)	0,8672
Cipermetrina + PBO	0,1	0,062 (0,05 - 0,067)	0,3 (0,24 - 0,40)	0,8285
Amitraz (24h)	0,2	0,025 (0,02 - 0,03)	0,73 (0,52 - 1,13)	0,9481
Amitraz (48 h)	0,2	0,06 (0,06 - 0,07)	0,31 (0,26 - 0,4)	0,9786

CL_{50}: Concentração de letalidade 50%; CL_{99}: Concentração de letalidade 99%; IC: Intervalo de confiança; R^2:Coeficiente de determinação;

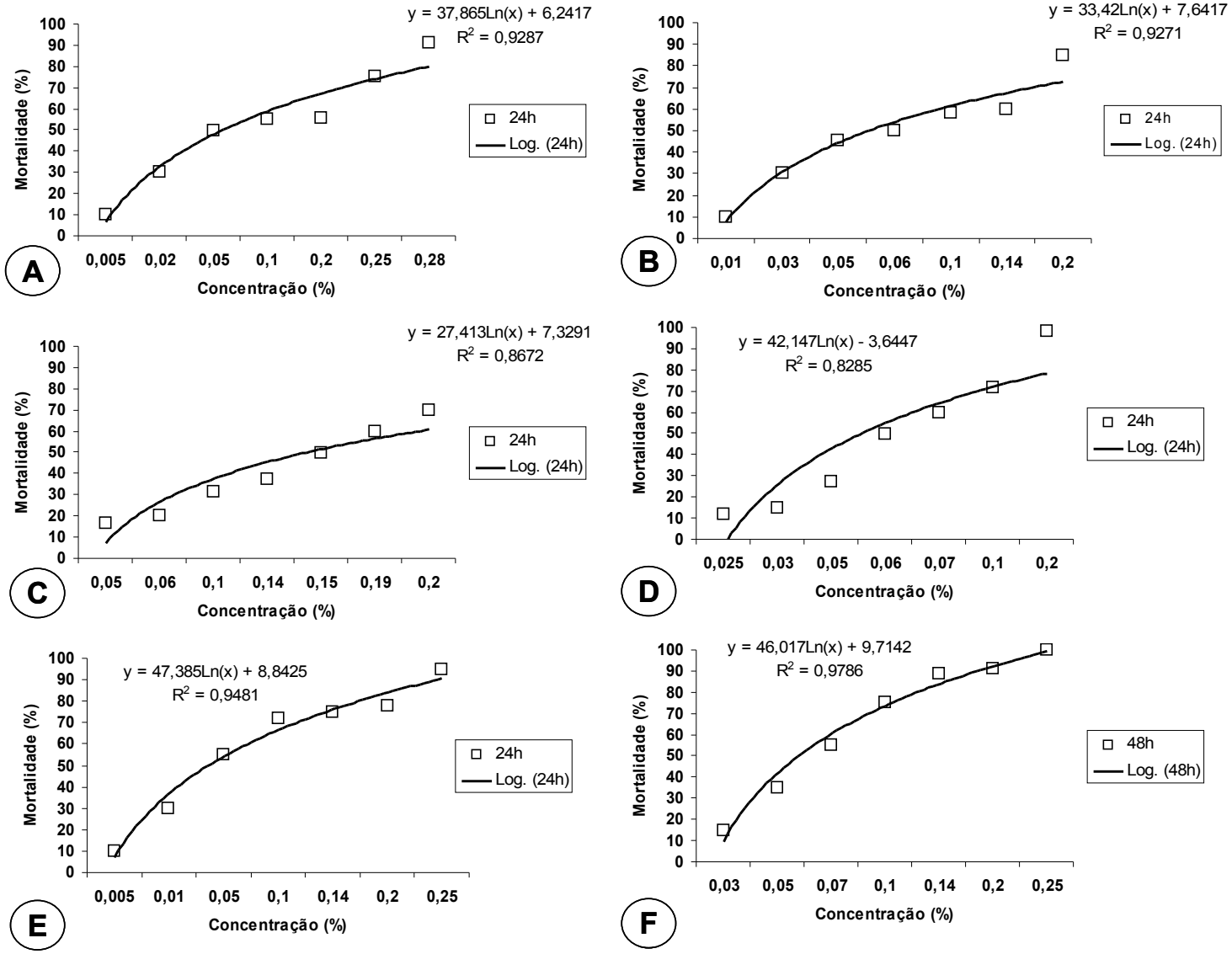


Figura 1. Representação gráfica da ação dos diferentes acaricidas sobre as larvas de *R. sanguineus*. (A) Deltametrina, (B) Cipermetrina, (C) Permetrina, (D) Cipermetrina + PBO, (E) Amitraz (24h) e (F) Amitraz (48 h).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Atkins EL, Greywood EA, Macdonald RL (1973) Toxicity of pesticitedes and other agricultural chemical to honey bees: laboratory studies. Davis: University of California. (Technical bulletin, M-16) 36 p.

Andereg PI, Passos LMF (1999) Erliquiose canina-revisão. Clínica Veterinária 12: 31-38.

Balluz L, Moll D, Diaz-Martinez MG, Colindres JEM, Malilay J (2001) Environmental pesticide exposure in Honduras following hurricane mitch. Bull. World Health Organ 79: 288-295.

Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH 2006. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. Vox/ICTTD-3/ Butantan, São Paulo. 223 pp.

Belot J, Mishra G (1979) Toxicité de huit produits acaricides différents sur le tiques de l'espèce *Rhipicephalus sanguineus*. Recueil de Médicine Vétérinaire 155: 869-871.

Bicalho KA, Ferreira F, Borges LMF, Ribeiro MFB (2001) *In vitro* evaluation of the effects of some acaricides on life stages of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 53: 548-552.

Burgdorfer W, Sexton DJ, Gerloff RK, Anacker RL, Philip RN, Thomas LA (1975) *Rhipicephalus sanguineus*: vector of a new spotted fever group *Rickettsia* in the united states. Infection and Immunity12: 205-210.

Clarck KL, Wills W, Teders SH, Williams DC (1996) Ticks removed from dogs and animal care personal in Orangeburg County, south Carolina. Journal of Agromedicine 3: 45-55.

Conrado A, Mujica F (1998) Efficacy of different acaricides in the control of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). Boletin de la Direction de Malariologia y Saneamiento Ambiental 38: 119-122.

Costa JO, Botelho JR (2005) Classe Arachnida. In: Neves DP, Melo AL, Genaro O, Linardi PM Parasitologia Humana, 11. ed. Atheneu, São Paulo. 413-421.

Dantas-Torres F, Faustino MAG, Lima OCC, Acioli RV, (2005). Epidemiologic surveillance of canine visceral leishmaniasis in the municipality of Recife, Pernambuco. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 38, 444-445.

Dantas-Torres F, Figueredo LA, Brandão-Filho SP (2006) *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 39: 64-67.

De La Fuente J, Kocan KM., Almazán C, Blouin EF (2007). RNA interference for the study and genetic manipulation of ticks. Trends in Parasitology 23: 427-433.

Estrada-Peña A (2005) Comparative efficacy of Amitraz, Propoxur, Fipronil and Deltamethrin against the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. Revue de Médecine Vétérinaire 156: 125-128.

FAO (Food and Agriculture Organization of The United Nations) (1995) Acaricide resistance test kit instructions for use, World Acaricide Resistance Reference Centre (WARRC), Edition 11/1995, Berlin, Germany.

FAO (Food and Agriculture Organization of The United Nations) (2003) Resistencia a los antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina. Producción y Sanidad Animal 157: 55 pp.

FAO (Food and Agriculture Organization of The United Nations) (2004) Module 1: Ticks. In: Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants, Rome.

Felz MW, Durden LA, Oliver Jr JH (1996) Ticks parasitizing humans in Georgia and South Carolina. Journal of Parasitology 82: 505-508.

Fernandes FF (2000) *In vitro* activitty of permethrin, cipermethrin and deltamethrin on larvae of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae). Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 52: 621-626.

Fernandes FF (2001) Toxicological effects and resistance to pyrethroids in *Boophilus microplus* from Goiás, Brazil. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 53: 538-543.

Fernandes FF, Castro Jr. LC, Silva IG (2005) Larvicidal potential of *Sapindus saponaria* to control of the cattle tick, *Boophilus microplus*. Pesq. Agropec. Bras. 39: 000-009.

Fernandes FF, Leles RN, Silva IG (2007) Larvicidal Activity of *Sapindus saponaria* (Sapindaceae) against *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 57: 000-006.

Fernandes FF, Freitas EPS (2007) Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Vet. Parasitol. 147: 150–154.

Flechtmann CHW (1973). Ácaros de Importância Médico-veterinária, Nobel, São Paulo, 192 pp.

Foil LD, Coleman P, Eisler M, Frangoso-Sanchez H, Garcia-Vasquez Z, Guerrero FD, Jonsson NN, Langstaff IG, Li AY, Machila N, Miller RJ, Morton J, Preutt JH, Torr S (2004) Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. Vet. Parasitol. 125: 163-181.

Gladney WJ, Dawkins CC (1976) The brown dog tick: laboratory tests of acaricides. Southwestern Entomologist 1: 184-189.

Harrison BA, Engber BR, Apperson CS (1997) Ticks (Acari: Ixodidae) uncommonly found biting humans in North Carolina. Journal of Vector Ecology 22: 6-12.

Hoogstraal H (1967) Ticks in relation to human diseases caused by *Rickettsia* species. Annual Review of Entomology 12: 377-420.

Maritz-Olivier C, Stutzer C, Jongejan F, Neitz AWH, Gaspar ARM (2007). Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics. Trends in Parasitology 23: 397-407.

Miller RJ, George JE, Guerrero F, Carpenter L, Welch JB (2001) Characterization of acaricide resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) collected from the Corozal Army Veterinary Quarantine Center, Panama. Journal of Medical Entomology 38: 298-302.

Polyakov DK, Smirnova OI (1976) Resistance of ticks to organophosphorus and carbamate acaricides. Veterinary Bulletin 46: 324.

Silva WW, Athayde ACR, Araújo GMB, Santos VD, Silva Neto AB (2005) Resistência de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* e *Riphicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE) a carrapaticidas no semi-árido paraibano: efeito da cipermetrina e do amitraz. Agropecuária Científica no Semi-Árido 1: 59-62.

Sogorb MA, Vilanova E (2002) Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydeolysis. Toxicology letters. 128, 215-228.

WHO (Word Health Organization) (1970). Insecticide Resistance and Vector Control. WHO Technical Report Series, Geneva.

WHO (Word Health Organization) (1998) Test procedures for Insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio – efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. WHO Report of the WHO informal consulation, Geneva 46 pp.

WHO (World Health Organization) (2005) The WHO recommended classification of pesticides by hazard and Guidelines to classification 60 pp.

6- Manuscrito2: Avaliação do potencial larvicida dos óleos essenciasis de *Piper hispidinervum* C.DC. (Piperaceae) e *Carapa guianensis* AUBLET. (Meliaceae) para controle de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae)

Manuscrito a ser submetido à revista Veterinary Parasitology: Qualis A Internacional, indexado no Web of Science. Fator de impacto: 1,9.

Avaliação do potencial larvicida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C.DC. (Piperaceae) e *Carapa guianensis* AUBLET (Meliaceae) para controle de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae)

Walmirton Bezerra D'Alessandro [1]; Murilo Fazolin [2]; Edméia de Paula e Souza Freitas[3]; Fernando de Freitas Fernandes [4*]

Resumo- *Amblyomma cajennense*, comumente conhecido por "carrapato-estrela", é um ixodídeo heteroxeno cosmopolita que parasita mamíferos, aves, répteis e, preferencialmente eqüinos em áreas rurais. Possui grande importância médica e veterinária por ocasionar anemias severas, prurido e irritação em seus hospedeiros, além de poder transmitir ao homem a febre maculosa. A principal medida de controle para este ixodídeo baseia-se na utilização de acaricidas químicos sintéticos (carrapaticidas comerciais). Todavia, resistência a estes produtos por *A. cajennense* têm sido diagnosticada, no exterior e no Brasil, suscitando estudos para desenvolvimento de novas estratégias de controle. Objetivou-se no presente trabalho avaliar o potencial larvicida dos óleos essenciais de *Carapa guianensis* e *Piper hispidinervum* na prospecção de acaricidas organonaturais, para controle de *A. cajennense*. Teleóginas de *A. cajennense* foram coletadas em cavalos oriundos de propriedades rurais de diferentes bairros e municípios circunvizinhos de Goiânia e foram mantidas em incubadoras do tipo B.O.D. a 27±1ºC, UR≥80% e fotoperíodo de 12 h, para realizarem a oviposição. Bioensaios foram realizados em quadruplicata, utilizando larvas com idade de 14 a 21 dias. As larvas de *A. cajennense* foram expostas em envelopes de papel filtro as diferentes concentrações dos óleos essenciais testados. O grupo controle foi submetido apenas à água destilada e solventes (DMSO para *C. guianensis* e acetona para *P. hispidinervum*). A mortalidade foi observada ao estéreoscópio após 24 h e 48 h de exposição. Mortalidade significativa de larvas não foi observada no grupo controle. Concentrações letais (CLs) foram calculadas através de análise estatística de *Probit*. A CL_{50} e CL_{99} referente a 24 e 48 h de exposição ao óleo essencial de *P. hispidinervum* foi de 4218 ppm (≈0,42%) e 4592 ppm (≈0,45%) e

8855 ppm (≈0,88%) e 10687 ppm (≈1%), respectivamente. Ao analisar a mortalidade na 24 h de exposição, verificou-se mortalidade não superior a 10% na concentração de 350000 ppm, para o óleo essencial de *C. guianensis*. A CL_{50} e CL_{99} observado na 48 h de exposição foram de 73878 ppm (≈7,3%) e 454538 ppm (≈45%). Atividade larvicida dos óleos essenciais de *C. guianensis* e *P. hispidinervum* foi constatada sobre *A. cajennense. P. hispidinervum* demonstrou um potencial acaricida superior à *C. guianensis*, propiciando a obtenção de maiores índices médios de mortalidade por concentrações menores. Constatou-se o potencial destas plantas na prospecção de acaricidas botânicos, de menor impacto ambiental, para serem utilizados como medida alternativa nas estratégias de controle deste carrapato.

Key Words: *Amblyomma cajennense*, *Piper hispidinervum*, *Carapa guianensis*, acaricidas botânicos, óleos essências.

[1] Aluno de Pós-Graduação do Programa de Medicina Tropical IPTSP/UFG, Bolsista da FUNAPE-UFG, LAMV, IPTSP, UFG, walmirton@gmail.com;

[2] Pesquisador Doutor do Centro de Pesquisa Agroflorestal (CPA) da Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

[3] Bolsista de Iniciação Tecnológica Industrial do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), LAMV, IPTSP, UFG;

[4*] Professor do Laboratório de Artropodologia Médica e Veterinária (LAMV), Setor de Entomologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás- UFG, 74.605-050, C. postal 131, Goiânia, GO, fernandes@pequisador.cnpq.br.

