



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA

**REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL
COORDENAÇÃO ESTADUAL DO PPG-BIONORTE**

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE PESTICIDA DE *Piper tuberculatum*
JACQ. (PIPERACEAE) PARA O CONTROLE DAS INFESTAÇÕES DE
Rhipicephalus microplus (IXODIDEAE) E *Haematobia irritans* (MUSCIDAE)**

ANDRINA GUIMARÃES SILVA BRAGA

**Porto Velho - RO
JULHO/2017**

ANDRINA GUIMARÃES SILVA BRAGA

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE PESTICIDA DE *Piper tuberculatum*
JACQ. (PIPERACEAE) PARA O CONTROLE DAS INFESTAÇÕES DE
Rhipicephalus microplus (IXODIDEAE) E *Haematobia irritans* (MUSCIDAE)**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal de Rondônia, como requisito final para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. VALDIR ALVES
FACUNDO

Coorientador: Prof. Dr. FÁBIO DA SILVA
BARBIERI

**Porto Velho - RO
JULHO/2017**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

B813a Braga, Andrina Guimarães Silva
Avaliação in vitro da atividade pesticida de *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae) para o controle das infestações de *Rhipicephalus microplus* (Ixodidae) e *Haematobia irritans* (Muscidae) / Andrina Guimarães Silva Braga. 2017
106 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Alves Facundo
Coorientador: Prof. Dr. Fábio da Silva Barbieri
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. *Piper tuberculatum* (Pimenta-de-macaco). 2. Plantas inseticidas. 3. Controle de pragas. 4. *Rhipicephalus microplus* (Carrapato). 5. *Haematobia irritans* (Mosca-dos-chifres). I. Facundo, Prof. Dr. Valdir Alves II. Universidade Federal do Amazonas III.
Título

ANDRINA GUIMARÃES SILVA BRAGA

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE PESTICIDA DE *Piper tuberculatum*
JACQ. (PIPERACEAE) PARA O CONTROLE DAS INFESTAÇÕES DE
Rhipicephalus microplus (IXODIDEAE) E *Haematobia irritans* (MUSCIDAE)**

Tese de doutorado apresentada ao
Curso de Doutorado do Programa de
Pós-Graduação em Biodiversidade e
Biotecnologia da Rede BIONORTE, na
Universidade Federal de Rondônia,
como requisito final para a obtenção do
Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. VALDIR ALVES FACUNDO

Coorientador: Prof. Dr. FÁBIO DA SILVA BARBIERI

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Valdir Alves Facundo
Orientador - Presidente da banca

Prof. Dr. José Roberto Vieira Junior
Titular

Prof. Dr. César Augusto Domingues Teixeira
Titular

Prof. Dr. Renato Abreu Lima
Titular

Prof. Dra. Caroline Bioni Garcia Teles
Titular

Prof. Dr. Júlio Sancho Linhares Teixeira Militão
Suplente

Prof. Dr. Alexandre de Almeida e Silva
Suplente

Porto Velho – RO

JULHO/2017

Dedico este trabalho a Paulo Leandro Braga Raimundo, meu querido esposo, pelo grande apoio, carinho e compreensão de minhas ausências.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser o guia de meus passos e ajudando-me a tornar real o meu anseio e por me colocar numa família iluminada e abençoada, por também me dar força sempre e quando eu mais preciso, guiando sempre meu caminho para junto Dele;

Ao meu amado esposo Paulo Leandro Braga, pelo incentivo, paciência, apoio, companheirismo e por compartilhar de toda uma vida. Amo você!

Aos meus pais Alcilene Ribeiro e Sebastião Rufino pelo incentivo aos estudos, por apoiarem as minhas escolhas, aos ensinamentos, carinho, amor e otimismo. Enfim, ajudar em tudo que preciso, ouvir as minhas chateações e serem muito pacientes nessas horas. Amo vocês incondicionalmente;

A minha irmã querida Adriele Guimarães, a minha sogra e cunhada Adelina e Ana Paula Braga pelo apoio prestado e amizade;

Ao hoje então Dr. Renato Abreu Lima, um amigo, um irmão que esteve comigo desde o início da graduação, aconselhando-me e incentivando na busca de conhecimento, obrigada por tudo;

À Universidade Federal de Rondônia que, por sua natureza pública e gratuita, permitiu-me realizar esse estudo, hoje expresso neste trabalho;

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) pelo suporte físico e material no desenvolvimento desta pesquisa;

Ao meu orientador Prof. Dr. Valdir Alves Facundo pela sua competência, dedicação e incentivo que tornou este trabalho possível e só aumentou minha admiração;

Ao meu coorientador Prof. Dr. Fábio da Silva Barbieri pela sua competência, pelo exemplo de pessoa, dedicação, incentivo e paciência demonstrada durante os momentos difíceis, e, principalmente, por aceitar contribuir como coorientador nesse trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais (LPQPN) da Universidade Federal de Rondônia (UNIR), Dionatas, Fernanda, Deyse Ane, Laís Helena, Guilherme, Rodolfo, Rosângela e Priscila;

Aos colegas do Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa-RO, Caroline, Senhor Xavier, Tiego, Clariana e Marcela pelo carinho e ajuda para realização deste trabalho;

Aos colegas de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, pelos momentos de muito estudo e dedicação, durante a obtenção dos créditos, mas muito alegres na convivência diária;

À Isabel, Lúcia Pontes, Sílvia, Leila, Giovani e Emerson, funcionários da secretaria da pós-graduação da BIONORTE, pela paciência de me receber a qualquer hora e me ajudar com muita boa vontade;

Aos meus professores da pós-graduação: Luciana Gatto, Wanderley Bastos, Carolina Dória e Andreimar Soares, pela grandiosa contribuição à minha formação acadêmica;

Aos estatísticos Rodrigo Barros (Embrapa) e Moreno (LaBEIn) pelo suporte prestado;

Ao Cleber pela ajuda com as cromatografias;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo apoio e auxílio financeiro no decorrer do desenvolvimento deste trabalho;

A todos que participaram direta e indiretamente deste trabalho.

“Aprendi a transformar o medo em respeito, o respeito em confiança. Descobri como é bom chegar quando se tem paciência para se chegar, onde quer que seja. Aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão”.

Amyr Klink

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.

José de Alencar

BRAGA, Andrina Guimarães Silva. **Avaliação *in vitro* da atividade pesticida de *Piper tuberculatum* JACQ. (Piperaceae) para o controle das infestações de *Rhipicephalus microplus* (Ixodidae) E *Haematobia irritans* (Muscidae).** 2017. 106f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2017.

RESUMO

R. microplus e *H. irritans* são ectoparasitas que causam prejuízos econômicos na pecuária brasileira. Os produtos naturais extraídos de plantas são fontes promissoras para o combate de pragas, reduzindo os efeitos negativos ocasionados pela aplicação descontrolada dos acaricidas disponíveis no mercado. *P. tuberculatum* destaca-se nas pesquisas devido as suas várias ações inseticidas. Com isso, o objetivo desse trabalho foi realizar estudo fitoquímico de *P. tuberculatum*, bem como determinar seu potencial inseticida contra *H. irritans* e *R. microplus*. Neste estudo, foi avaliado o potencial inseticida de extratos e de substâncias isoladas de *P. tuberculatum*. Os extratos foram obtidos de folhas, frutos e talos preparados com os solventes: hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol em seis concentrações, no entanto, para as substâncias foram quatro concentrações. A atividade dos extratos foi avaliada sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e de adultos *H. irritans*. As substâncias isoladas e identificadas foram a piplatina, pelitorina e ácido 3,4,5- trimetóxi-dihidrocinâmico, isoladas a partir de extrato etanólico de frutos de *P. tuberculatum*. No teste de imersão de adultos de *R. microplus*, observou-se que o extrato que apresentou eficácia foi o extrato de fruto com 99,7%, sendo que para os demais extratos o fruto também mostrou ser promissor para o teste de imersão de adultos. Para as larvas de *R. microplus*, a avaliação ocorreu em 24 horas, observando CL₅₀ de 1,23 mg/mL e 1,29 mg/mL para os extratos hexânico de folhas e talos, respectivamente. Já a CL₅₀ encontrada para *H. irritans* em papel filtro impregnado, o extrato etanólico de talos a CL₅₀ foi de 6,00 mg/mL, sendo este o melhor resultado para este teste. No entanto, entre as substâncias isoladas, somente a pelitorina mostrou resultados (CL₅₀ de 0,48 mg/mL). Isso pode ter corrido devido a não combinação de compostos, já que nos extratos, a combinação dos compostos fez com que os resultados fossem mais potencializados. Dessa forma, o presente trabalho demonstrou que a espécie *P. tuberculatum* apresenta importante ação acaricida.

Palavras-chave: *Piper tuberculatum*, plantas inseticidas, controle de pragas, *Rhipicephalus microplus*, *Haematobia irritans*.

BRAGA, A.G.S. **In vitro evaluation of pesticide activity of *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae) for controlling infestations of *Rhipicephalus microplus* (Ixodidae) and *Haematobia irritans* (Muscidae).** 2017. 106f. Thesis (Doctorate in Biotechnology) - Federal University of Rondônia, Porto Velho, 2017.

ABSTRACT

R. microplus and *H. irritans* are ectoparasites that cause economic losses in Brazilian livestock. Natural products extracted from plants are promising sources for pest control, reducing the negative effects caused by the uncontrolled application of commercially available acaricides. *P. tuberculatum* stands out in the surveys due to its insecticidal actions. Therefore, the objective of this work is to perform the phytochemical study of *P. tuberculatum*, as well as its insecticidal potential against *H. irritans* and *R. microplus*. In this study the insecticidal potential of extracts and isolated substances of *P. tuberculatum* was evaluated, extracts were obtained from leaves, fruits and stalks prepared with solvents: hexane, chloroform, ethyl acetate and ethanol in six concentrations, however, for Como Concentrations. The activity of the extracts was evaluated on engorged larvae and females of *R. microplus* and adults *H. irritans*. The isolated and identified substances were piplatin, pelitorin and 3,4,5-trimethoxy dihydrocinnamic acid isolated from ethanolic extract of *P. tuberculatum* fruits. There is no immersion test of adults of *R. microplus*, it was observed that it offers effective results of fruit extract with 99,7%, and for other extracts or fruit are also shown as promising for adult immersion test. For *R. microplus* larvae a 24 hour evaluation, observing LC₅₀ of 1,23 mg/mL and 1,29 mg/mL for hexenic leaf and bead extracts, respectively. The LC₅₀ found for *H. irritans* on impregnated filter paper, the ethanolic extract of stems at LC₅₀ was 6,00 mg/mL, which was the best result for this test. However as isolated substances, the message shown (LC₅₀ of 0,48 mg/mL), this may have been due to a combination of compounds, since in the extracts with a combination of compounds, with the most known results. Thus, the present work demonstrates that the species *P. tuberculatum* presents an important acaricidal action.

Keywords: *Piper tuberculatum*, toxic plants, pest control, *Rhipicephalus microplus*, *Haematobia irritans*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica do gênero <i>Piper</i>	24
Figura 2. Folhas e frutos de <i>Piper tuberculatum</i>	27
Figura 3. Teleógena, adulto fêmea de <i>Rhipicephalus microplus</i> , parte ventral (A) e parte dorsal (B).....	32
Figura 4. Modelo esquematizado da preparação dos extratos hexânicos, clorofórmico, acetato de etila, etanólicos e metanol, para as folhas frutos e talos de <i>P. tuberculatum</i>	39
Figura 5. Estrutura química da Pelitorina.....	46
Figura 6. Estrutura química da Piplartina.....	46
Figura 7. Estrutura química do ácido 3,4,5-trimetoxi-diidrocinâmico.....	47
Figura 8. Curvas de dose resposta das CLs encontradas no Teste de Pacote de Larvas sobre larvas de <i>R. microplus</i>	
Figura 9. Curvas de dose resposta das CLs encontradas no Teste de Papel Filtro impregnado sobre larvas de <i>H. irritans</i> . Extrato hexânico de frutos (PTFrHe) [a] e extrato etanólico folhas e talos (PTFEt e PTTEt) [b].....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento dos extratos obtidos de <i>Piper tuberculatum</i> Jacq.....	40
Tabela 2. Siglas para identificação dos extratos de <i>P. tuberculatum</i>	40
Tabela 3. Redução de ovoposição com os extratos hexânico, clorofórmico, acetato de etila e etanólico de folha, talo e fruto de <i>P. tuberculatum</i> sobre as fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	48
Tabela 4. Redução de eclosão dos extratos hexânico, clorofórmico, acetato de etila e etanólico de folha, talo e fruto de <i>P. tuberculatum</i> sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	51
Tabela 5. Eficiência reprodutiva dos extratos hexânico, clorofórmico, acetato de etila e etanólico de folha, talo e fruto de <i>P. tuberculatum</i> sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	52
Tabela 6. Eficiência reprodutiva dos extratos hexânico, clorofórmico, acetato de etila e etanólico de folha, talo e fruto de <i>P. tuberculatum</i> sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	53
Tabela 7. Toxicidade dos extratos de <i>P. tuberculatum</i> para larvas <i>R. microplus</i> (Concentração Letal – CL) Teste de Pacote de Larvas – TPL calculado pelo programa Probit.....	54
Tabela 8. Toxicidade das substâncias de frutos de <i>P. tuberculatum</i> sobre as larvas de <i>R. microplus</i> (Concentração Letal – CL) Teste de Pacote de larvas – TPL calculado pelo programa Probit.....	55
Tabela 9. Toxicidade dos extratos de <i>P. tuberculatum</i> sobre <i>H. irritans</i> (Concentração Letal – CL) Teste Papel Impregnado calculado pelo programa Probit.....	60

QUADROS

Quadro 1. Algumas plantas e suas propriedades biológicas.....22

Quadro 2. Algumas espécies de *Piper* e sua atividade biológica.....26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BOD – *Biological organisms development*
CCD - Cromatografia de camada delgada
CL – Concentração Letal
DMSO – Dimetilsulfóxido
E - Eficácia do tratamento
EM - Espectroscopia de Massa
Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ER – Índice reprodutivo
INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
IV - Espectroscopia na região do Infravermelho
LPQPN - Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais
LSA – Laboratório de Sanidade Animal
OR – Redução de Ovoposição
PTFEt – Extrato etanólico de folhas de *P. tuberculatum*
PTFrEt - Extrato etanólico de frutos de *P. tuberculatum*
PTTEt - Extrato etanólico de talos de *P. tuberculatum*
PTFHe - Extrato hexânico de folhas de *P. tuberculatum*
PTFrHe - Extrato hexânico de frutos de *P. tuberculatum*
PTTHe - Extrato hexânico de talos de *P. tuberculatum*
PTFCI - Extrato clorofórmico de folhas de *P. tuberculatum*
PTFrCI - Extrato clorofórmico de frutos de *P. tuberculatum*
PTTCI - Extrato clorofórmico de talos de *P. tuberculatum*
PTFAc - Extrato acetato de etila de folhas de *P. tuberculatum*
PTFrAc - Extrato acetato de etila de frutos de *P. tuberculatum*
PTTAc - Extrato acetato de etila de talos de *P. tuberculatum*
RMN-¹H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1
RMN-¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
TLC - Cromatografia em Camada Fina
TPL – Teste de pacote de larvas
UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE PLANTAS COM AÇÃO INSETICIDA.....	19
2.2 A FAMÍLIA PIPERACEAE.....	22
2.2.1 Importância econômica das Piperaceas.....	22
2.2.2 Classificação, características e distribuição da família Piperaceae.....	23
2.2.3 O gênero <i>Piper</i>	24
2.3 A ESPÉCIE <i>Piper tuberculatum</i> JACQ.....	27
2.3.1 Descrição botânica.....	27
2.3.2 Distribuição geográfica.....	27
2.3.3 Atividade inseticida de <i>P. tuberculatum</i>	28
2.4 O CARRAPATO <i>Rhipicephalus microplus</i> (CANESTRINE, 1887).....	30
2.4.1 Origem, classificação, descrição da espécie e ciclo biológico.....	30
2.4.2 Danos ocasionados por <i>R. microplus</i> e sua resistência ao uso de carrapaticidas.....	32
2.5 A MOSCA-DOS-CHEFRES <i>Haematobia irritans</i> (LINNAEUS, 1758).....	34
2.5.1 Breve histórico.....	34
2.5.2 Descrição da mosca-dos-chifres <i>H. irritans</i>	34
2.5.2.1 Morfologia de <i>H. irritans</i> segundo Honer; Bianchin; Gomes, (1990).....	34
2.5.3 Prejuízos causados pela ação da <i>H. irritans</i>	35
2.5.4 O uso de inseticidas e a resistência das moscas-dos-chifres.....	36
3 OBJETIVOS	37
3.1 GERAL.....	37
3.2 ESPECÍFICOS.....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 ORIGEM E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	38

4.1.1 Coleta e identificação da planta	38
4.1.2 Elaboração dos extratos de <i>P. tuberculatum</i>	38
4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS	41
4.2.1 Substâncias isoladas a partir de frutos de <i>P. tuberculatum</i>	41
4.3 POTENCIAL INSETICIDA POR MEIO DE ENSAIOS <i>in vitro</i>	41
4.3.1 Preparo das diluições	41
4.3.2. Ensaio de imersão de adultos (DRUMMOND et al., 1973)	42
4.3.3. Ensaio do pacote de larvas de <i>R. microplus</i>	43
4.3.4 Ensaio do papel filtro impregnado	44
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS DE <i>P. tuberculatum</i>	46
5.2 TESTE LARVAL DAS SUBSTÂNCIAS PIPLARTINA, PELITORINA E ÁCIDO 3,4,5-TRIMETOXI-DIIDROCINÂMICO ISOLADAS DE FRUTOS DE <i>P. tuberculatum</i> SOBRE <i>R. microplus</i>	47
5.3 IMERSÃO DE ADULTOS (TIA) NOS EXTRATOS DE <i>P. tuberculatum</i> SOBRE ADULTOS DE <i>R. microplus</i>	51
5.3.1 Redução de ovoposição (RO)	51
5.3.2 Redução de eclosão (HR)	52
5.3.3 Eficiência reprodutiva (ER)	53
5.3.4 Eficácia (E)	54
5.4 CONCENTRAÇÃO LETAL DO TESTE LARVAL DOS EXTRATOS DE FOLHAS, FRUTOS E TALOS EM DIFERENTES SOLVENTES <i>P.</i> <i>tuberculatum</i> SOBRE <i>R. microplus</i>	55
5.5 CONCENTRAÇÃO LETAL DO TESTE DE PAPEL IMPREGNADO DOS EXTRATOS DE FOLHAS, FRUTOS E TALOS EM DIFERENTES SOLVENTES <i>P. tuberculatum</i> SOBRE <i>H. irritans</i>	60
CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	64
ANEXOS	84
APÊNDICE	98

1 INTRODUÇÃO

O sucesso da pecuária bovina está fundamentado nos avanços tecnológicos adotados, devendo as tecnologias disponíveis, nas diferentes áreas de conhecimento serem implementadas conjuntamente para proporcionar o máximo desempenho. Nos bovinos, o cruzamento mais comum é entre *zebuínos* e *taurinos* amplamente utilizados na atualidade, sendo que o manejo nutricional e sanitário do rebanho constituem fatores básicos para o sucesso. No entanto, no que se refere à sanidade animal, um dos problemas a ser destacado é o controle dos ectoparasitas (OLIVEIRA, 2015).

Rodrigues et al. (2015) estimaram a perda financeira decorrente do parasitismo de *R. microplus* na produção de leite, correspondendo a 55 % da perda total, estimando um prejuízo superior a 400 milhões de dólares por ano.

A mosca-dos-chifres (*H. irritans*) é um díptero hematófago da família Muscidae que mede de dois a três milímetros. Macho e fêmea são hematófagos e têm preferência por sangue bovino (BIANCHIN et al., 2002). As picadas são dolorosas, irritam e estressam os animais, podendo transmitir doenças como a carbunculose, anaplasmose e leucose (GRISI et al., 2014a).

No Brasil, os danos são atribuídos à redução de peso e/ou ganho de peso zero e queda na produção de leite, os quais são consequências, principalmente, do estresse provocado pela ação irritante das moscas e, não apenas determinados pela ação hematófaga. Outro prejuízo importante causado pela moscas-dos-chifres se relaciona à qualidade do couro dos animais infestados, uma vez que o grande número de picadas no animal acarreta uma reação local no couro, podendo torná-lo grosso e inflexível e, portanto, de menor qualidade (TOGNOLI; CREPALDI; MEDEIROS, 2009).

Calcula-se que as perdas econômicas determinadas pela presença da moscas-dos-chifres nos rebanhos bovinos brasileiros são superiores a R\$ 9,43 bilhões (GRISI et al., 2014b).

O controle efetivo dos ectoparasitas por meio de produtos químicos manufacturados tem encontrado três problemas: o desenvolvimento acelerado de resistência aos princípios ativos; a preocupação da sociedade e órgãos governamentais com relação aos resíduos de agrotóxicos nos produtos de origem animal; e a preocupação com os danos ambientais causados com o uso inadequado desses produtos (BARBOSA et al., 2013).

Tais fatores incentivaram a busca por outras formas de controle, mais incisivamente, a partir da década de 90. Dentre essas, o uso de fitoterápicos destaca-se, devido à grande biodiversidade de espécies vegetais existentes, baixo custo e fácil disponibilidade nas propriedades (FERNANDES; BRAGA, 2014).

As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para síntese de um grande número de fármacos. Chama a atenção dos pesquisadores da área de produtos naturais a grande diversidade de estruturas e de propriedades físico-químicas e biológicas que eles podem oferecer (GUERRA; NODARI, 2004).

A ampla diversidade biológica, em grande parte ainda inexplorada no Brasil, principalmente de regiões como a Amazônia, representa um potencial para a pesquisa de novos produtos que poderão vir a substituir os agrotóxicos e acaricidas sintéticos.

O conhecimento de plantas com ação inseticidas vem despertando a atenção e interesse por parte de pesquisadores pela potencial ação parasiticida, que poderá subsidiar a síntese de novas moléculas para o controle das infestações por *R. microplus* e *H. irritans*. As plantas inseticidas podem ser utilizadas de diferentes formas, sendo mais comum o seu emprego na forma de óleos essenciais e extratos.

Entre as plantas em que os extratos apresentam potencial inseticida estão às espécies pertencentes à família Piperaceae, especialmente aquelas pertencentes ao gênero *Piper*, consideradas a de maior importância, tanto do ponto de vista científico quanto econômico (FAZOLIN et al., 2007). Estas plantas acumulam metabólitos secundários, entre os quais as amidas (piperamidas) e diversos compostos aromáticos que são os mais encontrados. Além disso, há relatos da ocorrência de terpenos, flavonóides e outras classes de compostos (SCOTT et al., 2008).

Piper tuberculatum Jacq., conhecida popularmente como pimenta de macaco ou pimenta d'arda, é utilizada na medicina popular tanto como sedativo quanto como antídoto para mordidas de cobras. Dentre as substâncias isoladas dessa espécie, destaca-se a pipartina, uma alcaloide encontrada em várias espécies de piperáceas (BEZERRA et al., 2008). Esta substância apresentou diversas atividades biológicas, incluída atividade citotóxica e antitumoral (DUH; WU, 1990; KONG et al., 2008).

Atualmente, as pesquisas conduzidas com extratos vegetais ampliaram as séries de ações biológicas para o controle de pragas e doenças. Considerando a necessidade da prospecção de novas substâncias vegetais que possuam atividade

biocida e que possam ser utilizadas no controle de pragas, o presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade inseticida de diferentes extratos de folhas, frutos e talos de *P. tuberculatum* e substâncias isoladas em larvas e fêmeas de *R. microplus* e adultos de *H. irritans*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE PLANTAS COM AÇÃO INSETICIDA

O uso de plantas com propriedades inseticidas é uma prática muito antiga (ROEL, 2001; GALLO et al., 2002; ACIOLE, 2009) mas que, atualmente, ressurgiu com o objetivo de buscar novas moléculas para o controle e manejo integrado de pragas (COSTA et al., 2004).

Os produtos naturais oferecem grande diversidade estrutural de compostos, desta forma, constituem uma importante fonte para descoberta e desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos (SAKLANI; KUTTY, 2008). Para isso, a abordagem fitoquímica tem contribuído de forma fundamental, por meio do isolamento e da identificação estrutural de compostos farmacologicamente ativos, facilitados pelo contínuo aperfeiçoamento de métodos cromatográficos e espectroscópicos (PHILLIPSON, 2007).

Assim, as modernas técnicas de triagem, separação e elucidação estrutural têm renovado o interesse das indústrias farmacêuticas por produtos naturais. Entretanto, apesar desse crescente interesse, poucas plantas foram estudadas (SAKLANI; KUTTY, 2008).

No século XIX, o emprego dos acaricidas organossintéticos foi amplamente difundido, dando início ao uso de plantas para proteção de plantas (os chamados aleloquímicos) (REGNAULT-ROGER; PHILOGÈNE, 2008; ROSSEL et al., 2008). Entretanto, devido ao aumento da preocupação ambiental após a Revolução Verde, e visando solucionar ou minimizar os prejuízos causados pelo uso indiscriminado de inseticidas sintéticos, novos estudos buscam viabilizar estratégias de manejo que incluam plantas inseticidas (VENDRAMIM, 1997).

A prospecção de princípios ativos provenientes de espécies vegetais com objetivos principais de: descoberta de novas moléculas, que permitam a obtenção de novos inseticidas sintéticos e/ou obtenção de inseticidas botânicos naturais para o uso direto no controle de pragas (VENDRAMIM; CASTIGLIONI, 2000).

Dessa forma, são necessários estudos que visam identificar plantas com ação inseticida, isolar, caracterizar e sintetizar compostos de interesse no controle de pragas (SHAPIRO, 1991; GUIMARÃES, 2015).

A grande demanda originada pelos recentes apelos conservacionistas aumentou a comercialização de inseticidas de origem vegetal nos últimos anos, pois

são de rápida degradação e não se acumulam ao longo das cadeias tróficas, sendo assim, pouco danosos ao meio ambiente (ALMEIDA, 2010).

As plantas produzem defesas bioquímicas, também conhecidas como metabólitos secundários (FRIGHETTO, 1997), que segundo Rodríguez; Vendramim (1996) causam mortalidade ou atuam negativamente no comportamento e na fisiologia dos insetos.

Para Fazolin et al. (2002), a escolha da melhor abordagem está relacionada às estruturas químicas, que são muito grandes e complexas, difíceis de isolar e sintetizar, bem como às considerações de ordem econômica e tecnológica.

De acordo com Vendramim (1997), as plantas inseticidas podem ser utilizadas de diversas formas, sendo mais comum o seu emprego na forma de pó seco, óleos e extratos. Para esse autor, os pós e extratos constituem-se na melhor opção por serem de fácil obtenção e aplicação. Apresentando toxicidade por contato, ingestão e fumigação (KARR; COATS, 1988; RAJENDRAN; SRIRANJINI, 2008). Esses produtos provocam mortalidade, repelência, diferença na alimentação e oviposição e afetam o crescimento das pragas (HUANG et al., 2000; MARTINEZ; VAN EMDEN, 2002).

Diversas pesquisas têm demonstrado a viabilidade do uso de compostos ativos, obtidos a partir de plantas no controle de pragas, devido a sua eficiência, geralmente baixo custo, segurança para os consumidores e meio ambiente (SHAAYA et al., 1997; HUANG et al., 2000; BOUDA et al., 2001; DEMISSIE et al., 2008).

Muitos compostos de origem vegetal têm sido isolados, como os terpenoides, limonoides, roçaglamidas, furanocumarina, cromenos, alcaloides e acetogeninas, apresentando propriedades inseticidas (VIEIRA; MAFEZOLI; BIAVATTI, 2007).

Os monoterpenos e seus análogos são os mais importantes, estando presentes em grande abundância em óleos essenciais de muitas plantas superiores. São compostos tipicamente lipofílicos, tendo alto potencial para interferências tóxicas em processos bioquímicos básicos, com consequências fisiológicas e comportamentais em insetos (PRATES; SANTOS, 2002).

Os três maiores grupos de metabólitos secundários são: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides. Os terpenos são feitos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (cloroplasto). Os compostos fenólicos são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são

derivados do ácido chiquímico e também de aminoácidos alifáticos (BUSTILLO-PARDEY, 2005; SIMÕES et al., 2007). Os alcalóides constituem um grupo heterogêneo de substâncias nitrogenado, com acentuada ação farmacológica (POLLI, 2007).

A busca por novos inseticidas constitui-se num campo de investigação amplo. A grande variedade de substâncias presentes na flora continua sendo um enorme atrativo na área de controle de insetos (VIEIRA; FERNANDES, 1999). Estes produtos de origem botânica desempenham papel na interação da planta com o ambiente, como defesa contra herbivoria e patógenos, competição entre plantas e atração de organismos benéficos, como polinizadores, dispersores de sementes e microorganismos simbiotes (CASTRO et al., 2004; RAVEN; EVERT; EICHHORN; 2011).

Segundo Gallo et al. (2002) os primeiros inseticidas botânicos a serem usados para o combate de insetos-pragas foram a piretrina, extraída de *Chrysanthemum cinerifolium*, a nicotina, extraída do fumo (*Nicotiana tabacum*), a sabadina, extraída da sabadila (*Schoenocaulon officinale*), rotenona obtida de *Derris* spp e rianodina obtida de *Rhyania* sp.

Os metabólitos secundários botânicos que protegem as plantas contra ataques de insetos, também contribuem com o sabor e aroma dos vegetais, que podem ter ação tóxica para o homem e outros seres vivos, mas que também podem ser muito desejados pelos seres humanos, visto que existem relatos da utilização de especiarias pelos seres humanos como uso medicinal há milênios (RAVEN; EVERT; EICHHORN; 2011).

Como a origem do uso de extratos e óleos essenciais provenientes de plantas medicinais é antiga, as informações sobre o uso de plantas no tratamento de diversas enfermidades têm sido acumuladas e repassadas de geração em geração (ANJOS-JÚNIOR, 2007).