Abstract- *Amblyomma cajennense*, commonly known as "tick-star" is a cosmopolitan ixodid heteroxenous parasite that mammals, birds, reptiles and, preferably horses in rural areas. It has great importance for medical and veterinary cause severe anemia, itching and irritation in your hosts, and they could pass to humans spotted fever. The main measure of control for this ixodídeo based on the use of synthetic chemical acaricides. However, resistance to these products by *A. cajennense* have been diagnosed, abroad and in Brazil, prompting studies to develop new strategies of control. The objective was to work in this larvicidal assess the potential of essential oils of *Carapa guianensis* and *Piper hispidinervum* in prospecting for acaricides organonaturais for control of *A. cajennense*. Engorged female of *A. cajennense* were collected on horses from rural farms of different neighborhoods and surrounding municipalities of Goiânia, were these kept in incubators type of B.O.D. to 27±1ºC, UR≥80% and photoperiod of 12 h, to conduct the oviposition. Bioessays were performed in for replicate using larvae aged from 14 to 21 days. These were exposed on envelopes of paper filter the different concentrations of essential oils tested. The control group was referred to only distilled water and solvents (DMSO for *C. guianensis* and acetone for *P. hispidinervum*). The mortality was observed to stereoscope after 24 h and 48 h of exposure. Significant mortality of larvae was not observed in the control group. Concentrations lethal (CLs) were calculated through statistical analysis of *Probit*. A CL_{50} and CL_{99} referring to 24 and 48 h of exposure to essential oil of *P. hispidinervum* was 4218 ppm (≈ 0.42%) and 4592 ppm (≈ 0.45%) is 8855 ppm (≈ 0.88%) and 10687 ppm (≈ 1%). An analysis of mortality in 24 h of exposure, there was no mortality over 10% in the concentration of 350000 ppm (≈35%), for the essential oil of *C. guianensis*. The CL_{50} and CL_{99} observed in the 48 h of exposure was 73878 ppm (≈ 7.3%) and 454538 ppm (≈ 45%). Concentration more than 350000 ppm made up between 10% mortality, for the essential oil of *C. guianensis*. Larvicidal activity of essential oils of *C. guianensis* and *P. hispidinervum* was found on *A. cajennense*. *P. hispidinervum* demonstrated a potential acaricide higher than *C. guianensis*, leading to obtain higher rates of mortality average lower concentrations. It was the potential of these plants in the botanical exploration of acaricides, lower environmental impact, to be used as alternative measure of control strategies in this tick.

Key Words: *Amblyomma cajennense*, *Piper hispidinervum*, *Carapa guianensis*, acaricide botanical, essential oils.

1. INTRODUÇÃO

Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) é um carrapato trioxeno, que durante seu hematofagismo pode provocar danos diretos e indiretos ao seu hospedeiro. Os danos diretos incluem espoliação sangüínea, dermatites e em alguns casos até paralisia do animal, provocada por neurotoxinas liberadas pela saliva do carrapato durante sua alimentação. Os danos indiretos estão relacionados à transmissão de doenças como: Borreliose e Febre maculosa (Lemos et al., 2002; Fonseca et al., 2005; Mantovani et al., 2007). Recentemente, inúmeros de casos de Febre maculosa tem sido registrados em Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e, mais recentemente, em Santa Catarina (SVS/MS 2005).

Os acaricidas químicos sintéticos têm sido utilizados há décadas para o controle deste carrapato. Estudos demonstram que o uso indiscriminado destes produtos vem acarretando no desenvolvimento de resistência deste ectoparasito (Furlong and Martins, 2000; Fernandes, 2000). Este fato suscita o desenvolvimento de metodologias alternativas de controle, tais como o uso de extratos vegetais com potencial acaricida.

Os metabólitos (primários e secundários) encontrados em determinadas plantas agem como agentes protetores, inibindo ataques de insetos e infestações parasitárias (Simpson, 1995). Terpenos com atividade inseticida têm se mostrado como uma alternativa promissora ao controle químico, por ocasionar desde inibição no crescimento, maturação, reprodução e apetite de certos insetos, à mortalidade propriamente dita. A relação biológica entre a fisiologia dos artrópodes e a fisiologia e bioquímica de princípios ativos de plantas mostra-se cada vez mais merecedora de estudos (Viegas Jr., 2003).

Diversas plantas têm demonstrado potencialidade para o desenvolvimento de inseticidas e/ou acaricidas. *Melia azedarach*. L (Meliaceae) demonstrou ação larvicida sobre a traça do tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick, 1971) (Lepidopetera: Gelechiidae) (Brunherotto and Vendramim, 2001). *Copaifera reticulata* (Caesalpiniaceae) apresentou ação larvicida sobre *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Canestrine, 1887) (Acari: Ixodidae) (Fernandes and Freitas, 2007). *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae), *Dahlstedtia pentaphylla* Taub. (Leguminosae), e *Eucalyptus globulus* Labill. (Myrtaceae), também apresentaram ação letal sobre diferentes estádios do carrapato do boi *R.* (*B.*) *microplus* (Chagas et al., 2002; Pereira and Famadas, 2004; Fernandes et al., 2005a). *Piper hispidinervum* C.DC. (Piperaceae) e *Carapa guianensis* Aubl. (Meliaceae), plantas selecionadas para o presente estudo, demonstraram por sua vez promissora ação adulticida sobre o caruncho de cereais, *Sitophilus zeamais* (Motschulsky, 1855) (Coleoptera: Curculionidae) (Estrela et al., 2006) e ação larvicida como também de repelência, para o mosquito transmissor da dengue, *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) e A*edes albopictus* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) respectivamente (Miot et al., 2004; Silva et al., 2004, 2006). Estudos envolvendo efeitos toxicológicos destas plantas sobre o carrapato *R. sanguineus,* ainda não foram evidenciado na literatura científica.

Neste sentido, o presente trabalho propôs avaliar a ação dos óleos essenciais de *P. hispidinervum* e *C. guianensis*, em diferentes concentrações, sobre larvas *A. cajennense*, objetivando o desenvolvimento de medidas alternativas para controle deste vetor.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Teleóginas de *A. cajennense* foram coletadas em cavalos parasitados naturalmente em fazendas de diversas localidades do Estado de Goiás, nos municípios de Hidrolândia, Teresópolis e Goianápolis. As teleóginas coletadas foram armazenadas em frascos de vidro e encaminhadas ao Laboratório de Artropodologia Médica Veterinária (LAMV) da Universidade Federal de Goiás. Estas foram lavadas com água destilada e secas em papel toalha. Com o auxílio de um estereoscópio foram selecionadas somente teleóginas em perfeitas condições anatômicas e de motilidade (Fernandes, 2000). Para realizarem a oviposição, estas foram aderidas dorsalmente por uma fita dupla face à lâminas de vidro, inversamente dispostas sobre a base de uma placa de petri. Em seguida foram acondicionadas em incubadoras do tipo B.O.D., climatizadas a 27º±1ºC, UR>80% e fotoperíodo de 12 horas (Figura 1A). Os ovos eram recolhidos diariamente e reunidas em um único tubo de polietileno (3 x 9 cm) com tampa enroscável (Fig. 1 B). Após a eclosão, cada tubo de polietileno era então vedado com fita adesiva para evitar o escape de larvas (Fernandes and Freitas, 2007).

As folhas e os ramos secundários de *P. hispidinervum* foram transportadas ao Centro de Pesquisa Agroflorestal do Acre – Embrapa/Acre para processamento e obtenção de seu óleo (Fig. 1 C e D). No laboratório, a biomassa de *P. hispidinervum* foi triturada, submetida à secagem e posteriormente compactada em um destilador. A extração do óleo essencial foi feita por meio de arraste de vapor d'água, utilizando sistema de caldeira aquecida. A condensação foi realizada por refrigeração utilizando água a cerca de 25°C. Em seguida foi submetido ao processo de destilação (Pimentel et al., 1998). Amostras da semente de *C. guianensis* foram coletadas em áreas da Floresta Amazônica do município de Belém do Pará e encaminhadas ao laboratório de fitoquímica para a extração de seu óleo essencial, de forma semelhante à supracitada.

(Figura E e F), onde permaneceram em frascos de vidro âmbar, no dessecador, até a realização dos bioensaios.

Os bioensaios foram feitos em quadruplicata, para cada período de tempo analisado. Para cada bioensaio, uma nova solução estoque a 7000 ppm do óleo essencial de *P. hispidinervum* foi preparada, pesando em balança analítica com precisão 0,1mg e diluindo em acetona e água destilada. A partir da solução estoque outras soluções com menores concentrações (6500, 6000, 5000, 4000, 3000 e 2000 ppm) foram obtidas por diluição em água destilada, objetivando a determinação das CL_{50} e CL_{99}. O óleo essencial de *C. guianensis* foi dissolvido com Dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada para a preparação da solução estoque a 350000 ppm. Desta foram obtidas as concentrações de 300000, 250000, 200000, 100000, 50000 e 25000 ppm, por diluição em água destilada. A escolha do solvente baseou-se na verificação da eficiência do mesmo em pequenas concentrações, objetivando prover soluções mais homogêneas e de menor toxicidade para as larvas de *A. cajennense* (Fernandes et al., 2005a, 2005b).

Para a verificação da sensibilidade larval utilizou-se a metodologia de papéis impregnados desenvolvida pela FAO (2004), com adaptações (Fernandes et al., 2005a, 2005b; Fernandes and Freitas, 2007), objetivando conferir maior praticidade e diminuição de custos, sem prejuízo da eficiência. Foram utilizados nos bioensaios larvas com 14 a 21 dias de idade, oriundas de tubos com pool de larvas com as maiores taxas de eclosão (90 a 100%). Selecionado o tubo, para evitar a fuga de larvas, este era colocado sobre um frasco invertido, disposto no centro de uma placa de petri com água, sendo então aberto. As larvas eram içadas com um pincel umedecido, as quais eram dispostas sobre uma folha de papel aderida à bancada (Figura 1 G).

Os bioensaios foram realizados em uma câmara climatizada a 27º±1ºC, UR>80%, com fotofase natural de 12 h, especialmente construída para realização de bioensaios com acaricidas/inseticidas organonaturais. Para cada repetição uma nova solução estoque foi utilizada. Foram preparados quatro envelopes de papel-filtro para cada concentração testada. Estes foram impregnados com 2 ml da solução, uniformemente distribuídos em sua superfície interna (Figura 1 H). O grupo teste foi submetido a envelopes impregnados com as soluções botânicas. O grupo controle foi submetido a: 1. envelopes secos (sem tratamento); 2. envelopes com água destilada; e 3. envelopes impregnados com acetona ou DMSO, nas mesmas concentrações utilizadas para o grupo teste. Cada envelope recebeu 50 ou mais larvas. Estes eram então fechados dobrando-se em sua abertura uma borda com cerca de 1 cm, lacrando-se esta com um prendedor metálico. Os envelopes foram então suspensos pelos prendedores em suportes, a fim de evitar contaminação ou perda de solução por contato.

As concentrações letais (CLs), especialmente CL_{50} (Concentração capaz de matar 50% das larvas testadas) e CL_{99} (Concentração capaz de matar 99% das larvas testadas) foram calculadas através da análise de *Probit*, seus intervalos de confiança a 95% (IC 95%), coeficientes de determinação (R^2) e Análise de variância (ANOVA) (Centeno et al.,1990) seguida do teste Scott Knott (α = 5%) foram obtidas, empregando o "*Sistema para Análises Estatísticas e Genética*" (SAEG® *software* v. 9.0©) e software Assiistat® v. 7.4

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O óleo essencial de *P. hispidinervum* e *C. guianensis* apresentaram ação larvicida para as larvas de *R. sanguineus*. Índices de mortalidade acima de 80%, foram alcançados em concentrações em concentrações de 6000 ppm (0,6 %) e 7000 ppm (0,7%) em 24 h e 6500 ppm (0,65 %) e 7000 ppm (0,7%) em 48h, sob ação do óleo essencial de *P. hispidinervum* (Figura 2A e 2B). Concentração do óleo essencial de *C. guiannensis* até 350000 ppm analisadas na 24 h, não demonstrou mortalidade superior a 10% sobre as larvas de *A. cajennense*. Porém ao observar a mortalidade na 48 h de exposição, verificou-se mortalidade acima de 80% em concentrações de 250000 ppm (25%), 300000 ppm (30 %) e 350000 ppm (35 %) (Figura 2C). Não foi evidenciada mortalidade de larvas no grupo controle nos bioensaios relacionados às duas plantas.

Para verificar o grau de relação entre as concentrações e a mortalidade, foi calculado o coeficiente de determinação (R^2). Esses coeficientes representam o resultado da variação existente entre as variáveis independentes (Concentrações) e variáveis dependentes (Mortalidade), ou seja, quanto mais próxima de 0,1 (100%), maior será a relação de homogeneidade das concentrações com as respectivas mortalidades (Atkins et al., 1973). Analisando os valores de R^2 obtidos verificou-se que o aumento das concentrações do óleo essencial de *P. hispidinervum* relativo a 24 h de exposição, interfere em 93,19% na mortalidade das larvas de *A. cajennense*. Em 48 h de exposição é de 89,75% para *P. hispidinervum* e 98,05% para *C. guianensis*. As CLs_{50} e $_{99}$ de *P. hispidinervum* referida a 24 h de exposição foram 4218 ppm (IC95%= 4042-4386) e 4592 ppm (4397 – 4784) e na 48 h foram de 8855 ppm (8175 – 9790) e 10687 ppm (9677 – 12138). A CLs_{50} e $_{99}$ de *C. guianensis* foram 73878 ppm (66162 – 81782) e 454538 ppm (377555 – 571267), respectivamente (Tabela 1).

A ANOVA seguida do teste Scott – Knott (α = 5%) verificou-se diferenças significativas das mortalidades médias respectivas em todas as concentrações. Os resultados obtidos na 24 h e 48 h respectivas ao óleo essencial de *P. hispidinervum* e somente na 48 h respectiva ao óleo essencial de *C. guianensis* (Tabela 2 e 3) foram ($F_{1,5}$) 366,13 e 140,85 e 22,93 respectivamente ($p < 0,001$). Observa-se que a CL_{50} e CL_{99} de *P. hispidinervum* referente a 24 h e 48h, demonstrou efeito toxicológico *Knock down*, ou seja, as larvas de *A. cajennense* responderam de forma decrescente de mortalidade de acordo com o tempo. Este efeito é muito comum de acontecer, quando um espécime de carrapato, é exposto em contato com inseticidas em concentrações maiores do que a as descritas pelo fabricante, favorecendo o fenômeno de resistência. Este estudo é o primeiro no que se diz respeito deste efeito toxicológico ocasionado por óleos essenciais de plantas, especificamente *P. hispidinervum*.

No presente trabalho, o óleo de *P. hispidinervum* proporcionou letalidade de 100% das larvas de *A. cajennense*, demonstrando CL_{99} de 10687 ppm (≈1%). Esta concentração é bem inferior à necessária para matar 100% do adulto de *S. zeamais* submetidas ao mesmo óleo (20% de concentração), conforme observado anteriormente por Estrela et al., (2006). Ndumu et al., (1999) demonstraram existir efeitos toxicológicos do óleo puro da planta *Azadirachta indica*, sobre o carrapato *A. variegatum*, nativo da Nigéria, verificando a mortalidade de 100% das larvas do carrapato após 48 h, com CL_{50} de 66,7% (66700 ppm). Esta concentração demonstra-se superior às obtidas na avaliação do óleo essencial de *C. guianensis* ($CL_{99} \approx 45\%$). Fernandes et al., 2005a, 2005b, ao avaliarem a atividade larvicida do extrato bruto etanólico da casca do caule de *S. saponaria* L. sobre *R.* (*B.*) *microplus* e *R. sanguineus* observaram $CL_{99} \approx 0,6\%$ e $CL_{99} \approx 0,4\%$, respectivamente. Fernandes and Freitas (2007) ao avaliarem a ação larvicida do óleo-resina de *C. reticulata* sobre *R.* (*B.*)

microplus obteveram $CL_{99} \approx 0,3\%$. Chagas et al., (2002) obtiveram 100% de mortalidade das larvas de *R.* (*B.*) *microplus* por ação do óleo essencial de *E. globulus,* na concentração de 20%. Pereira and Famadas (2004) ao utilizar o extrato da planta *D. pentaphylla* sobre *R.* (*B.*) *microplus* obteve 100% de mortalidade a concentração de 5%.