Os estudos de inseticidas botânicos no combate a insetos têm ganhado espaço ultimamente, onde diversas substâncias tiradas de plantas, seja na forma de extratos, óleos essenciais ou pós, têm se demonstrado vantajosas por serem biodegradáveis, sendo reduzidos os efeitos negativos do uso desordenado de inseticidas sintéticos e custarem menos, tornando-se alternativa eficaz para o controle efetivo de pragas agrícolas e vetores de doenças (ACIOLE, 2009; CASTRO et al., 2010; FARIAS, 2012).

No quadro abaixo há algumas espécies vegetais e suas atividades biológicas.

Quadro 1. Algumas plantas com ação inseticidas.

Nome popular	Nome Científico	Uso popular	Substâncias ativas	Ação
Alho branco	<i>Allium sativum</i>	Comestível e usado tanto como tempero, fins medicinais e defensivo agrícola	Alina, alicina, iodo e aminoácidos entre outros	Inseticida, bactericida
Arruda	<i>Ruta graveolens</i>	Espantar maus espíritos	Flavonoides, cumarinas e alcaloides	Anticoncepcional
Capim cidreira	<i>Cymbopogon citratus</i>	Problema de depressão	Terpenos e alcaloides	Repelentes de insetos
Cinamomo	<i>Melia azedarach</i>	-----	saponinas e alcaloides neurotóxicos	Inseticida
Cravo-da-índia	<i>Caryophilus aromaticus</i>	Repelente	eugenol, de acetileugenol, cariofileno e metilamilcetona.	Repelente inseticida
Cravo-de-defunto	<i>Tagetes erecta</i>	Quando plantado em hortas, repele insetos e mantém o solo livre de nematoides e para cães, afugenta pulgas	Cineol, linalol, carvona, ocimento, dextra-llinoleno, fenol, anetol, eugenol, quercetagetina	Repelente de insetos.
Eucalipto	<i>Eucaliptus citriodora</i>	Movelaria, celulose, produtos de limpeza, cosméticos	Terpenos, canfeno, limoneno, mirtenol, borneol, pinocarveol, flavonóides, cetonas, aldeídos e taninos.	Repelente de insetos
Falso-açafrão	<i>Curcuma longa</i>	Digestivo e ativador da função hepática	Ácidos orgânicos, resina e amido	Repelente de insetos
Fumo	<i>Nictiana tabacum</i>	Fins terapêuticos,	Nicotina	Fungicida, inseticida e como vermífugo na pecuária.
Hortelã	<i>Mentha spicata</i>	Repelente	Terpenos, aldeídos e taninos, resinas, flavonóides, ácidos, carotenos e vitaminas.	Repelente e inseticida
Louro	<i>Laurus nobilis</i>	Culinária	Taninos	Inseticida, repelentes
Neem	<i>Azadirachta indica</i>	Produtos de higiene e limpeza.	Azadiractina, meliantrol, salanina e vilasinina	combate a pragas como nematóides, fungos, bactérias e insetos.
Pimenta malagueta	<i>Capsicum frutescens</i>	Condimento e excitantes do aparelho digestivo.	Caroteno, tiamina, niacina e riboflavina.	Inseticida
Saboneteira	<i>Sapindus saponaria</i>	Ação eficaz contra piolhos.	Saponinas, ácidos graxos, amirina, antocianina, triterpenos, luteolina, tanino, rutina, sitosterol.	Inseticida e sarnicida.

Fonte: Baseado em Preveiro et al. (2010).

2.2 A FAMÍLIA PIPERACEAE

2.2.1 Importância econômica das Piperáceas

Diversas substâncias têm sido utilizadas desde os primórdios da população, para muitos tipos de males e dentre elas, destaca-se o uso de substâncias vegetais que são extraídas por meio de plantas superiores (MONTANARI; BOLZANI, 2001; NEWMAN; CRAGG, 2007).

O mercado farmacêutico é um dos que mais explora os produtos naturais, sendo 25% das substâncias utilizadas nos medicamentos provenientes das plantas e em torno de 44% das descobertas em pesquisas naturais surgem delas (HOSTETTMANN; MARSTON, 2007).

O uso da família Piperaceae é datado há séculos, que segundo descrição a sua utilização ficava restrita como aditivos alimentares, temperos e no uso medicinal popular em infecções (SOUSA, 2011).

Certas espécies de *Piper* são consideradas de grande importância para a economia e como uso medicinal, sendo usadas mundialmente, como é o caso da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) utilizada popularmente em várias doenças; *Piper betle* e *P. methysticum* são utilizadas para mastigação (GUIMARÃES; MONTEIRO, 2005).

Segundo Souza et al. (2017) o Brasil fica entre os primeiros produtores de *P. nigrum* L., ficando entre a segunda e terceira posição no mercado do mundo, e é um dos maiores importadores da atualidade desta pimenta para o México, os Estados Unidos, Argentina, Holanda, Alemanha, França e Espanha.

Os gêneros *Peperomia* e *Piper* da família Piperaceae são os mais utilizados no paisagismo. Dentre as espécies, destacam-se *Peperomia caperata*, *Peperomia obtusifolia*, *Peperomia sandersii*, *Peperomia magnoliifolia*, *Piper magnificum* e *Piper umbellatum* (CEAP, 2015).

2.2.2 Classificação, características e distribuição da família Piperaceae

Dentro da ordem Piperales estão cinco famílias, mais ou menos 25 gêneros com aproximadamente 4.000 espécies (MELO; GUIMARÃES; ALVES, 2014), onde a família Piperaceae tem distribuição pantropical, tendo aproximadamente 3.000 espécies (CARVALHO-SILVA; GUIMARÃES, 2009), 700 espécies pertencentes ao gênero *Piper* (TRINDADE; SILVA, 2008), com 162 espécies só no Brasil (SARNAGLIA-JÚNIOR, 2012) (Figura 1).

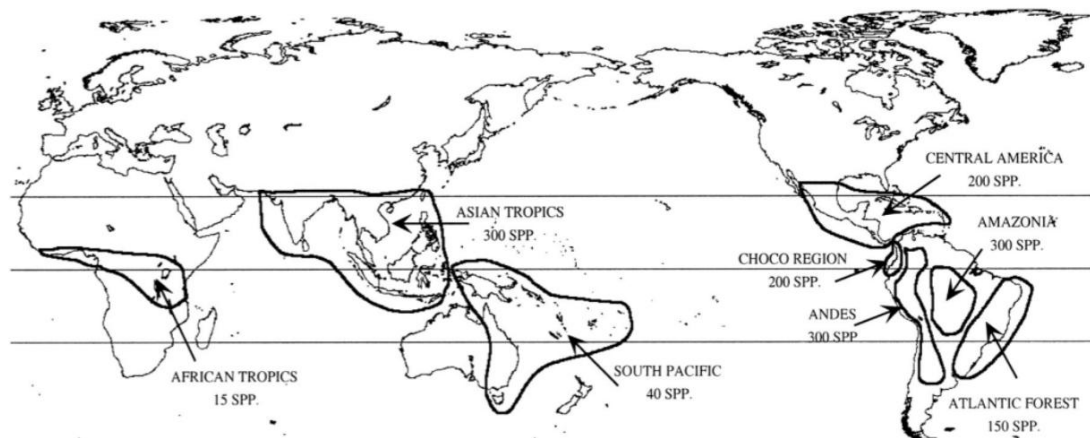


Figura 1: Distribuição geográfica do gênero *Piper*. Fonte: JARAMILLO; MANOS, 2001.

No Brasil, são encontrados os gêneros da família Piperaceae: *Manekia* Trel. *Peperomia* Ruiz & Pav. e *Piper* L. O maior gênero desta família é *Peperomia*, onde estão incluídos 1.500-1.700 táxons com maior diversificação. Estudos sobre a flora brasileira das Piperáceas têm demonstrado enorme diversidade das espécies de *Piper* no Brasil (SARNAGLIA-JÚNIOR, 2012).

Há variações da família Piperaceae entre elas arbusto, árvores, ervas, trepadeiras e subarbustos, tendo como substratos epífitos rupícolas e terrícolas. Possuem folhas simples, com flores incompletas (sem perianto) andrógenas ou unissexuais, pediceladas ou sésseis, geralmente peltadas. O androceu é formado de 2-6 estames livres, ovário súpero, O fruto é uma drupa indeiscente, carnosa raramente com perisperma escasso; o embrião é reduzido (RIZZINI; MORS, 1995; GUIMARÃES; GIORDANO, 2004).

2.2.3 O gênero *Piper*

O gênero *Piper* é constituído por cerca de 1.200 espécies (MOREIRA et al., 1998; TAWAN et al., 2002; DANELUTTE et al., 2003). São arbustos, subarbustos ou arvoretas, com folhas inteiras alternas, geralmente variando entre 1 e 10 m de altura, mais ou menos lignificados, ramosos, não raro nodosos. As inflorescências são espiciformes com flores hermafroditas e muito reduzidas, solitárias e opostas às folhas pedunculadas que estão dispostas de forma alternada.

As espécies do gênero *Piper* têm alto valor comercial, medicinal e econômico, possuindo características como: aroma forte, agradável e sabor picante. Oferecem grande variedade de uso como condimentos, aromatizantes e medicinais

(HEGNAUER, 1996). A espécie *P. nigrum* é uma das mais importantes do ponto de vista econômico, sendo um condimento amplamente conhecido como pimenta do reino quando se utiliza o fruto verde e como pimenta branca quando o fruto é utilizado maduro. Outras espécies são usadas na medicina Ayurvédica, na medicina popular da América Latina e nas Índias Orientais (PARMAR et al., 1997).

Diversos trabalhos têm demonstrado atividades biológicas atribuídas aos extratos e óleos essenciais de plantas do gênero *Piper*, tais como: atividade antioxidante, inseticida, tripanocida e antifúngica (TIRILLINI et al., 1996; MARTINS, 2003; NAKAMURA et al., 2006; YAMAGUCHI et al., 2006; ANJOS-JÚNIOR, 2007; CASTRO, 2007; NAVICKIENE et al., 2007; NUNES et al., 2007; RAPADO, 2007; TRINDADE; SILVA, 2008; CASTRO et al., 2010; DEBONSI et al., 2009; LIMA et al., 2009; COSTA et al., 2010; NASCIMENTO, 2011; FARIAS, 2012; LOPES et al., 2012; VASCONCELOS et al., 2012; BATISTA et al., 2013; SILVA, 2013; MARQUES et al., 2017).

Dentre os compostos isolados nas espécies de *Piper* que têm demonstrado atividade despertando o interesse como inseticidas botânicos estão as amidas. A piperina foi a primeira amida a ser isolada dos frutos das espécies de *Piper* e os seus constituintes químicos têm sido frequentemente investigados, dentre os quais estão as amidas lipofílicas insaturadas. Essas, além de constituírem o principal grupo de metabólitos da planta, são os principais responsáveis pela atividade inseticida (PARMAR et al., 1997).

Entretanto, estudos realizados com espécies de *Piper* na Ásia e na África revelam que as lignanas e isobutilamidas são compostos com maior atividade de defesa contra insetos (BERNARD, 1995). No Brasil, as espécies *Piper aduncum* L., *Piper hispidinervum* C. DC., e *P. tuberculatum* têm sido, amplamente avaliadas contra vários insetos pragas (CASTRO et al., 2010).

No quadro abaixo estão algumas espécies de *Piper* e suas atividades biológicas (Quadro 2):

Quadro 2. Algumas espécies de *Piper* e sua atividade biológica.

Espécies	Nome e uso Popular	Atividade	Referência
<i>P. aduncum</i> L.	“Aperta-ruão”	Moluscicida, citotóxica, antibacteriana, inseticida e larvicida, fungicida	Nascimento, 2011
<i>P. amalago</i> (Jacq.)	Dores de estômago e no combate a diversas infecções	Propriedades, antioxidante, psicotrópicas, antiofídica e antimicrobiana.	Facundo et al., 2008; Rovani et al., 2014
<i>P. arboreum</i> Yunck.	Fruto de morcego	Fungicida, inseticida	Lira et al., 2014
<i>P. cuyabanum</i> C.CD.	Pimenta-do-Mato	Moluscicida, ovicida	Rapado, 2007
<i>P. nigrum</i> L.	Pimenta-do-reino. Tempero	Inseticida	Almeida et al., 2004
<i>P. regnellii</i> (Miq.) C. DC.	Pariparoba	atividade antimicrobiana, atividade antileishmania e antitripanossoma.	Pessini et al. 2003; Nakamura et al., 2006;
<i>P. cernuum</i> Vell.	Pimenta-de-macaco	Fungicida antimicrobiano e	Constantin et al., 2001
<i>P. hispidum</i> Kunth.	Falso jaborandi. Dores estomacais,	Inseticida	Facundo et al., 2008; Santos et al., 2010.
<i>P. permucronatum</i> Yuncker	“Elixir paregórico”. Cólicas menstruais e intestinais, problema digestivo, dor de estômago, diarreia, hemorragia e náusea.	Atividade fungicida, Leishmanicida	Anjos-Júnior, 2007
<i>P. alatabaccum</i> Trel & Yunck	“João brandinho”. Anestésico bucal local.	Atividade inseticida larvicida,	Trindade; Silva, 2008
<i>P. reticulatum</i> L.	Conatello, flexa.	Fungicida, inseticida, antitumoral,	Silva, 2011
<i>P. marginatum</i> Jacq	“Caapeba cheirosa ou malvarisco”. Dores estomacais, como diurético.	Fungicida	Araújo et al., 2014

2.3 A ESPÉCIE *Piper tuberculatum* JACQ

2.3.1 Descrição botânica

P. tuberculatum é um arbusto com aproximadamente 2,5 m de altura, com folhas de bainha alada, suas flores são largas, com 2-5 estames e de ovário variado. Apresentam três estigmas, no fruto pode haver de 2-4 sésseis ou não e seu pericarpo é pouco espesso (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004). A espécie é conhecida como pimenta de macaco (FARIAS, 2012) (Figura 2).



Figura 2: Folhas e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. Fonte: Rosely Valéria Rodrigues.

2.3.2 Distribuição geográfica

É distribuída no Continente Americano e Antilhas (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004) e, multiplica-se por sementes (LORENZI; MATOS, 2002). Cresce em altitudes próximas a 550 m, em encosta úmida, em áreas de capoeira e em locais brejosos (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004).

Segundo Araújo-Júnior et al. (1997), no estado da Paraíba, essa planta, é conhecida localmente como pimenta d'arda. Scott et al. (2002) relataram que, na

Costa Rica, essa espécie é abundante e semi-domesticada, onde é usada como cerca viva.

Amplamente distribuído no Brasil, não ocorrendo nos estados de Rio grande do Sul, Santa Catarina e Sergipe. Com os domínios fitogeográficos na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal.

2.3.3 Atividade inseticida de *P. tuberculatum*

A atividade inseticida de *P. tuberculatum* deve-se a ação de suas piperamidas, em especial as isobutilamidas e piperidinas (ARAÚJO-JÚNIOR et al., 1997; SCOTT et al., 2002; FACUNDO et al., 2008). Segundo Trindade; Silva (2008) essa planta está relacionada à presença de vários componentes como alcaloides, lignanas, flavonoides e arilpropanoides. Os principais compostos químicos apresentados em *P. tuberculatum* são amidas do tipo isobutílicas, pirrolidínicas, dihidropiridonas, piperidinas, derivados prenilados do ácido benzoico, derivados do ácido cinâmico e flavonoides (SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS, 2017).

Pesquisas realizadas por Celestino et al. (2016) verificaram que *P. tuberculatum* tem princípios ativos contra todas as fases de vida de insetos, apontando resultados positivos de atividade inseticida (ovicida, larvicida, adulticida) contra *Callosobruchus maculatus*, *Spodoptera frugiperda*, *Anopheles darlingi*, *Cerotoma arcuatus*, *Aphis craccivora*, *Crinocerus sanctus* e *Alabama argilacea*.

P. tuberculatum revelou ser promissora como inseticida, viabilizando suas substâncias ativas para posteriores pesquisas com outras espécies de insetos, não só de importância agrícola como também os de importância médica que são vetores de doenças (CELESTINO et al., 2016).

Alguns trabalhos publicados como o de Castro (2007), Trindade; Silva (2008), Castro et al. (2010), Farias (2012) e Silva et al. (2013), demonstraram por meio de bioensaios o princípio ativo inseticida de *Piper* sendo eles eficientes para as fases larvais, ovos ou adultos de *Callosobruchus maculatus*, *Spodoptera frugiperda* (CASTRO, 2007; CASTRO et al., 2010; FARIAS, 2012), *Anopheles darlingi* (TRINDADE; SILVA, 2008), *Cerotoma arcuatus* (SILVA; CASTRO; BARRETO, 2011), *Aphis craccivora* (SILVA et al., 2013), *Crinocerus sanctus* (SOUSA, 2011), *Alabama argilacea* (MIRANDA et al., 2002).

Nos experimentos em laboratório realizados por Castro (2007) foi verificado que extratos aquosos de frutos frescos e frutos desidratados de *P. tuberculatum* tiveram ação inseticida (larvicida) sobre a *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho do milho), visto que as folhas do milho foram tratadas com várias concentrações dos extratos sendo dadas às larvas todos os dias para a alimentação, verificando a redução do consumo da folha, revelando a propriedade tóxica desta espécie de *Piper*.

Em seus experimentos, Farias (2012) verificou em campo que o óleo essencial de *P. tuberculatum* possui ação inseticida contra *S. frugiperda*.

Silva et al. (2013), demonstraram eficácia em experimentações laboratoriais realizadas com óleo essencial extraído de folhas desidratadas de *P. tuberculatum* no controle do pulgão-preto-do-feijão-caupi.

Silva; Castro; Barreto (2011) também verificaram a ação inseticida de *P. tuberculatum* no combate de adultos de *Ceratomyza arcuatus*.

Sousa (2011) realizou seu trabalho avaliando o potencial inseticida de *P. tuberculatum* em condições laboratoriais onde utilizou o óleo extraído das folhas desidratadas sobre as ninfas percevejo-vermelho-do-caupi (*Crinocerus sanctus*), e obteve resultado positivo.

As experimentações de Miranda et al. (2002), demonstraram a atividade inseticida da pimenta de macaco no controle de larvas de *Alabama argilacea* (curuquerê-do-algodoeiro).

Os compostos químicos apresentados em *P. tuberculatum* são vários, dentre elas amidas do tipo isobutílicas, pirrolidínicas, dihidropiridonas, piperidinas, derivados prenilados do ácido benzoico, derivados do ácido cinâmico e flavonoides (PARMAR et al., 2007).

Facundo et al. (2008), em seus experimentos de extração de óleos essenciais dos frutos e talos de *P. tuberculatum*, verificou a presença dos seguintes componentes químicos: óxido de cariofileno, monoterpenos, sesquiterpenos e o (*E*)-cariofileno. No extrato etanólico dos frutos obtiveram e identificaram dois esteroides, o stigmasterol e o β -sitosterol. Além disso, foram identificadas misturas de duas amidas: adihidropiplartina e a piplartina, e o ácido 3,4,5-trimetoxi-dihidrocinâmico.

Miranda et al. (2000) testou duas amidas de *P. tuberculatum* (pelitorina e a 4,5-diidropiperlonguminina) quanto à suscetibilidade da broca-da-cana, *Diatraea*

saccharalis (Lepidoptera: Crambidae). Ambos os compostos foram eficazes como inseticidas contra essa broca.

2.4 O CARRAPATO *Rhipicephalus microplus* (CANESTRINE, 1887)

2.4.1 Origem, classificação, descrição da espécie e ciclo biológico

R. microplus originou-se provavelmente na Ásia, mais precisamente da Índia e Ilha de Java, adaptando-se perfeitamente ao clima tropical, onde o calor e a umidade propiciaram condições favoráveis à sobrevivência e manutenção da espécie (POWELL; REID, 1982). Sua incidência é maior em grandes rebanhos da América, África, Ásia e Austrália, sendo considerado o carrapato de maior impacto em perda econômica nos rebanhos bovinos da América do Sul (GONZALES, 1993; NARI, 1995; GONZALES et al., 2003).

Os carrapatos assim como os ácaros, fazem parte do grande filo dos Artrópodes por apresentarem algumas características incomuns como, exoesqueleto rígido, serem invertebrados e possuírem vários pares de apêndices articulados. Os artrópodes podem assumir uma gama de cores e formatos, quanto ao tamanho, podem variar de macro a microrganismos, e quanto a sua relevância toxicológica se destacam aranhas, escorpiões e carrapatos, sendo os dois primeiros diretamente associados ao seu efeito pernicioso aos seres humanos, por meio de picadas desses animais, já os carrapatos, relacionados imediatamente ao parasitismo (GONÇALVES; HUERTA; FREITAS; 2016).

Carrapatos são ectoparasitos hematófagos classificados em três famílias: Argasidae, Ixodidae e Nuttalliellidae (KEIRANS, 1992; KEIRANS; ROBBINS, 1999; HORAK et al., 2002). Os Argasídeos são carrapatos que procuram o hospedeiro para sugar sangue, alimentando-se mais de uma vez em seu ciclo de vida, e o abandona sempre depois de alimentar-se. Nos Ixodídeos a alimentação dura um tempo mais prolongado e é feita uma única vez em todo o ciclo de vida e a ovoposição resulta num grande número de ovos (de várias centenas a 23.000 ovos por fêmea) e depois morrem, sendo estas as diferenças mais marcantes entre estas famílias (KLOMPEN, 2005). A família Nuttalliellidae é representada por apenas uma espécie (*Nuttalliella namaqua*) (OLIVEIRA, 2004). Os carrapatos são transmissores de patógenos que afetam a população animal e humana (ESTRADA-PEÑA; JONGEJAN, 1999; PAROLA; RAOULT, 2001).

O *R. microplus* parasita um único hospedeiro (monóxeno), isto é, depende de apenas um hospedeiro em seu ciclo de vida, preferencialmente os bovinos e secundariamente outras espécies como: bubalinos, equinos, ovinos, caprinos e cervídeos (FERRETO, 2013).

O ciclo biológico e evolutivo do carrapato dos bovinos pode ser dividido em duas fases: a fase de vida livre ou também chamada de vida não parasitária, que ocorre na pastagem, e a fase parasitária, que ocorre no próprio hospedeiro. Os carrapatos dessa espécie costumam causar infestações por ter um curto ciclo de vida, de maneira que conseguem se reproduzir rapidamente em um curto espaço de tempo (BROWN; AINSLIE; BEINART, 2013).

A fase parasitária ocorre no próprio hospedeiro, na qual o parasita passa por duas transformações. Esta fase inicia-se com a fixação da larva no animal, de maneira que a mesma se sustenta de linfa onde o seu corpo se distende. Em seguida, ocorre a ecdise na qual a larva passa a ser chamada de metalarva, que após a ruptura das paredes do idiossoma, libera a ninfa, e a partir dessa etapa o sangue já é a fonte alimentar do parasita (RIBEIRO et al., 2011; LÁZARO et al., 2013).

A ninfa sofre outra mutação se transformando em metaninfa, a qual por diferenciação sexual libera os adultos. Por serem menores que as fêmeas, os machos conseguem se locomover com mais facilidade, alimentar-se de mais sangue e fecundar muitas fêmeas. A fêmea passa a ser chamada de teleógena (Figura 3) após o seu período de fecundação, onde continua seu rastro sanguíneo ingurgitando-se até o fim da sua fase parasitária, assim a teleógena cai no solo para a postura dos ovos (RIBEIRO et al., 2011; LÁZARO et al., 2013).

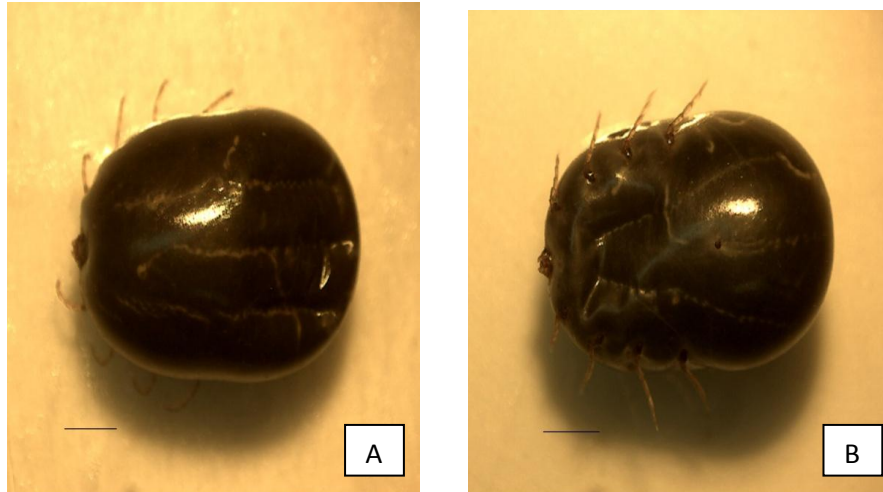


Figura 3: Teleógena, adulto fêmea de *Rhipicephalus microplus*, parte ventral (A) e parte dorsal (B).
Fonte: Andrina G.S.Braga e Caroline V. Smozinski. Porto Velho-RO, 2015.

2.4.2 Danos ocasionados por *R. microplus* e sua resistência ao uso de carrapaticidas

Segundo Grisi et al. (2014), o carrapato *R. microplus* é responsável por expressivas perdas à pecuária bovina brasileira. Estimativas mostraram que o impacto econômico anual pode ser maior que R\$ 3,24 bilhões de dólares, o carrapato se tornou o principal alvo de programas de controle e erradicação nos rebanhos bovinos da América do Sul (NARI, 1995).

O carrapato *R. microplus* acarreta severos prejuízos, diretos e indiretos, na produção animal, que são relacionados com a perda de peso, baixa conversão alimentar, perdas na qualidade do couro, toxinas liberadas no hospedeiro, lesões de pele e perdas produtivas em carne e leite (SILVEIRA; CARVALHO; PECONICK, 2014; PEDRASSANI; REISDORFER, 2015).

Esforços significativos para controlar os carrapatos são feitos na maior parte dos países produtores de bovinos, principalmente com os carrapaticidas. No entanto, devido ao uso indiscriminado dos acaricidas disponíveis no mercado, populações de *R. microplus* vêm se tornando resistentes aos princípios ativos, tornando-se um problema sério na maioria destes países. O estudo de novas moléculas e estratégias para o controle do carrapato é imprescindível para a manutenção da produtividade dos rebanhos bovinos (GUERRERO et al., 2012).

O controle de *R. microplus* é feito por meio de acaricidas, desde o final do século XIX pesquisadores buscam produtos com a finalidade de combatê-lo, sendo o arsênico o primeiro composto registrado para essa finalidade. Posteriormente,

surgiram os organoclorados, os organofosforados, os piretróides sintéticos, os amidínicos, as benzoilfenulureias, os fenilpirazol e as lactonas macrocíclicas (avermectinas/milbemicinas) (FERRETO, 2013).

A partir do aparecimento de indícios de resistências aos acaricidas organofosforados, muito difundidos no país na década de 1980, estimulou-se o uso extensivo dos piretróides, que surgiram em 1977 (ADREOTI, 2010).

Esses, em alguns casos, já não são mais eficazes contra os ectoparasitas, ou ainda que tenham efeitos, os mesmos podem desenvolver uma relativa resistência ao produto, inviabilizando assim o seu uso pelo alto risco de contaminação ambiental por meio do solo e da água ou até mesmo humana, impulsionando adversidades à saúde, pelo consumo dos produtos finais de origem animal, como carne e leite contaminados (RIBEIRO, et al., 2011).

O controle tem sido feito, principalmente com uso de carrapaticidas, sendo a forma de controle mais utilizada atualmente no Brasil (PAIM, et al., 2011; OLIVO et al., 2013; SILVA-FILHO et al., 2013; PEDRASSANI; REISDORFER, 2015). Porém, o uso inadequado e desenfreado desses químicos tem selecionado populações de carrapatos resistentes a inúmeros princípios ativos (SANTOS et al., 2015).

Até o momento, entendia-se que os produtos mais imutáveis tanto no ambiente quanto no animal, eram os mais eficazes. Contudo, com o passar dos anos percebeu-se que estudar a relação direta entre os carrapatos e as plantas gerava somente benefícios, tanto em função da resistência que antes o ectoparasita apresentava, quanto à persistência do produto químico no meio ambiente, que, muitas vezes, não apresenta nenhuma característica em função da sua capacidade de biodegradabilidade (GONÇALVES; HUERTA; FREITAS, 2016).

A utilização de métodos alternativos para controlar o carrapato tem sido discutida com a finalidade de minimizar os custos com acaricidas e a contaminação dos subprodutos. Outro fator importante é a redução do problema de resíduos bem como sua característica biodegradável (BROGLIO-MICHELETTI, 2009).

Atualmente, vem sendo desenvolvido na Embrapa Rondônia um projeto que contempla a aplicação de metabólitos secundários contra carrapatos *R. microplus*, como forma de minimizar os prejuízos que estes organismos causam à bovinocultura da região Amazônica (GUIMARÃES, 2015).

2.5 A MOSCA-DOS-CHIFRES *Haematobia irritans* (LINNAEUS, 1758)

2.5.1 Breve histórico

Haematobia irritans, conhecido popularmente como a moscas-dos-chifres foi descrita por Linnaeus em 1758 e reconhecida como uma praga de bovinos na França em 1830. Foi introduzida acidentalmente em países onde a bovinocultura encontrava-se em expansão, tornando-se uma das principais pragas da pecuária na atualidade (VALÉRIO; GUIMARÃES, 1983).

A mosca-dos-chifres foi identificada primeiramente no Brasil, no Estado de Roraima, possivelmente vindo da Guiana por volta de 1977, com seu primeiro registro feito por Valério; Guimarães (1983). A sua dispersão pelo país, segundo Barros (2004) foi facilitada pelo transporte em rotas de comercialização de gado. Em 1990, notou-se a sua presença nos Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul e em 1991 a *H. irritans* chegou ao Estado do Paraná (FARIA, 1998). Hoje a mosca-dos-chifres encontra-se distribuída por todo o Brasil.