Bernard et al., (1995) demonstraram que as plantas pipéraceas propiciam a ocorrência de inter-relações das ligninas ao metilenedioxidofenil, sendo consideradas importantes inibidores de moonoxigenases dependentes do citocromo P450, atuando assim no sinergismo de inseticidas naturais (Mukerjee et al., 1979; Bernard et al., 1990). Atualmente, a família Meliaceae, vem se mostrando, dentre as demais famílias botânicas, como uma das mais importantes fontes de produtos inseticidas, devido ao número de espécie com à eficiência ao seu extrato sobre diversos insetos.

CONCLUSÃO

Os óleos essenciais testados demonstraram potencial acaricida para *A. cajennense*. O óleo de *P. hispidinervum* provou ser o mais letal para as larvas, em concentrações menores que as de *C. guianensis*. Esses estudos reforçam a utilização dos óleos essenciais destas plantas na formulação de acaricidas organonaturais, a serem utilizados como medida alternativa, de menor impacto ambiental, em substituição aos acaricidas químicos sintéticos, para o controle de carrapatos, especialmente de *A. cajennense*. Os resultados do presente trabalho suscitam investimentos para a preservação de *P. hispidinervum* e *C. guianensis* em seus biomas e a continuidade dos estudos objetivando o isolamento dos princípios ativos de seus óleos essenciais, para a prospecção de acaricidas organonaturais.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, FUNAPE-UFG e SECTEC-GO pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa e a bolsa concedida ao aluno de pós-graduação Walmirton Bezerra D'Alessandro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Atkins, E.L., Greywood, E.A., Macdonald, R.L., 1973. Toxicity of pesticitedes and other agricultural chemical to honey bees: laboratory studies. Davis: University of California. (Technical bulletin, M-16). 36 p.

Bernard, C.B., Arnason, J.T., Philogène, B.J.R., Lam, J., Waddell, T., 1990. *In vivo* effect of mixtures of allelochemicals onthe life cycle of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. Entomol. Exp. App. 57, 17-22.

Bernard, C.B., Krishanmurty, H.G., Chauret, D., Durst, T., Philogène, B.J.R., Sánchez-Vindas, P., Hasbun, C., Poveda, L., San Román, L., Arnason, J.T., 1995. Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. J. Chem. Ecol. 21, 801-814.

Brunherotto, R., Vendramim, J. D., 2001. Bioatividade de Extratos Aquosos de *Melia azedarach* L. Sobre o Desenvolvimento de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em Tomateiro. Neotrop. Entomol 30, 455-459.

Centeno, A.J., Kratz, F.L., D'Ayala, V.F., Monteiro, M.S.R., Torres, R.A.A., Chen, L.C., 1990. Curso de estatística aplicada à biologia. 1. ed. Goiânia: CEGRAF / UFG, 188 pp.

Chagas, A.C.S., Passos, W.M., Prates, H.T., 2002. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 39, 247-253.

Estrela, J.L.V., Fazolin, M., Catani, V., Alécio, M.R, Lima, M.S., 2006. Toxicity of essential oils of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* against *Sitophilus zeamais*. Pesq. Agropec. Bras. 41, 217-222.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2004. Module 1. Ticks: Acaricide Resistance: Diagnosis Management and Prevention In: Guidelines Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants. Rome: FAO Animal Production and Health Division.

Fernandes, F.F., 2000. *In vitro* activitty of permethrin, cipermethrin and deltamethrin on larvae of *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806) (Acari, Ixodidae). Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 52, 621-626.

Fernandes, F.F., Freitas, E.P.S., Costa, A.C., Silva, I.G., 2005a. Larvicidal potential of *Sapindus saponaria* to control cattle tick *Boophilus microplus*. Pesq. Agropec. Bras. Brasília. 40, 1243-1245.

Fernandes, F.F., Leles, R.N., Silva, I.G., Freitas, E.P.S., 2005b. Larvicidal Activity of *Sapindus saponaria* (Sapindaceae) against *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 59, 145-149.

Fernandes, F.F., Freitas, E.P.S., 2007. Acaricidal activity of na óleoresin extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinoideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *sanguineus* (Acari: Ixodidae). Vet. Parasitol. 147, 150-154.

Fonseca, A.H., Salles, R.S., Salles, S.A.N., Madureira, R.C., Yoshinari, N.H., 2005. Borreliose de Lyme *simile*: uma doença emergente e relevante para a dermatologia no Brasil. An. Bras. Dermatol. 80, 171-178.

Furlong, J., Martins, J.R.S., 2000. Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas. Circular Técnica vol. 59. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora Minas Gerais, Brazil.

Lemos, E.R.S., Rozental, T., Villela, L.C., 2002. Brazilian spotted fever: description of a fatal clinical case in the State of Rio de Janeiro. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 35, 523-525.

Mantovani, E., Costa, I.P., Gauditano, G., Bonoldi, V.L.N., Higuchi, M.L. Yoahinari, N.H., 2007. Description of Lyme disease-like syndrome in Brazil. Is it a new tick borne disease or lyme disease variation?. Braz. J. Med. Biol. Res. 40, 443-456.

Miot, H.A., Batistella, R.F., Batista, K.A., Volpato, D.E.C., Augusto, L.S.T., Madeira, N.G., Haddad Junior, V., Miot, L.D.B., 2004. Comparative study of the topical effectiveness of the andiroba oil (*Carapa guianensis*) And Deet 50% as repellent for *Aedes* sp**.** Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 46, 253-256.

Mukerjee, S.K., Saxena, V.S., Tomar, S.S., 1979. New methylenedioxyphenyl synergists for pyrethrins. J. Agric. Food Chem. 27, 1209-1211.

Ndumu, P.A., George, J.B., Choudhury, M.K., 1999. Toxicity of neem seed oil (*Azadirachta indica*) against the larvae of *Amblyomma variegatum* a three-host tick in cattle. Phytother. Res. 13, 532-534.

Pereira, J.R., Famadas, K.M., 2004. Avaliação "In Vitro" da eficiência do extrato da raiz do timbó (*Dahlstedtia Pentaphylla*) (Leguminosae, Papilionoidae, Millettiedae) sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) na região do Vale do Paraíba, São Paulo, Brasil. Arq. Inst. Biol. S. Paulo. 71, 443-450.

Pimentel, F.A.,Cabral, W.G., Silva, M.R. D., Pinheiro, P.S.N., 1998. Processo de extração do óleo essencial de pimenta longa (*P. hispidinervum*). Rio Branco: Embrapa-CPAF. (Comunicado técnico, 97) 2p.

Silva, O.S., Romão, P.R.T., Blazius, R.D., Prophiro, J.S., 2004. The use of andiroba *Carapa guianensis* as larvicide against *Aedes albopictus*. J. Am. Mosq. Control. Assoc. 20, 456-457.

Silva, O.S., Prophiro, J.S., Nogared, J.C., Kanis, L., Emerick, S., Blazius, R.D., Romão, P.R.T., 2006. Larvicidal effect of andiroba oil, *Carapa guianensis* as larvicide against *Aedes aegypti*. J. Am. Mosq. Control. Assoc. 22, 699-701.

Simpson, B.B.,1995. Spices, herbs and perfumes. In: Simpson, B.B.; Orgorzaly, M.C. (Ed). Economic botany: plants in our word. 2nd ed. New York: Mc Graw – Hill, p. 278-301.

SVS/MS, 2005. Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde, 6. ed. Brasília. Guia de Vigilância epidemiológica. Febre Maculosa Brasileira - Características clínicas e epidemiológicas. 330-343.

Viegas Jr., C., 2003. Terpenes with insecticidal activity: an alternative to chemical control of insects. Quim. Nova. 26, 390-400.

Figura 1. (A) Termohigrômetro demonstrando a temperatura e umidade adquirida durante os ensaios biológicos. (B) Teléogina de *A. cajennense* em oviposição. (C) Folhas de *P. hispidinervum*. (D) Óleo obtido das folhas de *P. hispidinervum*. (E) Sementes de *Carapa guianensis*. (F) Óleo obtido das sementes de *Carapa guianensis*. (G) Coleta das larvas de *A. cajennense* com o pincel. (H) Solução botânica sendo impregnada sobre a superfície interna do papel filtro com a utilização de uma pipeta de Pasteur descartável.

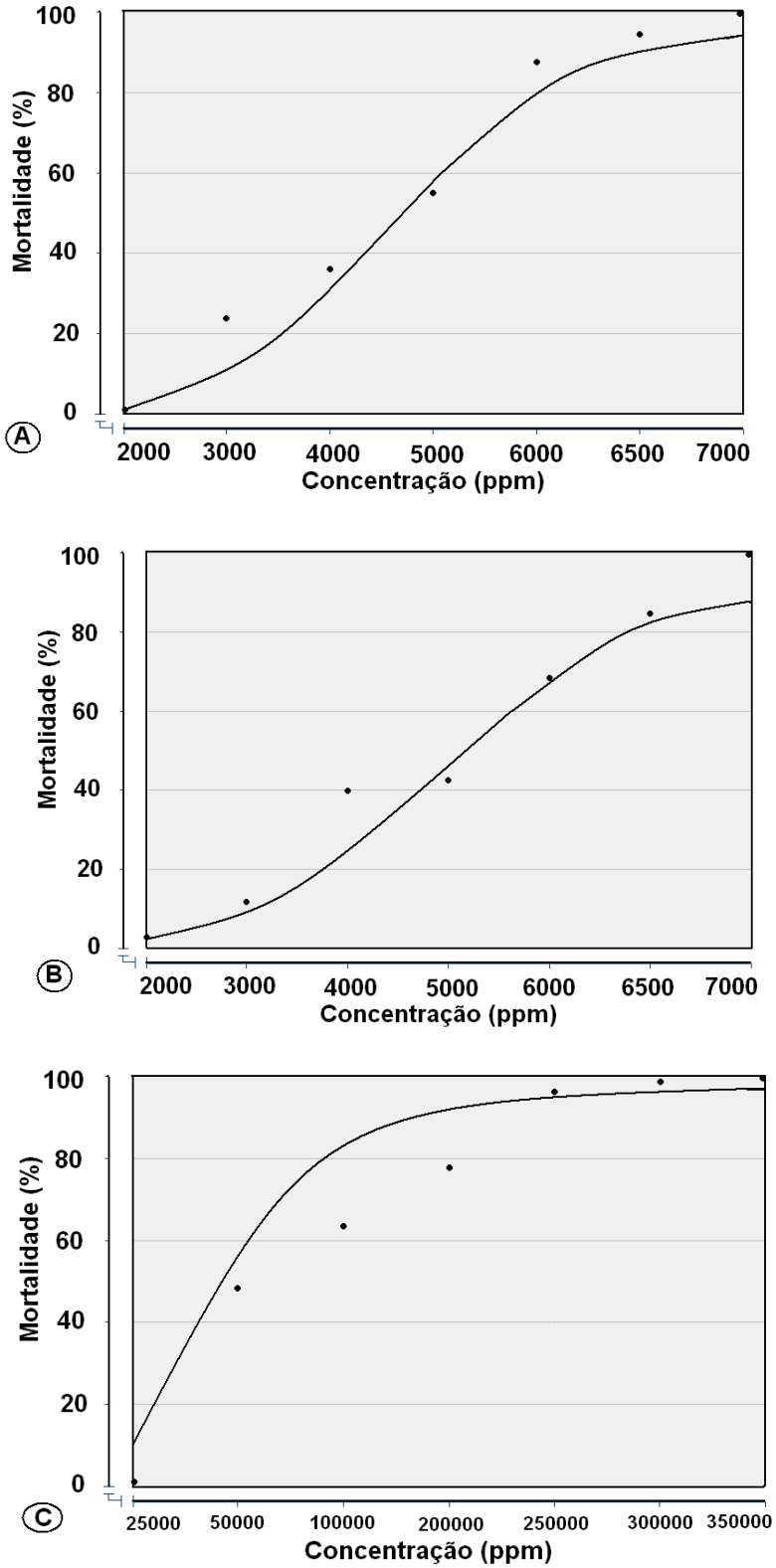


Figura 2. (A) Mortalidade de larvas de *A. cajennense* sob ação do óleo essencial de *P. hispidinervum*, observado após 24 h e **(B)** 48 h de exposição. **(C)** Mortalidade de larvas de *A. cajennnense*, motivada pela ação de diferentes concentrações do óleo essencial de *C. guianensis*, observado após 48 h de exposição.

Tabela 1. Análise da ação de diferentes concentrações dos óleos essenciais de *P. hispidinervum e C. guianensis* sobre larvas de *A. cajennense*, após 24 e 48 h de exposição.

Óleos essenciais	**Concentrações Letais (ppm) (Intervalo de Confiança a 95%)**		**R^2**
	CL_{50}	**CL_{99}**	
P. hispidinervum 24h	4218 ppm (4042-4386)	8855 ppm (8175-9790)	0,9319
P. hispidinervum 48h	4592 ppm (4397-4784)	10687 ppm (9677-12138)	0,8975
C. guianensis 48h	73878 ppm (66162-81782)	454538 ppm (377555-571267)	0,9805

CL_{50}: Concentração de letalidade 50%; CL_{99}: Concentração de letalidade 99%; IC: Intervalo de confiança; 24 h: 24 horas; 48 h: 48 horas; R^2: Coeficiente de determinação.

Tabela 2. Concentrações analisadas e suas respectivas mortalidades médias das larvas de *A. cajennense* encontradas na 24 e 48 h de exposição sob ação do óleo essencial de *P. hispidinervum*.

24 Horas		48 Horas	
Concentrações (ppm)	MM (%)	Concentrações (ppm)	MM (%)
2000	5 Aa	2000	1 Ba*
3000	23,4 Cb	3000	12,2 Db*
4000	35,9 Ec	4000	39,36 Fc*
5000	55 Gd	5000	43 Hd*
6000	87,6 Ie	6000	69,56 Je*
6500	94,6 Lf	6500	85 Mf*
7000	100 Ng	7000	100 Ng

Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem entre si, pelo teste Scott- Knott, a 5% de probabilidade. * Efeito knock down. MM = Mortalidade Média.

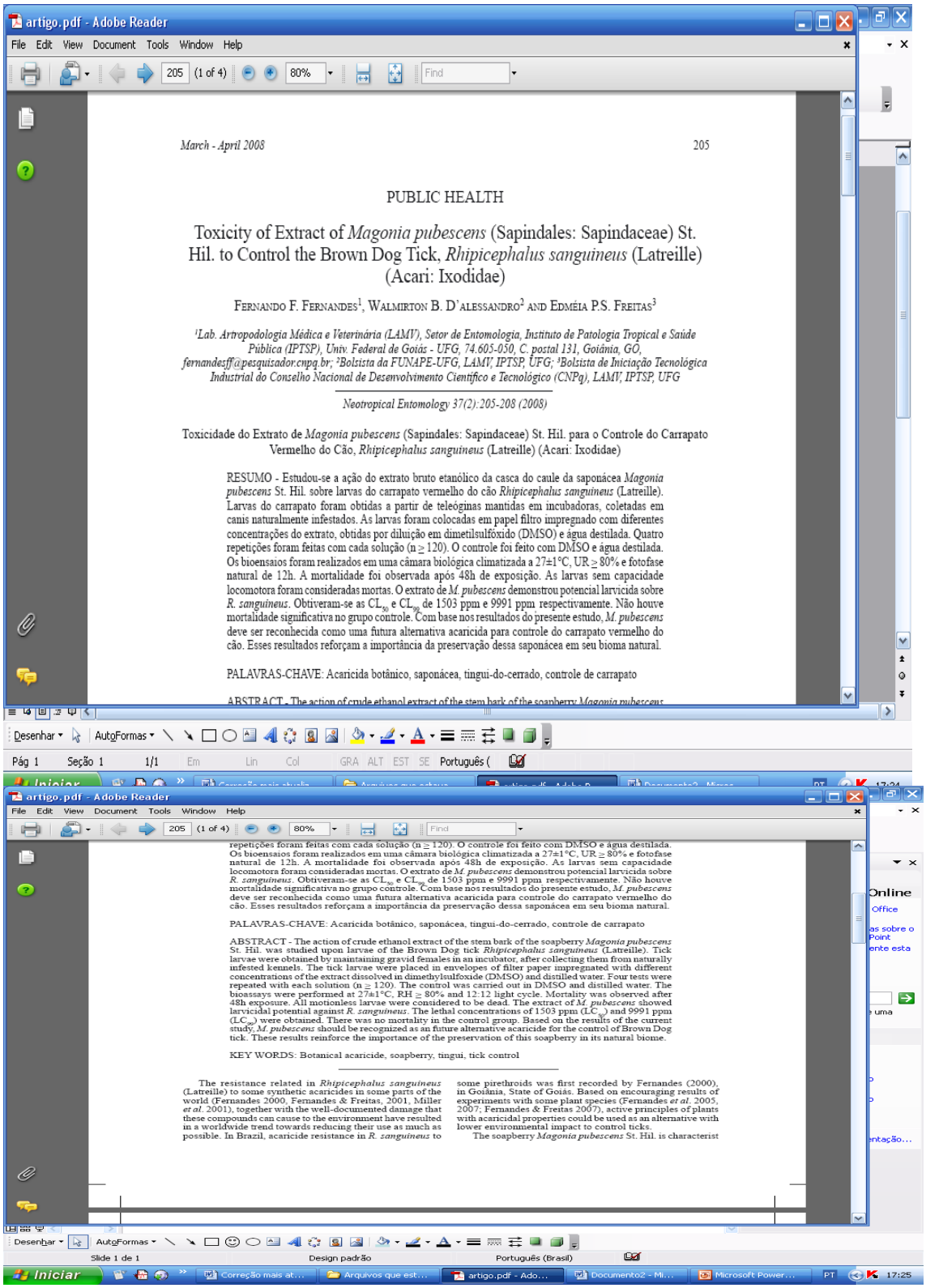
Tabela 3. Concentrações analisadas e suas respectivas mortalidades médias das larvas de *A. cajennense* encontradas na 48 h de exposição sob ação do óleo essencial de *C. guianensis*.

48 Horas	
Concentrações (ppm)	MM (%)
25000	1,07 A
50000	48 B
100000	62,08 C
200000	78,03 D
250000	95,9 E
300000	98,48 F
350000	100 G

Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste Scott- Knott, a 5% de probabilidade. MM = Mortalidade Média.

7- Artigo 1: Toxicity of Extract of *Magonia pubescens* (Sapindales: Sapindaceae) St. Hil. to Control the Brown Dog Tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae).

Artigo publicado na revista Neotropical Entomology: Qualis C Internacional, indexado no Web of Science. Fator de impacto: 0,413.



March - April 2008 205

PUBLIC HEALTH

Toxicity of Extract of *Magonia pubescens* (Sapindales: Sapindaceae) St. Hil. to Control the Brown Dog Tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae)

FERNANDO F. FERNANDES[1], WALMIRTON B. D'ALESSANDRO[2] AND EDMÉIA P.S. FREITAS[3]

[1]Lab. Artropodologia Médica e Veterinária (LAMV), Setor de Entomologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Univ. Federal de Goiás - UFG, 74.605-050, C. postal 131, Goiânia, GO, fernandesff@pesquisador.cnpq.br; [2]Bolsista da FUNAPE-UFG, LAMV, IPTSP, UFG; [3]Bolsista de Iniciação Tecnológica Industrial do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), LAMV, IPTSP, UFG

Neotropical Entomology 37(2):205-208 (2008)

Toxicidade do Extrato de *Magonia pubescens* (Sapindales: Sapindaceae) St. Hil. para o Controle do Carrapato Vermelho do Cão, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae)

RESUMO - Estudou-se a ação do extrato bruto etanólico da casca do caule da saponácea *Magonia pubescens* St. Hil. sobre larvas do carrapato vermelho do cão *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille). Larvas do carrapato foram obtidas a partir de teleóginas mantidas em incubadoras, coletadas em canis naturalmente infestados. As larvas foram colocadas em papel filtro impregnado com diferentes concentrações do extrato, obtidas por diluição em dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada. Quatro repetições foram feitas com cada solução (n ≥ 120). O controle foi feito com DMSO e água destilada. Os bioensaios foram realizados em uma câmara biológica climatizada a 27±1°C, UR ≥ 80% e fotofase natural de 12h. A mortalidade foi observada após 48h de exposição. As larvas sem capacidade locomotora foram consideradas mortas. O extrato de *M. pubescens* demonstrou potencial larvicida sobre *R. sanguineus*. Obtiveram-se as CL_{50} e CL_{99} de 1503 ppm e 9991 ppm respectivamente. Não houve mortalidade significativa no grupo controle. Com base nos resultados do presente estudo, *M. pubescens* deve ser reconhecida como uma futura alternativa acaricida para controle do carrapato vermelho do cão. Esses resultados reforçam a importância da preservação dessa saponácea em seu bioma natural.

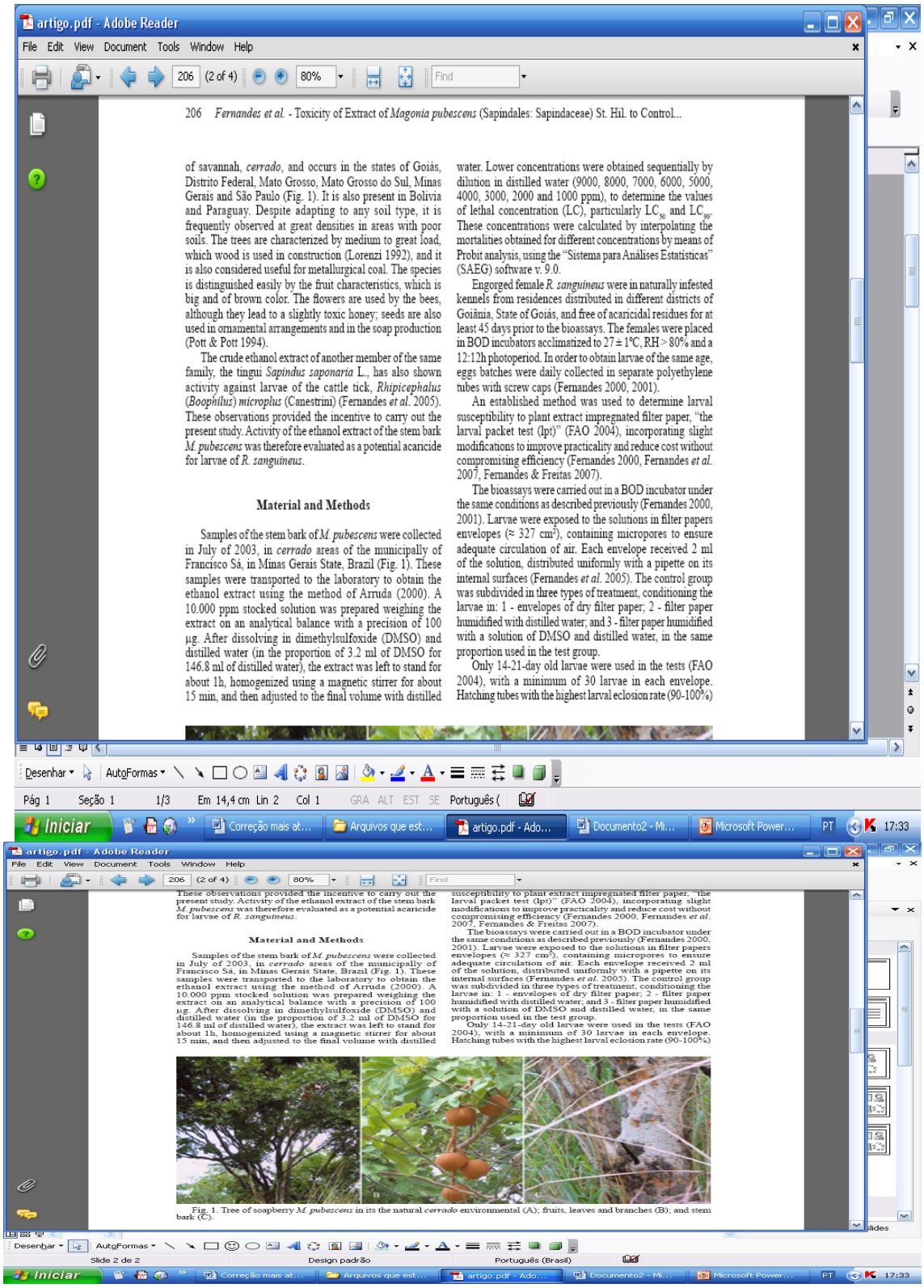
PALAVRAS-CHAVE: Acaricida botânico, saponácea, tingui-do-cerrado, controle de carrapato

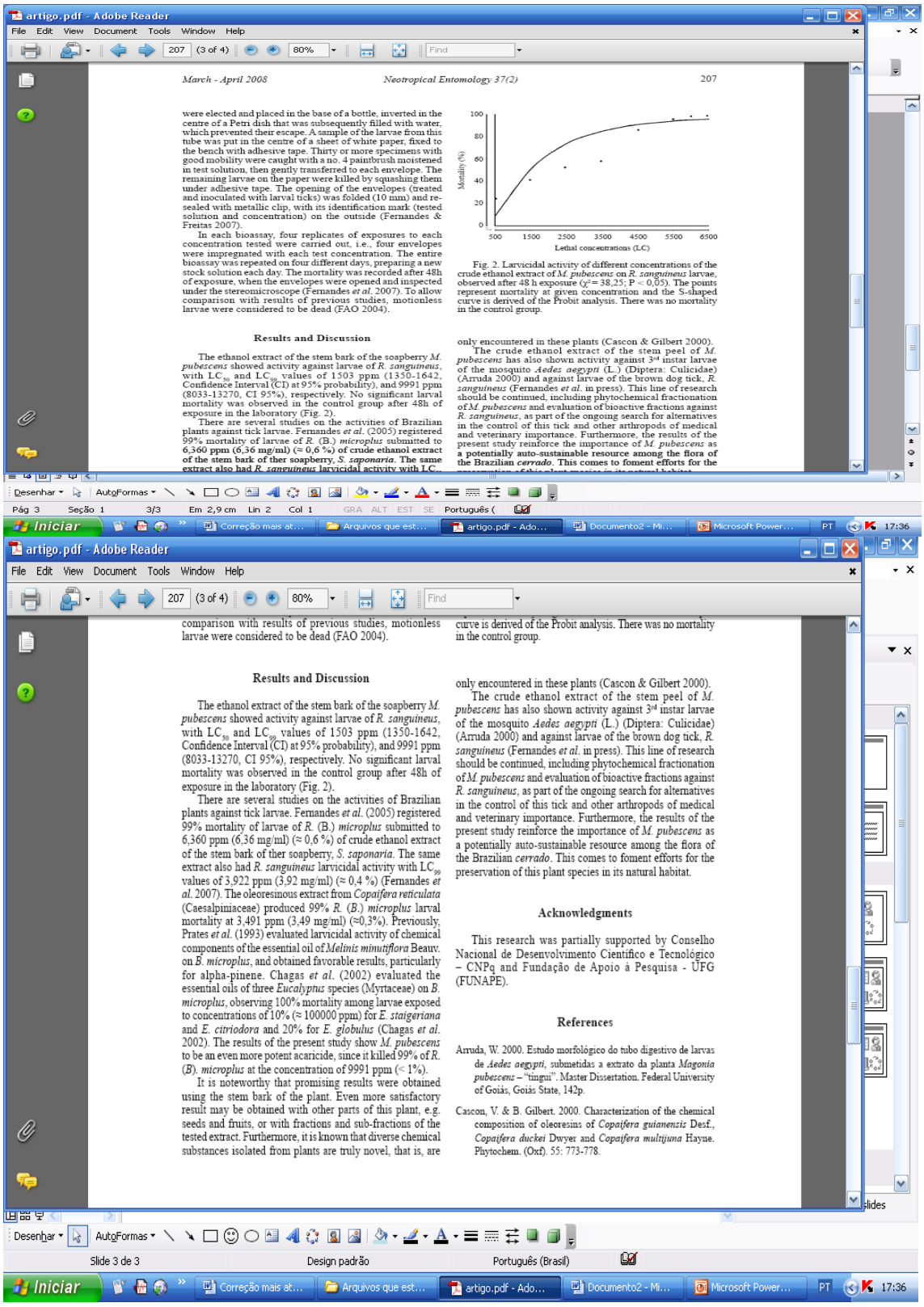
ABSTRACT - The action of crude ethanol extract of the stem bark of the soapberry *Magonia pubescens* St. Hil. was studied upon larvae of the Brown Dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille). Tick larvae were obtained by maintaining gravid females in an incubator, after collecting them from naturally infested kennels. The tick larvae were placed in envelopes of filter paper impregnated with different concentrations of the extract dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and distilled water. Four tests were repeated with each solution (n ≥ 120). The control was carried out in DMSO and distilled water. The bioassays were performed at 27±1°C, RH ≥ 80% and 12:12 light cycle. Mortality was observed after 48h exposure. All motionless larvae were considered to be dead. The extract of *M. pubescens* showed larvicidal potential against *R. sanguineus*. The lethal concentrations of 1503 ppm (LC_{50}) and 9991 ppm (LC_{99}) were obtained. There was no mortality in the control group. Based on the results of the current study, *M. pubescens* should be recognized as an future alternative acaricide for the control of Brown Dog tick. These results reinforce the importance of the preservation of this soapberry in its natural biome.

KEY WORDS: Botanical acaricide, soapberry, tingui, tick control

The resistance related in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) to some synthetic acaricides in some parts of the world (Fernandes 2000, Fernandes & Freitas, 2001, Miller *et al.* 2001), together with the well-documented damage that these compounds can cause to the environment have resulted in a worldwide trend towards reducing their use as much as possible. In Brazil, acaricide resistance in *R. sanguineus* to some pirethroids was first recorded by Fernandes (2000), in Goiânia, State of Goiás. Based on encouraging results of experiments with some plant species (Fernandes *et al.* 2005, 2007; Fernandes & Freitas 2007), active principles of plants with acaricidal properties could be used as an alternative with lower environmental impact to control ticks.