2.5.2 Descrição da mosca-dos-chifres *H. irritans*

Este díptero da família Muscidae é um ectoparasita hematófago que mede de dois a três mm, machos e fêmeas são hematófagos e têm preferência por sangue bovino (BIANCHIN et al., 2002) e que parasita o hospedeiro dia e noite, viciosamente 15 a 40 vezes por dia, de preferência pelo dorso, lado do tórax, abdome e ao redor da cabeça (AGNOLIN, 2009).

A fêmea deixa o animal para depositar seus ovos na massa fecal fresca, em média, 400 larvas, que eclodem dos ovos, após 24 horas, a uma temperatura de 24 e 26 graus (BORDIN,1992; AHID, 2009).

Esta fase pode acontecer no bolo fecal ou no solo, dependendo do grau de umidade, de onde o adulto (imago) emerge entre seis e oito dias. A duração média do ciclo de vida é de duas a quatro semanas, dependendo das condições climáticas. Na ausência de animas, as moscas podem voar por até 15 km à procura de hospedeiro (HONER; BIANCHIN; GOMES, 1990).

2.5.2.1 Morfologia de *H.irritans* segundo Honer; Bianchin; Gomes, (1990)

A pupa de *H.irritans* é constituída num pupário marrom escuro, situado na base da massa fecal ou até três cm do solo embaixo da massa (HONER; BIANCHIN; GOMES, 1990).

As larvas do tipo muscídeos, são pequenas e escuras (marrom) e encontram-se dentro da massa fecal numa profundidade que depende da temperatura, quanto mais quente, mais profundas. Nos espiráculos posteriores possuem um botão central e três sulcos sinuosos, os espiráculos anteriores com cinco projeções e o gancho bucal direito menor do que o esquerdo (HONER; BIANCHIN; GOMES, 1990).

As larvas e pupas são difíceis de serem encontradas, sem peneirar as fezes. A confirmação da presença da mosca-dos-chifres é mais simples e rápida pela identificação dos adultos nos bovinos (tamanho e comportamento), do que pelo exame nas pastagens (HONER; BIANCHIN; GOMES, 1990).

O adulto é menor pertencente ao grupo Muscídeo, tem a cor castanha e a característica é o tamanho do palpos (visíveis com uma lupa), os quais são pelo menos 2/3 de comprimento da probóscide. Ao microscópio, pode-se ver uma cerda anterior e uma posterior esternopleural, aresa plumosa somente na parte dorsal, probóscide rígida (inflexível) com dentes prestomais. A frons (frente) é mais larga nas fêmeas (HONER; BIANCHIN; GOMES, 1990).

2.5.3 Prejuízos causados pela ação da *H. irritans*

Por seus hábitos hematófagos, estes ectoparasitos causam prejuízos aos bovinos com infestações. Um animal com média de 500 moscas/dia pode sofrer uma perda anual de aproximadamente 2,6 litros de sangue (SAUERESSIG, 1994; FARIA, 1998; GARCIA et al., 2001; ALMEIDA et al., 2010). Grisi et al. (2002) estimaram que as perdas causadas pela mosca-dos-chifres no Brasil era da ordem de US\$150 milhões anuais e Bianchin; Koller; Alves (2004) verificaram perdas de 10% do peso vivo nos animais da raça Nelore infestados, o que significaria segundo Bianchin; Koller; Detmann (2006), uma perda de US\$ 865 milhões. Além dessas perdas, a mosca também é responsável por uma diminuição no valor do couro (SAUERESSIG, 1994; GUGLIELMONE et al., 2001).

No Brasil, a perda de peso vivo em função da ação da mosca-dos-chifres calculada por Honer; Gomes (1990) permite estimar que um animal com uma infestação média anual de 500 moscas, constantes, pode sofrer perda de peso vivo anual de aproximadamente 40 kg. Sendo assim, a perda total de carne para o Brasil Central foi estimada em 1,4 milhões de toneladas/ano se todos os animais fossem parasitados pela mosca. Os autores, afirmaram, ainda, que a perda de peso e ganho

zero foram consequências principalmente da ação irritante da mosca e não da perda de sangue. É preciso lembrar que o número de moscas não é constante, e que, durante a época chuvosa, qualquer animal pode apresentar uma infestação muito acima de 500 moscas (HONER; BIANCHIN; GOMES, 1990).

2.5.4 O uso de inseticidas e a resistência das moscas-dos-chifres

O uso de inseticidas químicos para o controle da mosca-dos-chifres nos últimos anos tem se intensificado com o uso principalmente de piretróides, mas este tem ocorrido sem critério quanto à época e frequência de tratamento (MARTINS et al., 2002). Com isso, tem levado ao desenvolvimento de resistência. Uma vez presente na população, à resistência frequentemente acarreta no aumento das concentrações utilizadas e maior frequência de tratamentos inseticidas, práticas empregadas na tentativa de recuperar a eficácia dos produtos e dos níveis de controle (ALMEIDA et al., 2010).

Desta forma, o desenvolvimento de resistência tende a aumentar os custos de produção, sobrecarregando um controle cada vez menos eficiente e aumentando riscos de contaminação humana, ambiental e em alimentos. Outro aspecto de grande relevância é que o controle químico da *H. irritans* contribui efetivamente para o agravamento da resistência em outros parasitas, em particular do carrapato dos bovinos (*R. microplus*), com o qual a mosca-dos-chifres divide expressiva atenção de produtores e do mercado de produtos ectoparasiticidas (BARROS, 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Realizar estudo fitoquímico de *P. tuberculatum*, bem como determinar seu potencial inseticida contra *H. irritans* e *R. microplus*.

3.2 ESPECÍFICOS

- Identificar as estruturas das substâncias isoladas do extrato etanólico de frutos de *P. tuberculatum*.
- Verificar o potencial acaricida das substâncias purificadas obtidas de extratos de frutos de *P. tuberculatum* por meio de ensaios *in vitro* em *R. microplus*.
- Avaliar o potencial acaricida de extratos vegetais de *P. tuberculatum* por meio de ensaios *in vitro* de imersão de adultos sobre *R. microplus*.
- Determinar a concentração letal CL₅₀ dos extratos de *P. tuberculatum* contra larvas de *R. microplus* e adultos de *H. irritans*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ORIGEM E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

A investigação química dos constituintes de *P. tuberculatum* foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de Rondônia – Porto Velho-RO.

4.1.1 Coleta e identificação da planta

Os materiais (folhas, talos e frutos) para estudos de *P. tuberculatum* foram coletados em Porto Velho – Rondônia. A identificação botânica da espécie foi realizada no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) pelo Dr. José Gomes e uma amostra encontra-se depositada sob o número 211724.

4.1.2 Elaboração dos extratos de *P. tuberculatum*

Para a obtenção dos extratos brutos, ramos contendo folhas, talos e frutos de *P. tuberculatum* foram separados e acondicionados em sacos de papel e encaminhados para o Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais da UNIR, onde os mesmos foram submetidos a secagem em estufa a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por um período de sete dias. Após a secagem, os materiais foram triturados em liquidificador industrial de alta rotação, obtendo ao final 2,18 Kg de folha, 1,90 Kg de talo e 1,80 Kg de frutos. Cada parte da planta triturada foi dividida em três partes iguais e colocadas em frascos de Erlenmeyer com capacidade para 10 litros.

Para a produção dos extratos, foram utilizados cinco solventes em sequência, sendo eles, hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol e metanol. Após a adição do solvente, a solução permaneceu em repouso por sete dias, sendo então submetida à evaporação em evaporador rotatório FISATOM (MATOS, 1997), onde foi obtido o extrato do solvente da parte da planta e o material residual, o qual foi adicionado o solvente subsequente, reiniciando o processo de repouso da solução.

O processo de extração iniciou com a extração por hexano de folhas, frutos e talos de *P. tuberculatum* (2,18; 1,80 e 1,90 Kg) respectivamente, que foram submetidos a três extrações (3 x 2,5 litros) por sete dias cada, a temperatura ambiente e posterior evaporação do solvente em evaporador rotativo. Após terem sido extraídos com hexano, as folhas, frutos e talos de *P. tuberculatum* (2,0; 1,70 e 1,80 kg) foram submetidos a três extrações com clorofórmio (3 x 2,5 litros) por sete dias cada, a temperatura ambiente e posterior evaporação do solvente em

evaporador rotativo. Após terem sido extraídos com clorofórmico das folhas, frutos e talos de *P. tuberculatum* (1,90; 1,60 e 1,70 Kg) foram submetidos a três extrações com acetato de etila (3 x 2,5 litros) por sete dias cada, a temperatura ambiente e posterior evaporação do solvente. As folhas, frutos e talos de *P. tuberculatum* (1,80; 1,50 e 1,60 kg) foram submetidos a três extrações com etanol (3 x 2,5 litros) por sete dias cada, a temperatura ambiente e posterior evaporação do solvente em evaporador rotativo.

A sequência de solventes, evaporação e produção de extratos pode ser observada na Figura 4. Os extratos etanólicos, hexânico, clorofórmicos, acetato de etila e metanólico das folhas, frutos e talos de espécie *P. tuberculatum* foram separados conforme a descrição a seguir:

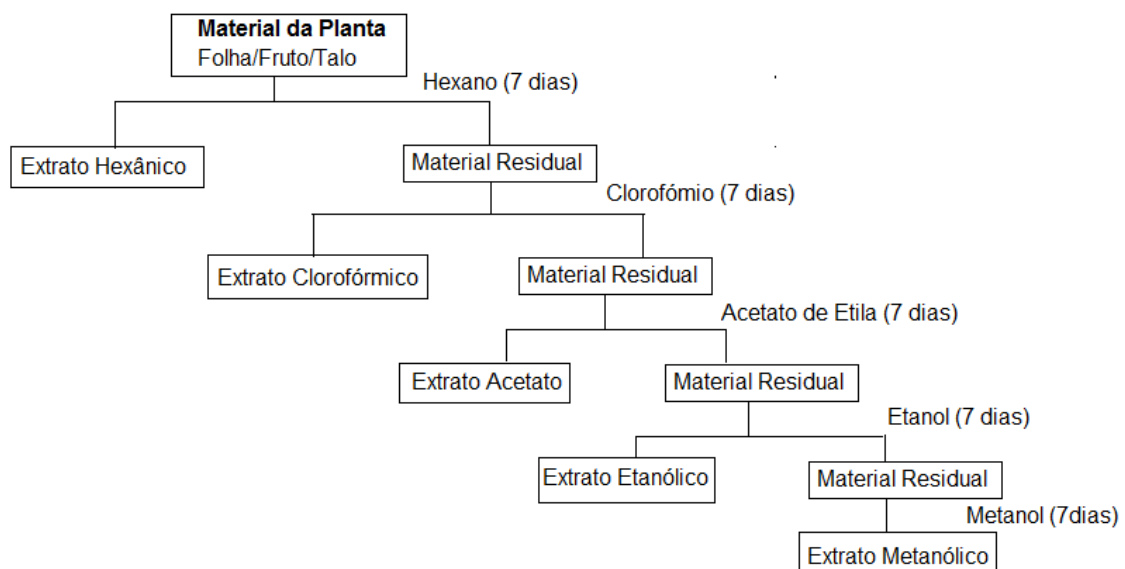


Figura 4: Modelo esquematizado da preparação dos extratos hexânicos, clorofórmico, acetato de etila, etanólicos e metanol, para as folhas frutos e talos de *P. tuberculatum*.

O material obtido de cada extração encontra-se na Tabela 1. O rendimento do extrato de metanol foi insuficiente para realização dos testes *in vitro* e por isso este não foi utilizado.

Tabela 1. Rendimento dos extratos obtidos de *Piper tuberculatum* Jacq.

Extratos		Massa seca (Kg)	Massa obtida (g)	Rendimento (%)	Coloração do extrato
Etanol	Folhas	1,8	11,5	0,63	Verde
	Frutos	1,5	17,3	1,15	Verde
	Talos	1,6	7,8	0,48	Marrom
Hexano	Folhas	2,1	3,4	0,01	Verde
	Frutos	1,8	21,3	1,18	Verde
	Talos	1,9	1,0	0,05	Marrom
Clorofórmio	Folhas	2,0	4,1	0,20	Verde
	Frutos	1,7	20,3	1,19	Verde
	Talos	1,8	1	0,05	Marrom
Acetato de Etila	Folhas	1,9	1,9	0,1	Verde
	Frutos	1,6	9,4	0,58	Verde
	Talos	1,7	1,0	0,05	Marrom

Tabela 2. Siglas para identificação dos extratos de *P. tuberculatum*.

Solvente	Folhas	Frutos	Talos
Aceta de etila	PTFAc	PTFrAc	PTTAc
Hexânico	PTFHe	PTFrHe	PTTHe
Clorofórmico	PTFCI	PTFrCI	PTTCI
Etanólico	PTFEt	PTFrEt	PTTEt

4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS

4.2.1 Substâncias isoladas a partir de frutos de *P. tuberculatum*

Parte do extrato hexânico dos frutos foi submetido a cromatografia em coluna de sílica e eluído com hexano/clorofórmio em polaridade crescente, obtendo-se, desta forma, um sólido branco amorfo denominado (1A).

A cromatografia em coluna de sílica gel do extrato clorofórmio dos frutos eluído com hexano/clorofórmio em polaridade crescente levou ao isolamento de um sólido branco amorfo denominado (2A).

O extrato acetato de etila dos frutos, após cromatografia em coluna de sílica gel e eluição com clorofórmio/acetato de etila, rendeu um sólido branco amorfo denominado (3A).

4.3 POTENCIAL INSETICIDA POR MEIO DE ENSAIOS *in vitro*

O potencial inseticida dos extratos e substâncias isoladas de *P. tuberculatum* foi avaliado no Laboratório de Sanidade Animal (LSA) e no Campo Experimental de Porto Velho (CEPV) da Embrapa Rondônia onde foram realizadas as coletas. Os bioensaios foram realizados em adultos de moscas-dos-chifres, *H. irritans*, e em larvas e fêmeas ingurgitadas do carrapato dos bovinos, *R. microplus*, seguindo metodologia de acordo com protocolos estabelecidos por FAO (2004).

4.3.1 Preparo das diluições

Os extratos foram diluídos em uma solução de água ultrapura e Tween 20 a 2% para os testes com fêmeas ingurgitadas e em etanol para a confecção dos kits para os testes com larvas de *R. microplus* e adultos de *H. irritans*. A preparação das concentrações foram feitas a partir de uma solução inicial de 1g de extrato/10mL de diluente.

A partir desta solução, foram realizadas diluições seriadas, obtendo-se as concentrações finais de 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 3,12 mg/mL e 1,56 mg/mL, as quais foram utilizadas nos bioensaios. Vale ressaltar que as concentrações superiores a 50 mg/mL apresentaram alta densidade e viscosidade e, por este motivo, não foram utilizadas.

Para as substâncias foram diluídas, em etanol 95% PA na concentração de 10 mg/mL, e posteriormente em óleo de oliva (Sigma nº 47118), em decorrência da baixa solubilidade das substâncias. Desta forma, foram obtidas as concentrações de

1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e a 0,125 mg/mL as quais foram utilizadas para o preparo dos kits.

4.3.2. Ensaio de imersão de adultos (Drummond et al., 1973)

Nos ensaios em *R. microplus*, fêmeas ingurgitadas foram coletadas diretamente sobre bovinos infestados, mantidos em área de isolamento no CEPV destinada a esta finalidade. As fêmeas ingurgitadas foram encaminhadas ao LSA da Embrapa Rondônia, onde foram imersas em solução de hipoclorito de sódio 2%, enxutas em papel toalha e selecionadas conforme a integridade, motilidade e grau de ingurgitamento. Parte das fêmeas foram destinadas aos testes de imersão de adultos (TIA).

Outra parte das fêmeas foi destinada a obtenção de larvas, as quais foram fixadas dorsalmente em placas de Petri e acondicionadas em estufa climatizada tipo BOD ($\pm 27^{\circ}\text{C}$ e UR > 80%) para a realização da postura. Após um período de 25 dias, as posturas foram removidas, pesadas e separadas em alíquotas de 500 mg de ovos, alocadas em tubos plásticos arrolhados com algodão hidrófilo e mantidas em BOD até a eclosão das larvas. Estas foram destinadas aos bioensaios e utilizadas em infestações artificiais em bovinos para a manutenção da colônia.

Grupos com 10 fêmeas ingurgitadas foram formados, em triplicata, pesados e submetidos à imersão em 10 mL de cada concentração, por 5 minutos. Após este período, as fêmeas foram enxutas em papel toalha, e alocadas em placa de Petri e incubadas em BOD ($27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ RH > 80%) para ovoposição. Para o controle negativo foi utilizada água destilada Tween 20 a 2% e controle positivo com Diazinon em grau técnico na concentração de 3,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Após o término da ovoposição, os ovos de cada grupo foram pesados e alocados em tubos plásticos arrolhados com algodão devidamente identificadas e colocadas em BOD até a eclosão das larvas. Foi avaliada a porcentagem de eclosão das larvas. O peso do grupo de fêmeas ingurgitadas, peso da postura e porcentagem de eclosão foram utilizados para os cálculos de Porcentagem de Redução de Ovoposição (%OR), porcentagem de redução de eclosão (%HR) (GONZALES, 2003), assim como eficiência reprodutiva (ER) e eficácia do tratamento (E), conforme as fórmulas descritas abaixo:

$$\%OR = \frac{\text{média peso Postura controle} - \text{média peso Postura Tratamento} \times 100}{\text{média Peso Postura Controle}}$$

$$\%HR = \frac{\text{taxa de eclosão controle} - \text{taxa de eclosão tratado}}{\text{Taxa de eclosão controles}} \times 100$$

$$ER = \frac{\text{peso postura} \times \% \text{ taxa de eclosão} \times 20000}{\text{Peso das fêmeas}}$$

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

4.3.3. Ensaio do pacote de larvas de *R. microplus*

Os testes do pacote de larvas (TPL) com larvas de *R. microplus* foram confeccionados com papel filtro (6 x 7cm), dobrado ao meio e vedados lateralmente com grampos para papel. No procedimento para impregnação dos envelopes concentrações dos extratos/ substância isolada quanto para os controles negativo e positivo, foi utilizado o volume de 0,5 mL de solução por envelope, e no controle positivo, foi utilizado fipronil a 1% v/v.

Os ensaios para a avaliação dos extratos e substâncias isoladas contra larvas de *R. microplus* foram realizados pela técnica do envelope de larvas (TPL) seguindo-se a metodologia proposta por Stone; Haydock (1962) modificada por Miller et al. (2003). Aproximadamente 100 larvas foram colocadas em cada envelope, vedados imediatamente com grampos para papel, acondicionados em BOD por 24 horas.

Após este período, os envelopes foram abertos e realizada a contagem de larvas vivas e mortas para cálculo da porcentagem de mortalidade. Os percentuais médios de mortalidade foram calculados considerando mortas também as larvas sem capacidade locomotora, da seguinte forma:

$$\text{Mortalidade\%} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ larvas mortas}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de larvas}} \times 100$$

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

4.3.4 Ensaio do papel filtro impregnado

Os bioensaios em *H. irritans* foram realizados no CEPV da Embrapa Rondônia por meio do método de papel-filtro impregnado, de acordo com a metodologia proposta por Sheppard; Hinkle (1987) e adaptada por Barros (2002). Os kits previamente preparados foram transportados ao campo em caixa térmica com gelo a fim de mantê-los resfriados.

Os kits para os bioensaios com *H. irritans* foram confeccionados conforme Barros (2002), onde discos de papel filtro com nove centímetros de diâmetro foram impregnados com as soluções dos extratos diluídas em etanol. Foi utilizado 1mL de cada extrato/concentração, em triplicata. Para o controle negativo, os discos de papel filtro foram impregnados com etanol e com uma solução de diazinon em grau técnico, diluído em etanol, na concentração de 3,2 mg/mL, também em triplicata.

Após a evaporação natural do etanol, e conseqüentemente a secagem do papel filtro, estes foram acondicionados em placas de Petri descartáveis contendo um orifício na tampa, a qual foi vedada com fita crepe. O conjunto de todas as concentrações com três repetições de um mesmo extrato juntamente com os controles negativo e positivo formou o kit.

As moscas-dos-chifres foram coletadas diretamente dos animais infestados com auxílio de uma rede entomológica e transferidas para os kits por meio do orifício da placa. Foram colocadas cerca de 15 espécimes em cada placa, as quais foram encaminhadas para o LSA da Embrapa Rondônia e permaneceram por um período de 2 horas. Após este período foi realizada a leitura, onde foi feita a contagem de moscas vivas e mortas em cada concentração para cálculo da porcentagem de mortalidade de cada extrato. Moscas com incapacidade de voar foram consideradas mortas.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental para as variáveis avaliadas foi inteiramente ao acaso com três repetições. A partir da porcentagem de mortalidade obtida nos bioensaios do papel filtro impregnado para *H. irritans* e teste do envelope de larvas, (TPL) foi realizada a análise de sobrevivência a partir do teste estatístico de Probit com auxílio do programa BioStat 2009 Professional 5.8.4., para cálculo da concentração letal, referente a mortalidade de 50% dos indivíduos (CL₅₀) em cada extrato.

Para as variáveis obtidas no teste de imersão de adultos, foi realizado um esquema fatorial 6x3 (concentração x extratos). Os resultados foram submetidos à análise de variância e teste de Scott e Knott a 5% de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS DE *P. tuberculatum*

A partir do extrato hexânico dos frutos, foi possível isolar uma substância denominada (1A). Os dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C e espectro de massa de pelitorina, quando comparados com os dados da literatura para a pelitorina (Figura 5), revelaram tratar-se da mesma substância.

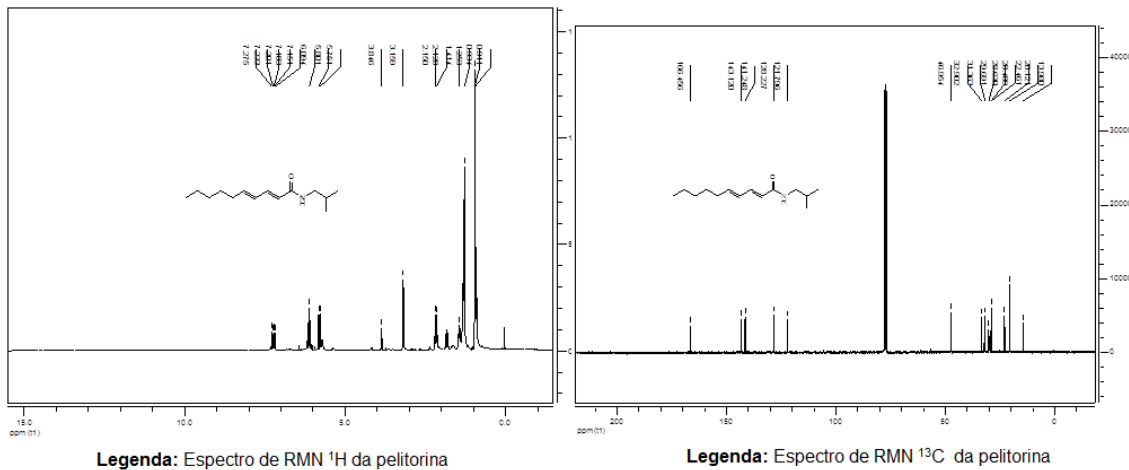


Figura 5. Estrutura química e espectro de RMN ^1H e ^{13}C da pelitorina

A substância isolada do extrato clorofórmio dos frutos (2A) foi identificada como sendo a piplartina (Figura 6) após comparação de seus dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C e espectro de massa com os dados espectroscópicos desta substância descritos na literatura. Resalva-se que esta substância já foi isolada de todas as partes desta planta.

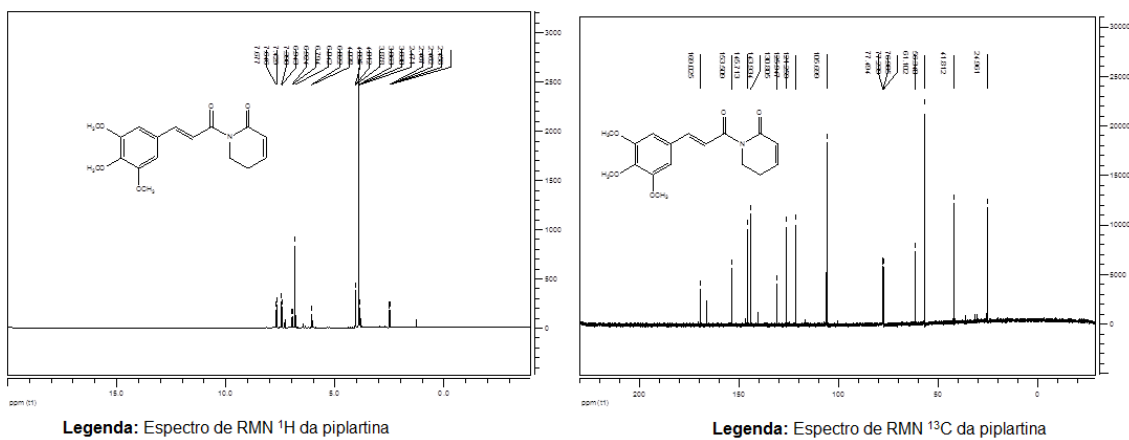


Figura 6. Estrutura química e espectro de RMN ^1H e ^{13}C piplartina

Após obtenção dos dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C e espectro de massa da substância isolada do extrato acetato de etila dos frutos (3A), quando comparados com os dados espectroscópicos descritos na literatura (RODRIGUES, 2009) para o ácido 3,4,5-trimetoxi-diidrocinâmico, já isolado desta planta, foram totalmente compatíveis Figura 7.

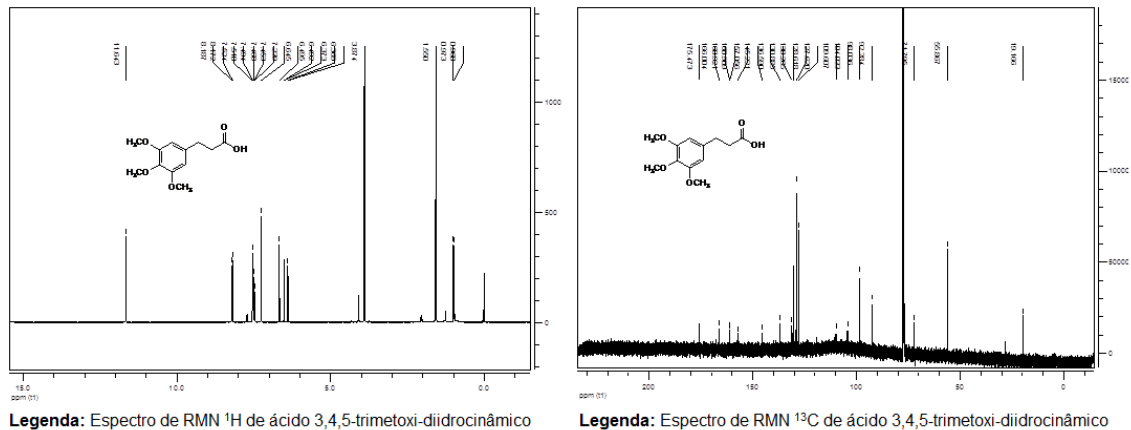


Figura 7. Estrutura química e espectro de RMN ^1H e ^{13}C do ácido 3,4,5-trimetoxi-diidrocinâmico.

Piper é um gênero notável entre as inúmeras famílias botânicas existentes na flora brasileira devido aos seus metabólitos secundários, tais como: lignanos, amidas, ésteres e ácidos gordos de cadeia longa que são citadas na literatura como anti-herbivoria, defesas com efeitos comparáveis de piretróides e que contém uma promessa no controle de insetos, incluindo vetores da malária. Extratos de *P. tuberculatum* e *P. alatabaccum* Trel. & Yunck., e alguns compostos isolados como: ácido 3,4,5-trimetoxi-dihydrocinamic, dihydropiartine; piplartina, piplartina-dihydropiartine e 5,5', 7'-trimetoxi-3', 4'-metilenodioxiflavone foram testados por Trindade et al. (2012), como larvicidas contra *A. darlingi*.

5.2 TESTE LARVAL DAS SUBSTÂNCIAS PIPLARTINA, PELITORINA E ÁCIDO 3,4,5-TRIMETOXI-DIIDROGINÂMICO ISOLADAS DE FRUTOS DE *P. tuberculatum* SOBRE *R. microplus*

Para o teste com as substâncias isoladas, o qual foi realizado somente com as larvas de *R. microplus*, as CLs encontradas foram altas quando comparadas entre elas, sendo que a pelitorina a $CL_{50\%}$ foi de 0,48 mg/mL, as demais foram de 65.84 mg/mL e 169.55 mg/mL para piplartina e ácido respectivamente, Tabela 3.

Tabela 3. Toxicidade das substâncias de frutos de *P. tuberculatum* sobre as larvas de *R. microplus* (Concentração Letal – CL) Teste de Pacote de larvas – TPL calculado pelo programa Probit.

COMPARAÇÃO DAS CLs DAS SUBSTÂNCIAS TESTADOS SOBRE LARVAS DE <i>R. microplus</i>		
Substâncias	CL ₅₀	Limites (Inferior - Superior)
Pelitorina	0,48	0,0000 - 39,57
Piplartina	65.84	0,0000 - 2.312
Ácido	169.55	0,0000 - 1.543

A família Piperaceae apresenta grande diversidade de metabólitos com variadas atividades biológicas e toxicológicas. Dentre eles: lignanas, neolignanas, terpenoides, propenilfenóis, chalconas, flavonas, benzenopiranos. Os constituintes químicos mais comuns são as amidas (PARMAR et al., 1997) e estão sendo investigadas em seus aspectos larvicidas e anestésicos (MCFERREN; RODRIGUEZ, 1997), destacando-se as isobutilamidas, piperidina e pirrolidina (PARMAR et al., 1997).

Os compostos insecticidas mais reconhecidos de Piperaceae foram isolados a partir de *P. nigrum*, *P. guineense* e *P. tuberculatum* com vários modos de ação que incluem toxicidade de contato, sinergismo, repelência, e propriedades antialimentares (SCOTT et al., 2008).