The soapberry *Magonia pubescens* St. Hil. is characterist


artigo.pdf - Adobe Reader
File Edit View Document Tools Window Help
206 (2 of 4)
80%
Find
206 Fernandes et al. - Toxicity of Extract of Magonia pubescens (Sapindales: Sapindaceae) St. Hil. to Control...
of savannah, cerrado, and occurs in the states of Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais and São Paulo (Fig. 1). It is also present in Bolivia and Paraguay. Despite adapting to any soil type, it is frequently observed at great densities in areas with poor soils. The trees are characterized by medium to great load, which wood is used in construction (Lorenzi 1992), and it is also considered useful for metallurgical coal. The species is distinguished easily by the fruit characteristics, which is big and of brown color. The flowers are used by the bees, although they lead to a slightly toxic honey; seeds are also used in ornamental arrangements and in the soap production (Pott & Pott 1994).
The crude ethanol extract of another member of the same family, the tingui Sapindus saponaria L., has also shown activity against larvae of the cattle tick, Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini) (Fernandes et al. 2005). These observations provided the incentive to carry out the present study. Activity of the ethanol extract of the stem bark M. pubescens was therefore evaluated as a potential acaricide for larvae of R. sanguineus.
Material and Methods
Samples of the stem bark of M. pubescens were collected in July of 2003, in cerrado areas of the municipally of Francisco Sá, in Minas Gerais State, Brazil (Fig. 1). These samples were transported to the laboratory to obtain the ethanol extract using the method of Arruda (2000). A 10.000 ppm stocked solution was prepared weighing the extract on an analytical balance with a precision of 100 µg. After dissolving in dimethylsulfoxide (DMSO) and distilled water (in the proportion of 3.2 ml of DMSO for 146.8 ml of distilled water), the extract was left to stand for about 1h, homogenized using a magnetic stirrer for about 15 min, and then adjusted to the final volume with distilled water. Lower concentrations were obtained sequentially by dilution in distilled water (9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000 and 1000 ppm), to determine the values of lethal concentration (LC), particularly LC50 and LC99. These concentrations were calculated by interpolating the mortalities obtained for different concentrations by means of Probit analysis, using the "Sistema para Análises Estatísticas" (SAEG) software v. 9.0.
Engorged female R. sanguineus were in naturally infested kennels from residences distributed in different districts of Goiânia, State of Goiás, and free of acaricidal residues for at least 45 days prior to the bioassays. The females were placed in BOD incubators acclimatized to 27 ± 1°C, RH > 80% and a 12:12h photoperiod. In order to obtain larvae of the same age, eggs batches were daily collected in separate polyethylene tubes with screw caps (Fernandes 2000, 2001).
An established method was used to determine larval susceptibility to plant extract impregnated filter paper, "the larval packet test (lpt)" (FAO 2004), incorporating slight modifications to improve practicality and reduce cost without compromising efficiency (Fernandes 2000, Fernandes et al. 2007, Fernandes & Freitas 2007).
The bioassays were carried out in a BOD incubator under the same conditions as described previously (Fernandes 2000, 2001). Larvae were exposed to the solutions in filter papers envelopes (≈ 327 cm²), containing micropores to ensure adequate circulation of air. Each envelope received 2 ml of the solution, distributed uniformly with a pipette on its internal surfaces (Fernandes et al. 2005). The control group was subdivided in three types of treatment, conditioning the larvae in: 1 - envelopes of dry filter paper; 2 - filter paper humidified with distilled water; and 3 - filter paper humidified with a solution of DMSO and distilled water, in the same proportion used in the test group.
Only 14-21-day old larvae were used in the tests (FAO 2004), with a minimum of 30 larvae in each envelope. Hatching tubes with the highest larval eclosion rate (90-100%)
Desenhar AutoFormas
Pág 1 Seção 1 1/3 Em 14,4 cm Lin 2 Col 1 GRA ALT EST SE Português (
Iniciar
Correção mais at...
Arquivos que est...
artigo.pdf - Ado...
Documento2 - Mi...
Microsoft Power...
PT
17:33
Slide 2 de 2
Design padrão
Português (Brasil)



artigo.pdf - Adobe Reader

March - April 2008 Neotropical Entomology 37(2) 207

were elected and placed in the base of a bottle, inverted in the centre of a Petri dish that was subsequently filled with water, which prevented their escape. A sample of the larvae from this tube was put in the centre of a sheet of white paper, fixed to the bench with adhesive tape. Thirty or more specimens with good mobility were caught with a no. 4 paintbrush moistened in test solution, then gently transferred to each envelope. The remaining larvae on the paper were killed by squashing them under adhesive tape. The opening of the envelopes (treated and inoculated with larval ticks) was folded (10 mm) and re-sealed with metallic clip, with its identification mark (tested solution and concentration) on the outside (Fernandes & Freitas 2007).

In each bioassay, four replicates of exposures to each concentration tested were carried out, i.e., four envelopes were impregnated with each test concentration. The entire bioassay was repeated on four different days, preparing a new stock solution each day. The mortality was recorded after 48h of exposure, when the envelopes were opened and inspected under the stereomicroscope (Fernandes *et al.* 2007). To allow comparison with results of previous studies, motionless larvae were considered to be dead (FAO 2004).

Fig. 2. Larvicidal activity of different concentrations of the crude ethanol extract of *M. pubescens* on *R. sanguineus* larvae, observed after 48 h exposure (χ^2= 38,25; P < 0,05). The points represent mortality at given concentration and the S-shaped curve is derived of the Probit analysis. There was no mortality in the control group.

Results and Discussion

The ethanol extract of the stem bark of the soapberry *M. pubescens* showed activity against larvae of *R. sanguineus*, with LC_{50} and LC_{99} values of 1503 ppm (1350-1642, Confidence Interval (CI) at 95% probability), and 9991 ppm (8033-13270, CI 95%), respectively. No significant larval mortality was observed in the control group after 48h of exposure in the laboratory (Fig. 2).

There are several studies on the activities of Brazilian plants against tick larvae. Fernandes *et al.* (2005) registered 99% mortality of larvae of *R.* (B.) *microplus* submitted to 6,360 ppm (6,36 mg/ml) (≈ 0,6 %) of crude ethanol extract of the stem bark of ther soapberry, *S. saponaria*. The same extract also had *R. sanguineus* larvicidal activity with LC_{99} values of 3,922 ppm (3,92 mg/ml) (≈ 0,4 %) (Fernandes *et al.* 2007). The oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Caesalpiniaceae) produced 99% *R.* (*B.*) *microplus* larval mortality at 3,491 ppm (3,49 mg/ml) (≈0,3%). Previously, Prates *et al.* (1993) evaluated larvicidal activity of chemical components of the essential oil of *Melinis minutiflora* Beauv. on *B. microplus*, and obtained favorable results, particularly for alpha-pinene. Chagas *et al.* (2002) evaluated the essential oils of three *Eucalyptus* species (Myrtaceae) on *B. microplus*, observing 100% mortality among larvae exposed to concentrations of 10% (≈ 100000 ppm) for *E. staigeriana* and *E. citriodora* and 20% for *E. globulus* (Chagas *et al.* 2002). The results of the present study show *M. pubescens* to be an even more potent acaricide, since it killed 99% of *R.* (*B*). *microplus* at the concentration of 9991 ppm (< 1%).

It is noteworthy that promising results were obtained using the stem bark of the plant. Even more satisfactory result may be obtained with other parts of this plant, e.g. seeds and fruits, or with fractions and sub-fractions of the tested extract. Furthermore, it is known that diverse chemical substances isolated from plants are truly novel, that is, are only encountered in these plants (Cascon & Gilbert 2000).

The crude ethanol extract of the stem peel of *M. pubescens* has also shown activity against 3rd instar larvae of the mosquito *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) (Arruda 2000) and against larvae of the brown dog tick, *R. sanguineus* (Fernandes *et al.* in press). This line of research should be continued, including phytochemical fractionation of *M. pubescens* and evaluation of bioactive fractions against *R. sanguineus*, as part of the ongoing search for alternatives in the control of this tick and other arthropods of medical and veterinary importance. Furthermore, the results of the present study reinforce the importance of *M. pubescens* as a potentially auto-sustainable resource among the flora of the Brazilian *cerrado*. This comes to foment efforts for the preservation of this plant species in its natural habitat.

Acknowledgments

This research was partially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico – CNPq and Fundação de Apoio à Pesquisa - UFG (FUNAPE).

References

Arruda, W. 2000. Estudo morfológico do tubo digestivo de larvas de *Aedes aegypti*, submetidas a extrato da planta *Magonia pubescens* – "tingui". Master Dissertation. Federal University of Goiás, Goiás State, 142p.

Cascon, V. & B. Gilbert. 2000. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera ducke*i Dwyer and *Copaifera multijuna* Hayne. Phytochem. (Oxf). 55: 773-778.

Chagas, A.C.S., M.W. M. Passos, H.T. Prates, R.C. Leite, J. Furlong & I.C.P. Fortes. 2002. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp. em *Boophilus microplus*. Braz. J. Vet. Res. Ani. Sci. 39: 247-253.

FAO. 2004. (eds.) Module 1. Ticks: Acaricide resistance: Diagnosis management and prevention. In Guidelines Resistance Management and integrated parasite control in ruminants. Rome: FAO Animal Production and Health Division, CDRom.

Fernandes, F.F. 2000. In vitro activity of permetrin, cipermetrin and deltamethrin on larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 52: 621-626.

Fernandes, F.F. 2001.Toxicological effects and resistance to pyretroids in *Boophilus microplus* from Goiás, Brasil. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 53: 548-552.

Fernandes, F.F & E.P.S. Freitas. 2007. Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the Southern Cattle Tick, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). Vet. Parasitol. 147: 150-154.

Fernandes, F.F. & E.P.S. Freitas. 2001. Analysis of the use of fenthion via epicutaneous in dogs for *Rhipicephalus sanguineus* control. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 34: 339-342.

Fernandes, F.F., E.P.S. Freitas, A.C. Costa & I.G. Silva. 2005. Larvicidal potential of *Sapindus saponaria* to control of the cattle tick, *Boophilus microplus*. Pesq. Agropec. Bras. 40: 1243-1245.

Fernandes, F.F., P.A.D. Bessa & E.P.S. Freitas. In press. Evaluation of activity of the crude ethanolic extract of *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) against larvae of the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *micropilus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). Braz. Arch. Biol. Technol. 51.

Fernandes, F.F., R.N. Leles, I.G. Silva & E.P.S. Freitas. 2007. Larvicidal potential of *Sapindus saponaria* (Sapindaceae) against *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 59: 145-149.

Lorenzi, H. 1992. (eds.) Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa, Plantarum, 240p.

Miller, R.J., J.E. George, F. Guerreiro, L. Carpenter & J.B. Welch. 2001. Characterization of acaricide resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) collected from the Corozal Army Veterinary Quarantine Center, Panama. J. Med. Entomol. 38: 293-302.

Pott, A. & V.J Pott. 1994. (eds.) Plantas do pantanal. Brasília, Brasil, EMBRAP/CPAP/SPI, 320p.

Prates, H.T., A.B. Oliveira, R.C. Leite & A.A. Craveiro. 1993. Atividade carrapaticida e composição química do óleo essencial do capim-gordura. Pesq. Agropec. Bras. 28: 621-625.

Received 10/05/05. Accepted 07/11/07.

8– CONCLUSÕES

Dentre os acaricidas químicos sintéticos estudados Cipermetrina, Cipermetrina + Butóxido de Piperolina, Deltametrina, Permetrina e Amitraz na 24 h de observação foram os que apresentaram quadro de resistência, na 48 h de exposição ao Amitraz apresentou um quadro de possível resistência para as larvas de *R. sanguineus*.

Verificou-se que grupos de inseticida associativos com piretróides e organofosforados podem potencializar o efeito letal.

O produto a base de fipronil apesar de ter demonstrado eficiência acaricida, apresenta como obstáculo ao seu uso devido o custo muito elevado.

Carrapaticida contendo cumafós, ou a associação de Clorpenvinfos e Diclorvós, apesar de eficientes, deveriam ser evitados por sua alta toxicidade aos mamíferos, e acúmulo residual no meio ambiente podendo afetar cadeias alimentares de indivíduos de uma população não alvo.

Os óleos essenciais de *P. hispidinervum* e *C. guianensis* testados demonstraram potencial acaricida para as larvas de *A. cajennense*, sendo *P. hispidinervum*, em concentrações menores que as de *C. guianensis*.

O extrato bruto etanólico de *M. pubescens* demonstrou ser letal para as larvas de *R. sanguineus* em baixa concentração.

9– CONSIDERAÇÃO FINAL

Esses estudos reforçam a utilização dos óleos essenciais destas plantas na formulação de acaricidas organonaturais, a serem utilizados como medida alternativa, de menor impacto ambiental, em substituição aos acaricidas químicos sintéticos, para o controle de carrapatos, especialmente de *A. cajennense*.

Os dados do presente estudo suscitam investimentos para a preservação e o cultivo das plantas estudadas (*P. hispidinervum*, *C. guianensis* e *M. pubescens*) em seus biomas visando à continuidade dos estudos, para o isolamento de compostos (frações e sub-frações) bioativos do extrato e óleos testados, com monitoramento da sensibilidade de *A. cajennense* aos mesmos, objetivando o desenvolvimento de acaricidas botânicos.

10– REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Segundo normas do Periódico Científico Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

Almonsny NR, Massard CL 1999. Erliquiose felina - Revisão. *Clínica Veterinária* 23: 30-32.

Andereg PI, Passos LMF 1999. Erliquiose canina - Revisão. *Clínica Veterinária* 12: 31-38.

Arruda W, Gláucia COM, Silva IG 2003. Alterações morfológicas observadas em larvas do *Aedes aegypti* submetidas à ação do extrato bruto etanólico da casca do caule da *Magonia pubescens*. *Entomologia e Vectores* 10: 47-60.

Barrionuevo WR, Lanças FM 2001. Extração em Fase Sólida (SPE) e Micro Extração em Fase Sólida (SPME) de Piretróides em água. *Química Nova* 24: 172-175.

Barros ATML, Ottea J, Sanson D, Foil LD 2001. Horn fly (Diptera: Muscidae) resistance to organophosphate insecticides. *Veterinary Parasitology* 96: 243-256.

Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH 2006. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. Vox/ICTTD-3/ Butantan, São Paulo. 223 pp.

Bellato V, Daemon E 1997. Influencia da temperatura de manutenção da fase não parasitária sobre a fase parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 06: 15-19.

Belot J, Mishra G 1979. Toxicité de huit produits acaricides différents sur le tiques de l'espèce *Rhipicephalus sanguineus*. *Recueil de Médecine Vétérinaire* 155: 869-871.

Burgdorfer W, Sexton DJ, Gerloff RK, Anacker RL, Philip RN, Thomas LA 1975. *Rhipicephalus sanguineus*: vector of a new spotted fever group *Rickettsia* in the united states. *Infection and Immunity* 12: 205-210.

Campos EP, Duarte TG, Néri AV, Silva AF, Meira-Neto JAA, Valente GE 2006 Sociedade de Investigação Ambiental. *Revista Árvore* 30: 471-479.

Camargo-Neves VLF, Vieira AML, Souza CE, Labruna MB, Mayo RC, Souza SSL 2004. Manual de vigilância acarológica. São Paulo (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN. p. 66.

Carneiro ME, Daemon E 2003. Influência da temperatura sobre os tipos celulares presentes na hemolinfa de larvas e ninfas de *Rhipicephalus sanguineus*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 55: 574-579.

Cechinel Filho V, Yunes RA 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otmização da atividade. *Química Nova* 21: 99-105.

Champagne DE, Koul O, Isman M.B, Scudder GGE, Towers GHN 1992. Biological activity of limonoids from the rutales. *Phytochemistry* 31: 377-394.

Clarck KL, Wills W, Teders SH, Williams DC 1996. Ticks removed from dogs and animal care personal in Orangeburg county, South Carolina. *Journal of Agromedicine* 3: 45-55.

Conrado A, Mujica F 1998. Efficacy of different acaricides in the control of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Boletim de la Direction de Malariologia y Saneamiento Ambiental* 38: 119-122.

Cordeiro DG, Amaral EF, Batista EM 1999. Características do solo nos locais de ocorrência de populações nativas de pimenta longa no Acre. Rio Branco, Embrapa Acre. AC: 2p. Embrapa Acre. Pesquisa em Andamento, 152.

Costa JO, Botelho JR 2005. *Classe arachnida*. In: Neves DP, Melo AL, Genaro O, Linardi PM. Parasitologia Humana, 11 ed. São Paulo. Editora Atheneu. 413-421p.

Coutinho MTZ, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, Maria M, Genaro O, Linardi PM 2005. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 128: 149–155.

Craig C, Stitzel RE 1996. Famarcologia moderna p. 825. Editora Gunabara Koogan. In Princípios de Toxicologia. Reasor, M; Davis, E. M. 69-78.

Dantas-Torres F, Figueredo LA, Brandão-Filho SP 2005. Primeira descrição de parasitismo humano por *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38: 411-412.

Dantas-Torres F, Figueredo LA, Brandão-Filho SP 2006. (ACARI: IXODIDAE), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39: 64-67.

Estrela JLV, Fazolin M, Catani V, Alécio MR, Lima MS 2006. Toxicity of essential oils of Piper aduncum and *Piper hispidinervum* against *Sitophilus zeamais*. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 41: 217-222.