Dentre as plantas avaliadas com potencial acaricida, observa-se que *P. tuberculatum* tem-se mostrado promissora para o controle de pragas e doenças, devido ao efeito biológico de seus metabólitos secundários. As principais atividades biológicas desta planta são: inseticida, bactericida, fungicida e acaricida, além da ação contra protozoários de importância na saúde pública (MIRANDA et al., 2000; NAVICKIENE et al., 2000; CUNHA; CHAVES, 2001; MIRANDA et al., 2002; SILVA et al., 2002; SCOTT et al., 2002; CHAVES; JUNIOR; SANTOS, 2003; MIRANDA et al., 2003; SCOTT et al., 2003; CASTRO et al., 2008; CHAGAS et al., 2012; LIMA et al., 2014).

A piplartina {5,6-dihydro-1-[1-oxo-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-trans-2-propenyl]-2(1H)pyrinome} é uma amida encontrada em espécies do gênero *Piper* (PARMAR et al., 1997). Na sua forma pura, a piplartina é obtida com rendimento na faixa de 1% (BRAZ-FILHO; SOUZA; MATOS, 1981; CICERO et al., 2007; BEZERRA

et al., 2008), onde esta substância apresenta diversas atividades biológicas avaliadas *in vitro* e *in vivo*, como observado no efeito ansiolítico e antidepressivo, anti-inflamatório, antiplaquetário e antitumoral (MAIA et al., 1998; BHUIYAN et al., 2001; CICERO et al., 2007; BEZERRA et al., 2008; FONTENELE et al., 2009; FAZOLIN et al., 2005).

Outros estudos relevantes foram observados para piplartina sobre formigas e lagartas, bem como atividade antifúngica em *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioedes* (CAPRON; WIEMER, 1996; NAVICKIENE et al., 2000; 2003). Além disso, o efeito antiparasitário *in vitro* da piplartina foi descrito em promastigota de *Leishmania donovani* e epimastigota de *Trypanosoma cruzi* (BODIWALA et al., 2007; COTINGUIA et al., 2009; MORAES, 2011).

No trabalho realizado por Santana (2012), observou-se que a piplartina, na maior concentração de 300 ppm, alcançou 78,66% de mortalidade durante as 96 horas de experimento; as demais concentrações de 50, 100 e 200 ppm apresentaram mortalidade de 18, 19 e 30 %, respectivamente. A piplartina causou três aumentos significativos na mortalidade larval, de acordo com o aumento das concentrações ($H = 29,9$ e $P \leq 0,001$), sendo que 50 e 100 ppm apresentaram resultados de mortalidade similares, sendo notável a eficácia dessa amida no presente estudo.

Além disso, nos estudos de Barros et al. (2010) verificou-se que os isolados de piperina (5% a 0,08%) e piplartina (1,25% a 0,02%) e mais 13 substâncias sintéticas denominadas AM estruturalmente similares à piperina, na concentração de 0,5% no teste de papel impregnado sobre as larvas de *R. microplus*, foram eficientes no controle deste ectoparasita. Contrariando esses resultados Barbieri-Junior et al. (2007) ao testar a substância piperine não apresentou resultados para *Lucilia cuprina* e *Musca domestica*. Sendo compatíveis com o presente estudo no qual as mesmas substâncias não apresentaram resultados para *R. microplus*.

A substância isolada piplartina já foi avaliada com diferentes ações e sendo constatados resultados promissores para a atividade de ação anti - câncer (COSTA - LOTUFO et al., 2010); esquistossomicida (MORAES et al., 2011) e inseticida (DYER et al., 2003). A pelitorina, é conhecida por possuir ação inseticida (PARCK, 2001), bactericida (REDDY et al., 2004), larvicida (PARCK, 2001), propriedades anticancerígenas (EE et al., 2010). Conforme Ku et al. (2013) a substância pelitorina

possui atividade anticoagulante, e para Narasimhan et al. (2004) o ácido 3,4,5-trimetoxi-diidrocinâmico ação antibacteriana e antifúngica.

Ferreira et al. (2010), isolaram do extrato hidroalcoólico de frutos de *P. tuberculatum* o ácido 3,4,5-trimetoxi-diidrocinâmico, testando-o *in vitro* em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. O ácido 3,4,5-trimetoxi-diidrocinâmico foi utilizado em culturas de *L. amazonensis* nas concentrações de 1600 a 6,25 µg/mL, onde o ácido 3,4,5-trimetoxi-diidrocinâmico apresentou efeito leishmanicida dose dependente para as formas promastigotas de *L. amazonensis* apresentando CL₅₀ de 145 µg/mL.

Piplartina, pelitorina e ácido 3,4,5-trimetoxi-diidrocinâmico, substâncias investigadas no presente estudo, isoladas dos frutos de *P. tuberculatum*, também já foram isoladas nessa planta por Navickiene et al. (2000), e em *P. rugosum* (MAXWELL; RAMPERSAD, 1991) e também em outras espécies de *Piper* por Parmar et al. (1997). Sendo que o ácido 3,4,5-trimetoxi-diidrocinâmico isolado de *P. retrofractum* foi separado por hidrólise a partir do composto 3',4',5'-trimetóxi-cinamato de etila original, isolado de *P. longum* (KUMAR et al., 2005).

5.3 IMERSÃO DE ADULTOS (TIA) NOS EXTRATOS DE *P. tuberculatum* SOBRE ADULTOS DE *R. microplus*

5.3.1 Redução de ovoposição (RO)

Na tabela 4, observa-se que o extrato hexânico de frutos (PTFrHe) apresentou melhores resultados, apresentando 75% de redução de ovoposição na concentração de 50 mg/mL, diferenças significativas foram observadas entre os extratos.

Para o extrato clorofórmico de talos (PTTCl) observou-se redução de 60,1%, sendo este o mais expressivo. Enquanto que nos extratos de acetato de etila e etanólico a redução de ovoposição não atingiu 50% na maior concentração (50 mg/mL).

Tabela 4. Redução de ovoposição com os extratos hexânico, clorofórmico, acetato de etila e etanólico de folha, talo e fruto de *P. tuberculatum* sobre as fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*

	Concentração	PTFHe	PTTHe	PTFrHe
Hexano	50,0	11,1 ^{Ba}	2,6 ^{Bb}	75,0 ^{Aa}
	25,0	19,3 ^{Ba}	16,3 ^{Bb}	52,4 ^{Aa}
	12,5	19,8 ^{Ba}	19,5 ^{Ba}	61,5 ^{Aa}
	6,25	17,6 ^{Aa}	5,7 ^{Bb}	27,6 ^{Aa}
	3,12	24,8 ^{Aa}	22,4 ^{Aa}	41,1 ^{Ab}
	1,56	5,0 ^{Ba}	13,4 ^{Aa}	12,1 ^{Bc}
	Concentração	PTFCI	PTTCl	PTFrCl
Clorofórmio	50,0	32,1 ^{Ba}	60,1 ^{Aa}	36,5 ^{Ba}
	25,0	18,7 ^{Bb}	5,7 ^{Bb}	39,1 ^{Aa}
	12,5	39,4 ^{Ba}	50,1 ^{Aa}	40,6 ^{Ba}
	6,25	6,5 ^{Bd}	11,5 ^{Ab}	21,0 ^{Ab}
	3,12	8,2 ^{Bc}	1,9 ^{Bb}	36,4 ^{Aa}
	1,56	2,2 ^{Bd}	13,9 ^{Ab}	20,0 ^{Ab}
	Concentração	PTFAc	PTTAc	PTFrAc
Acetato de Etila	50,0	47,1 ^{Aa}	33,0 ^{Aa}	25,4 ^{Aa}
	25,0	30,9 ^{Aa}	26,7 ^{Aa}	12,7 ^{Ab}
	12,5	13,6 ^{Ab}	14,9 ^{Aa}	30,7 ^{Aa}
	6,25	28,3 ^{Aa}	13,2 ^{Ba}	7,9 ^{Bb}
	3,12	9,4 ^{Ab}	15,3 ^{Aa}	10,6 ^{Ab}
	1,56	4,2 ^{Bb}	32,3 ^{Aa}	8,5 ^{Bb}
	Concentração	PTFEt	PTTEt	PTFrEt
Etanol	50,0	35,0 ^{Aa}	26,0 ^{Aa}	31,9 ^{Aa}
	25,0	30,4 ^{Aa}	27,3 ^{Aa}	14,7 ^{Ba}
	12,5	32,1 ^{Aa}	27,9 ^{Aa}	29,5 ^{Aa}
	6,25	27,5 ^{Aa}	20,6 ^{Aa}	23,9 ^{Aa}
	3,12	14,4 ^{Ab}	26,3 ^{Aa}	20,9 ^{Aa}
	1,56	13,3 ^{Ab}	11,4 ^{Aa}	20,5 ^{Aa}

*Letras iguais maiúsculas na horizontal constituem grupo estatisticamente homogêneo e minúsculas na vertical constituem grupo estatisticamente homogêneo não diferem pelo Teste Scott e Knott a 5% de significância, para cada solvente.

**Análise de variância dos dados foram realizadas com a transformação de $\sqrt{x} + 4$.

***As concentrações em mg/mL.

5.3.2 Redução de eclosão (HR)

Para a porcentagem de redução de eclosão, que avalia a diminuição da eclosão das larvas das posturas viáveis oriundas das fêmeas submetidas aos tratamentos, na tabela 5, observa-se a diferença entre as médias de porcentagem de eclosão para os diferentes extratos hexânicos, clorofórmicos, acetatos, etanólicos de folhas, talos e frutos de *P. tuberculatum*.

Para o extrato hexânico dos frutos (PTFrHe), observou-se uma redução de 99,0% da concentração de 50-12,5 mg/mL. Nos extratos clorofórmicos a redução foi observada no extrato de folhas (PTFCI) sendo de 68,4% e, o etanólico foi de 55,6% (PTFEt e PTFrEt) equanto que o acetato de etila observou-se 94,1% frutos (PTFrAc).

Tabela 5. Redução de eclosão dos extratos hexânico, clorofórmico, acetato de etila e etanólico de folha, talo e fruto de *P. tuberculatum* sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*

	Concentração	PTFHe	PTTHe	PTFrHe
Hexano	50,0	17,7 ^{Ba}	27,8 ^{Ba}	99,0 ^{Aa}
	25,0	17,0 ^{Ca}	38,6 ^{Ba}	99,0 ^{Aa}
	12,5	8,9 ^{Cb}	33,2 ^{Ba}	99,0 ^{Aa}
	6,25	6,4 ^{Bb}	19,5 ^{Aa}	15,1 ^{Ab}
	3,12	1,1 ^{Cc}	29,6 ^{Aa}	11,3 ^{Bb}
	1,56	2,1 ^{Cc}	35,0 ^{Aa}	4,8 ^{Bb}
	Concentração	PTFCI	PTTCI	PTFrCI
Clorofórmio	50,0	68,4 ^{Aa}	33,3 ^{Ba}	16,4 ^{Ba}
	25,0	27,2 ^{Ab}	29,6 ^{Aa}	7,8 ^{Ba}
	12,5	45,2 ^{Ab}	51,9 ^{Aa}	6,5 ^{Ba}
	6,25	19,0 ^{Ac}	14,8 ^{Ab}	4,4 ^{Aa}
	3,12	3,1 ^{Bc}	29,6 ^{Aa}	4,1 ^{Ba}
	1,56	4,1 ^{Ac}	16,7 ^{Ab}	4,8 ^{Aa}
	Concentração	PTFAc	PTTAc	PTFrAc
Acetato de Etila	50,0	28,3 ^{Ba}	12,7 ^{Ba}	94,1 ^{Aa}
	25,0	30,2 ^{Aa}	5,5 ^{Ba}	60,8 ^{Aa}
	12,5	17,0 ^{Ba}	3,6 ^{Ba}	64,7 ^{Aa}
	6,25	7,5 ^{Ba}	3,6 ^{Ba}	58,8 ^{Aa}
	3,12	1,9 ^{Aa}	1,8 ^{Aa}	11,8 ^{Ab}
	1,56	17,4 ^{Aa}	0,4 ^{Aa}	3,1 ^{Ab}
	Concentração	PTFEt	PTTEt	PTFrEt
Etanol	50,0	55,6 ^{Aa}	20,8 ^{Ba}	55,6 ^{Aa}
	25,0	44,4 ^{Aa}	14,7 ^{Ba}	38,6 ^{Ab}
	12,5	1,0 ^{Cc}	15,0 ^{Ba}	56,0 ^{Aa}
	6,25	1,0 ^{Cc}	20,8 ^{Ba}	56,0 ^{Aa}
	3,12	21,5 ^{Bb}	21,2 ^{Ba}	51,4 ^{Aa}
	1,56	18,8 ^{Bb}	3,8 ^{Cb}	54,6 ^{Aa}

*Letras iguais maiúsculas na horizontal constituem grupo estatisticamente homogêneo e minúsculas na vertical constituem grupo estatisticamente homogêneo não diferem pelo Teste Scott e Knott a 5% de significância, para cada solvente.

**Análise de variância dos dados foram realizadas com a transformação de $\sqrt{x} + 4$.

***As concentrações em mg/mL.

5.3.3 Eficiência reprodutiva (ER)

As médias de eficiência reprodutiva para o extrato estão representadas na Tabela 6, onde foi observado que o extrato hexânico de frutos (PTFrHe) apresentou 0,1% de eficiência reprodutiva a partir da concentração de 12,5 mg/mL. Sendo que para os outros extratos na maior concentração de 50 mg/mL, observou-se eficiência de 7,0%, 6,5% para clorofórmico de folhas e talos (PTFCI e PTTCI), o de acetato de etila de frutos (PTFrAc) 1,2%, enquanto que os etanólicos de frutos foi de 14,4% na concentração 50 mg/mL.

Tabela 6. Eficiência reprodutiva dos extratos hexânico, clorofórmico, acetato de etila e etanólico de folha, talo e fruto de *P. tuberculatum* sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*

	Concentração	PTFHe	PTTHe	PTFrHe
Hexano	50,0	28,8 ^{Ba}	66,7 ^{Aa}	0,1 ^{Cb}
	25,0	25,2 ^{Ba}	56,7 ^{Aa}	0,1 ^{Cb}
	12,5	26,5 ^{Ba}	61,7 ^{Aa}	0,1 ^{Cb}
	6,25	26,3 ^{Ba}	74,3 ^{Aa}	27,6 ^{Ba}
	3,12	28,5 ^{Ba}	65,0 ^{Aa}	23,8 ^{Ba}
	1,56	33,3 ^{Ba}	60,0 ^{Aa}	34,4 ^{Ba}
	Concentração	PTFCI	PTTCI	PTFrCI
Clorofórmio	50,0	7,0 ^{Bc}	6,5 ^{Bb}	32,4 ^{Ab}
	25,0	18,3 ^{Bc}	16,6 ^{Ba}	35,1 ^{Ab}
	12,5	9,5 ^{Bc}	5,1 ^{Bb}	38,9 ^{Aa}
	6,25	22,0 ^{Bb}	19,1 ^{Ba}	43,5 ^{Aa}
	3,12	29,0 ^{Ba}	17,2 ^{Ca}	42,3 ^{Aa}
	1,56	31,0 ^{Ba}	17,0 ^{Ca}	46,7 ^{Aa}
	Concentração	PTFac	PTTAc	PTFrAc
Acetato de Etila	50,0	13,0 ^{Bd}	20,9 ^{Ab}	1,2 ^{Cc}
	25,0	19,3 ^{Ac}	24,6 ^{Aa}	10,0 ^{Bb}
	12,5	27,0 ^{Ab}	29,1 ^{Aa}	8,5 ^{Bb}
	6,25	27,2 ^{Ab}	29,8 ^{Aa}	11,4 ^{Bb}
	3,12	15,1 ^{Aa}	30,7 ^{Aa}	24,6 ^{Ba}
	1,56	51,2 ^{Bc}	25,9 ^{Ab}	27,1 ^{Aa}
	Concentração	PTFEt	PTTEt	PTFrEt
Etanol	50,0	16,6 ^{Bb}	31,9 ^{Ab}	14,4 ^{Bb}
	25,0	20,3 ^{Bb}	33,0 ^{Ab}	24,1 ^{Ba}
	12,5	35,3 ^{Ba}	33,2 ^{Ab}	14,5 ^{Cb}
	6,25	37,9 ^{Ba}	31,6 ^{Ab}	15,2 ^{Cb}
	3,12	33,8 ^{Ba}	32,2 ^{Ab}	17,6 ^{Cb}
	1,56	34,6 ^{Ba}	45,1 ^{Aa}	16,4 ^{Cb}

*Letras iguais maiúsculas na horizontal constituem grupo estatisticamente homogêneo e minúsculas na vertical constituem grupo estatisticamente homogêneo não diferem pelo Teste Scott e Knott a 5% de significância, para cada solvente.

**Análise de variância dos dados foram realizadas com a transformação de $\sqrt{x} + 4$.

***As concentrações em mg/mL.

5.3.4 Eficácia (E)

De acordo com a Tabela 7, as médias de eficácia do teste de imersão de adultos para o extrato hexânico, clorofórmico, acetato de etila e etanol, observa-se que o extrato hexânico de frutos (PTFrHe) com 99,7% a partir da concentração de 12,5 mg/mL. Para o extrato clorofórmico folhas e talos (PTFCI e PTTCI) a eficácia observada foi de 80,9% e 72,6%, respectivamente. No acetato de etila frutos e folhas (PTFrAc e PTFAc) a eficácia observada foi de 96,9% e 67,6%. Enquanto que o extrato etanólico de frutos e folhas (PTFrEt e PTFEt) a eficácia foi de 71,6% e 68,4%, respectivamente.

Tabela 7. Eficiência reprodutiva dos extratos hexânico, clorofórmico, acetato de etila e etanólico de folha, talo e fruto de *P. tuberculatum* sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*

	Concentração	PTFHe	PTTHe	PTFrHe
Hexano	50,0	25,7 ^{Ba}	27,8 ^{Ba}	99,7 ^{Aa}
	25,0	30,2 ^{Ba}	38,6 ^{Ba}	99,7 ^{Aa}
	12,5	26,5 ^{Ba}	33,2 ^{Ba}	99,8 ^{Aa}
	6,25	27,1 ^{Ba}	19,5 ^{Ba}	43,9 ^{Ab}
	3,12	21,0 ^{Ba}	29,6 ^{Ba}	51,5 ^{Ab}
	1,56	7,7 ^{Bb}	35,0 ^{Aa}	30,1 ^{Ab}
	Concentração	PTFCI	PTTCI	PTFrCI
Clorofórmio	50,0	80,9 ^{Aa}	72,6 ^{Aa}	32,7 ^{Ba}
	25,0	50,0 ^{Aa}	29,6 ^{Ab}	27,0 ^{Ba}
	12,5	74,1 ^{Aa}	78,2 ^{Aa}	19,1 ^{Ba}
	6,25	39,9 ^{Ab}	19,0 ^{Ab}	9,7 ^{Bb}
	3,12	18,5 ^{Bc}	27,1 ^{Bb}	12,1 ^{Bb}
	1,56	15,2 ^{Ac}	28,0 ^{Ab}	4,5 ^{Bb}
	Concentração	PTFAc	PTTAc	PTFrAc
Acetato de Etila	50,0	67,6 ^{Ba}	41,3 ^{Ca}	96,7 ^{Aa}
	25,0	52,2 ^{Ba}	30,8 ^{Ca}	72,1 ^{Ab}
	12,5	33,0 ^{Bb}	18,2 ^{Bb}	76,2 ^{Ab}
	6,25	32,6 ^{Bb}	16,2 ^{Cb}	68,0 ^{Ab}
	3,12	15,1 ^{Bc}	13,8 ^{Bb}	31,1 ^{Ac}
	1,56	51,2 ^{Aa}	27,3 ^{Ba}	24,0 ^{Bc}
	Concentração	PTFEt	PTTEt	PTFrEt
Etanol	50,0	68,4 ^{Aa}	37,0 ^{Ba}	71,6 ^{Aa}
	25,0	60,0 ^{Aa}	35,0 ^{Ba}	52,5 ^{Ab}
	12,5	30,5 ^{Bb}	34,6 ^{Ca}	71,5 ^{Aa}
	6,25	25,3 ^{Bb}	37,7 ^{Ba}	70,1 ^{Aa}
	3,12	33,2 ^{Bb}	36,5 ^{Ca}	65,4 ^{Aa}
	1,56	31,7 ^{Bb}	11,1 ^{Cb}	67,6 ^{Aa}

*Letras iguais maiúsculas na horizontal constituem grupo estatisticamente homogêneo e minúsculas na vertical constituem grupo estatisticamente homogêneo não diferem pelo Teste Scott e Knott a 5% de significância, para cada solvente.

**Análise de variância dos dados foram realizadas com a transformação de $\sqrt{x} + 4$.

***As concentrações em mg/mL.

5.4 CONCENTRAÇÃO LETAL DO TESTE LARVAL DOS EXTRATOS DE FOLHAS, FRUTOS E TALOS EM DIFERENTES SOLVENTES *P. tuberculatum* SOBRE *R. microplus*

Na análise de Probit para o cálculo de CLs, os extratos hexânico de folhas, talos e frutos de *P. tuberculatum* sobre as larvas de *R. microplus*, obteve CL₅₀ de 1,23, 1,29 e 1,75 mg/mL, respectivamente, sendo essa as menores CLs encontradas. No entanto, os extratos clorofórmicos, acetato de etila e etanol também foram encontradas CLs. Nos extratos clorofórmicos as CL₅₀, do extrato de fruto, observou o menor valor (2,23 mg/mL), seguido de folhas (3,01 mg/mL) e por fim o de talo (7,87 mg/mL). Enquanto que para os extratos de acetato de etila, as menores CLs foram de 2,82 e 5,19 mg/mL, frutos e talos, respectivamente. Os extratos etanólicos, as CLs₅₀, a qual foram de 3,62, 4,02 e 5,29 mg/mL, nos extratos de frutos, talos e folhas, respectivamente (Tabela 8).

Tabela 8. Toxicidade dos extratos de *P. tuberculatum* para larvas *R. microplus* (Concentração Letal – CL) Teste de Pacote de Larvas – TPL calculado pelo programa Probit.

COMPARAÇÃO DAS CLs DOS EXTRATOS TESTADOS SOBRE LARVAS DE <i>R. microplus</i>			
EXTRATOS		CL ₅₀	Limites (inferior - superior)
Hexânico	Folhas	1,23	0,0000 – 3,07
	Frutos	1,75	1,67 – 1,81
	Talos	1,29	0,0003 – 3,14
Clorofórmico	Folhas	3,01	0,28 – 6,5
	Frutos	2,23	0,13 – 35,84
	Talos	7,87	0,72 – 48,46
Acetato de etila	Folhas	-----	-----
	Frutos	2,82	1,16 – 4,77
	Talos	5,19	3,80 – 6,77
Etanólico	Folhas	5,29	3,42 – 8,20
	Frutos	3,62	0,73 – 17,98
	Talos	4,02	2,22 – 6,61

*Para o cálculo das Concentrações letais (CLs) a análise estatística realizada pelo Probit com auxílio do programa BioStat 2009.

A Figura 8 representa a curva de dose resposta das CLs encontradas com os extratos testados sobre o teste pacote de larvas em *R. microplus*. Onde é observado que todos os extratos possuem efeito, porém, a potência dos mesmos são diferentes.

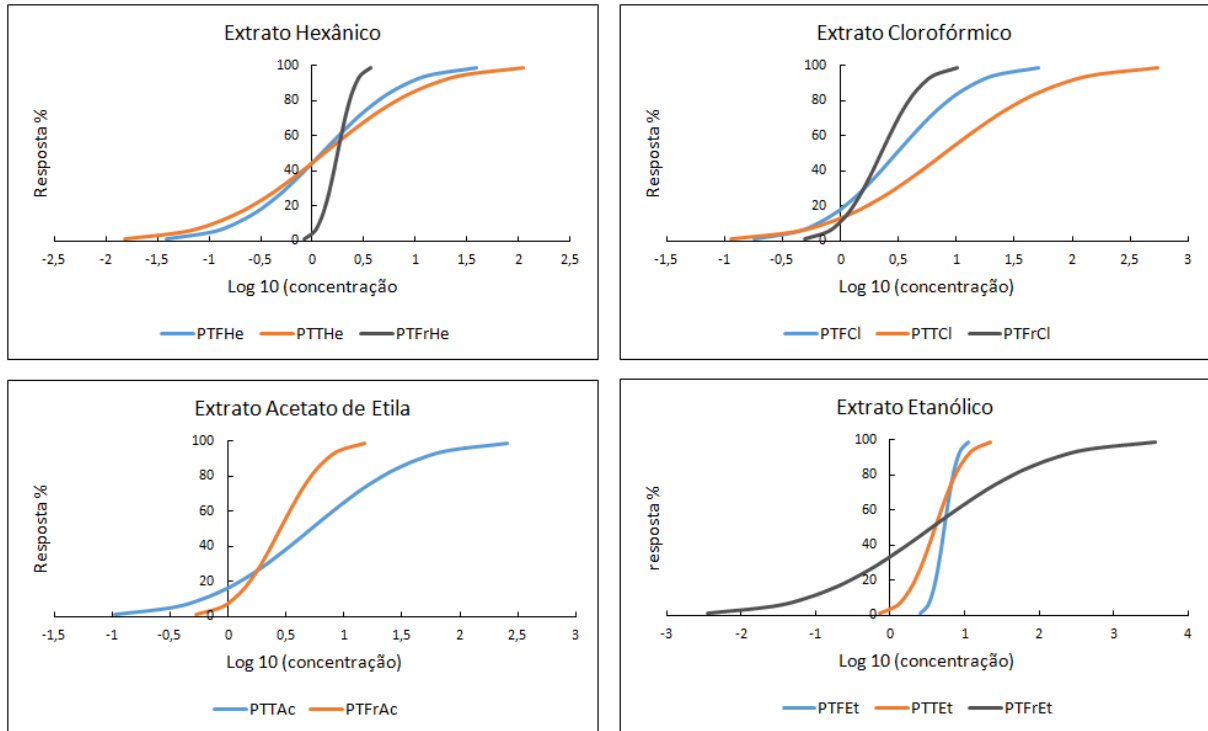


Figura 8. Curvas de dose resposta das CLs encontradas no Teste de Pacote de Larvas sobre larvas de *R. microplus*.

Para os extratos hexânicos, talos teve maior atividade biológica por equivalência de dose, sendo portanto, mais potente do que folha e fruto. Folha e fruto possuem a mesma eficácia, indicada pela resposta máxima alcançada (efeito teto). O extrato de fruto é o mais potente do que folhas e talos.

Para o extrato clorofórmico observou-se também que, talos teve maior atividade biológica por equivalência de dose, e o fruto o mais potente do que folhas e talos.

No extrato de acetato de etila os talos também tiveram maior atividade biológica por equivalência de dose, enquanto que o fruto foi o mais potente. Extratos de acetato de folhas não apresentaram resultados.

Enquanto que, para o extrato etanólico, os frutos apresentaram maior atividade biológica por equivalência de dose, porém, folhas e talos foram mais potentes.

Todos os extratos (hexânico, clorofórmico, acetato de etila e etanólico) de (folhas, talos e frutos) tiveram sua eficácia máxima. No entanto, o único que não teve resultado foi o extrato de acetato de etila de folhas.

O extrato de pimentas do gênero *Piper*, apresenta uma série de amidas, sendo a mais comum a piperina. Essas substâncias agem como neurotoxinas, afetando as funções do sistema nervoso central, causando rápida paralisia do inseto (SCOTT et al., 2002).

No Brasil foram registradas populações de carrapatos resistentes à maioria das classes de acaricidas usadas para o seu controle. Farias (1999) revelou casos de resistências a organofosforados e piretróides sintéticos, enquanto que Furlong (1999) ao amitraz na região sul e suldeste. Em meados da década de 90, intensificou-se o uso das lactonas macrocíclicas, servindo como uma alternativa no controle de populações resistentes aos compostos citados anteriormente, e, pela facilidade de aplicação, uma vez que a química de produtos naturais já começa a ser explorada. Tal fato tem impulsionado estudos com moléculas de origem vegetal, visando o controle dos carrapatos bovinos.

Tal fato tem impulsionado estudos com moléculas de origem vegetal, visando o controle dos carrapatos bovinos. Uma vez que o estado de Rondônia é o maior produtor de carne bovina. Para Borges et al. (2011) cerca de 55 plantas já foram avaliadas quanto ao potencial acaricida contra *R. microplus*, no entanto, poucas substâncias apresentaram atividades acaricidas, o que demonstra a importância de se estudar produtos vegetais sobre pragas e doenças.

Os extratos de folhas de *P. tuberculatum* têm sido utilizados como inseticidas botânicos, assim como afirmam os estudos Trindade et al. (2012). No entanto, há poucos estudos publicados que visam a avaliação de uso de extratos de *P. tuberculatum* contra carrapatos (CHAGAS et al., 2012).

Os resultados obtidos nesse estudo mostram o potencial acaricida dos extratos de *P. tuberculatum* sobre as larvas de *R. microplus*, onde essa potencialidade foi demonstrada na ação acaricida sobre larvas com uma mortalidade de 100% para os diferentes extratos de frutos de *P. tuberculatum*. Em outro trabalho analisado por Fazolin et al. (2007) com coleóptero *Tenebrio molitor*, verificaram a mortalidade de 100% sobre larvas e adultos de *Callosobruchus maculatus*.

No estudo de Lima et al. (2014) testando os frutos de *P. tuberculatum* em diferentes solventes contra larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, verificaram

que as larvas submetidas ao extrato hexânico na concentração de $CL_{50\%}$ foi de 0,04 mg/mL, para o extrato de éter etílico a $CL_{50\%}$ foi de 0,08 mg/mL e de etanol foi de $CL_{50\%}$ de 2,73 mg/mL. Enquanto que a redução de ovosição de fêmeas ingurgitadas apresentaram melhores resultados para os extratos hexânico de 100% e éter etílico de 88,1%.

Lima et al. (2013), também avaliaram *in vitro* extratos de frutos de *P. tuberculatum* obtidos com diferentes solventes sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, sendo que os extratos acetato de etila, etanol e hexânico de frutos de *P. tuberculatum* contra as fêmeas ingurgitadas, apresentou uma $CL_{50\%}$ de 18,4mg/mL, 140,0 mg/mL e 297,4mg/mL, respectivamente.

Santos et al. (2013) avaliando 21 espécies de plantas sobre larvas e adultos de *R. microplus*, observaram que somente as *Lithospermum canescens*, *Myosotis latifolia*, *Caperonia castaneifolia*, *Solidago hispida*, *Hippocratea volubilis*, e *Hibiscus mutabilis* mostraram-se ativas sobre as larvas do carrapato, com eficácia de 95% na concentração de 400 mg/mL. Além disso, nota-se que uma concentração de 400 mg/mL é maior que a concentração utilizada no presente estudo que foi de 50 mg/mL, ou seja, vale ressaltar que concentrações superiores à 50 mg/mL apresentaram alta viscosidade e densidade.

Chagas et al. (2012) avaliando o extrato bruto de folhas de *P. tuberculatum* em larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em seis diluições (0,31%, 0,63%, 1,25%, 2,5%, 5% e 10%), onde foi obtido a $CL_{50\%}$ de 0,41% e $CL_{90\%}$ de 0,63%), observaram uma eficácia de 91,66% na diluição de 10%, a qual segundo os autores ocorreu em função do efeito sobre a eclosão das larvas. Ainda, verificada uma alta porcentagem de mortalidade a 5% (63,34%). No presente estudo também utilizou-se extratos de folhas de *P. tuberculatum*, observando CL_{50} de 1,23 mg/mL, para o extrato hexânico. No entanto, para as fêmeas ingurgitadas a eficácia foi observada com o extrato de frutos com 99,8% na concentração de 50mg/mL, porém esse resultado ocorreu em função da redução de ovoposição. Esses autores também realizaram testes com os compostos isolados (piperina e piplartina) e não causaram mortalidade. Os resultados mencionados aqui apoiam a hipótese que outras substâncias ativas ou uma combinação delas pode ser mais eficaz.

Sousa et al. (2008), trabalhando com extratos hexânicos de frutos de *P. tuberculatum* com diluições de 0,25 a 0,0156%, sobre fêmeas ingurgitadas e larvas do carrapato bovino, observaram que o extrato de frutos apresentou uma eficácia

que variou de 5,2 a 99,7% para as fêmeas. Diferente dos resultados obtidos nesse estudo, os frutos de *P. tuberculatum* extraído com os diferentes solventes (hexano, clorofórmico, acetato de etila e etanol).

Testes utilizando papéis de filtro impregnados foram realizados por Guglielmone et al. (2000a); Guglielmone et al. (2001b); Fader et al. (2003) no sul do Brasil e Argentina para avaliar populações quanto a resistências aos inseticidas do mercado de *H. irritans*, sendo estes as únicas informações sobre estes muscideos, testes como esse realizado em nosso estudo não há relatos, pois a utilização de extratos vegetais esta sendo uma inovação para o avanço da agropécua.

Embora testes adicionais que envolvem estes produtos naturais, tais como os estudos farmacológicos e toxicológicos, são necessários para a elucidação do mecanismo de ação inseticidas, estes resultados podem ser úteis na identificação dos produtos naturais para o desenvolvimento de novos acaricidas, porém outras concentrações e diluições precisam ser testadas para verificar a notável importância de se utilizar espécies vegetais no controle de pragas.

A toxicidade dos extratos de *P. tuberculatum* pode ser atribuída à presença das substâncias plipartina, peritorina e ácido 3,4,5-trimetoxi-diidrocinâmico na sua composição, o qual contém a reconhecida ação inseticida e sinérgica como se afirma nos estudos de Maia et al. (1998); Bhuiyan et al. (2001) e Fazolin et al. (2005).

Os resultados apresentados são de grande importância, uma vez que a toxicidade induzida pelos extratos pode ser dependente de uma interação com os metabólitos secundários da planta.

5.5 CONCENTRAÇÃO LETAL DO TESTE DE PAPEL IMPREGNADO DOS EXTRATOS DE FOLHAS, FRUTOS E TALOS EM DIFERENTES SOLVENTES *P. tuberculatum* SOBRE *H. irritans*

A avaliação *in vitro* da susceptibilidade das populações de mosca-dos-chifres foi efetuada realizando leitura dos testes com duas horas de exposição aos papéis filtro impregnado com os extratos nas placas de Petri. Os resultados das CL₅₀ obtidos com os extratos avaliados de *P. tuberculatum*, com relação a leitura de duas horas, para cada um dos extratos testados estão apresentados na Tabelas 9. O extrato que apresentou atividade inseticida promissora para o controle da mosca-dos-chifres foi o extrato de talos de etanólico (PTTEt) com CL₅₀ de 6,00 mg/mL enquanto que os outros extratos obtiveram CL₅₀ de 61,14 mg/mL e 136,88 mg/mL para os extratos de folhas etanólicos (PTFEt) e extratos de hexânico de frutos (PTFrHe), respectivamente. Os extratos com CLs acima das previamente estipuladas não foram mencionadas.

Tabela 9. Toxicidade dos extratos de *P. tuberculatum* sobre *H. irritans* (Concentração Letal – CL) Teste Papel Impregnado calculado pelo programa Probit.

EXTRATOS		CL ₅₀	Limites (inferior - superior)
Hexânico	Frutos	136,88	58,40 – 1.308
Etanólico	Folhas	61,14	28,69 – 130,29
	Talos	6,00	1,71 – 20,83

Na Figura 9 estão representadas as curvas de dose resposta das CLs encontradas com os extratos testados sobre o de teste de papel filtro impregnado sobre *H. irritans*. Onde é observado que os extratos possuem efeito, porém, a potência dos mesmos são diferentes.

No extrato etanólico, observa-se que o extrato de talos possui uma maior atividade por equivalência de dose, sendo o mais potente que o de folhas. Ambos possuem a mesma eficácia, indicada pela resposta máxima alcançada (efeito topo), porém o extrato de talos é mais potente do que o extrato de folhas.

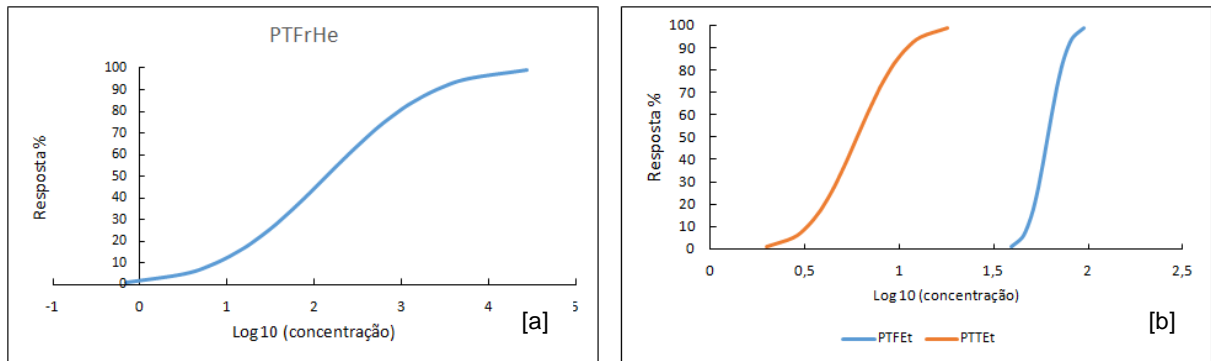


Figura 9. Curvas de dose resposta das CLs encontradas no Teste de Papel Filtro impregnado sobre larvas de *H. irritans*. Extrato hexânico de frutos (PTFrHe) [a] e extrato etanólico folhas e talos (PTFEt e PTTEt) [b].

A crescente demanda por princípios ativos que apresentem baixa toxicidade ao homem, menor impacto ambiental e menores custos de obtenção vem fazendo crescer a utilização dos recursos naturais como fonte de novas substâncias ativas, que são consideradas até mais seguras e mais efetivas que drogas sintéticas (PANG et al., 2014).

O uso intensivo e indiscriminado de moléculas acaricidas sintéticas tem promovido à pressão de seleção e aparecimento de populações de carrapatos resistentes a diferentes classes de fármacos disponíveis no mercado. No entanto é que nesta pesquisa trabalhou-se a fitoquímica de *P. tuberculatum* visando o controle acaricida e inseticida.

O controle de ectoparasitas tem sido feito, principalmente, com o uso de acaricidas. Porém, o uso inadequado e desenfreado desses químicos tem selecionado populações resistentes a inúmeros princípios ativos (PAIM et al., 2011; OLIVO et al., 2013; SILVA et al., 2013; SANTOS et al., 2015). É por meio disto que se busca controlar o uso intensivo de produtos químicos que causam diretamente poluição do ar, água e solo (SPAGNOL; PRANHOS; ALBUQUERQUE, 2010).

Relatos têm sido apresentados sobre o uso de algumas espécies do gênero *Piper* como inseticida na África (IVBIJARO; BOLAJI, 1990). Outras espécies provenientes da Índia, como *P. longum* apresentam atividade inseticida sobre espécies de Coleoptera e Diptera (MIYAKADO et al., 1989).

Segundo Lima et al. (2014) a eficiência de ectoparasita e de outras atividades biológicas pode variar de acordo com o método e a forma de extração, combinação de polaridade de solvente.

Por essa razão, este estudo utilizou partes diferentes da planta, com diferentes solventes, tendo em vista que não há trabalhos semelhantes com a utilização da espécie *P. tuberculatum*, com *H. irritans*, para *R. micropus* observou-se estudos com folhas e frutos, sendo talos a análise inédita, por essa razão, um estudo de comparação entre os três materiais.

CONCLUSÃO

- *P. tuberculatum* é uma planta promissora para o desenvolvimento de um novo acaricida, e mais estudos devem ser realizados quanto à composição química e entendimento da atividade de interação dos diferentes extratos e parte da planta.
- O extrato hexânico de frutos de *P. tuberculatum* causou respostas contra as teleóginas, fêmeas adultas de *R. microplus*, provocando redução de ovoposição, ação contra a eclosão dos ovos, maior eficiência reprodutiva e eficácia do tratamento.
- A menor concentração letal (CL₅₀) encontradas pelos testes de TPL sobre larvas de *R. microplus*, foram dos extratos hexânico de folhas (1,23 mg/mL), e extratos hexânicos de talos (1,29 mg/mL). Enquanto que para as substâncias a pelitorina apresentou CL₅₀ de 0,48 mg/mL, sendo este o melhor resultado entre as substâncias.
- A concentração letal (CL₅₀) encontrada para o teste de papel filtro impregnado sobre *H. irritans* o extrato etanólico dos talos *P. tuberculatum* foi de 6,00mg/mL, sendo este o melhor resultado para essa espécie.
- No entanto, as substâncias testadas no teste de TPL com as substâncias isoladas, a única que apresentou a devida ação acaricida foi a pelitorina.

REFERÊNCIAS

- ACIOLE, S.D.G. **Avaliação da Atividade Inseticida dos Óleos Essenciais das Plantas Amazônicas Annonaceae, Boraginaceae e de Mata Atlântica Myrtaceae como Alternativa de Controle às Larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)**. 2009. 86p. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente). Faculdade de Ciências. Universidade de Lisboa. Departamento de Biologia Animal. Lisboa, 2009.
- AGNOLIN, C. A. **Óleo de Citronela no Controle de Ectoparasitas de Bovinos**. 2009. 64f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Santa Maria. Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Rio Grande do Sul, 2009.
- AHID, S. M. M. **Apostila Didática em Entomologia Veterinária**. Mossoró: UFERSA, 2009.
- ALMEIDA, J.R.G.S.; SILVA-FILHO, R.N.; NUNES, X.P.; DIAS, C.S.D.; PEREIRA, F.O.; LIMA, E.O. Antimicrobial activity of the essential oil of. **Química Nova**, v.33, n.10, p.2202–2210, 2006.
- ALMEIDA, M.N. Eficiência de um Inseticida Botânico no controle de Ninfas de *Euphalerus clitoriae* (Hemiptera: Psyllidae). **Revista Controle Biológico (BE-300) on line**. 2010. Disponível em: <http://www2.ib.unicamp.br/profs/eco_aplicada/revistas/be300_vol2_5.pdf>. Acesso em: 28 de jun 2017.
- ALMEIDA, F. A.; BASSO, F. C.; SENO, M. C. Z.; VALÉRIO FILHO, W. V. Dinâmica Populacional da Mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) em Bovinos da Raça Guzerá e Mestiço em Selvíria, MS. Semina: **Ciências Agrárias**, v.31, n.1, p.157-162, 2010.
- ANJOS-JÚNIOR, J.F. **Estudo fitoquímico e atividade biológica de *Piper permucronatum* Yuncker (Piperaceae)**. 2007. 148p. Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental). Universidade Federal de Rondônia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental. Porto Velho, 2007.
- ARAÚJO, E.R.; HARAND, W.; LIMA, I. C.; DIAS, F.C.R.; SANTANA, A.A.D.; CARVALHO, R.R.C.; LARANJEIRA, D. Extratos de *Piper marginatum* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum scovillei* em pimentão. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v.49, n.2, p.88-94, 2014.
- ARAÚJO-JUNIOR, J.X.; DA-CUNHA, E.V.L.; CHAVES, M.C.D.O.; GRAY, A.I. Piperdardine, a piperidine alkaloid from *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, Elmsford, v.44, n.3, p. 559-561, 1997.
- BARBOSA, C.S.; BORGES, L.M.F.; NICÁCIO, J.; ALVES, R.D.; MIGUITA, C.R.; VIOLANTE, I.M.P.; HAMERSKI, L.; GARCEZ, W.S.; GARCEZ, F.R. *In vitro* activities of plant extracts from the Brazilian Cerrado and Pantanal against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Exp Appl Acarol**, v.60, p.421–430, 2013.

BARROS, A.T.M. Desenvolvimento de *Haematobia irritans* em massas fecais de bovinos mantidas em laboratório. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.2, p. 217-221, 2002.

BARROS, A.T.M. Situação da resistência da *Haematobia irritans* no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.3, p.109, 2004.

BARROS, F.; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N. Orchidaceae in R.C. Forzza, et al (org.). Catálogo de plantas e Fungos do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. v.2, p.1344- 1426, 2010.

BATISTA, L.C.S.O.; FLORENCIO, C.N.; CID, Y,P.; MAGALHÃES, V.S.; CHAVES, D.S.A.; COUMENDOUROS, K. Bioprospecção de extratos de Jaborandi contra *Ctenocephalides felis felis*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Rhipicephalus microplus*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.35, n.2, p.113-118, 2013.

BERNARD, C.B.; KRISHANMURTY, H.G.; CHAURET, D.; DURST, T.; PHILOGNE, B.J.R.; SNCHEZ-VINDAS, P.; POVEDA, L.; SAN ROMÉN, L.; ARNASON, J.T. Inseticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. **Journal of Chemical Ecology**, v.21, p.801-814, 1995.

BEZERRA, D.P.; MOURA, D.J.; ROSA, R.M.; VASCONCELLOS, M.C.; SILVA, A.C.R.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S.; HENRIQUES, J.A.P.; COSTA-LOTUFO, L.V.; SAFFI, J. Evaluation of the genotoxicity of pipartine, an alkalamide of *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian V79 cells. **Mutation Research**, v.652, p.164-174, 2008.

BHUIYAN, M.K.R; HASSAN, E; ISMAN, M.B. Growth inhibitory and lethal effects of some botanical insecticides and potential synergy by dilapiol in *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepdoptera Noctuidal). **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.108, p.82-88, 2001.

BIANCHIN, I.; HONER, M.R.; KOLLER, W.W.; GOMES, A.; SCHENK, J.A.P. **Desenvolvimento de um programa integrado de controle dos nematódeos e a mosca-dos-chifres na região dos cerrados. Fase 5. Efeito da mosca-dos-chifres sobre o ganho de peso de vacas e bezerros Nelore**. Campo Grande, Embrapa-CNPGC, (Embrapa-CNPGC. Comunicado Técnico, 46). 8p. 2002.

BIANCHIN,I.; WILSON, W.K.; ALVES, R.G.O.; DETMANN, E. Efeito da mosca-dos-chifres, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae), no ganho de peso de bovinos Nelore. **Ciência Rural**, v.34, n.3, p.885-890, 2004.

BOUDA, H.; TAPONDJOU, L.A.; FONTEM, D.A.; GUMEDZOE, M.Y.D. Effect of essential oils from leaves of *Ageratum conyzoides*, *Lantana camara* and *Chromolaena odorata* on the mortality of *Sitophilus zeamais* Mots., 1865 (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.37, .103-109, 2001.

BORDIN, E.L. *Haematobia irritans*: controle químico com ivermectim formulação pour-on. **A Hora Veterinária**, v.11, n. 65, p. 20-21, 1992.

BORGES, L.M.F.; SOUSA, L.A.D.; BARBOSA, C.S. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 89–96, 2011.

BROWN, K.; AINSLIE, A.; BEINART, W. Animal disease and the limits of local knowledge: dealing with ticks and tick-borne diseases in South Africa. **Journal of the Royal Anthropological Institute**, v.19, p.319-337, 2013.

BUSTILLO-PARDEY, D.E. La comunicación en insectos. Reciben mensajes de las plantas? El caso de la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari). **Cenicafé**, v.2, n.2, p.40-64, 2005.

BRAZ-FILHO, R.; SOUZA, M.P.; MATOS, M.E.O. Piplartine-dimer A, a new alkaloid from *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v.20, p.345-346, 1981.

BROGLIO-MICHELETTI, S.M.F.; VALENTE, E.C.N.; SOUZA, L.A.S.; DIAS, N.S.; ARAÚJO, A.M.N. Extratos de plantas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.4, p.44-48, 2009.

CAPRON, M.A.; WIEMER, D.F. Piplaroxide an ant-repellent piperidine epoxide from *Piper tuberculatum*. **Journal of Natural Products**, v.59, p.794-795, 1996.

CARVALHO-SILVA, M.; GUIMARÃES, E.F. Uma nova espécie e novos nomes em *Piper* seção *Ottonia* (Piperaceae) para o Sudeste do Brasil. **Hoehnea**, v.36, n.3, p.431-435, 2009.

CASTRO, H.G.; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H.; MOSQUIM, P.R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais metabólitos secundários**. 2. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, p.99, 2004.

CASTRO, M.J.P. **Potencial inseticida de extratos de *Piper tuberculatum* JACQ. (Piperaceae) sobre a fase larval de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). 2007. 61f. Universidade Federal do Piauí. Teresina, 2007.

CASTRO, M.J.P.; SILVA, P.H.S.; PÁDUA, L.E.M. Atividade de extratos de *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Revista Ciências Agrônômicas**, v.3, p.437-442, 2008.

CASTRO, M.J.P.; SILVA, P.H.S.; PÁDUA, L.E.M. Potencial de extratos de frutos frescos e desidratados de *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae) no desenvolvimento da lagarta-do-cartucho do milho. **Magistra Cruz das almas**, v.22, n. 2, 2010.

CELESTINO, C.O.; VARÃO, C.A.R.; VELUDO, H.H.; BRAGA, A.G.S.; LIMA, R.A. AÇÃO INSETICIDA DO EXTRATO DE *Piper tuberculatum* (Jacq.). **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v.3, n.2, p.03-09, 2016.

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

CHAVES, O.M.C.; JUNIOR, F.A.G.; SANTOS, B.V. Amides from *Piper* fruits. **Fitoterapia**, v.74, n.12, p.181-3, 2003.

COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; ALVES, A.P.N.N.; MADEIRA, S.V.F.; PESSOA, C. MORAES, M.E.A.; MORAES, M.O. The contribution of natural products as a source of new anticancer drugs: studies in the national laboratory of experimental oncology at the Federal University of Ceará. **Virtual J Chem**, v.2, p.47-58, 2010.

COSTA, E. L. N.; SILVA, R. F. P.; FIUZA, L. M. Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. **Acta Biologica Leopoldensia**. São Leopoldo, v. 26, n.2, p.173-185, 2004.

COSTA, J.G.M.; SANTOS, P.F.; BRITO, S.A.; RODRIGUES, F.F.G.; COUTINHO, H.D.M.; BOTELHO, M.A.; LIMA, S.G. Composição Química e Toxicidade de Óleos Essenciais de Espécies de *Piper* Frente a Larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Latin Am. J. Pharm**, v.29, p.463-467, 2010.

CUNHA, E.V.L., CHAVES, M.C.O. Two amides from *Piper tuberculatum* fruits. **Fitoterapia**, v.72, p.197-199, 2001.

DANELUTTE, A. P., LAGO, J.H.G., YOUNG, M.C.M, KATO, M.J. Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. **Phytochemistry**, n. 64, p.555-559, 2003.

DEMISSIE, G.; TESHOME, A.; ABAKEMAL, D.; TADESSE, A. Cooking oils and "Triplex" in the control of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.44, p.173-178, 2008.

DEBONSI, H.M.; MIRANDA, J.E.; MURATA, A.T.; BORTOLI, S.A.; KATO, M.J.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M. Isobutyl amides - potent compounds for controlling *Diatraea saccharalis*. **Pest Management Science**, v.65, p.47-51, 2009.

DRUMMOND, R. O.; ERNEST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W. J.; GRAHAM, O. H. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v.66, p.130-133, 1973.

DUH, C.; WU, Y. Cytotoxic pyridone alkaloids from the leaves of *Piper aborescens*. **Journal of Natural Products**, v.53, n.6, p.1575-1577, 1990.

DYER, L.A.; DODSON, C.D.; STIREMAN, J.O.; TOBLER, M.A.; SMILANICH, A.M.; FINCHER, R.M.; LETOURNEAU, D.K. Synergistic effects of three *Piper* amides on generalist and specialist herbivores. **Journal of Chemical Ecology**, v.29, p.2499-2514, 2003.

EE, G.C.L.; LIM, C.M.; RAHMANI, M.; SHAARI, K.; BONG, C.F.J. Pellitorine, a Potential Anti-Cancer Lead Compound against HL60 and MCT-7 Cell Lines and Microbial Transformation of Piperine from *Piper Nigrum*. **Molecules**, v.15, p.2398-2404, 2010.

ESTRADA-PENÃ, A.; JONGEJAN, F. Ticks feeding on humans: a review of records on humans- biting Ixodidae with special references to pathogen transmission. **Experimental and Applied Acarology**, v.23, p.685-715, 1999.

FACUNDO, A.V.; POLLI, A.R.; RODRIGUES, R.V.; MILITÃO J.S.T.; STABELLI, C.T.C. Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H.B.K. **Acta Amazonica**, v.38, n.4. p.733 – 742, 2008.

FADER, O.W.; GUGLIEMONE, A.A.; CASTELLI, M.E.; VOLPOGNI, M.M.; MANGOLD, A.J. Resistance /susceptibility of *Haematobia irritans* (L. 1758) to cypermethrin and diazinon in the central area of Cordoba (Argentina). **Veterinaria**, Argentina, v.20, p.421-442, 2003.

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

FARIA, M.J. Mosca-dos-chifres. Rio de Janeiro: PESAGRO-RIO, 1998. (Informe Técnico, n. 26).

FARIAS, A. M. **Bioatividade do óleo essencial de *Piper tuberculatum* Jacq sobre a lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith. 1797) (Lepidoptera:Noctuidae)**. 2012. 66f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Piauí. Teresina, 2012.

FARIAS, N.A. Situación de La resistêcia de La garrapata *Boophilus microplus* em La región sur de Rio Grande do Sur, Brasil. In: **4 Seminario Internacional de Parasitologia**, 1999, Puerto Vallarta. Mexico: Conasag. 1999. p.25-31.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; CATANI, V.; DE LIMA, M.S.; ALÉCIO, M.R. Toxicidade do óleo de *Piper aduncum* L. a adultos de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Crysomelidae). *Neotropical Entomology*, v.34, p.485-489, 2005.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; CATANI, V.; ALÉCIO, M.R.; LIMA, M.S. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervium* C. DC.; *Piper aduncum* L.; e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebrio molitor* L., 1758. **Ciências Agrotecnologia**, v.31, n.1, 2007.

FAZOLIN, M. Utilização de óleos essenciais no controle de pragas do abacaxi. Inf. Embrapa Acre n. 21, 4 p.; 2007.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; CATANI, V.; ALÉCIO, M.R.; LIMA, M.S. Atividade inseticida do óleo de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Schum

(Bignoneaceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). **Acta Amazonica**, v. 37, p. 599-604. 2007a.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; LIMA, A.P.; ARGOLO, V.M. **Avaliação de plantas com potencial inseticida no controle da vaquinhadão-feijoeiro (*Cerotoma tingomarianus* Bechyné)**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2002. 42 p. Embrapa Acre. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 37).

FERREIRA, M.G.P.R.; KAYANO, A.M.; SILVA-JARDIM, I.; SILVA, T.O.; ZULIANI, J.P.; FACUNDO, V.A.; CALDERON, L.A.; SILVA, A.A.; CIANCAGLINI, P.; STÁBELI, R.G. Antileishmanial activity of 3-(3,4,5-trimethoxyphenyl) propanoic acid purified from Amazonian *Piper tuberculatum* Jacq., Piperaceae, fruits. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v.20, p.1003-1006, 2010.

FERRETO, R. Revisão de literatura sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. 2013, 46f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária). Faculdade de Veterinária. Porto Alegre, 2013.

FERNANDES, T.F. BRAGA, G.M.S. Obtenção de extratos líquênicos do Cerrado Maranhense para avaliação da atividade carrapaticida. **PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, Londrina, v.8, n.21, Ed.270, Art.1799, 2014.

FONTENELE, J.B.; LEAL, L.K.; SILVEIRA, E.R.; FELIX, F.H.; BEZERRA FELIPE, C.F.; VIANA, G.S. Antiplatelet effects of pipartine, na alkamide isolated from *Piper tuberculatum*: possible involvement of cyclooxygenase blockade and antioxidant activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.61, p.511-515, 2009.

FRIGHETTO, R.T.S. Preparação e avaliação da bioatividade de extratos vegetais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., 1997, Salvador. **Resumos...** Salvador: SEB; Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMF, 1997. p. 10.

FURLONG, J. Diagnosis of the susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* to acaricides in Minas Gerais state, Brasil. In: **IV SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL**, Puerto Vallarta, Jalisco, México, p. 41-46, 1999.

GARCIA, C.A. SALAS, S.C.; OSTI, J.L.; VÁZQUEZ, Z.G. Dinâmica populacional de *Haematobia irritans* em um hato de bovinos de Soto La Marina, Tamaulipas, México. **Veterinaria México**, v.2 p.149-152, 2001.

GALLO, D; NAKANO, O; NETO, S. S; CARVALHO, R. P. L; BAPTISTA, G. C; FILHO, E. B; PARRA, J. R. P; ZUCCHI, R. A; ALVES, S. B; VENDRAMIM, J. D; MARCHINI, L. C; LOPES, J. R. S; OMOTO, C; **Manual de Entomologia Agrícola**. Ed Fealq: Piracicaba-SP, p.920, 2002.

GONÇALVES, V.M.; HUERTA, M.M.; FREITAG, R.A. Potencial de plantas acaricidas no controle de carrapatos *Rhipicephalus (boophilus) microplus*. **Revista de Ciências Veterinária e Saúde Pública**, v.3, n.1, p.14-22, 2016.

GONZALES, J.C.; SILVA, N.R.; FRANCO, N. A vida livre do *Boophilus microplus*. Arq. Fac. Vet. UFRGS. RG. v. 3, p. 21-28. 2003.

GONZALES, J.C. O controle do carrapato do boi. Porto Alegre: Editora Universidade Passo Fundo, 1993. 80p.

GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA BORJA, G.E.; PEREIRA, J.B.; Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v.21, n.125, p.8-10, 2002.

GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.S.; BARROS, A.T.M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P.H.D.; LEÓN, A.A.P.; PEREIRA, J.B.; VILLELA, H.S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.23, p.150-156, 2014a.

GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA BORJA, G.E.; PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v.21, n.1, p.8-10, 2014b.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, C.M.O. et al. (orgs) Farmacognisia: da planta ao medicamento. 5ª ed. Editora da UFRGS, Editora da UFSC. Porto Alegre/Florianópolis, 2004.

GUERRERO, F.D.; LOVIS, L.; MARTINS, J.R. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, p.1-6, 2012.

GUGLIELMONE, A.A.; KUNZ, S.E.; CASTELLI M.E.; VOLPOGNI M.M.; KAMMALAH D.; MARTINS J.R.; MATTOS C.; AGUIRRE D.H.; SUÁREZ V.R.; ANZIANI O.S.; MANGOLD, A.J. Susceptibilidad al diazinón de la *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) de diferentes localidades argentinas y del sur de Brasil. **Revisita Medica Veterinaria**, v.91, p.184-186, 2000a.

GUGLIELMONE, A.A.; VOLPOGNI, M.M.; MANGOLD, A.J.; ANZIANI, O.S.; CASTELLI, M.C. Evaluation of a commercial pour-on of 1% fipronil for control of *Haematobia irritans* in naturally infested Holstein heifers. **Veterinaria**, v.17, p.108-113, 2001b.

GUIMARÃES, M.C.M. **Estudo da caloênese, diâmica de crescimento de calos e estabelecimento de suspensões celulares de *Piper permucronatum***. 2015. 46f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente). Universidade Federal de Rondônia. Programa de Pós-Graduação Desenvolvimento em Regional e Meio Ambiente. Porto Velho, 2015.

GUIMARÃES, E.F.; MONTEIRO, D. Piperaceae na Reserva Biológica de Poço das Antas, Silva Jardim, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguesia**, v.57, p.569-589, 2005.

GUIMARÃES, E.F.; GIORDANO, L.C.S. Piperaceae do nordeste brasileiro I: estado do Ceará. **Rodriguesia**, v.55, n.84, p. 21-46, 2004.

HONER, M. R.; GOMES, A. O manejo integrado de mosca-dos-chifres, berne e carrapato em gado de corte. Campo Grande, EMBRAPA-CNPGC, 1990. 60p. (EMBRAPA-CNPGC. Circular Técnica, 22).