ETO M 1990. *Biochemical mechanisms of insecticidal activi-ties*. In: Chemistry of Plant Protection, 6. Ber-lin: Springer-Verlag, 65-107. Wolff. In: International Organization for Biological Control of noxious animals.

FAO (Food and Agriculture Organization of The United Nations) 1995. Acaricide resistance test kit instructions for use, World Acaricide Resistance Reference Centre (WARRC), Edition 11/1995, Berlin, Germany.

FAO (Food and Agriculture Organization of The United Nations) 2004. Module 1: Ticks. In: Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants, Rome.

Farias MPO, Sousa DP, Arruda AC, Aarruda MSP, Wanderley AG, Alves LC, Faustino MAG 2007. Eficácia in vitro do óleo da *Carapa guianensis* Aubl. (andiroba) no controle de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 9: 68-71.

Felz MW, Durden LA, Oliver Jr JH 1996. Ticks parasitizing humans in Georgia and South Carolina. *Journal of Parasitology* 82: 505-508.

Ferraz IDK 2003. Informativo técnico rede de sementes da Amazônia. Andiroba-*Carapa guianensis* Aubl. N^{0}1. Versão online. 1679-8058. Acessado dia 18/1207 <http://www.rsa.ufam.edu.br:8080/sementes /especies/pdf/doc1.pdf>.

Fernandes FF, Silva IG, Gomes AG, Silva JRV, Silva OR 1997. Ação carrapaticida in vitro de "Butox P®" sobre larvas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae). In: *Congresso Brasileiro de Parasitologia*, 15. Salvador. Anais. Salvador p.200 (Resumo).

Fernandes FF, Silva OR, Silva JRV 1998. Estudo da ação de cypermethrin 15% sobre larvas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). In: *Congresso Brasileiro de Parasitologia*, 16, Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro p.1076 (Resumo).

Fernandes FF 2000. In vitro activitty of permethrin, cipermethrin and deltamethrin on larvae of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 52: 621-626.

Fernandes FF 2001. Toxicological effects and resistance to pyrethroids in *Boophilus microplus* from Goiás, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 53: 538-543.

Fernandes FF, Freitas EPS, Silva JRV 2001. Toxicological effects and in vitro inefficacy of deltamethrin on larvae of *Rhipicephalus sanguineus* from Goiânia, Goiás, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34: 159-165.

Fernandes FF, Freitas EPS 2001. Analysis of the use of fenthion via epicutaneous in dogs for *Rhipicephalus sanguineus* control. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34: 339-342.

Fernandes FF, Freitas EPS 2007. Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology* 147: 150–154.

Fernandes FF, Leles RN, Silva IG 2007. Larvicidal Activity of *Sapindus saponaria* (Sapindaceae) against *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 57: 000-006.

Flechtmann CHW 1973. *Ácaros de Importância Médico-veterinária*. Nobel, São Paulo, 192 pp.

Fonseca AH, Salles RS, Salles SAN, Madureira RC, Yoshinari NH 2005. Borreliose de Lyme simile: uma doença emergente e relevante para a dermatologia no Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 80: 171-178.

Furlong J, Martins JRS 2000. Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas. Circular Técnica vol. 59. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora Minas Gerais, Brazil.

Gerritse RG 1988. Movilidad de los organoclorinos en una arean Bassendean. En: Autoridad de Protección del Ambiente, Evaluación de la utilización del heptacloro para el control de la Hormiga Argentina y las termitas en Australia Occidental, Boletín no. 354 (Perth: La Autoridad), Apéndice 2, p.13.

Gladney WJ, Dawkins CC 1976. The brown dog tick: laboratory tests of acaricides. *Southwestern Entomologist* 1: 184-189.

Guercio VMF, Rocha MMM, Melles HHB, Lima VCL, Pignati MG 1997. Febre maculosa no município de Pedreira, SP, Brasil. Inquérito sorológico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 30: 47-52.

Guerra MS, Sampaio DPA 1991. *Receituário agronômico*. 2.ed. São Paulo: Editora Globo.

Guerrero FD, Li AY, Hernandez R 2002. Molecular diagnosis of pyrethroid resistance in Mexican strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 39: 770-776.

Guimarães AM, Oliveira RMFS, Rosa ICAS 2002. Babesiose canina: uma visão dos clínicos veterinários de Minas Gerais. *Revista Clínica Veterinária* 41: 60-68.

Harrison BA, Engber BR, Apperson CS 1997. Ticks (Acari: Ixodidae) uncommonly found biting humans in North Carolina. *Journal of Vector Ecology* 22: 6-12.

Hegnauer R 1990. *Chemotaxonomie der Pflanzen*. v.9. Birkhauser Verlag. Stuttgart.

Hoogstraal H 1967. Ticks in relation to human diseases caused by *Rickettsia* species. *Annual Review of Entomology* 12: 377-420.

Jensen S, Hasen J, Boll PM 1993. Lignans and neolignans from Piperaceae (Review). *Phytochemistry* 33: 523-530.

Joppert AM, Hagiware MK, Yoshinari NH 2001. *Borrelia burgdorferi* antibodies in dogs from Cotia county, São Paulo State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 43: 251-255.

Koch HG, Tuck MD 1986. Molting and survival of the brown dog tick (Acari: Ixodidae) under different temperatures and humidities. *Annals of the Entomological Society of America* 79: 11-14.

Labruna MB 2004. Biológica-Ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria13: 123-124.

Labruna MB, Kasai N, Ferreira F, Faccini JLH, Gemari SM 2002. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology* 105: 65-77.

Leite ACR 1988. Scanning electron microscopy of the egg and first instar larva of *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 83: 253-257.

Lemos ER, Machado RD, Coura JR, Guimaraes MA, Freire NM, Amorim M, Gazeta GS 1997. Epidemiological aspects of the Brazilian spotted fever: seasonal activity of ticks collected in an endemic area in São Paulo, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 30: 181-185.

Lemos ERS, Rozental T, Villela LC 2002. Brazilian spotted fever: description of a fatal clinical case in the State of Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35: 523-525.

Lopes CML, Leite RC, Labruna MB, Oliveira PR, Borges LMF, Rodrigues ZB, Carvalho HA, Freitas CMV e Vieira Júnior CR 1998. Host Specificity of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) with Comments on the Drop-off Rhythm. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93: 347-351.

Lord CC 2005. Brown Dog Tick *Rhipicephalus sanguineus* Latreille (Arachnida: Acari: Ixodidae). *Florida Medical entomology Laboratory, University of Florida* 221-225.

Lorenzi H 1992. (eds.) *Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa, Brasil, Plantarum 240p.

Mantovani, E., Costa, I.P., Gauditano, G., Bonoldi, V.L.N., Higuchi, M.L. Yoahinari, N.H., 2007. Description of Lyme disease-like syndrome in Brazil. Is it a new tick borne disease or lyme disease variation?. Braz. J. Med. Biol. Res. 40, 443-456.

Marcondes CB 2001. *Moscas*. In: Marcondes CB. Entomologia Médica e Veterinária. São Paulo: Editora Atheneu. 125-156.

Martins JR, Medri IM, Oliveira CM, Guglielmone A 2004. Ocorrência de carrapatos em tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) e tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*) na região do Pantanal Sul Mato-Grossense, Brasil Cienc. Rural 34: 293 295.

Martins JRS, Furlong J, Leite RC, 2006. *Controle de carrapatos*. In: Barros-Battesti D, Arzua M, Bechara GH. (eds.) Carrapatos de importância Médica e Veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. Brasil, São Paulo, pp. 145-153.

Miller RJ, George JE, Guerrero F, Carpenter L, WELCH JB 2001. Characterization of acaricide resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) collected from the Corozal Army Veterinary Quarantine Center, Panama. *Journal of Medical Entomology* 38: 298-302.

Milby TH 1971. Prevention and Management of Organophosphate Poisoning. *Journal of the American Medical Association* 216: 2131-2133.

Moraes ACL 1999. *Contribuição para o estudo das intoxicações por carbamatos: o caso do chumbinho no Rio de Janeiro*. [Mestrado] Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública. 111 p.

Neves DP 2005. Classe Arachnida. In: Costa JO, Botelho JR. Parasitologia Humana, 11. ed. São Paulo: Editora Atheneu. p. 413-421

Nouira S, Abroug F, Elatrous S, Boujdaria R, Bouchoucha S 1994. Prognostic Value os Serum Cholinesterase in Organophosphate Poisoning. *Chest* 106: 1811-1814.

Ndumu PA, George JB, Choudhury MK 1999. Toxicity of neem seed oil (*Azadirachta indica*) against the larvae of *Amblyomma variegatum* a three-host tick in cattle. *Phytother*. Res. 13: 532-534.

O' Dwyer LH, Massard CL 2001. Aspectos gerais da hepatozoonose canina. *Revista Clínica Veterinária* 31: 34-40.

Oliveira W, Adeodato SO 1997. O bairro que respira veneno. *Globo Ciência* 6: 48-51.

Oliveira PR, Borges LMF, Lopes CML, Leite RC 2000. Population dynamics of the free living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology* 92: 295-301.

Oliveira CMR, Iacomini M, Alquini Y, Gorin PAJ 2001. Microscopic and NMR analysis of the external coat from seeds of *Magonia pubescens*. *New Phytologist* 152: 501-509.

Oyafuso MK, Dagnone AS, Vidotto O, Morais HSA 2002. Caracterização de carrapatos parasitas de cães em uma população hospitalar no norte do Paraná. *Ciências Agrárias, Londrina* 23: 71-74.

Pereira MC, Labruna MB 1998. Febre maculosa: aspectos clínico epidemiológicos. *Revista Clínica Veterinária* 12: 19-23.

Pimentel FA, Sousa MMM, SÁ CP, Cabral WG, Silva MR, Pinheiro PSN, Bastos RM 1998. Recomendações básicas para o cultivo de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) no Estado do Acre. Rio Branco: Embrapa- CPAF/AC. Embrapa-CPAF/AC. Circular Técnica 28: 14 pp.

Pimentel FA, Silva MR 2000. Recomendações sobre processo de destilação comercial de biomassa triturada de pimenta longa (*Piper hispidinervum*). Comunicado Técnico Embrapa Acre, nº 123, p. 3.

Pinheiro VRE 1987. Avaliação do efeito carrapaticida de alguns piretróides sintéticos sobre o carrapato *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acarina ixodidae). *A Hora Veterinária* 40: 21-25.

Pinheiro VRE, Massard CL, Grisi L 1989. Atividade In Vitro de alguns piretóides sintéticos no carrapato *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787). *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 24: 1193-1199.

Pinheiro ACFB, Monteiro ALFBPA 1992. *Ciências do ambiente – ecologia, poluição e impacto ambiental*. São Paulo: Editora Makron.

Polyakov DK, Smirnova OI 1976. Resistance of ticks to organophosphorus and carbamate acaricides. *Veterinary Bulletin* 46: 324.

Pott A, Pott VJ 1994. *Plantas do pantanal*. Brasília, Brasil, EMBRAP/CPAP/SPI, p. 320.

Rey 2002. *Bases da Parasitologia Médica*. 2ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, 695 pp.

Rocha Neto OG, Veigas IJM, Brasil EC, Carvalho JEU, Poltronieri IS, Silva ESA, Shikama FL 1999. Recomendações básicas para o cultivo da pimenta longa (*Piper hispidinervum*) no Estado do Pará. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental, DFID. 9p. apostila do Curso de Manejo Fitotécnico de Pimenta Longa realizado de 22 a 26 de novembro de 1999 em Igarapé-Açu, Pará.

Roel AR, Vendramim JD 2006. Efeito residual do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) para lagartas de diferentes idades de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciência Rural, Santa Maria* 36: 1049-1054.

Seizi O 2003. *Fundamentos de toxicologia*. In Alonzo HG, Corrêa CL, Praguicidas (2.ed). Editora Atheneu. 437-458.

Silva HHG, Silva IG, Santos RMG, Rodrigues Filho E, Elias CN 2004. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 37: 396-399.

Silva IG, Zanon VOM, Silva HHG 2003. Larvicidal activity of Copaifera reticulata Ducke oil-resin against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology* 32: 729-732.

Singh S, Batra YK, Singh SM, Wig N, Sharma, BK 1995. Is Atropine Alone Sufficient in Acute Severe Organophosphorous Poisoning? Experience of a North West Indian Hospital. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 33: 628-630.

SVS/MS 2005. Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde, 6. ed. Brasília. Guia de Vigilância epidemiológica. Febre Maculosa Brasileira - Características clínicas e epidemiológicas. 330-343.

Thompson C, Spielman A, Krause PJ 2001. Coinfecting deer-associated zoonoses: Lyme disease, Babesiosis, and Ehrlichiosis. *Clinical Infectious Diseases* 33: 676-85.

Tsao TC, Juang YC, Lan RS, Shieh WB, Lee CH 1990. Respiratory Failure of Acute Organophosphate and Carbamate Poisoning. *Chest* 98: 631-635.

Wadt LHO 2001. Estrutura genética de populações naturais de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.), visando seu uso e conservação. Piracicaba: ESALQ. Tese Doutorado. 95 pp.

WHO (Word Health Organization) 1970. *Insecticide Resistance and Vector Control*. WHO Technical Report Series, Geneva.

WHO (Word Health Organization) 1998. *Test procedures for Insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio – efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces*. WHO Report of the WHO informal consulation, Geneva 46 pp.

Woldehiwet Z, Ristic M 1993. *Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals*. Oxford: Pergamon, 1993. 427p.

Veronesi R 1982. *Doenças infecciosas e parasitárias*, 7ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Viegas Júnior C 2003. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*. 26: 390-400.

Vieira PC, Fernandes JB 1999. *Em Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR, (eds); 1ª. ed., Ed. UFSC e UFRGS, Florianópolis/Porto Alegre.

Zwiener RJ, Ginsburg CM 1988. Organophosphate and Carbamate Poisoning in Infants and Children. *Pediatrics* 81: 121-126.

11– Anexos

11.1- Roteiro para preparação de Dissertação de Mestrado e Tese de Doutorado no PPGMT.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
Rua Delenda Rezende Melo, S/N- Setor Universitário - 74605-050 - Goiânia-GO
Fone **(062)521.1837 - 209.61.02 - FAX (062)521.1839** – E-mail: ppgmt@iptsp.ufg.br

ROTEIRO PARA PREPARAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO E TESE DE DOUTORADO

COMENTÁRIOS GERAIS:

O Colegiado do Curso recomenda que todas as teses e dissertações sejam apresentadas segundo as especificações a seguir:

1. As teses ou dissertações, qualquer que seja a modalidade escolhida: clássica ou baseada em manuscritos, devem ser redigidas em português. Para a modalidade baseada em manuscrito(s) estes devem ser incluídos no idioma em que foram publicados/ submetidos a publicação e as demais partes da tese devem ser redigidas em português.
2. Teses à nível de Doutorado devem conter contribuições originais e/ou importantes para área de conhecimento.
3. A dissertação para obtenção do grau de mestre deve mostrar a familiaridade com trabalhos prévios na área e habilidade para desenvolver, organizar e discutir os resultados da investigação. Não há exigência de originalidade na investigação/ resultados apresentados.
4. Qualquer que seja a modalidade escolhida, esta deverá ser apresentada com: capa, contracapa no verso da qual deverá ser inserida a ficha catalográfica (segundo modelo da Biblioteca Central da UFG), página de aprovação (para o exemplar final), agradecimentos, dedicatória, lista de abreviaturas.

COMPONENTES DA TESE DE MESTRADO OU DOUTORADO

1. OPÇÃO CLÁSSICA

A tese deve incluir na seguinte ordem:

a) Sumário do conteúdo;
b) Resumo em português e em inglês;
c) Introdução/ revisão da literatura nos moldes tradicionais;
d) Objetivos do estudo;
e) Material e métodos: descrição da população e métodos utilizados;
f) Resultados: descrição dos principais resultados e apresentação de tabelas/ gráfica/ fotografias, etc;
g) Discussão dos resultados nos moldes tradicionais.
h) Conclusões/ recomendações finais;
i) Referências bibliográficas de acordo com as normas adotas pelo periódico: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.
j) Anexos opcionais: Aprovação do Comitê de Ética, fichas/questionários utilizados.