HONER, M.R.; BIANCHIN, I.; GOMES, A. **Moscados-chifres**: histórico, biologia e controle. Campo Grande: Embrapa-CNPGC, 1990. 34 p. (Embrapa-CNPGC. Circular Técnica, 45).

HORAK, I.G.; CAMICAS, J.; KEIRANS, J.E. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari:Ixodida): a world list of valid tick names. **Experimental and Applied Acarology**, v.28, p.27–54, 2002.

HOSTETTMAN, K.; MARSTON, A. The search for new drugs from higher plants. **Chimia** 61. 2007.

HUANG, Y.; LAM, S.L.; HO, S.H. Bioactivities of essential oil from *Ellateria cardamomum* (L.) Maton. to *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of Stored Products Research**, v.36, p.107-117, 2000.

JARAMILLO, M.A.; MANOS, P.S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American journal of Botany**, v.88, p.706-716, 2001.

JUNIOR BARBIERI, É.; JUNIOR BARRETO, C.B.; RIBEIRO, R.C.; OLIVEIRA, V.H.S.; LIMA, M.E.F.; MOYA-BORJA, G.E. Efeito Inseticida de Amidas Naturais de *Piper* e do Derivado Sintético Tetraidropiperina sobre *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) e *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, n.2, p.87-91, 2007.

KARR, L.L.; COATS, J.R. Insecticidal properties of d-limonene. **Journal Pesticide Scienc**, v.13, p.287-289, 1988.

KEIRANS, J.E. Systematics of the Ixodida (Argasidae, Ixodidae, Nuttalliellidae): An overview and some problems. In: Tick Vector Biology. Medical and Veterinary Aspects (B. H. Fivaz, T.N. Petney, and I.G. Horak,) ed. Springer- Verlag, Berlin, p.1-21. 1992.

KEIRANS, J.E.; ROBBINS, R.G. A world checklist of genera, subgenera, and species of ticks (Acari: Ixodida) published from 1973- 1997. **Journal of Vector Ecology**, v.24, p.115-129, 1999.

KLOMPEN, H. Ticks, the Ixodida In: MARQUARDT, W.C.; BLACK, W.C.; FREIER, J. E.; HAGEDORN, H.H.; HEMINGWAY, J.; HIGGS, S.; JAMES, A.A.; KONDRATIEFF, B.; MOORE, C.G. Biology of Disease Vectors. 2^oed Colorado: Elsevier Academic Presss, p.45-55. 2005.

KONG, E. H.; KIM, Y. J.; KIM, Y. J.; CHO, H. J.; YU, S. N.; KIM, K. Y.; CHANG, J. H.; AHN, S. C. **Oncology Reports**, v.20, 785p., 2008.

KUMAR, S.; ARYA, P.; MUKHERJEE, C.; SINGH, B. K.; SINGH, N.; PARMAR, V. S.; PRASAD, A.K.; GHOSH, B. Novel aromatic ester from *Piper longum* and its

analogues inhibit expression of cell adhesion molecules on endothelial cells.

Biochemistry, v.44, p.15944-15952, 2005.

LÁZARO, S. F.; FONSECA, L. D.; MARTINS, E. R.; OLIVEIRA, N. J. F.; DUARTE, E. R. Effect of aqueous extracts of *Baccharistriamera* on development and hatching of *Rhipicephalus microplus* (Acaridae) eggs. **Veterinary Parasitology**, v.194, p.79-82, 2013.

LIRA, C.S.; LIMA, B.N.; PROCÓPIO, T.F.; AGRA NETO, A.C. THIAGO, H.N.; NAVARRO, D.M.A.F. **Atividade fungicida do óleo essencial de folhas de *Piper arboreum***. 54° Congresso Brasileiro de Química. 03 a 07 de novembro de 2014. Natal, Rio Grande do Norte. 2014.

LIMA, R.K.; CARDOSO, M.G.; MORAES, J.C.; MELO, B.A.; RODRIGUES, V.G. GUIMARÃES, P.L. Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Acta Amazonica**, v. 39, n.2, p.377 – 382, 2007.

LIMA, A.S.; SOUZA, J.G.N.; PEREIRA, S.G.; GUILLON, M.S.P.; SANTOS, L.S.; COSTA, L.M. Acaricidal activity of different extracts from *Piper tuberculatum* fruits against *Rhipicephalus microplus*. **Parasitology Research**, v.113, p.107-112, 2014.

LIMA, W.Q. F. L.; PEREIRA, T. C. D.; PEREIRA, M. G. M.; BRITO, N. J. N.; ZAMPIERON, R. G.; SILVA, G. A. Avaliação fitoquímica e antioxidante de plantas medicinais do norte do Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2013.

LOPES, J.J.; MARXA, C.; INGRASSIA, R.; NASCIMENTO PICADA, J.; PEREIRA, P.; FERRAZ, A.B.F. Neurobehavioral and toxicological activities of two potentially CNS-acting medicinal plants of *Piper* genus. **Exp Toxicol Pathol**, v.64, p.9–14, 2012.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Ed. Instituto Plantarum, 512p. 2002.

MAIA, J.G.S.; ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; SANTOS, A.S.; SILVA, M.H.L.; LUZ, A.I.R.; BASTOS, C.N. Constituents of the Essential oil of *Piper aduncum* L. Growing Wild in the Amazon Region. **Flavour and Fragrance Journal**, v.13, p.269-272, 1998.

MATOS, F.J.A. Introdução a Fitoquímica Experimental. Ed. UFC. Fortaleza, 1997, 141p.

MARQUES, A.M.; VELOZO, L.S.; CARVALHO, M.A.; HONÓRIO, N.A.; KAPLAN, M.A.; MALECK, M. L. A potential natural alternative source for mosquito vector control in Brasil. **Journal Vector Borne Dis**, v.54, n.1, p.61-68, 2017.

MARTINS, R.C. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 67-670. 2003.

MARTINS, R.C. LAGO, J.H.; ALBUQUERQUE, S. KATO, M.J. Trypanosidal Tetracyclodifuran Lignans From Inflorescences of *Piper solmsianum*, **Phytochemistry**, v.64, p.667-670, 2003.

MARTINEZ, S.S.; VAN EMDEN, H.F. Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by azadirachtin. **Neotropical Entomologia**, v.30, p.113-124, 2002.

MAXWELL, A.; RAMPERSAD, D. A new dihydropiplartine and piplartina dimer from *Piper rugosum*. **Journal of Natural Products**, v.54, n.4, p.1150-1152, 1991.

MELO, A.; GUIMARÃES, E.F.; ALVES, M. Piperaceae do Parque Nacional do Viruá, Caracará, Roraima, Brasil. **Rodriguésia**, v.65, n.2, p 455-470, 2014.

MIRANDA, J.E.; NAVICKIENE, H.M.D.; NOGUEIRA-COUTO, R. H.; DE BORTOLIC, S.A.; KATO, M.J.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M. Susceptibility of *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae) to pellitorine, an amide isolated from *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Apidologie**, v. 34, p. 409-415. 2003.

MIRANDA, J. E.; OLIVEIRA, J.E.M.; ROCHA, K.C.G.; BORTOLI, S.A.; NAVICKIENE, H.M.D.; KATO, M.J.; FURLAN, M. Potencial inseticida do extrato de *Piper tuberculatum* (Piperaceae) sobre *Alabama argilácea* (Huebner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista brasaleira de olioginosas e fibrosas**, v.6, n.2, p.557-563, 2002.

MOREIRA D.L.; KAPLAN M.A.C.; GUIMARÃES E.F. Essential oil of two *Piper species* (Piperaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.70, n.4, p.151-154, 1998.

MORAES, J. **Efeito in vitro de extratos e compostos naturais em *Schistosoma mansoni***. 2011, 236f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2011.

MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; LOPES, P.O.M.V.; NAKANO, E.; YAMAGUCHI, L.F.; KATO, M.J.; KAWANO, T. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of piplartine. **Exp Parasitol**, v.127, p.357-364, 2011.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento Racional de Fármacos Baseado em Produtos Naturais. **Química nova**, v.24, n.1, p.105-111, 2001.

NAKAMURA, C.V.; SANTOS, A.O.; VENDRAMETTO, M.C.; LUIZE, P.S.; FILHO-DIAS, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA-UEDA, C. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.1, p.61-66, 2006.

NASCIMENTO, K. M. **Composição química e atividade antifúngica dos óleos essenciais *Piper* frente a cepas de *Candidasp.*** 2011. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária. Fortaleza, 2011.

NARASIMHAN, B.; BELSARE, D.; PHARANDE, D.; MOURYA, V.; DHAKE, A. 2004. Esters, amides and substituted derivatives of cinnamic acid: synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.39, p.827-834, 2004.

NARI, A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tickborne diseases in South America. **Veterinary Parasitology**, v.57, p.153-165, 1995.

NAVICKIENE, H.M.; ALÉCIO, A.C.; KATO, M.J. BOLZANI, V.S.; YOUNG, M. C.M.; CAVALHEIRO, A.J.; FURLAN, M. Antifungal amides from de *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 621-626. 2000.

NAVICKIENE, H.M.; BOLZANI, V. S.; KATO, M.J.; PEREIRA, A.M.; BERTONI, B.W.; FRANÇA, S.C.; FURLAN, M. Quantidade determination of anti-fungal and insecticide amides in adult plnts, plantlets na callus from *Piper tuberculatum* by reverse-phase high-performande liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v.14, p.281-284, 2003.

NAVICKIENE, H.M.D.; MIRANDA, J.E.; BORTOLI, S.A.; KATO, M.J.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M. Toxicity of extracts and isobutyl amides from *Piper tuberculatum*: potent compounds with potential for the control of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. **Pest Management Science**, v.63, p.399-403, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**. 2007.

NUNES, J.D.; TORRES, G.A.; DAVIDE, L.C.; SALGADO, C.C. Citogenética de *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum*. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v.42, n.7, p.1049-1052, 2007.

OLIVO, C.J; AGNOLIN, C.A.; PARRA, C.L.C.; VOGEL, F.S.F.; RICHARDS, N.S.P.S.; DE PELLEGRINI, L.G.; WEBE, A.; PIVOTO, F.; ARAUJO, L. Efeito do óleo de eucalipto (*Corymbia citriodora*) no controle do carrapato bovino. **Ciência Rural**, v.43, n.2, p.331-337, 2013.

OLIVEIRA, P.R. Biologia e controle de *Amblyomma cajennense*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, n.1, p. 118-122, 2004.

PAIM, F.; DE SOUZA, A.P.; BELLATO, V.; SARTOR, A.A. Controle seletivo do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em bovinos criados em campo nativo, no município de Lages, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, n.1, p.13-16, 2011.

PANG, Y. WANG, D.; FAN, Z.; CHEN, X.; YU, F.; HU, X.; WANG, K.; YUAN, L. Blumea balsamifera - a phytochemical and pharmacological review. **Molecules**, v.19, n.7, p.9453–9477, 2014.

PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; BISHT, K.S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A .; TYAGI, O. D.; PRASAD, A.K.; Wengel, J.; Olesen, C.E; Boll, P.M. Phytochemistry of the Genus Piper. **Phytochemistry**, v.46, n.4, p.597-673, 1997.

PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; BISHT, K.S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TUAGI, O.D.; PRASAD, A.K.; WENGEL, J.; OLESEN, C.E.; BOLL, P.M.; MENDELSON, R. Phytochemistry of genus *Piper*. **Phytochemistry**, v.46, n.4, p.597-673, 1998.

PARMAR, V.; KEYSON, D.; BONT, C. I.F.I.P. **International Federation for Information Processing, Shaping social beliefs**: A community sensitive health information system for rural India. In VENKATESH, A.; GONZALVES, T.; MONK, A.; BUCKNER, K. (Eds.). Home informatics and telematics: ICT for the next billion p.133–143. Boston: Springer. 2007.

PAROLA, P.; RAOULT, D. Tick- borne bacterial diseases emerging in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v.7, p.80-83, 2001.

PEDRASSINI, D.; REISDORFEER, S. Avaliação da eficácia *in vitro* de carrapaticidas comerciais. **Archives of Veterinary Science**, v. 20, n. 1, p. 17-29, 2015.

Piperaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12860>>. Acesso em: 20 Fev. 2017

PESSINI, G.L.; ALBIERO, A.L.M.; MOURÃO, K.S.M.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G. Análise farmacológica de *Piper regellii* (Miq.) C.DC. var. *pallidum* (C.DC.) Yunk: aspectos botânicos e enfoque físico-químico preliminar. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.22, n.3, p.209-16, 2003.

POWELL, R.; REID, T.; Project tick control. **Queensland Agricultura Journal**, v.108, n.6, p.279-300, 1982.

PRATES, H.T.; SANTOS, J.P. **Óleos essenciais no controle de pragas de grãos armazenados**, p.443-461. In: Lorini, I.; Miike, L.H.; Senssel, V.M. (eds.), Armazenagem de grãos. Campinas, Instituto Bio Geneziz, 1000p. 2002.

PREVIERO, C.A.; JÚNIOR-LIMA, B.C.; FLORENCIO, L.K.; SANTOS, D.L. **Receita de plantas com propriedades inseticidas no controle de pragas**. CEULP/ULBRA. Palmas, 32p., 2010.

RAJENDRAN, S.; SRIRANJINI, V. Plant products as fumigants for stored-product insect control. **Journal of Stored Products Research**, v.44, p.126-135, 2008.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F., EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 7.Ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2011, 830p.

REDDY, S.V.; SRINIVAS, P.V.; PRAVEEN, B.; KISHORE, K.H.; RAJU, B.C.; MURTHY, U.S.; RAO, J.M. Antibacterial constituents from the berries of *Piper nigrum*. **Phytomedicine**, v.11, p.697–700, 2004.

REGNAULT-ROGER, C.; PHILOGÈNE, B. J. R. Past and current prospects for the use of botanicals and plant allelochemicals in integrated pest management. **Pharmaceutical Biology**, v.46, n.01, p.41-52, 2008.

RIBEIRO, V.L.S.; SANTOS, J.C.; MARTINS, J.R.S.; SCHRIPSEMA, J.; SIQUEIRA, I. R.; POSER, G.L.; APEL, M.A. Acaricidal properties of the essential oil and precocene II obtained from *Caleaserrata* (Asteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.189, n.1, p.195-198, 2011.

RIBEIRO, V.; VANZELLA, C.; MOYSÉS, F. S.; SANTOS, J. C.; MARTINS, J. R. S.; POSER, G. L.; SIQUEIRA, I. R. Effect of *Caleaserrata* Less. *n*-hexane extract on acetylcholinesterase of larvae ticks and brain Wistar rats. **Veterinary Parasitology**, v. 189, n. 2, p. 322-326, 2011.

RIZZINI, C.T.; MORS, W.B. **Botânica Econômica Brasileira**. 2º Ed. Âmbito Cultural. Rio de Janeiro. RJ, 1995.

RODRIGUES, R.V. **Estudo fitoquímico dos frutos de *Piper tuberculatum* (Jacq.) e avaliação da atividade antinocicepiva dos extratos e constituintes isolados**. 2009. 137f. Tese (Doutorado – Biologia Experimental). Universidade Federal de Rondônia, 2009.

RODRIGUES D.S.; LEITE, R.C.; GRISE, L.; MARTINS, J.R.; ANDREOTTI, R.; BARROS, A.T.M. Estimativa de perda financeira decorrentes do parasitismo por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* para o estado de Minas Gerais, Brasil. Saúde e Produção de Ruminantes e equídeos. 211p. 2015. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/96177/1/Rodrigues-et-al-2013-P-211-X-Conbravet.pdf>>

RODRÍGUEZ, H.C.; VENDRAMIM, J.D. Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae em *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Manejo Integrado de Plagas**, v.42, p.14-22, 1996.

ROEL, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. **Revisa Internacional de Desenvolvimento Local**, v.1, n.2, p.43-50, 2001.

ROSSEL, G.; QUERO, C.; COLL, J.; GUERREIRO, A. Biorational insecticides in pest management, **Journal of Pest Science**, v.33, n.02, p.103-121, 2008.

ROVANI, G.T.; SANTOS, V.L P.; OBDÚLIO, G. M. BUDEL, J.M.; CAMPOS, R. INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E ANTIOXIDANTE DE PARTES VEGETATIVAS AÉREAS DE *Piper amalago* L. **Cadernos da Escola de Saúde**, Curitiba, v.2, n.10, p. 164-177, 2014.

SAKLANI, A.; KUTTY, S.K. Plant-derived compounds in chincial trials. **Drug Discovery Today**, v.13, n.3, p.161-171, 2008.

SANTANA, H.T. **Estudo fitoquímico de *Piper alatabacum* Trel & Yunck, 1950 e avaliação da atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* Linnaus, 19762 (Diptera: Culicidae) em condições de campo simulado**. 2012. 91f. Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Núcleo de Saúde (NUSAU), Fundação universidade federal de Rondônia, Porto Velho, 2012.

SANTOS, M.R.A.; SILVA, A.G.; LIMA, R.A.; LIMA, D.K.S.; SALLET, L.A.P.; TEIXEIRA, C.A.D.; POLLI, A.R.; FACUNDO, V.A. Atividade inseticida do extrato das folhas de *Piper hispidum* (Piperaceae) sobre a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*). **Revista Brasileira de Botânica**, v.33, n.2, p.319-324, 2010.

SANTOS, L.B.; SOUZA, J.K.; PAPASSONI, B.; BORGES, D.G.L.; JUNIOR, G.A.D.; SOUZA, J.M.E.; CAROLLO, C.A.; BORGES, F.A. Efficacy of extracts from plants of the Brazilian Pantanal against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 532-538, 2013.

SANTOS, T.R.B.; AGUIAR, C.L.G.; PRESTES, L.; DANELUZ, M.O.; ALVES, B.F.; TORRES, M.I.T. Avaliação da eficácia de produtos isoterápicos no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, **Arquivos do Instituto Biológico**, v.8, p.1-5, 2015.

SARNAGLIA-JUNIOR, V. B. **Diversidade de *Peperomia* Ruiz&Pav. em Santa Teresa, ES – Brasil**. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro Escola Nacional de Botânica Tropical Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* Rio de Janeiro, 2012.

SAUERESSIG, T.M. **Estudo da fase não parasitária do carrapato de bovinos em pastagens cultivadas e nativa no Distrito Federal**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 1994. 15p. (Boletim de Pesquisa, 37).

SCOTT, I.M.; PUNIANI, E.; DURST, T.; PHELPS, D.; MERALI, S. ASSABGUI, R.A.; SANCHES-VINDAS, P.; POVEDA, L.; PHILOGÈNE, B.J.R.; ARNASON, J.T. Insecticidal activity of *Piper tuberculatum* Jacq. extracts: synergistic interaction of piperamides. **Agricultural and Forest Entomology**, v.4, p.137–144, 2002.

SCOTT, I. M.; JENSEN, H.; SCOTT, J.G.; ISMAN, M.B.; ARNASON, J.T.; PHILOGÈNE, B.J.R. Botanical insecticides for controlling agricultural pests: piperamides and the colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.54, p.212-225, 2003.

SCOTT, I.M.; PUNIANI, E.; JENSEN, H.; LIVESEY, J.F.; POVEDA, L.; SANCHEZ-VINDAS, P.; DURST, T.; ARNASON, J.T. Analysis of Piperaceae germplasm by HPLC and LCMS: a method for isolating and identifying unsaturated amides from *Piper* spp. extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n.6, p.1907-1913, 2005.

SCOTT, I.M.; PUNIANI, E.; DURST, T.; PHELPS, D.; MERALI, S.; ASSABGUI, R.A.; SÁNCHEZ-VINDAS, P.; POVEDA, L.; PHILOGÈNE, B.J.R.; ARNASON, J.T. Insecticidal activity of *Piper tuberculatum* Jacq. Extracts: synergistic interaction of piperamides. **Agricultural and Forest Entomology**, v.4, p.137-144, 2008.

SHAAYA, E.; KOSTJUKOVSKI, M.; EILBERG, J.; SUKPRAKARN, C. Plant oils as fumigants and contact insecticides for the control of stored-product insects. **Journal of Stored Products Research**, v.33, p.7-15, 1997.

SHAPIRO, J.P. Phytochemicals at the plant-insect interface. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.17, p.191-200, 1991.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC/Editora da UFRGS, p. 403-434, 2007.

SILVA, P.H.S.; CASTRO, M.J.P. Avaliação do extrato aquoso de frutos da pimenta-damacaco *Piper tuberculatum* Jacq. na mortalidade e biologia de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NATURAIS, 3., 2006, Belém. **Anais...** Belém: Embrapa Amazônia Oriental: SEBRAE, 2006. p. 18.

SILVA-FILHO, M.L.; SILVA, L.B.; FERNANDES, R.M.; LOPES, G.S. Efeito do extrato aquoso e etanólico do angico preto sobre larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.3, p.637-644, 2013.

SILVA, R. A. **Análise metabolômica e atividade biológica de *Piper reticulatum* L.** 2011. p.149. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2011.

SILVA, P.H.S.; CARVALHO, D.P.; BARRETO, A.L.H.; CASTRO, M.J.P. **Eficiência de doses do óleo essencial de *Piper tuberculatum* JACQ sobre adultos do pulgão-preto-do-feijão-caupi *Aphis craccivora* KOCH.** III CONAC. Congresso Nacional de feijão-caupi. 22 a 24 de abril, Recife, 2013.

SILVA, P.H.S. ; CASTRO, M.J. P. ; BARRETO, A.L.H. **Toxicidade do óleo essencial de *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae) sobre adultos de *Cerotoma arcuatus* (Oliv.) (Coleoptera: Chrysomelidae).** Apresentação de Trabalho/Congresso. 2011.

SILVA, R.A. **Análise metabolômica e atividade biológica de *Piper reticulatum* L.** Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2011. p.149.

SILVA, R.V.; NAVICKIENE, H.M.D.; KATO, M.J.; BOLZANI, V.S.; MÉDIA, C.I.; YOUNG, M.C.M.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v.59, n.5, p.521–527, 2002.

SILVEIRA, W.H.; CARVALHO, G.D.; PECONICK, A.P. Medidas de controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*: uma breve revisão. **PUBVET, Publicações em medicina veterinária e zootecnia**, v.8, n.10, Ed. 259, 2014.

SOUSA, E.P.S. **Bioatividade do óleo essencial de *Piper tuberculatum* (Jacq.) sobre o percevejo-vermelho-do-caupi *Crinocerus sanctus* (Fabr.) (Hemiptera: Coreidae).** Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

SOUSA, L.A.D.; SOARES, S.F.; PIRES, H.B.; FERRI, P.H.; BORGRS, L.M.F. Avaliação da eficácia de extratos oleosos de frutos verdes e maduros de cinamomo

(*Melia azedarach*) sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, n.1, p.36-40, 2008.

SPAGNOL, F.H.; PARANHOS, E.B.; ALBUQUERQUE, G.R. Avaliação *in vitro* da ação sobre o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, Canestrini, 1887 (Acari: Ixodidae) de bovinos leiteiros no município de Itamaraju, Bahia, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.3, p.731-736, 2010.

SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS (SUCEN). **Documentos técnicos**. Mai. 2004. Disponível em: <<http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/index.htm>>. Acesso em: 21 fev. 2017.

TAWAN, C.S.; IPOR, I.B.; FASHIHUDDIN, B. A.; SANI, H. A brief account on the wild Piper (Piperaceae) of the Crocker Range, Sabah. **ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation (ARBEC)**, v.11, 2002.

TIRILLINI, B.; VELASQUEZ, E.R.; PELLEGRINO, R.; Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Piper angustifolium*. **Plantas e ervas Mediciniais**, v.62, p.372–373, 1996.

TOGNOLI, L.; CREPALDI, N.; MEDEIROS, F. *Haematobia irritans*: Revisão Literária. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Ed. FAEF, Garça/SP, N. 12, 2009.

TRINDADE, F.T.T.; SILVA, A.A. **Avaliação da atividade larvicida dos extratos de *Piper tuberculatum* JACQ. e *Piper alatabaccum* TREL & YUNCKER sobre as larvas de *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae)**. Anais do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC2008/2009, 2008, Porto Velho, Rondônia. Porto Velho, 2008.

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

VALÉRIO, J.R.; GUIMARÃES, J.G. Sobre a ocorrência de uma nova praga, *Haematobia irritans* (L.)(Diptera: Muscidae), no Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.4, p.417-418, 1983.

VENDRAMIM, J.D. Plantas inseticidas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., 1996, Salvador. **Resumos...** Salvador: SEB; Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMF, 1996. p. 10.

VENDRAMIM, J.D. Uso de plantas inseticidas no controle de pragas. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE AGRICULTURA ORGÂNICA, 2, 1997, Campinas. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1997, p. 64-69.

VENDRAMIM, J. D.; CASTIGLIONI, E. Aleloquímicos, resistência de plantas e plantas inseticidas, p.113-128. In J.C. Guedes, I.D. da Costa & E. Castiglioni, Bases

e técnicas do manejo de insetos, cap. 8. Santa Maria, UFSM/CCR/DFS, Palloti, 248p. 2000.

YAMAGUCHI, L.F. Antioxidant activity of prenylated hydroquinone and benzoic acid derivatives from *Piper crassinervium* Kunth. **Phytochemistry**, v.67, p.1838-1843. 2006.

Obras consultadas

AKOB, C.A.; EWETE, F.K. The efficacy of ashes of four locally used plant materials against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) in Cameroon. **International Journal of Tropical Insect Science**. 27: 21-26. 2007.

BARKER S.C.; MURRELL, A. Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. *Experimental and Applied Acarology* 28: 55-68. 2002.

BARROSO, G.M. **Sistemática das angiospermas do Brasil**. Viçosa, MG: Imprensa da Universidade Federal de Viçosa, v.2, 321p., 1991.

BENHALIMA, H.; CHAUDHRY, M.Q.; MILLS, K.A.; PRICE, N.R. Phosphine resistance in stored-product insects collected from various grain storage facilities in Marocco. **Journal of Stored Products Research**, v.40, p.241-249, 2004.

BUZATTI, A.; KRAWCZAK, F.S.; PIVOTO, F.L.; VOGEL, F.S.F.; BOTTON, S.A.; ZANETTI, G.D.; MANFRON, M.P.; SANGIONI, L.A. Atividade acaricida *in vitro* de *Glechon spathulata* Benth. Sobre telógenas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ciências Rual**, v. 41, n. 10, p. 1813-1817, 2011.

CASTRO-JANER, E.; MARTINS, J.R.; MENDES, M.C.; NAMINDOME, A.; KLAFKE, G.M.; SCHUMAKER, T.T.S. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* using *in vitro* larval bioassays. **Veterinary Parasitology**, v. 173, p. 300-306, 2010.

CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH (CFSPH). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. 2007. Disponível em: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/boophilus_microplus.pdf> Acesso em: 19 MAIO. 2015.

CHOOCHOTE, W.; CHAITHONG, U.; KAMSUK, K.; RATTANACHANPICHAI, E.; TIPPAWANGKOSOL, P.; CHAMPAKAEW, D.; TUETUN, B.; PITASAWAT, B. Adulticidal activity against *Stegomyia aegypti* of three *Piper* spp. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, n.1, p.33-37, 2006.

ESTRELA, J.L.V.; FAZOLIN, M.; CATANI, V.; ALÉCIO, M.R.; LIMA, M.S. Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 217-222. 2006.

FELIPE, C.B.; FILHO, T.S.; TRAJANO, S.F.J.; OLIVEIRA, S.L.E.; ALEXANDRE, S.J.; ESDRAS, A.U.; ROCHA, S.E.; DEUSDENIA, L.P.O.; BARROS, V.G.S.

Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mic. **Phytomedici**, v. 14, p. 605-612, 2007.

FERRAZ, A.B.F.; BALBINO, J.M.; ZINI, C.A.; RIBEIRO, V.L.; BORDIGNON, S.A.; VON POSER, G. Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three *Piper* species. **Parasitol. Res**, v.10, p.243–248, 2010.

FIELDS, P.G. Effect of *Pisum sativum* fractions on the mortality and progeny production of nine stored-grain beetles. **Journal of Stored Products Research**, v. 42, p. 86-96. 2006.

HIGA, L.O.S.; GARCIA, M.V.; BARROS, J.C.; BARROS, J.C.; KOLLER, W.W.; ANDREOTTI, R. Avaliação da restência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) a diferentes formulações acaricidas utilizando amostras de propriedades brasileiras. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 25, n. 2, p. 163-171, 2016.

ISMAN, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Ann. Revist Entomology**, v. 51, p. 45-66. 2006.

KABEH, J.D.; JALINGO, M.G.D.S.S. Pesticidal effect of bitter leaf plant *Vernonia amygdalina* (Compositae) leaves and pirimiphos-methyl on larvae of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Institute Journal Agriculture Biologic**, v. 9, p. 452-454. 2007.

KLAFKE, G.M. **Diagnóstico e mecanismos de resistência à ivermectina em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)**. 2001. 176f. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro_ - Instituto de Ciências BioMédicas, Universidade de São Paula, São Paulo, 2011.

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

LIMA, R.K.; CARDOSO, M.G.; MORAES, J.C.; MELO, B.A.; RODRIGUES, V.G.; GUIMARÃES, P.L. Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum*C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Acta Amazonica**. v. 39, n. 2, p. 377 – 382, 2007.

MABBERLEY, D. **The plant-book**: a portable dictionary of the vascular plants. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. 858 p.

MARTINS, J.R.; FURLONG, J. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. **Veterinary Record**, v.149, n.2, 64p., 2001.

MINISTERIO DA AGRICULTURA. **Preconização para registro de acaricidas**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 28/06/2017.

MUSETTI, L. Avaliação de efeitos de extratos de *Piper nigrum* L. sobre adultos de *Sitophilus zeamais* Mots., 1855 (Coleoptera, Curculionidae). 1991. 79 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1991.

NAVICKIENE, H.M.D.; MORANDIM, A.A.; ALÉCIO, A.C.; REGASINI, L.O.; BERGAMO, D.C.B.; TELASCREA, M.; CAVALHEIRO, A.J.; LOPES, M.N.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; MARQUES, M.O.M.; YOUNG, M.C.M.; KATO, M.J. Composition and Antifungal Activity of Essential Oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Quimica Nova**, v.29, p.467-470, 2006.

NORTON, R.A.; DOWD, P.F. Effect of 8teryl cinnamic acid derivatives from corn bran on *Aspergillus flavus*, corn earworm larvae, and driedfruit beetle larvae and adults. **J Agric Food Chem**, v.44, p.2412-2416, 1996.

PARK, I.K. Insecticidal activity of isobutylamides derived from *Piper nigrum* against adult of two mosquito species, *Culex pipiens pallens* and *Aedes aegypti*. **Nat Prod Res**, v.26, p.2129–31, 2012.

PEREIRA, A.C.R.L.; OLIVEIRA, J.V.; GONDIM JUNIOR, M.G.C.; CÂMARA, C.A.G. Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.3, p.717-724, 2008.

PEREIRA, A.C.L. Utilização de óleos essenciais e fixos no controle de *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em Caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. armazenado. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Entomologia Agrícola, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil. 2006.

PERON, F., FERREIRA, G.C.A. Potencial inseticida de extrato de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.) no controle da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*). *Anais... VI Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica*, 2012.

PIRES, J.E.P. **Efeito dos extratos aquoso e etanólico de planta *Simarouba versicolor* St. Hill “in vitro” sobre larvas e teleóginas de carrapatos *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 e *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806.** 2006. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí. Teresina: 2006.

POHLIT, A.M.; QUIGNARD, E.L.J.; NUNOMURA, S.M.; TADEI, W.P.; HIDALGO, A. F.; PINTO, A.C.S.; SANTOS, E.V.M.; MORAIS, S.K.R.; SARAIVA, R.C.G.; MING, L.C.; ALECRIM, A.M.; FERRAZ, A.B.; PEDROSO, A.C.S.; DINIZ, E.V.; FINNEY, E.K.; GOMES, E.O.; DIAS, H.B.; SOUZA, K.S.; OLIVEIRA, L.C. P.; DON, L.C.; QUEIROZ, M.M.A.; HENRIQUE, M.C.; SANTOS, M.; LACERDA JÚNIOR, O.S.; PINTO, P.S.; SILVA, S.G.; GRAÇA, Y.R. Screening of plants found in the State of Amazonas, Brazil for larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae. **Acta amazônica**, v.34, n.1, p.97-105, 2004.

POLLI, A.R. **Estudo Fitoquímico Efarmacológico das Raízes de *Piper hispidum*sw (Piperaceae).** 2007, 114f. Dissertação (Mestrado em Biologia

Experimental) Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental – Universidade Federal de Rondônia. Poto Velho: 2007.

PREVIERO, C.A. **Receita de plantas com propriedades inseticidas no controle de pragas**. CEULP/ULBRA . Palmas, 2010.

SANTOS, T.R.B.; FARIAS, N.A.R.; CUNHAS, N.A.; PAPPEN, F.G.; VAZ, I.S. Abordagem sobre o controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 29, p. 65-70, 2009.

SEYMOR, P.H. Princípios ativos botânicos na luta contra os insetos. **Rev. Ecologia e Saúde**, v.3, n.1, p.25-29, 2007.

SILVA, W.C.; RIBEIRO, J.D.; SOUZA, H.E.M.; CORRÊA, R.S. Atividade inseticida de *Piper aducum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera: Aetalionidae), pragas de importância econômica no Amazonas. **Acta Amazonia**, v.37, n.2, p.293-298. 2007.

SOUZA, A.C.C.; SILVA, A.P.; ROMIO, E.E.M.; TRAVEÇOLO, R.W.; SANTANA, S.R.; NUNES, R.O. Estudo potencial econômico de *Piper nigrum* L. (Piperaceae). **Revista Científica Facimed**, Cacoal. Disponível em: <<http://www.facimed.edu.br/o/revista/pdfs/c817fa184dc5467cc7ccd2066e25651d.pdf>>. Acesso em: 05 de jun de 2017.

TOZONI-REIS, M.F.C. **A pesquisa e a produção de conhecimentos**. In: PINHO, S. Z. (Org.). Cadernos de Formação: Formação de Professores. Educação, Cultura e Desenvolvimento. Volume 3. São Paulo: Cultura Acadêmica.v. 3, p. 111-148, 2010. VIEIRA, P.C.; MAFEZOLI, J.; BIAVATTI, M.W. Inseticidas de origem vegetal, p.105-120. In: CORRÊA, A.G.; VIEIRA, P.C. (eds.), **Produtos naturais no controle de insetos**. São Carlos, EdUFSCar, 150p. 2007.

VASCONCELOS, J.N.C.; CARDOSO, N.S.N.; OLIVEIRA, L.M.; SANTANA, J. R.F.; FERNANDEZ, L.G.; BELLO KOBLITZ, M.G.; SILVA, M.L.C. Indução, caracterização bioquímica e ultra-estrutural de calos de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Revista Brasileira de Planas Mediciniais**, v.14, n.4, p.592-597, 2012.

VIEIRA, C.P.; FERNANDES, B.J. Plantas inseticidas. In: SIMÕES, C.M. et al. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 43 1999. p. 739-753.

WARRC. **Manual de instruções, diagnóstico de resistência a carrapaticidas**. New York: Centro Mundial de Referência para a Resistência a Acaricidas, Organização Mundial para Alimentos e Agricultura (FAO), 1997. 650p.

WILLIAMS, R.E. Controle químico, prejuízos econômicos e estratégias de controle. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MOSCA DOS CHIFRES (*Haematobia irritans*), 1. , 1991. **Anais...**São Paulo: USP, 1991.

WIESBROOK, M.L. Natural indeed: Are Natural insecticides safer and better than conventional insecticides? **IllinoisPesticideReview**, Urbana, v. 17, n. 3, 2004.

ANEXO

Atividade pesticida de extratos de *Piper tuberculatum* Jacq sobre *Haematobia irritans* L.

Andrina Guimarães Silva Braga¹, Fábio da Silva Barbieri², Luciana Gatto Brito², Caroline Oliveira Celestino³, Tiego Santos Costa⁴, Valdir Alves Facundo⁵

1. Bióloga (Faculdade São Lucas). Doutoranda em Biodiversidade e Biotecnologia (Universidade Federal do Amazonas, Brasil).

2. Médico(a) Veterinário(a) e Doutor(a) em Ciências Veterinárias (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro). Pesquisador da Embrapa Rondônia, Brasil.

3. Bióloga (Faculdades Integradas Aparício Carvalho, Brasil).

4. Agrônomo (Faculdade Interamericana de Porto Velho). Técnico da Embrapa Rondônia, Brasil.

5. Químico Industrial e Doutor em Química (Universidade Federal do Ceará). Professor da Universidade Federal de Rondônia.

*Autor para correspondência: andrinagsilva@gmail.com

RESUMO

A busca por alternativas aos produtos químicos no controle de artrópodes, de uso agrícola e pecuário, têm se intensificado nos últimos anos. Dentre as plantas em que os extratos apresentam potencial inseticida está a *Piper tuberculatum*, conhecida popularmente como pimenta de macaco. *Haematobia irritans* (mosca-dos-chifres), ectoparasita de rebanho bovinos, encontra-se distribuído em todos os estados brasileiros e causa prejuízos estimados em US\$ 865 milhões anuais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade pesticida de diferentes extratos de folha, frutos e talos de *P. tuberculatum*, em adultos de *H. irritans*. Espécimes da mosca-dos-chifres foram capturados diretamente sobre os animais infestados com auxílio de rede entomológica e transferidos para os kits de placas a qual possuíam orifício no meio. Utilizou-se o método do papel filtro impregnado, onde foram realizadas diluições de 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25 e 50 mg/mL de cada extrato, todos em triplicada. Os controles utilizados foram etanol (controle negativo) e cipermerina em grau técnico (controle positivo) na concentração de 409,5 mg/mL também em triplicada. Em cada placa de Petri foram colocadas cerca de 15 espécimes. A leitura foi realizada duas horas após o início do teste. Moscas com incapacidade de voar foram consideradas mortas. Para a análise de eficácia inseticida dos extratos foi obtido a concentração letal (CL) feita através do teste de PROBIT. Os extratos que não apresentaram valores de mortalidade não foram analisados. Os extratos de *P. tuberculatum* que apresentaram atividade inseticida promissora para o controle da mosca-dos-chifres foram os extratos etanólico de folhas (61.14mg/mL), etanólico de talos (6.00 mg/mL), hexânico de frutos (136.88 mg/mL), acetato de etila de talos (1.03 mg/mL). *P. tuberculatum* apresentou resultados promissores e uma investigação mais detalhada deverá ser realizada para avaliar sua aplicação no futuro.

Palavras-chave: *Haematobia irritans*, *Piper tuberculatum*, controle de ectoparasitas.

Pesticide activity of extracts of *Piper tuberculatum* Jacq on *Haematobia irritans* L.

ABSTRACT

The search for alternatives to chemicals in the control of agricultural and veterinary arthropods has intensified in recent years. Among the plants in which the extracts present insecticidal potential are *Piper tuberculatum*, popularly known as monkey pepper. *Haematobia irritans* (horn fly) ectoparasite of Brazilian cattle raising, causing losses estimated at U \$ 865 million per year. The objective of this work was to evaluate the pesticidal activity of different leaf extracts, fruits and stems of *P. tuberculatum* in adults of *H. irritans*. Horn flies were collected directly on infested animals with the aid of an entomological network and transferred to the kits of plates which had holes in the middle. The impregnated filter paper method was used, where the dilutions were 1.56; 3.12; 6.25; 12.5; 25 and 50 mg/mL of each extract, all were evaluated in triplicate. The controls used were ethanol and Cipermerina in technical grade at the concentration of 409.5 mg/mL also in triplicate. About 15 specimens were placed in each Petri dish. The reading was performed two hours after the start of the test. Flies with inability to fly were considered dead. For the analysis of the insecticidal efficacy of the vegetal extracts, a lethal concentration (LC) was obtained through the PROBIT test. The extracts that did not present mortality values were not analyzed. The extracts that presented promising insecticidal activity for hornfly control were the ethanol extracts of leaves of *P. tuberculatum* (61.14 mg/mL), ethanol extracts of stems of *P. tuberculatum* (6.00 mg/mL), hexane extracts of *P. tuberculatum* fruits (136.88 mg/mL), ethyl acetate extracts of *P. tuberculatum* stems (1.03 mg/mL). *P. tuberculatum* presented promising results and a more detailed investigation should be carried out to evaluate its application in the future.

Keywords: *Haematobia irritans*; *Piper tuberculatum*; pest control.

Introdução

A flora brasileira apresenta uma das maiores biodiversidades do planeta, podendo ser considerada como uma fonte de fármacos. Não só na região amazônica, onde a extensão geográfica já propicia uma ideia do seu poder de diversidade, mas também em outras regiões brasileiras (ABIFISA, 2006).

A busca por alternativas aos produtos químicos no controle de artrópodes agrícolas e veterinários têm se intensificado nos últimos anos. O uso de extratos vegetais nativos e seus produtos estão entre os temas emergentes de artigos publicados em todo o mundo e oferecem uma promessa de desenvolvimento de novas estruturas moleculares de constituintes naturais (BATISTA et al., 2013).

Tais fatores incentivaram a busca por outras formas de

controle, mais incisivamente a partir da década de 90. Dentre essas, o uso de fitoterápicos, destaca-se devido à grande biodiversidade espécies existentes, baixo custo e fácil disponibilidade na propriedade (FERNANDES; BRAGA, 2014).

Entre as plantas em que os extratos apresentam potencial inseticida estão às espécies pertencentes à família Piperaceae, especialmente as espécies pertencentes ao gênero *Piper*, considerada de maior importância, tanto do ponto de vista científico quanto econômico (FAZOLIN et al., 2007). Estas plantas acumulam metabólitos secundários, entre os quais as amidas (piperamidas) e diversos compostos aromáticos são os mais encontrados, além desses relatam-se a ocorrência de terpenos, flavonóides e outras classes de compostos (SCOTT et al., 2008). A espécie *Piper tuberculatum* Jacq., conhecida

popularmente como pimenta de macaco ou pimenta d'arda, é utilizada na medicina popular tanto como sedativo como antídoto para mordidas de cobras, destaca-se a pipartina uma alcaloide encontrada em várias espécies de piperáceas (BEZERRA, 2008). Esta substância apresentou diversas atividades biológicas, incluída atividade citotóxica e antitumoral (DUH; WU, 1990; KONG, 2008).

As parasitoses dos animais determinam um significativo entrave à pecuária nacional, pois causam redução na produtividade, mortalidade de animais e aumento dos custos de produção, além de gastos com as tentativas de controle (GRISI et al. 2002, BIANCHIN et al. 2006). A mosca-dos-chifres, *Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae), considerado um importante ectoparasito da pecuária bovina brasileira, causando prejuízos estimados em U\$ 865 milhões anuais (GRISI et al., 2002).

O controle destes ectoparasitos baseia-se primordialmente na aplicação de ectoparasiticidas comerciais. O uso indiscriminado de tais produtos, juntamente com práticas inadequadas para o combate dos parasitos e a falta de especificidade dos ectoparasiticidas, tem colaborado para a rápida seleção de populações resistentes (SANTOS JUNIOR et al., 2000, SAUERESSIG; BARROS, 2003, RODRIGUES et al., 2004, OLIVEIRA et al., 2006, BARROS et al., 2007, SANTOS et al., 2009, MENDES et al., 2011; DOMINGUES et al., 2012).

O conhecimento de plantas pesticidas vem despertando a atenção e interesse por parte de pesquisadores pela potencial ação parasiticida, que poderá subsidiar a síntese de novas moléculas para o controle das infestações por *H. irritans*.

Atualmente, as pesquisas conduzidas com os óleos essenciais e extratos vegetais ampliaram as series de ações biológicas para o controle de pragas e doenças. Considerando a necessidade da prospecção de novas substâncias vegetais que possuam atividade biocida e que possam ser utilizadas no controle de pragas, este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade pesticida de diferentes extratos etanólicos de folha, frutos e talos de *P. tuberculatum* em adultos de *H. irritans*.

Material e Métodos

Os bioensaios *in vitro* foram conduzidos na Embrapa Rondônia, localizada no município de Porto Velho, estado de Rondônia, no período de outubro 2015 e março de 2016.

Origem e obtenção dos extratos

A coleta de *Piper tuberculatum* (PT) foi realizada em Porto Velho-RO. A identificação foi realizada pela confecção de exsicata e o envio desta ao Herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), onde se encontra sob o número 211724. Logo após a coleta, talos, folhas e frutos foram pesados e em seguida secos em estufa a 50^o C por 72 horas. A extração foi realizada a partir do material devidamente seco e triturado, colocados em Erlenmeyer contendo dois litros de solvente, por sete dias, em três repetições. Para a produção dos extratos foram utilizados cinco solventes em sequência de polaridade sendo eles, hexano (He) P.A. 100%, clorofórmio (Cl) P.A. 100%, acetato de etila (Ac) P.A. 100% e etanol (Et) 99,5%. Após a adição do solvente, a solução permaneceu em repouso por sete dias, sendo então submetida à evaporação em evaporador rotatório FISATOM, onde foi obtido o extrato do solvente da parte da planta e o material residual, o qual foi adicionado o solvente subsequente, reiniciando o processo de

repouso da solução (MATOS, 1997)

Os extratos de talo, folhas e frutos de *P. tuberculatum* foram diluídos em etanol utilizado para impregnar o papel filtro e proporção planta/solvente de 1/10 (m/v). Os extratos foram pesados e diluídos, com auxílio de ultrassom e agitador vortex para maximizar solubilização do extrato, obtendo-se as concentrações finais de 1,56 mg/mL, 3,12 mg/mL, 6,25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 25 mg/mL e 50 mg/mL, na proporção 6:3:1.

Bioensaio do papel filtro impregnado

Os bioensaios *in vitro* foram realizados no Campo experimental de Porto Velho (CEPV) da Embrapa Rondônia através da técnica de papel filtro impregnado de acordo com a metodologia proposta por Sheppard; Hinkle (1987) e adaptada por Barros et al. (2002), onde discos de papel filtro com 9 cm de diâmetro foram impregnados com as soluções dos extratos diluídas em etanol. Foi utilizado 1ml de cada extrato/concentração, em triplicata. Após a secagem do papel filtro, foram colocados em placas de Petri descartáveis para a montagem dos kits.

As mosca-dos-chifres foram capturadas diretamente sobre bovinos naturalmente infestados com auxílio de uma rede entomológica e transferidas para os kits. Foram colocados cerca de 15 espécimes em cada placa, as quais foram encaminhadas para o Laboratório de sanidade animal da Embrapa Rondônia. A leitura foi realizada duas horas após o início do teste, onde foram contabilizados moscas vivas e mortas. As moscas com incapacidade de voar foram consideradas mortas.

A partir destes dados, foram calculadas as porcentagens de mortalidade, e analisados com o programa Probit com auxílio do programa BioStat 2009 Professional 5.8.4., para o cálculo da concentração letal (CL₅₀).

Resultados e Discussão

A avaliação *in vitro* da susceptibilidade das populações da mosca-dos-chifres foi efetuada realizando leitura dos testes com duas horas de exposição aos papéis filtro impregnado com os extratos nos kits. Os resultados obtidos com os extratos avaliados de *P. tuberculatum*, com relação a CL₅₀ na leitura de duas horas, para cada um dos materiais testados estão na Tabelas 1. O extrato de *P. tuberculatum* que apresentou atividade inseticida promissora para o controle da mosca-dos-chifres foi o extrato etanólico de talo (PTTEt) com CL₅₀ de 6.00 mg/mL, enquanto que os outros extratos obtiveram CL₅₀ de 61.14mg/mL, 136.88 mg/mL e 1.03 mg/mL para os extratos etanólico de folha (PTFEt), hexânico de fruto (PTFrHe) e acetato de etila de talo (PTTAc), respectivamente. Para os extratos com baixa mortalidade não foram calculadas as concentrações letais.

Tabela 1. Toxicidade dos extratos de *P. tuberculatum* para adultos de *H. irritans* (Concentração Letal - CL) Papel Filtro Impregnado calculado pelo programa Probit. / **Table 1.** Toxicity of extracts of *P. tuberculatum* for adults of *H. irritans* (Lethal Concentration - LC) Paper Impregnated Filter calculated by Probit program.

Comparação das CLS dos extratos testados sobre adultos de <i>H. irritans</i>				
Extratos		CL ₅₀	Erro-padrão	Limites (inferior - superior)
Hexânico	Frutos	136.88	80.72	58.40 - 1.309
Acetato de etila	Talos	1.03	13.15	153.22-10.192
Etanólico	Folhas	61.14	24.19	28.69 - 130.29
	Talos	6.00	2.78	1.71 - 20.83

A diversidade da flora brasileira apresenta um imenso potencial para a produção de compostos secundários, que têm sido demandados continuamente pela indústria, nas últimas décadas, devido ao incremento da utilização de produtos naturais na agropecuária (PLETSCH; SANTANA, 1995).

Plantas, como organismos que coevoluem com insetos e outros microrganismos, são fontes naturais de substâncias inseticidas e antimicrobianas, já que as mesmas podem ser produzidas pelo vegetal em resposta a ataques de insetos e microrganismos. O uso de extratos de plantas inseticidas, inclusive os compostos aleloquímicos como os óleos essenciais, eram empregados no controle de insetos antes do advento das substâncias orgânicas sintéticas (REGNAULT-ROGER, 1997).

Carrillo, Molano e López (2011), testaram os extratos de *Brugmansia arborea*, *Bidens pilosa*, *Sambucus nigra*, *Nicotiana tabacum* e *Ambrosia cumanenses*, contra *H. irritans* nas concentrações de 5:10, 2,5:10, 1,25:10, 0,62:10, 0,31:10. Após a pulverização dos extrato nas moscas, eles encontram um aumento da atividade inseticida com *N. tabacum* com uma percentagem mortalidades de 100, 96,6, 80 e 60%, nas respectivas diluições; seguido por *B. arborea* e *S. nigra*. Os extratos que mostrou menos eficácia foram *B. pilosa* e *A. cumanensis*.

Navickiene et al. (2007), testaram extratos orgânicos de sementes, folhas e talos de *P. tuberculatum*, verificaram que esses extratos apresentaram atividade inseticida potencial, mostrando um processo de intoxicação rápido contra *Anticarsia gemmatilis*, causando 80% de mortalidade quando doses maiores que 800 µg inseto⁻¹ foram administradas, sendo o extrato de sementes o mais eficaz.

A pimenta-do-reino *P. nigrum* é conhecida desde 1924 por possuir propriedades inseticidas. A piperina é o principal constituinte dessa pimenta, que demonstrou sobre a mosca-doméstica, *Musca domestica*, uma atividade inseticida maior do que aquela observada para as piretrinas (MIYAKADO et al., 1989).

No Brasil, como em outros países, o maior número de relatos sobre a atividade inseticida de piperáceas tem sido apresentado sobre a espécie *P. nigrum* como o de Musetti (1991) que constatou toxicidade dos extratos acetônico e metanólico de frutos secos de *P. nigrum* para adultos de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae), oferecendo proteção superior a 95% nas concentrações mais elevadas (12,5; 25 e 50%) e provocando efeito fagoinibidor. O extrato acetônico mostrou-se mais eficaz, proporcionando 100% de proteção já na dosagem de 25% e apresentando-se repelente contra os insetos.

A planta de *P. aduncum* é também muito conhecida no Brasil, é nativa da região Amazônica, rica no óleo essencial dilapiol, vem sendo testada com êxito como fungicida, moluscicida, acaricida, bactericida e larvicida (OLIVEIRA NETO et al., 2006).

Uma outra espécie que vem ganhando destaque, sobretudo no Brasil, onde, segundo Fazolin et al. (2006) é abundante em áreas degradadas e de regeneração florestal no estado do Acre, é a pimenta longa *P. hispidinervum*. Ela produz um óleo essencial rico em safrol, componente químico aromático empregado como matéria prima na manufatura de heliotropina, importante fixador de fragrâncias, e butóxido de piperonila, agente sinérgico natural de inseticidas.

Pohlit et al. (2004) realizaram uma triagem com 56 espécies vegetais distribuídas em 28 famílias de plantas encontradas no estado do Amazonas. Foram preparados e testados extratos aquosos, etanólicos e metanólicos contra *Aedes aegypti*. Os extratos metanólicos foram, em geral, os que apresentaram maior atividade larvicida, destacando-se apenas sete espécies vegetais que provocaram 100% de mortalidade nas larvas desse inseto, dentre elas *P. aduncum* (folha e raiz) e *P. tuberculatum* (folha, fruto e talos). É relevante salientar que não foram encontrados na literatura estudos comparativos como o utilizado neste estudo.

Conclusão

A utilização de extratos vegetais para o controle de moscas-chifres pode ser promissora, bem como a produção sustentável sem o uso de agroquímicos. Os extratos que apresentaram atividades pesticidas promissoras para o controle de *H. irritans* foram os extratos etanólicos de folhas e talos, o extrato acetato de étala de talos e extrato hexânico de frutos de *P. tuberculatum*. *P. tuberculatum* apresentou resultados promissores e uma investigação mais detalhada deverá ser realizada para avaliar sua aplicação no futuro bem como a realização de estudos fitoquímicos.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq - 406156 / 2013-1) pelo suporte de financeiro e bolsas de estudo; Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela concessão bolsa de doutoramento; e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa - SEG 02.14.00.004.00.00) pelo suporte financeiro.

Referências Bibliográficas

- ABIFISA (Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico). Uma legislação justa para os produtos de origem natural, 2006. Disponível em: <http://www.abifisa.or.br>. Acesso em: 28 Mar. 2016.
- BATISTA, L. C. S. O.; FLORENCIO, C. N.; CID, Y. P.; MAGALHÃES, V. S.; CHAVES, D. S. A.; COUMENDOUROS, K. Bioprospecção de extratos de jaborandi contra *Ctenocephalides felis felis*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Rhipicephalus microplus*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 35 (Supl.2): p. 113-118, 2013.
- BARROS, A. T. M.; GOMES, A.; KOLLER W. W. 2007. Insecticide susceptibility of horn flies, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae), in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 3, p.145-151, 2007.
- BARROS, A.T.M. Desenvolvimento de *Haematobia irritans* em massas fecais de bovinos mantidas em laboratório. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 217-221, 2002.
- BEZERRA, D.P.; MOURA, D.J.; ROSA, R.M.; VASCONCELLOS, M.C.; SILVA, A.C.R.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S.; HENRIQUES, J.A.P.; Evaluation of the genotoxicity of pipartine, an alkamide of *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian V79 cells. **Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 652, n. 2, p. 164-174, 2008.
- BIANCHINI, I.; KOLLER W.; Detmann E. Sazonalidade de *Haematobia irritans* no Brasil Central. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 26, n. 2, p.79-86, 2006.
- CARRILLO, A.C.; MOLANO, C.E.R.; LÓPEZI, C.O. Efecto insecticida in vitro del extracto etanólico de algunas plantas sobre la mosca adulta *Haematobia irritans*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**; v. 16, n. 3, p. 216-226, 2011.

- COSTA-LOTUFO, L. V.; SAFFI, J. Evaluation of the genotoxicity of piplartine, an alkamide of *Piper tuberculatum*, I yeast and mammalian V79 cells. **Mutation Research**, v. 652, p. 164-174, 2008.
- DOMINGUES, L. N.; BELLO, A. C. P. P.; CUNHA, A. P.; LEITE, P. V. B.; BARROS, A. T. M.; LEITE, R. C. Caracterização do controle de *Haematobia irritans* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 12, p.1246-1252, 2012.
- DUH, C.; WU, Y. Cytotoxic pyridone alkaloids from the leaves of *Piper aborescens*. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 6, p. 1575-1577, 1990.
- FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; CATANI, V.; ALÉCIO, M. R.; LIMA, M. S. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervium* C. DC.; *Piper aduncum* L.; e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebrio molitor* L., 1758. **Ciências Agrotecnologia**, v. 31, n. 1, 2007.
- FERNANDES, T. F. BRAGA, G. M. S. Obtenção de extratos liquênicos do Cerrado Maranhense para avaliação da atividade carrapaticida. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnologia**, v. 8, n. 21, Ed. 270, Art. 1799, 2014.
- GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA BORJA, G.E.; PEREIRA, J.B. 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **Hora Veterinária**, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.
- KONG, E. H.; KIM, Y. J.; KIM, Y. J.; CHO, H. J.; YU, S. N.; KIM, K. Y.; CHANG, J. H.; AHN, S.C. **Oncology Reports**, v. 20, 785p. 2008.
- MATOS, F. J. A. Introdução a Fitoquímica Experimental. Ed. UFC. Fortaleza, 1997.141p.
- MENDES, M. C.; LIMA, C. K. P.; NOGUEIRA, A. H. C.; YOSHIHARA, E.; CHIEBAO, D. P.; GABRIEL, F. H.; UENO, T. E.; NAMINDOME, A.; KLAFKE, G. M. 2011. Resistance to cypermethrin, deltamethrin and chlorpyrifos in populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from small farms of the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 178, n. 4, p. 383-388, 2011.
- MIYAKADO, M.; NAKAIAMA, I.; OHNO, N. Insecticidal unsaturated isobutylamides: From natural products to agrochemical leads. In: ARNASON, J. T.; PHILOGÈNE, B.J.R.; MORAND, P.J. Insecticides of plant origin. New York: **American Chemical Society**, 1989. 418 p.
- MUSETTI, L. **Avaliação de efeitos de extratos de Piper nigrum L. sobre adultos de Sitophilus zeamais Mots., 1855. 79 f. (Coleoptera, Curculionidae)**. 1991. 79 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1991.
- NAVICKIENE, H. M. D.; MIRANDA, J. E.; BORTOLI, S. A.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Toxicity of extracts and isobutyl amides from *Piper tuberculatum*: potent compounds with potential for the control of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. **Pest Management Science**, v. 63, p. 399-403, 2007.
- NAVICKIENE, H. M. D.; MORANDIM, A. A.; ALÉCIO, A. C.; REGASINI, L. O.; BERGAMO, D. C. B.; TELASCREA, M.; CAVALHEIRO, A. J.; LOPES, M. N.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; MARQUES, M. O. M.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Composition and Antifungal Activity of Essential Oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Química Nova**, v. 29, p. 467-470. 2006.
- OLIVEIRA NETO, C. F. et al. Redução do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn submetido a meios de cultura preparado com extrato aquoso de *Piper aduncum* L. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NATURAIS, 3., 2006, Belém. **Anais...** Belém: Embrapa Amazônia Oriental: SEBRAE, 2006. p. 33.
- OLIVEIRA, A. A. A.; AZEVEDO, H. C.; MELO, C. B.; BARROS, A. T. M. 2006. Susceptibilidade da mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) a inseticidas nos tabuleiros costeiros de Alagoas, Bahia e Sergipe, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 2, p. 65-70, 2006.
- PLETSCH, M.; SANT'ANA, A. E. G. Secondary compound accumulation in plants: the application of plant biotechnology to plant improvement. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CHEMISTRY OF THE AMAZON, 2., 1995, Manaus. **Anais...** Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 1995. v. 5, p. 51-64.
- PHOLIT, A. M.; QUIGNARD, E. L. J.; NUNOMURA, S. M.; TADEI, W. P.; HIDALGO, A. F.; PINTO, A. C. S.; SANTOS, E. V. M.; MORAIS, S. K. R.; SARAIVA, R. C. G.; MING, L. C.; ALECRIMM, A. M.; FERRAZ, A. B.; PEDROSO, A. C. S.; DINIZ, E. V.; FINNEY, E. K.; GOMES, E. O.; DIAS, H. B.; SOUZA, K. S.; OLIVEIRA, L. C. P.; DON, L. C.; QUEIROZ, M. M. A.; HENRIQUE, M. C.; SANTOS, M.; LACERDA JÚNIOR, O. S.; PINTO, P. S.; SILVA, S. G.; GRAÇA, Y. R. 2004. Screening of plants found in the state of Amazonas, Brasil for larvicidal against *Aedes aegypti* larvae. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 1, p. 97-105, 2004.
- REGNAULT-ROGER, C. The potential of botanical essential oils for insects pest control. **Integrated Pest Management Reviews**, v. 2, p. 25-34, 1997.
- RODRIGUES, S. R.; SANCHES, C. S.; FIALHO, E. M. L. M.; ISMAEL, A. P. K.; BARROS, A. T. M. 2004. Comercialização e uso de produtos inseticidas para controle da mosca-dos-chifres em Aquidauana, MS. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. 32, Embrapa Pantanal, Corumbá. 23p.
- SANTOS, T. R. B.; FARIAS, N. A. R.; CUNHA FILHO, N. A.; PAPPEN, F. G.; VAZ JUNIOR, I. S. 2009. Abordagem sobre o controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 65- 70, 2009.
- SCOTT, I. M.; PUNIANI, E.; DURST, T.; PHELPS, D.; MERALI, S.; ASSABGUI, R. A.; SÁNCHEZ-VINDAS, P.; POVEDA, L.; PHILOGÈNE, B. J. R.; ARNASON, J. T. Insecticidal activity of *Piper tuberculatum* Jacq. Extracts: synergistic interaction of piperamides. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 4, p. 137-144, 2008.
- SANTOS JÚNIOR, J. C. B.; FURLONG, J.; DAEMON, E. 2000. Controle do carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) em sistemas de produção de leite da Microrregião Fisiográfica Fluminense do Grande Rio, Rio de Janeiro. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 305-311, 2000.
- SAUERESSIG, T. M.; BARROS, A. T. M. 2003. Diagnóstico da susceptibilidade de populações de mosca-dos-chifres a inseticidas em Goiás, Tocantins e Distrito Federal. **Bolm Pesq. Desenvolv.** 82. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF. 16p.