2. OPÇÃO BASEADA EM MANUSCRITO

Como alternativa para formato de tese clássica ou tradicional a tese pode consistir em apresentação de um ou mais artigos nos quais o candidato é autor ou co-autor. Os artigos devem ter um eixo comum caracterizando-os como componentes de uma única linha de investigação.

1. Os candidatos tem a opção de incluir como parte integrante da tese o texto de um ou mais manuscritos submetidos, ou a serem submetidos para publicação ou artigos já publicados.
2. A tese deve ser mais do que uma coletânea de manuscrito(s). Todos os componentes da tese devem ser integrados com uma progressão lógica de um capítulo para o próximo. Para assegurar que a tese tenha continuidade de conteúdo, textos de conexão que possibilitem vínculos entre os diferentes artigos são recomendados.

   A estrutura da tese com inserção de manuscrito(s) deve conter na seguinte ordem:

a) Sumário do conteúdo;

b) Resumo geral da tese/ dissertação em português e em inglês;
c) Introdução/ revisão da literatura, nos moldes tradicionais.
d) Manuscrito(s) tais como publicados/redigidos/submetidos com texto de ligação;
e) Conclusões/ recomendações finais;
k) Referências bibliográficas citadas na introdução e textos de conexão de acordo com as normas adotadas pelo periódico Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. www.fiocruz.br
l) Anexos opcionais: Aprovação do Comitê de Ética, fichas/questionários utilizados.

Adendo: Nos casos de inserção de artigos já publicados, recomenda-se que só sejam incluídos na tese artigos sob co-autoria de pós graduandos quando estes tenham tido participação substancial nos trabalhos. Nestes casos, sugerimos uma declaração explícita de todos os co-autores e colaboradores do(s) trabalho(s) apresentado(s) especificando qual tipo de participação. Esta declaração poderia ser incluída em uma parte inicial da tese denominada: **Contribuição dos autores**. Consideramos que seja interesse dos candidatos e orientadores especificar claramente as responsabilidades de todos os autores e co-autores nos artigos apresentados.
Quando houver a inclusão de manuscritos a serem submetidos, relacionar apenas o nome do pós graduando na autoria.

Modificações substanciais no conteúdo da tese devem ser autorizados previamente pela comissão de pós graduação.

MODELO CAPA	MODELO CONTRACAPA
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO **UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS** **INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**	UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
Nome do Pós-Graduando	**Nome do Pós-Graduando**
(Título da Tese ou Dissertação)	**(Título da Tese ou Dissertação)**
Orientador: Nome	**Orientador:** Nome
Dissertação/Tese de (Mestrado ou Doutorado)	**Tese ou dissertação submetida ao PPGMT/UFG como requisito parcial para obtenção do Grau de ....,** **na área de concentração de ....**
Goiânia-GO, ano	Este trabalho foi realizado com o auxilio financeiro do....., processo.... **Goiânia-GO**, ano

11.2 Normas adotadas pelo Periódico Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

ISSN 0074-0276 ***versão impressa***
ISSN 1678-8060 ***versão on-line***

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- Objetivos e política editorial
  - Formato e estilo
- Checklist para os manuscritos

Objetivos e política editorial

As **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** são uma revista multidisciplinar que publica pesquisas originais relativas aos campos da medicina tropical (incluindo patologia, epidemiologia de campo e estudos clínicos), parasitologia médica e veterinária (protozoologia, helmintologia, entomologia e malacologia) e microbiologia médica (virologia, bacteriologia e micologia). A revista aceita, especialmente, pesquisas básicas e aplicadas em bioquímica, imunologia, biologia molecular e celular, fisiologia, farmacologia e genética relacionada a essas áreas. Comunicações breves são também consideradas. Artigos de revisão só quando solicitados. Ocasionalmente, trabalhos apresentados em simpósios ou congressos são aparecem como suplementos.

Os artigos apresentados devem ser escritos preferencialmente em inglês. Quando neste idioma, devem ser checados por alguém que tenha o inglês como primeira língua e que, preferencialmente, seja um cientista da área.

A submissão de um manuscrito às **Memórias** requer que este não tenha sido publicado anteriormente (exceto na forma de resumo) e que não esteja sendo considerado para publicação por outra revista. A veracidade das informações e das citações bibliográficas é de responsabilidade exclusiva dos autores.

Os manuscritos serão analisados por pelo menos dois pareceristas; a aprovação dos trabalhos será baseada no conteúdo científico e na apresentação.

Todo o material deve ser enviado para a Produção Editorial, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Av. Brasil 4365, Pavilhão Mourisco, sala 308, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Os manuscritos que não estiverem de acordo com estas instruções serão imediatamente devolvidos.

Ao encaminhar um manuscrito para a revista, os autores devem estar cientes de que, se aprovado para publicação, o copyright do artigo, incluindo os direitos de reprodução em todas as mídias e formatos, deverá ser concedido exclusivamente para as

Memórias. A revista não recusará as solicitações legítimas dos autores para reproduzir seus trabalhos.

Favor providenciar e checar cada item abaixo antes de submeter seu manuscrito para as **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**:

- Carta de submissão do trabalho, assinada por todos os autores, especificando o autor de contato, bem como endereço, telefone, fax e e-mail.
- O manuscrito (incluindo tabelas e referências) deve ser preparado em um software para edição de textos, em espaço duplo, fonte 12, impresso em papel padrão e paginado. As margens devem ser de pelo menos 3 cm.
- A seqüência do artigo deve ser: **título resumido** (com até 40 caracteres - letras e espaços), **título** (com até 250 caracteres), **autores** (sem títulos ou graduação), **afiliação institucional** (endereço completo somente do autor correspondente), **resumo**, **palavras-chave**, **notas de rodapé** indicando a fonte de financiamento ou mudanças de endereço, **introdução**, **material e métodos**, **resultados**, **discussão**, **agradecimentos** (os mínimos necessários), **referências**, **tabelas** (fora do texto e com título), e **figuras** (com legendas em folha separada).
- Só as referências citadas no texto devem aparecer nas lista e devem seguir o estilo do Index Medicus. Se a referência for de artigo ainda não publicado, mas já aceito, deverá ser apresentada carta da revista que publicará o manuscrito ou de outros autores autorizando a referida citação.
- Para maiores informações sobre o formato e o estilo da revista, favor consultar um número recente da Revista ou entrar em contato com a Editoria Científica pelo telefone (+55-21-2598.4335), fax (+55-21-2561.1442 / 2280-5048), ou e-mail (memorias@fiocruz.br / memorias@ioc.fiocruz.br).

Formato e estilo

O manuscrito deve ser organizado de acordo com a seguinte ordem: título corrente, título, nomes dos autores, afiliações institucionais, resumo, palavras-chave, introdução, materiais e métodos, resultados, discussão, agradecimentos e referências. Patrocínios devem ser mencionados em nota de rodapé na primeira página.

Resumo: Com até 200 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves), o resumo deve apresentar os objetivos do estudo ou pesquisa, seus procedimentos básicos (seleção dos temas de estudo ou animais de laboratório; métodos analíticos ou de observação), as principais descobertas ou resultados (oferecendo dados específicos e seu significado estatístico, se possível), e as principais conclusões. Deve enfatizar novos e importantes aspectos do estudo ou observações.

Palavras-chave: Devem ser fornecidos de 3 a 6 termos, de acordo com a lista Medical Subject Headings (Mesh) do *Index Medicus*.

Introdução: Deve determinar o propósito do estudo, oferecer um breve resumo (e não uma revisão de literatura) dos trabalhos anteriores relevantes, e especificar quais novos avanços foram alcançados através da pesquisa. A introdução não deve incluir dados ou conclusões do trabalho em referência.

Materiais e métodos: Deve oferecer, de forma breve e clara, informações suficientes para permitir que o estudo seja repetido por outros pesquisadores. Técnicas padronizadas bastam ser referenciadas.

Ética: Ao descrever experimentos relacionados a temas humanos, indicar se os procedimentos seguidos estiveram de acordo com os padrões éticos do comitê responsável por experimentos humanos (institucional ou regional) e de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 1983. Não citar os nomes ou iniciais dos pacientes ou registros de hospitais, especialmente nos materiais ilustrativos. Ao relatar experimentos em animais, indicar se diretrizes de conselhos de pesquisa institucionais ou nacionais, ou qualquer lei nacional relativa aos cuidados e ao uso de animais de laboratório foram seguidas.

Resultados: Devem oferecer uma descrição concisa das novas informações descobertas, com o mínimo julgamento pessoal. Não repetir no texto todos os dados contidos em tabelas e ilustrações.

Discussão: Deve limitar-se ao significado de novas informações e relacionar as novas descobertas ao conhecimento existente. Somente as citações indispensáveis devem ser incluídas.

Agradecimentos: Devem ser breves e concisos e se restringir ao absolutamente necessário.

Referências: Devem ser precisas. Somente as citações que aparecem no texto devem ser referenciadas. Trabalhos não publicados, a não ser os já aceitos para publicação, não devem ser citados. Trabalhos aceitos para publicação devem ser citados como "in press"; nesse caso, uma carta de aceitação da revista deverá ser fornecida. Dados não publicados devem ser citados somente no texto como "unpublished observations"; nesse caso, uma carta com a permissão do autor deve ser fornecida. As referências ao final do manuscrito devem ser organizadas em ordem alfabética de acordo com o sobrenome do primeiro autor.

Os títulos de revistas devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no *Index Medicus*. Consultar a List of Journals Indexed no I*ndex Medicus* publicada no número de janeiro do *Index Medicus* ou no website http://www.nlm.nih.gov/serials/lii.html.

- No texto, usar o sobrenome dos autores e a data:

Lutz (1910) ou (Lutz 1910).

Com dois autores, a forma é

(Lutz & Neiva 1912) ou Lutz and Neiva (1912).

Quando há mais que dois autores, somente o primeiro é mencionado:

Lutz et al. (1910) ou (Lutz et al. 1910).

- No final do trabalho, usar os seguintes estilos:

Artigo de revista

Chagas C, Villela E 1922. Forma cardíaca da tripanosomiase americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 14: 15-61.

Livro ou Tese

Morel CM 1983. *Genes and Antigens of Parasites*. A Laboratory Manual, 2nd ed., Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, xxii + 580 pp.

Capítulo de livro

Cruz OG 1911. The prophylaxis of malaria in central and southern Brasil. In R Ross, *The Prevention of Malaria*, John Murray, London. p. 390-398.

Ilustrações: As ilustrações devem ser limitadas ao mínimo necessário para exemplificar estruturas ou condições particulares, para sintetizar dados ou para registrar resultados quantitativos. Detalhes de resultados apresentados nessa forma não devem ser repetidos no texto. Figuras e tabelas devem ser compreensíveis sem a necessidade de referência ao texto.

- **Figuras** devem ser apresentadas em uma folha de mesmo tamanho que as do manuscrito. As fotografias devem ser bem nítidas, com alto contraste, ampliadas em preto e branco em papel brilhante. As fotografias e os desenhos devem ser marcados no verso com o nome do autor, o número da figura e uma seta indicando a parte de cima da ilustração. Se apresentadas lâminas, as figuras devem ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. As escalas devem ser indicadas por uma linha ou barra na figura, e referenciadas, se necessário, na legenda (por exemplo, bar = 1 mm etc.). Lâminas e gráficos devem ajustar-se tanto em uma coluna (7 cm) ou na largura completa (14.5 cm) da página, e devem ser menores que a página para permitir a inclusão da legenda. As legendas devem ser encaminhadas em uma folha separada. As letras e números nas figuras devem ter tamanho legível após a redução ou a impressão. Ilustrações coloridas somente podem ser aceitas se os autores assumirem os custos. Por outro lado, uma fotografia colorida ilustra a capa de cada fascículo de **Memórias**, e os autores são convidados a submeter para consideração da revista ilustrações com legendas de seus manuscritos que poderão vir a ilustrar a capa sem custos para os autores.

- **Tabelas** devem complementar, e não duplicar, o texto. Elas devem ser numeradas em algarismos romanos. Um título breve e descritivo deve constar no alto de cada tabela, com quaisquer explicações ou notas de rodapé (identificadas com letras a, b, c etc.) colocadas abaixo.

Comunicações breves devem ser breves e diretas. Seu objetivo é comunicar com rapidez resultados ou técnicas particulares. As comunicações não devem ocupar mais do que quatro páginas impressas, incluindo figuras e/ou tabelas. Não devem conter referências em excesso. As referências devem ser citadas no final do texto, usando o mesmo formato para artigos originais. Um resumo breve e três palavras-chave devem ser apresentados.

Formato alternativo: Os manuscritos podem ser submetidos seguindo os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produzidos pelo International Committee of Medial Journal Editors, também conhecidos como Vancouver Style. Nesse caso, os autores devem seguir as diretrizes da quinta edição (*Annals of Internal Medicine* 1997; 126: 36-47, ou no website http://www.acponline.org/journals/resource/unifreqr/htm), sendo responsáveis por modificar o manuscrito onde diferir das instruções aqui apresentadas, se o manuscrito for aceito para publicação. Os autores também deverão seguir os Uniform Requirements para quaisquer outras diretrizes omitidas nestas instruções.

Uma vez que um trabalho seja aceito para publicação, os autores devem enviar:

um disquete contendo o texto completo da versão final aprovada do manuscrito (incluindo tabelas e gráficos), processado em um editor de texto como Word ou Word Perfect para Windows (formato Macintosh deverá ser convertido);

- uma declaração assinada por todos os autores afirmando que:

(i) todos os dados contidos no trabalho são precisos;
(ii) todos os autores participaram do trabalho de forma substancial e estão preparados para assumir responsabilidade pública pelo seu conteúdo;
(iii) o manuscrito ora apresentado a essa revista não está sendo publicado no todo ou em parte por outra revista, assim como não está sendo encaminhado para outra publicação. Autores de diferentes países ou instituições podem assinar em diferentes folhas que contenham a mesma declaração;

- uma declaração de copyright fornecida pela produção editorial da revista, assinada pelo autor responsável pela correspondência.

Taxas: A revista não cobra taxas para publicação.

Provas: Serão enviadas provas tipográficas aos autores para a correção de erros de impressão. As provas devem retornar para a Produção Editorial na data estipulada. Outras mudanças no manuscrito original não serão aceitas nesta fase.

Separatas: Os autores receberão 30 separatas gratuitamente. Junto, um formulário de pedidos e uma lista de preços serão enviados aos autores, permitindo que novas separatas sejam solicitadas.

11.3- Normas para Publicação no Periódico Científico: Apply Exp Acarology.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS — EXPERIMENTAL AND APPLIED ACAROLOGY

Manuscript submission

Legal requirements
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) 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.

How to submit
Authors should submit their manuscripts **online**. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please connect directly to the site and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen. http://www.editorialmanager.com/appa

Language
Springer appreciates any efforts that you make to ensure that the language is corrected before submission. This will greatly improve the legibility of your paper if English is not your first language.

Manuscript preparation

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 100 to 300 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

Introduction

The introduction should clearly state the purpose (aims and objectives) of the paper. It should include key references to appropriate work but should not be an historical or literature review.

Materials and methods

Methods should be described in sufficient detail to allow the work to be repeated. References should be used where appropriate to avoid repetition of established methods and techniques. The origin of materials and/or suppliers of equipment should be named.

Results

Results should be presented in a logical sequence. Use tables and figures as appropriate but do not repeat information in both formats or in the text.

Discussion

The discussion should emphasize the implications and practical significance of the findings, their limitations, and relevance to previous studies.

Text formatting

For submission 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.

Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use MathType instead.

Save your file in two formats: doc and rtf. Do not submit docx files.

Heading levels, numbering

Please use no more than three levels of displayed **headings**.

Abbreviations and acronyms

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

SI units, numbers

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

Terminology

Genus and species names should be in *italics*. The common names of animals should not be capitalized.

Equations

Please use the standard mathematical notation for **formulae, symbols** etc.:

• *Italic* for single letters that denote mathematical constants, variables, and unknown quantities
• Roman/upright for numerals, operators, and punctuation, and commonly defined functions or abbreviations, e.g., cos, det, e or exp, lim, log, max, min, sin, tan, d (for derivative)
Bold for vectors, tensors, and matrices.

Footnotes
Footnotes on the title page are not given reference symbols. 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).

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.

References
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.

Citation in text
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 (Becker and Seligman 1996).
This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1993).

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

Journal article
Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. N Engl J Med 965:325–329
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
Article by DOI
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. J Mol Med. doi:10.1007/s001090000086
Online document
Doe J (1999) Title of subordinate document. In: The dictionary of substances and their effects. Royal Society of Chemistry. Available via DIALOG. http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document. Cited 15 Jan 1999

Always use the standard **abbreviation** of a journal's name according to the ISSN *List of Title Word Abbreviations*, see http://www.issn.org/en/node/344

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 heading. The table title should explain clearly and concisely 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 heading.
• 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.

Figures
• All figures are to be numbered using Arabic numerals.
• Figure parts should be denoted by lowercase letters.
• Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
• For each figure, please supply a figure caption.
• Make sure to identify all elements found in the figure in the caption.
• Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the caption.
• For more information about preparing your illustrations, please follow the hyperlink to the artwork instructions on the right.

ESM
If **Electronic supplementary material** (ESM) is submitted, it will be published as received from the author in the online version only.
ESM may consist of
• information that cannot be printed: animations, video clips, sound recordings.
• information that is more convenient in electronic form: sequences, spectral data, etc.
• large original data, e.g. additional tables, illustrations, etc.
• If supplying any ESM, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables (e.g., ". . . as shown in Animation 3.").
• For details on formats and other information, please follow the hyperlink to the specific instructions for electronic supplementary material on the right.

After acceptance
During the production phase the following issues have to be clarified:

Open Choice
In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles. Springer Open Choice

Copyright transfer
Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws. Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, they agree to the Springer Open Choice
Licence.

Offprints/Reprints
Free and/or additional **offprints** can be ordered by the corresponding author. Fifty offprints of each contribution are supplied free of charge to the corresponding author.

Color in print
Online publication of **color illustrations** is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs. The charges are EUR 950,- / US$ 1150,- per article.

Proof reading
Subsequently, proofs will be sent to the corresponding author by e-mail. The purpose of the **proof** is to check for typesetting errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor. After online publication, major errors can only be corrected in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online first
The article will be published **online** after receipt and processing of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

11.4- Normas para Publicação no Periódico Científico: *Veterinary Parasitology*.

VETERINARY PARASITOLOGY

An international scientific journal and the Official Organ of the American Association of Veterinary Parasitologists (AAVP)), the European Veterinary Parasitology College (EVPC) and the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP).

Guide for Authors

Veterinary Parasitology

Types of contributions

1. Original research papers (Regular Papers).
2. Review articles.
3. Rapid Communications.
4. Short Communications.
5. Letters to the Editor.
6. Book Reviews

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.
Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be submitted or invited.
Rapid Communications should contain information of high 'news'/scientific value worthy of very rapid publication. Rapid Communications should be submitted to the journal as such (i.e. clearly labelled as a RC) and should, in general, not exceed 2000 words in length. Upon receipt, they will be subject to rapid assessment and if accepted, published with priority.
Short Communications should consist of original observations or new methods within the scope of the journal. Reports of observations previously published from different geographical areas may be accepted only if considered sufficiently unusual or noteworthy. The Communications should be concise with the minimum of references, and cover no more than four pages of the journal; they need not be formally structured as are full papers, but should give sufficient methods and data necessary for their comprehension.
Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors-in-Chief. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.
Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old and were written in English.

Book reviews will be solicited by the Book Review Editor. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to the Book Review Editor:
Dr F.H.M. Borgsteede
Animal Sciences Group, Wageningen UR
Division Infectious Diseases
Laboratory of Parasitic Diseases
P.O. Box 65
8200 AB Lelystad
The Netherlands

Submission of manuscripts

Submission to *Veterinary Parasitology* now proceeds online via Elsevier Editorial System - http://ees.elsevier.com/vetpar. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a given list, as well as a category designation (Original Research Paper, Short Communication, and so on). Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent reviewing.
Authors are invited to suggest the names of up to 5 referees (with email addresses) whom they feel are qualified to evaluate their submission. Submission of such names does not, however, imply that they will definitely be used as referees. Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.
Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.
Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.
Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o WHO, Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland, or at the following URL: http://www.cioms.ch/frame_1985_texts_of_guidelines.htm.
Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Veterinary Parasitology*.

Preparation of manuscripts

1. Manuscripts should be written in English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission.
Language Editing: Elsevier's Authors Home provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance *before* they submit their article or *before* it is accepted for publication. Authors should

contact these services directly. Authors should also be aware that *The Lucidus Consultancy* edit@lucidusconsultancy.com offers a bespoke service to putative contributors to Veterinary Parasitology who need to arrange language improvement for their manuscripts. For more information about language editing services, please email authorsupport@elsevier.com.

Please note that Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our terms & conditions http://www.elsevier.com/termsandconditions.

2. Manuscripts should have **numbered lines**, with wide margins and **double spacing** throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.
3. Manuscripts in general should be organized in the following order:
Title (should be clear, descriptive and not too long)
Name(s) of author(s)
Complete postal address(es) of affiliations
Full telephone, Fax No. and e-mail address of the corresponding author
Present address(es) of author(s) if applicable
Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent
Abstract
Keywords (indexing terms), normally 3-6 items. Please refer to last index (Vol. 100/3-4).
Introduction
Material studied, area descriptions, methods, techniques
Results
Discussion
Conclusion
Acknowledgments and any additional information concerning research grants, etc.
References
Tables
Figure captions
Tables (separate file(s))
Figures (separate file(s)).
4. Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.
5. SI units should be used.
6. Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

Abstracts
The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the

journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.
2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.
4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible. Any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.
5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.
6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.
7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.
8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.
9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.
Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.
10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL: http://www.elsevier.com/artworkinstructions

Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published free of charge online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: http://www.sciencedirect.com. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit http://www.elsevier.com/artworkinstructions

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.
2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed – if necessary – by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12–16)".
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on author's names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates – publications of the same author with one co-author – publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.
5. Use the following system for arranging your references:

a. *For periodicals*

Lanusse, C.E., Prichard, R.K., 1993. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. Vet. Parasitol. 49, 123–158.

b. *For edited symposia, special issues, etc., published in a periodical*

Weatherley, A.J., Hong, C., Harris, T.J., Smith, D.G., Hammet, N.C., 1993. Persistent efficacy of doramectin against experimental nematode infections in calves. In: Vercruysse, J. (Ed.), Doramectin – a novel avermectin. Vet. Parasitol. 49, 45–50.

c. *For books*

Blaha, T. (Ed.), 1989. Applied Veterinary Epidemiology. Elsevier, Amsterdam, 344 pp.

d. *For multi-author books*

Wilson, M.B., Nakane, P.K., 1978. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp, W., Holubar, K., Wick, G. (Eds.), Immunofluorescence and Related Staining Techniques. North Holland, Amsterdam, pp. 215–224.

6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references in accordance with BIOSIS Serial Sources, published annually by BIOSIS. The correct abbreviation for this journal is Vet. Parasitol.
7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".
9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.
10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.
11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

Formulae

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.
2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.
3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.
4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.
5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+}, not as Ca^{++}.
6. Isotope numbers should precede the symbols e.g. ^{18}O.
7. The repeated use of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Footnotes

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information into the normal text.

2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the*International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.
5. For the denomination of parasitic diseases or infections, authors are requested to follow the Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases (SNOAPAD) published in 1988 in *Veterinary Parasitology* (Kassai, T. et al., 1988. Vet. Parasitol. 29, 299–326).

Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article.
Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+1) 215 239 3804 or +44(0)1865 843830, fax +44(0)1865 853333, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage http://www.elsevier.com/permissions.
Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Authors Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:
• make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
• make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
• post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
• post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com)
• present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
• for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
• retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
• include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)

• use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
• prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit http://www.elsevier.com/fundingbodies).

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Author Services

Questions arising after acceptance of the manuscript, especially those relating to proofs, should be directed to Elsevier Ireland, Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland, Tel.: (+353) 61 709600, Fax: (+353) 61 709111/113, authorsupport@elsevier.com.

Authors can also keep a track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track your accepted article" option on the journal's homepage http://www.elsevier.com/locate/vetpar For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in

the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.

Offprints

1. The corresponding author will, at no cost, be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints (100 for Review Articles). The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.
2. Additional paper offprints can be ordered on an offprint order form, which is included with the proofs.
3. UNESCO coupons are acceptable in payment of extra paper offprints.

Veterinary Parasitology **has no page charges**

11.5- Normas para Publicação no Periódico Científico: *Neotropical Entomology*.

Neotropical Entomology

ISSN 1519-556X ***printed version***
ISSN 1678-8052 ***online version***

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- Scope and policy
- Form and preparation of manuscripts
- Further information

Scope and policy

Neotropical Entomology publishes original scientific articles that significantly contribute to entomological knowledge. Articles previously submitted to or accepted by other journals are not accepted. Technological-content papers with bioassays on efficacy of methods to control insects and mites are not accepted. Manuscripts are peerreviewed and acceptance for publication is based on recommendations by the editorial board and peer-reviewers.

Languages. Manuscripts should preferably be in English, although texts in Portuguese and Spanish are also considered.

Types of manuscript. Manuscripts can be published as scientific articles, scientific notes and forum articles.

Submission. All manuscripts should be submitted electronically using the form available at www.seb.org.br/ neotropical.

Form and preparation of manuscripts

Please submit manuscripts as MS Word 97 or other recent word processors with a page size of 21.0 x 29.7 cm. Type all pages as double-spaced with 2.5 cm margins. Use the font Times New Roman with a size of 12 points. Number all lines and pages consecutively, beginning with the title page.

Front page. Justify the name and the regular and electronic mail addresses of corresponding author on the upper right of the page. Center-justify the title using capital initials (except for prepositions and articles). Scientific names in the title should be followed by the descriptor's name (do not mention the year) and by the order and family names in parentheses. Author names should be center-justified below the title using small capital letters; only the first and last names of authors should be written in full. Next, list authors' affiliation including mail and email addresses; call numbers should be used for more than one address. This page is not sent to peer-reviewers, to preserve author identity.

Page 2. Title page. Write the title of the manuscript.

Page 3. Abstract in a second language. For articles submitted in English, the abstract can be in Portuguese or in Spanish. For articles originally in Portuguese or Spanish, the abstract should be in English. The abstract should be easy to understand and not require reference to the body of the article. Only very important results should be presented in the abstract; it must not contain any abbreviations or statistical details. Initials of the original title should be in capital initials (except for prepositions, conjunctions and articles). Below the title type RESUMO, RESUMEN or ABSTRACT followed by a hyphen and the text. The abstract should be one-paragraph long and not exceed 250 words. Skip one line and type PALAVRAS-CHAVE, PALABRAS-CLAVE or KEY WORDS in capital letters. Type three to five words separated by commas; these words can not be in the title.

Page 4. Abstract. This page contains the abstract in the same language as the article. Abstracts and Resumo must have exactly the same content.

Page 5. Introduction. Do not type the subtitle "Introduction". The introduction should clearly state the problem, the hypothesis, and the objectives of the study. When first mentioned, scientific names should be followed by the descriptor's name (do not mention the year), and by the order and family in parentheses.

Material and Methods. The subtitle "Material and Methods" should be in bold and center-justified. Include all information for replication of the study, including the statistical design used and if appropriate, the statistical program used for data analysis.

Results and Discussion. Center-justify the subtitle "Results and Discussion" or "Results" and "Discussion" separately, using bold face. The conclusions should be stated in the end of Discussion.

Acknowledgement. The subtitle should be in bold and centralized. Aknowledgements should be concise and contain your recognition to people first, and then to affiliations or sponsors.

References. References should be typed in a separate page, in alphabetical order. The author's last names are typed in full and capital initials followed by a period should be used for Christian names; commas separate the names of authors. Next, type the year. The first author is cited by the last name first and then name initials; all others are cited by their name initials first and then last names in full. Use the symbol "&" before citing the last author. Abbreviate the titles of bibliographical sources, starting with capital letters. Use journal acronyms according to BIOSIS Serial Sources (http://csssrvr.entnem.ufl.edu/~pmc/journals/all_journals.htm or http://www.library.uq.edu.au/faqs/endnote/biosciences.txt). Abbreviation of Brazilian journal titles must follow each journal requirements. Please avoid citations of dissertations, theses, and extension materials. Do not cite restrictedcirculation materials (such as institutional documentation and research reports), monographs, partial research reports, or abstracts of papers presented at scientific meetings. Citation examples for books, book chapters, journal articles, and on-line materials are available at the Neotropical Entomology site.

Tables. Tables and respective titles should be typed in MS Word 97 or other recent programs and" uploaded separately, one per page, after the References section. Please number tables consecutively with Arabic numbers followed by a full stop, in the order

they occur in the text. Footnotes must have call numbers. Example of a table title: Table 1. Mean (± SE) duration and survivorship of larvae and pupae of T. absoluta fed on leaves of different tomato genotypes. Temp.: 25 ± 1ºC, RH: 70% and photophase: 14h.

Figures. Insert the list of figures after the tables. Use the abbreviation "Fig." Figures should be smaller than 500 kb and in JPG (photos) or GIF (graphs or schema). Original or higher resolution figures can be required after manuscript approval. Figure files should be named according to figure numbers. Examples: fig1.gif or fig2.jpg. Fig. 1. Flutuação populacional de M. fimbriolata em São Carlos, SP, 2002 a 2005.

In-text citations

Scientific names. Write the scientific names in full, followed by the descriptor's name, when they are mentioned for the first time in the Resumo, Abstract and Introduction. E.g.: *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Use the abbreviated generic name in the rest of the paper, including tables and figures. E.g.: *S. frugiperda.*

References. Please write the author's last name with capital initial, followed by the year of publication (for example, Martins 1998). More than one publication by the same author are chronologically ordered (for example: Martins 1998, Garcia 2002, Gomes 2005). Use "&" for two authors (such as Martins & Gomes 2004). Please use italicized "*et al*." for more than two authors (as in Garcia *et al*. 2003); for more than two citations of the same author, use a semi-colon between authors (for example.: Garcia 2003; Toledo 2001, 2005).

Tables: Use the word "Table" in full in the text (example: Table 1).

Figures: Use the abbreviation "Fig." in the text (such as Fig. 3).

Scientific Notes. Manuscripts that register trophic occurrences and interactions and new methods for the study of insects can be accepted. Manuscript requirements are the same as for scientific articles but the Introduction, the Material and Methods, and the Results and Discussion sections are written as one paragraph without subtitles. The abstract can have up to 100 words.

Forum. Extensive interpretative or evaluative articles on current topics in Entomology are published in this section. Controversial articles are welcome and must present both the currently accepted and the controversial paradigms or views. Neotropical Entomology and its Editorial Board are not responsible for the opinions expressed in this section.

Printing Costs. SEB members non-resident in Brazil pay US$ 12.00 (twelve dollars) per printed page, non-members pay US$ 18.00 (eighteen dollars) per page. Color reproduction should only be included when highly necessary. Authos pay additionally US$ 35.00 (thirty five dollars) per color page. All articles can be assessed and downloaded free of charge from the Neotropical Entomology and Scielo site (www.scielo.br/ne).