Tick *Rhipicephalus microplus* Canestrini: Biological, morphological and biological activity

*Carrapato *Rhipicephalus microplus* Canestrini:
Aspectos biológicos, morfológicos e atividade biológica*

**Andrina Guimarães Silva Braga¹, Renato Abreu Lima², Caroline Oliveira Celestino³
e Valdir Alves Facundo⁴**

¹ Doutoranda em Biodiversidade e Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas. Departamento de Ciências Biológicas
andrinagsilva@gmail.com

² Biólogo, Prof. D.Sc. em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, UFAM, Benjamin Constant-AM, Brasil
renatoabreu07@hotmail.com

³ Graduação em Ciências Biológicas, Faculdade Integradas Aparício Carvalho, FIMCA, Porto Velho-RO, Brasil,
carol-olyver@bol.com.br

⁴ Químico, Prof^o. D.Sc. em Química Orgânica, professor da Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO
vfacundo@pq.cnpq.br

Resumo

O rebanho bovino brasileiro é o segundo maior do mundo e o primeiro maior exportador e produtor de carne bovina. Apesar disso, os prejuízos diretos em decorrência do parasitismo pelo carrapato *Rhipicephalus microplus* são devido à perda de peso, baixa produção de leite e diminuição da qualidade do couro. Com isso, o presente trabalho constitui-se de uma revisão bibliográfica sobre o rebanho bovino brasileiro associado com os danos causados por parasitas. Foram utilizadas as bases de dados: LILACS, SciELO e PubMed e por meio de palavras-chave como ectoparasitas, carrapatos e gado brasileiro tornou-se a pesquisa. Constatou-se que nas últimas décadas, tem-se dado uma extrema importância econômica para a agricultura brasileira visando o controle biológico para diminuição do ataque de pragas.

Palavras-chave: *Ectoparasitas. Rhipicephalus microplus. Carrapato bovino. Danos causados por parasitas.*

Abstract

The Brazilian cattle herd is the second largest in the world and the first largest exporter and producer of beef. Nevertheless, the direct losses due to parasitism by *Rhipicephalus microplus* are due to weight loss, low milk production and decreased quality of leather. Thus, this study consists of a literature review on the Brazilian cattle herd associated with damage caused by pests. databases were used: LILACS, SciELO and PubMed and through keywords such as ectoparasites, ticks and Brazilian cattle became the research. It was found that in recent decades has been given an extreme economic importance for Brazilian agriculture aiming to decrease the biological control of pest attack.

Keywords: *Ectoparasites. Rhipicephalus microplus. Tick Bovine. Damage caused by pests.*

1 Introduction

The Brazilian cattle herd was recently estimated at 193,393,388 million head, the second largest herd in the world and the first largest exporter and producer of beef (ANUALPEC, 2013 apud TONIN; DEL CARLO, 2014). Despite advances in the industry, the parasites continue to cause many barriers to Brazilian livestock. The direct losses due to parasitism by *Rhipicephalus microplus* are due to weight loss, low milk production, reproductive failure, skin lesions favoring the occurrence of myiasis and decreasing the quality of the leather, transmission of pathogens (*Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma*) and indirect losses as spending on drugs and labor (FARIAS, 2014; SACCO, 2002).

The tick *R. microplus* is a ixodídeo responsible for great economic losses to livestock in tropical and subtropical regions. This tick is a blood-sucking ectoparasites originating in Asia, whose primary host is cattle. Its incidence is higher in large herds America, Africa, Asia and Australia, is considered the tick greatest impact in economic loss in cattle herds in South America (GONZALES et al., 2003; NARI, 1995).

This ectoparasites, known in Brazil as tick of cattle, is a blood-sucking ectoparasites belonging to the phylum Arthropoda, Aracnida class, order Acarina, suborder and superfamily Metastigmata Ixodidea, gênero *Rhipicephalus*, *Boophilus* subgenre. The ticks *Boophilus* were reclassified by means of a molecular phylogenetic study as belonging to the genus *Rhipicephalus* (MURRELL; BARKER, 2003; MURRELL et al. 2000; MURRELL et al., 2001; BEATI; KEIRANS, 2001).

R. microplus ectoparasites monóxeno (a single host), depending on only one host in their life cycle, preferably cattle and secondarily other species such as buffalo, horses, sheep, goats and deer. Its biological cycle divided into two phases, the free-living and parasitic (FERRETTO, 2013). According Grisi et al. (2014), the tick *R. microplus* is responsible for significant losses to the Brazilian cattle ranching, estimates showed that the annual economic impact may be greater than \$324 billion. The damage caused by this ectoparasite is divided into direct and indirect damages. Direct damage is caused by: Direct action on the host, estimated 1-3 ml of blood to complete its life cycle in an animal. Therefore, it can cause anemia and loss of nutrients. Moreover, the irritation caused by ticks leads to a reduction of food intake by animals, depreciation of the leather due to skin damage, and high infestations predispose installation mises.

Thus, all these factors have a negative impact on weight gain, milk production and the optimization of leather. In indirect highlight to the transmission of pathogens that Sadness Parasitic Bovina (the *Babesia* protozoa of the genus and the bacterium *Anaplasma* genus) (FERRETTO, 2013; CORDOVAN, 1999; ROAD-PEÑA; JONGEJAN, 1999; PAROLA; RAOULT 2001; GONZALES et al., 2003; NARI, 1995). In recent decades, the chemical control of cattle tick has been realized as the predominant form, to be practical, effective and economical. However, excessive use of acaricide without understanding the ecology and epidemiology of tick ally failures in detecting and application led to good resistance development of the drugs available in the market (SPAGNO; PARANHOS; ALBUQUERQUE, 2010; GUERRERO et al., 2014; ALVES-WHITE et al., 2008; GULIAS-GOMES, 2009; BULLMAN et al., 1996; ROCHA, 1996; LEITE et al., 1995; LEAL et al., 2003; FURLONG; SILVER, 2006).

The need for new active ingredients for the control of *R. microplus* is a reality, the identification of new molecules with acaricide activity can be found from studies with plant extracts. For, from the 90s, with the rise of these obstacles to livestock production, research seeking alternative acaricide control from herbal measures stood out (BUZATTI et al., 2011; FERRETTO, 2013).

The species of *R. microplus* stands out in agricultural research due to concern generated by use of conventional chemicals for its control, which lead to two major problems, the rapid development of resistance to the active ingredient and waste in origin products animal, which has caused great concern in society is government agency. This study aimed to analyze the damage caused by *R. microplus* and the search for new molecules to with acaricide action, exposing their effectiveness and identifying substances with the active ingredient through literature.

2 Materials and Methods

This work consisted in a bibliographic qualitative study, descriptive and exploratory, about action and damage caused by *R. microplus*, from electronic search databases, as well as the Google Scholar access, Scientific Electronic, Library Online (SciELO) and Capes Journal, have been evaluated by scientific articles means, dissertations, theses, books and monographs the years 1995-2015 in Portuguese, English and Spanish, selecting those that brought relevant scientific knowledge bolvino tick in question to gather a single document information on the species *R. microplus*.

According to Rodrigues (2007), the literature search is a search mode in which scientific knowledge and recovered by a problem in which the exploratory research and provides greater depth with the problem, going through lifting bibliographies or interviews, and a qualitative research approach is one that describes and that the information can not be described in numbers. According to Tozoni-Kings (2010), all the search modes require literature review [...], but only the bibliographical research is the literature data collection field. To Lima; Mioto, (2007), the literature is more labor intensive, because demand more attention to the work is not affected.

3 Results and Discussion

The plant allelochemicals were used in plant protection of the late nineteenth century to World War II when the use of pesticides organossintéticos was widespread (REGNAULT-ROGER; PHILOGÈNE, 2008; ROSSEL et al., 2008). However, due to increasing environmental concern after the Green Revolution, and in order to solve or minimize the damage caused by the indiscriminate use of synthetic insecticides, new studies seek to facilitate management strategies that include insecticidal plants (VENDRAMIM, 1997).

The plant has been an important source of substances with different chemical structures and different activities against arthropods (VIVAN, 2005). Thus, it is believed that the use of plant extracts in an isolated form or associated can cause a much slower development of strength. Another important factor and the waste problem of the reduction and its biodegradable characteristics.

The control of bovine mite that has been researched. The use of toxic and medicinal plants in pest control is of great importance for agriculture and sustainable development. The great diversity of plants found in the Amazon enables the research of new products that may replace or reduce the use of synthetic acaricides (SILVA, 2008). In the Amazon, there are numerous plants that stand out the great economic potential present in their chemical composition, secondary metabolites with activity insecticide, miticide, fungicide and bactericide (SEQUEIRA et al., 2009; ALECIO et al., 2010; SANTOS et al., 2011).

The use of plant extracts in tick control has also been the focus of research in several countries (CHUNGSAMARNYART et al., 1991; WILLIAMS, 1993; Vatsya et al., 2006; ALVAREZ et al., 2008). In Brazil, studies that use eucalyptus oil (*Eucalyptus* spp.) (Myrtaceae), extracted rotenoids the timbó (*Derris annatto*) (Fabaceae) (VERISSIMO, 2004) and azadirachtin present in Meliaceae family plants (*Melia azedarach*) (BORGES et al., 2003) have shown promise in control of this parasite.

The use of plants with insecticidal properties is a very ancient practice (ROEL, 2001; GALLO et al., 2002), but currently resurfaces as search object of new alternative molecules to control and integrated pest management (COSTA et al., 2004). Plants produce biochemical defenses, also known as secondary metabolites (FRIGHETTO, 1997), which according to Rodríguez and Vendramim (1996) cause mortality and act negatively on the behavior and physiology of insects. Vendramim (1997) reported two approaches to the use of plants for activity on insects: the discovery of new molecules that permit the formulation of synthetic products and obtaining natural botanical insecticides for direct use in pest control.

For Fazolin et al. (2002), the choice of the best approach is related to the chemical structures, which are very large, complex, difficult to isolate and synthesize, and the considerations of economic and technological. According to Vendramim (1997), the insecticide plants can be used in various ways, most commonly your job as a dry powder, oils, aqueous and non-aqueous. For this author, powders and aqueous extracts, constitute the best option because they are easy to obtain and application.

Currently exist in Brazil, many studies on the fitoinseticida potential of some native plants (PERON; FERREIRA, 2012), among which, those belonging to the Piperaceae family has stood out with some promising species in the control of various pests. Several studies have demonstrated the feasibility of using bioactive compounds derived from plants to control pests, because of its efficiency, generally inexpensive, safe for consumers and the environment (SHAAYA et al., 1997; HUANG et al., 2000; BOUDA et al., 2001; DEMISSIE et al., 2008).

They may be used as powders, aqueous or organic extracts, essential oils, with toxic by contact, ingestion and fumigation (KARR; COATS 1988; RAJENDRAN; SRIRANJINI, 2008). These products cause mortality, repellency, deference in feeding and oviposition and affect the growth of insects (HUANG et al., 2000; MARTINEZ; VAN EMDEN, 2001). Many compounds of vegetable origin have been isolated, such as the terpenoids, limonoids, rocaglamidas, furanocumarina, chromene, alkaloids and acetogenins, having insecticidal properties (VIEIRA et al., 2007).

The presence of amides with insecticide and acaricide in *Piper* species has led to an intense phytochemical study of this kind. Piperine amide was the first to be isolated from the fruits of *Piper* species and their chemical constituents have often been investigated, among which the unsaturated lipophilic amides. These, in addition to being the main group of plant metabolites are primarily responsible for insecticidal activity (PARMAR et al., 1997).

Studies with *Piper* species in Asia and Africa show that lignans and isobutylamides are compounds with higher activity defense against insects (BERNARD, 1995). In Brazil, *P. aducum* L. species, *P. hispidinervum* C. DC., and *P. tuberculatum* have recently been evaluated against various insect pests (Castro et al., 2010). The extracts of *Piper tuberculatum* Jacq leaves have been used as insecticides (TRINITY et al., 2012), and against the food of insects and essential oils have been used as miticides (Castro et al., 2008). However, there are few studies to evaluate the use of extracts *P. tuberculatum* against ticks (Chagas et al., 2012).

According to Lima et al. (2014) the acaricidal efficiency may vary depending on the method of extraction, solvent polarity, and part of the plant used for the extraction. Lima et al. (2014) evaluated the fruit of *P. tuberculatum* in different solvents, hexane, ethyl ether, methanol and ethanol against larvae and engorged female *R. microplus*. In larvae extracts with lower polarity showed the best results, hexane (LC50% = 0.04 mg / ml) followed by ethyl ether extracts (LC50% = 0.08 mg / ml), ethanol (LC50 = 2.73 mg% / ml) and finally metanol (LC50% = 4.49 mg / ml). In engorged female oviposition reduction showed better results for the hexane extracts (100%) and ethyl ether (88.1%). The highest efficiency was checked by ethyl ether extract (% LC50 = 18.4 mg / ml), followed by methanol extract (LC50% = 105.6 mg / ml) and ethanol (LC50% = 140.0 mg / mL).

Lima et al. (2013), also evaluated in vitro *P. tuberculatum* fruit extracts with different solvents on larvae and engorged females of *R. microplus*. The selected solvents: hexane, ethyl ether, ethanol and methanol. Both assays were performed with five different concentrations for each of the extracts. The hexânico extracts showed the highest larvicidal activity against *R. microplus*. The *P. tuberculatum* fruits extracts were also effective against engorged females, and the ethyl acetate extract more efficient to LC50 = 18%, 4 mg / ml, followed by methanolic LC50% = 105.6 mg / ml % ethanolic LC50 = 140.0 mg / mL and LC50% hexane = 297,4mg / ml.

Santos et al. (2013) evaluated 21 species of plants against larvae and adults of *R. microplus*, but only *L. canescens*, *M. latifolia*, *C. castaneifolia*, *S. hispida*, *H. volubilis*, and *H. mutabilis* were active on tick larvae with 95% effectiveness at the concentration of 400 mg / ml. Santos et al. (2013) evaluated a concentration of 400 mg / ml. Chagas et al. (2012) evaluated the crude extract of *P. tuberculatum* leaves on larvae and engorged females of *R. microplus*. Larvae were evaluated in five dilutions (0.31%, 0.63%, 1.25%, 2.5%, 5% and 10%) which was obtained LC50 0.41% LC90% and 0%, 63%).

In engorged females was found an efficacy of 91.66% at a dilution of 10%, which according to the authors was due to the effect on the eggs hatch. Still verified a high percentage of 5% mortality (63.34%), which was obtained LC50 and LC90% 3.76% 25.03%%. Barros et al. (2010) also tested in triplicate crude extract of *P. tuberculatum* (in concentrations ranging from 10% to 0.04%), hexane partition (5% to 0.02%) and dichloromethane partition (5% to 0,08%), and the isolated piperine (5% to 0.08%) and piplartine (1.25% to 0.02%) and 13 synthetic substances called structurally similar to piperine in a concentration of 0.15% in immersion test and 0.5% in the impregnated paper test.

The control consisted of 3% Tween 80 and distilled water. The data obtained were used to determine the effectiveness of the product. For females, the crude extract of *P. tuberculatum* 10% and 5% hexane partition presented the best efficacies with 91.97% and 74.29% respectively. As for the larvae, the 5% crude extract and 2.5% and the hexane partition from 2.5% to 0.31% were 100% effective. Research management opportunities using resources of natural origin to control *R. microplus*, as the use of plant molecules with potential acaricide, can provide the development of viable methods to reduce chemical contamination in livestock and minimize one of the major problems faced by farmers and increased *R. microplus* resistance to synthetic acaricides.

Conclusion

Infections caused by ectoparasites are responsible for damages to the creation of beef cattle. The control of these infections is essential to the success of ruminant production systems. In addition to the observation of animals susceptible to various parasites, should be highlighted viable alternatives such as biological control as a form of management practice for so reduce the population of parasites guided by the use of active ingredients of medicinal plants.

Acknowledgements

The authors thanks the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM).

References

- ALECIO, M.R.; FAZOLIN, M.; COELHO NETO, R.A.; CATANI, V.; ESTRELA, J.L.V.; ALVES, S.B.; CORREA, R.S.; ANDRADE NETO, R.C.; GONZAGA, A.D. 2010. Ação inseticida do estrato de *Derris amazônica* Killip para *Cerotoma arcuatus* Olivier (Coleoptera: Chrysomelidae). **Acta Amazonica**, v. 40, n. 4, p. 719-728.
- ÁLVAREZ, V. et al. Control *in vitro* de garrapatas (*Boophilus microplus*; Acari: Ixodidae) mediante extractos vegetales. **Revista de Biología Tropical**, v. 56, n. 1, p. 291-302, 2008.
- ALVES-BRANCO, F.P.S.; PINHEIRO, A.C.; SAPPER, M.F.M.; MERCIER, P.; WHITE, C.R. Carrapato dos Bovinos (*Boophilus microplus*) "Controle e Resistência a Carrapaticidas no Rio Grande do Sul". In: V SEMINÁRIO DE PECUÁRIA DE CORTE. p. 84, 2008, Bagé. **Palestras...Bagé**, 2008.
- BARROS, F., VINHOS, F., RODRIGUES, V.T., BARBERENA, F.F.V.A., FRAGA, C.N. 2010. Orchidaceae in R.C. Forzza, et al (org.). Catálogo de plantas e Fungos do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. v.2., p.1344- 1426.
- BEATI, L., KEIRANS, J. E. Analysis of the systematic relationships among ticks genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. **Journal of Parasitology**. V.87 n.1, p. 32-48, 2001.
- BERNARD, C.B.; KRISHANMURTY, H.G.; CHAURET, D.; DURST, T.; PHILOGNE, B.J.R.; SNCHEZ-VINDAS, P.; POVEDA, L.; SAN ROMÉN, L.; ARNASON, J.T. Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. **Journal of Chemical Ecology**, v.21, p. 801-814, 1995.

- BOUDA, H.; TAPONDJOU, L.A.; FONTEM, D.A.; GUMEDZOE, M.Y.D. Effect of essential oils from leaves of *Ageratum conyzoides*, *Lantana camara* and *Chromolaena odorata* on the mortality of *Sitophilus zeamais* Mots., 1865 (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 37, p. 103-109, 2001.
- BORGES, L. M. F. et al. *In vitro* efficacy of extracts of *Melia azedarach* against the tick *Boophilus microplus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, n. 2, p. 228-231, 2003.
- BULLMAN, G.M.; MUÑOS CABENAS, M. E.; AMBRÚSTOLO, R.R. El impacto ecológico de las lactonas macrocíclicas (endectocidas): una actualización comprensiva y comparativa. **Veterinária Argentina**, v. 8, p. 3-15, 1996.
- BUZATTI, A.; KRAWEZAK, F.S.; PIVOTO, F.L.; VOGEL, F.S.F.; BOTTON, S.A.; ZANETTI, G.D.; MANFRON, CASTRO, M.J.P.; SILVA, P.H.S.; PÁDUA, L.E.M. Potencial de extratos de frutos frescos e desidratados de *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae) no desenvolvimento da lagarta-do-cartucho do milho. **Magistra Cruz das Almas**, v. 22, n. 2. Bahia, 2010.
- CASTRO, M.J.P.; SILVA, P.H.S.; PÁDUA, L.E.M. Atividade de extratos de *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae) sobre *Shodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Revista Ciências Agronômicas**, v. 3, p. 437-442, 2008.
- CHAGAS, A.C.S.; BARROS, L.D.; COTINGUIBA, F.; FURLAN, M.; GIGLIOTI, R.; OLIVEIRA, M.C.S.; BIZZO, H.R. *In vitro* efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Revist**, v. 110, p. 295-303, 2012.
- CHUNGSAMARNYART, N.; JIWAJINDA, S.; JANSAWAN, W. Acaricidal effect of plant crude-extracts on tropical cattle tick (*Boophilus microplus*). **Kasetsart Journal, (Natural Sciences Supplement)**, v. 25, p. 90-100, 1991.
- COSTA, E. L. N.; SILVA, R. F. P.; FIUZA, L. M. Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. **Acta Biologica Leopoldensia**. São Leopoldo, v. 26, n. 2, p.173-185, 2004.
- CORDOVÉS, C.O. **Carrapatos: controle e erradicação**. Alegrete: Galha, 1999, p. 130.
- DEMISSIE, G.; TESHOME, A.; ABAKEMAL, D.; TADESSE, A. Cooking oils and “Triplex” in the control of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 44, p. 173-178, 2008.
- DOS SANTOS, M.R.A.; LIMA, R.A.; SILVA, A.G.; TEIXEIRA, C.A.D.; LIMA, D.K.S.; POLLI, A.R.; FACUNDO, V.A. Atividade inseticida do extrato de raiz de *Piper hispidum* H.B.K. (Piperaceae) sobre *Hypothenemus hampei* Ferrari. **Revista saúde e pesquisa**, v. 4, n. 3, p. 335-340, 2011.
- FARIAS, J.A. Efeito acaricida *in vitro* de extratos de *Baccharis trimera*, *Vernonia nudiflora* e *Eupatorium buniifolium* (Asterales: Asteraceae) EM LARVAS E ADULTOS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2014.
- FRIGHETTO, R.T.S. Preparação e avaliação da bioatividade de extratos vegetais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., 1997, Salvador. **Resumos...** Salvador: SEB; Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMPF, 1997. p. 10.
- ESTRADA-PENÃ, A.; JONGEJAN, F. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. **Experimental and Applied Acarology**, v. 23, p. 685-715, 1999.
- FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; LIMA, A.P.; ARGOLO, V.M. **Avaliação de plantas com potencial inseticida no controle da vaquinheiro-feijoeiro (*Ceratomyxa manganis* Bechyné)**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2002. 42 p. Embrapa Acre. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 37).

- FERRETTO, R. **Revisão de literatura sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. Monografia em medicina veterinária, Faculdade de Veterinária. 46f., 2013.
- FURLONG, J.; PRATA, M. **Controle estratégico do carrapato dos bovinos de leite**. Juiz de Fora: EMBRAPA-CNPGL, 2006. 2 p. (Circular Técnica, 38).
- GALLO, D; NAKANO, O; NETO, S. S; CARVALHO, R. P. L; BAPTISTA, G. C; FILHO, E. B; PARRA, J. R. P; ZUCCHI, R. A; ALVES, S. B; VENDRAMIM, J. D; MARCHINI, L. C; LOPES, J. R. S; OMOTO, C; **Manual de Entomologia Agrícola**. Ed Fealq: Piracicaba-SP, p. 920, 2002.
- GONZALES, J. C. **O controle do carrapato do boi**. 3.ed. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2003. 128 p.
- GULIAS-GOMES, C.C. O Carrapato-do-Boi e o Manejo da Resistência aos Carrapaticidas. **Comunicado Técnico 70**. Bagé, p. 5, 2009.
- GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.S.; BARROS, A.T.M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P.H.D.; LEÓN, A.A.P.; PEREIRA, J.B.; VILLELA, H.S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 23, p. 150-156, 2014.
- HUANG, Y.; LAM, S.L.; HO, S.H. Bioactivities of essential oil from *Ellateria cardamomum* (L.) Maton. to *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of Stored Products Research**, v. 36, p.107-117. 2000.
- KARR, L.L.; COATS, J.R. Insecticidal properties of d-limonene. **Journal Pesticide Scienc**, v. 13, p. 287-289, 1988.
- LEAL, A. T.; FREITAS, D. R. J. de; VAZ JUNIOR, I. da S. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, n. 1, p. 1-11, 2003.
- LEITE, R.C.; LABRUNA, M.B.; OLIVEIRA, P.R.; MONTEIRO, A.M.F.; CAETANO JÚNIOR, J. In vitro susceptibility of engorged females from different populations of *Boophilus microplus* to commercial acaricides. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 4, n. 2, p. 283-294, 1995.
- LIMA, T.C.S.; MIOTO, R.C.T. Procedimentos metodológicos na construção do conhecimento científico: a pesquisa bibliográfica. **Rev.Katál.**, v. 10, n.esp., p. 37-45, 2007.
- LIMA, A.S.; SOUZA, J.G.N.; PEREIRA, S.G.; GUILLON, M.S.P.; SANTOS, L.S.; COSTA, L.M. Acaricide activity of different extracts from *Piper tuberculatum* fruits against *Rhipicephalus microplus*. **Parisitol Revist**, v. 113, p. 107-112, 2014.
- LIMA, W.Q. F. L.; PEREIRA, T. C. D.; PEREIRA, M. G. M.; BRITO, N. J. N.; ZAMPIERON, R. G.; SILVA, G. A. Avaliação fitoquímica e antioxidante de plantas medicinais do norte do Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2013.
- MARTINEZ, S.S.; VAN EMDEN, H.F. Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by azadirachtin. **Neotropical Entomologia**, v. 30, p. 113-124, 2002.
- MURREL, A.; BARKER, S.C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Syst Parasitology, Queensland**, v. 56, n. 3, p. 169-172, 2003.
- MURREL, A.; CAMPBELL, N.J.H.; BARKER, S.C. Phylogenetic analyses of Rhipicephaline ticks indicate that the genus *Rhipicephalus* is paraphyletic. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 16, n. 1, p. 1-7, 2000.
- MURRELL, A.; CAMPBELL, N.J.H.; BARKER, S.C. Totalevidence phylogeny of ticks provides insights into the evolution of life cycles and biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 21, n. 2, p. 244-258, 2001.

- NARI, A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tickborne diseases in South America. **Vet. Parasitol.**, v. 57, p. 153-165, 1995.
- PAROLA, P.; RAOULT, D. Tick- borne bacterial diseases emerging in Europe. **Clin Microbiol Infect**, v. 7, p. 80-83, 2001.
- PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; BISHT, K.S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A .; TYAGI, O. D.; PRASAD, A.K.; Wengel, J.; Olesen, C.E; Boll, P.M. Phytochemistry of the Genus Piper. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597-673. 1997.
- PERON, F., FERREIRA, G.C.A. Potencial inseticida de extrato de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.) no controle da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*). **Anais... VI Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica**, 2012.
- REGNAULT-ROGER, C.; PHILOGENE, B.J.R. Past and current prospects for the use of botanicals and plant allelochemicals in integrated pest management. **Pharm. Biol**, v. 46, n. 1–2, p. 41–52, 2008.
- RAJENDRAN, S.; SRIRANJINI, V. Plant products as fumigants for stored-product insect control. **Journal of Stored Products Research**, v. 44, p. 126-135, 2008.
- ROCHA, C.M.B.M.; OLIVEIRA, P.R.; LEITE, R.C. Percepção dos produtores de leite do município de Passos, MG, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae), 2001. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1235-1242, 2006.
- RODRIGUES, W. C. **Metodologia Científica**. FAETEC/IST. Paracambi, 2007.
- RODRÍGUEZ, H.C.; VENDRAMIM, J.D. Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae em *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Manejo Integrado de Plagas**, Costa Rica, n. 42, p. 14-22, 1996.
- ROEL, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. **Rev. Internacional de Desenvolvimento Local**, v.1, n.2, p.43-50, 2001.
- ROSSEL, G.; QUERO, C.; COLL, J.; GUERREIRO, A. Biorational insecticides in pest management, **Journal of Pest Science**, Berlin, v. 33, n. 02, p. 103-121, 2008.
- SACCO, A. M. S. Profilaxia da Tristeza Parasitária Bovina: Por quê, quando e como fazer. **Circular Técnica 28**. Bagé, p. 12, 2002.
- SANTOS, L.B.; SOUZA, J.K.; PAPASSONI, B.; BORGES, D.G.L.; JUNIOR, G.A.D.; SOUZA, J.M.E.; CAROLLO, C.A.; BORGES, F.A. Efficacy of extracts from plants of the Brazilian Pantanal against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 532-538, 2013.
- SEQUEIRA, B.J.; VITAL, M.J.S.; POHLIT, A.M.; PARAROLS, I.C.; CAÚPER, G.S.B. Antibacteria and antifungal activity of extracts and exudates of the Amazonian medicinal tree *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson (common name: *sucuba*). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 659-661, 2009.
- SHAAYA, E.; KOSTJUKOVSKI, M.; EILBERG, J.; SUKPRAKARN, C. Plant oils as fumigants and contact insecticides for the control of stored-product insects. **Journal of Stored Products Research**, v. 33, p. 7-15, 1997.
- SILVA, F.F.; SOARES, M.C.S.C.; ALVES, L.C.; LIMA, M.M.; SILVA, L.V.A.; FAUSTINO, M.A.G. SILVA, F.F. Avaliação comparativa da eficácia de fitoterápicos e produtos químicos carrapaticidas no controle do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) por meio do biocarrapaticidograma. **Medicina Veterinária**, Recife, v. 2, p. 1-8, 2008.
- SPAGNO, F.H.; PARANHOS, E.B.; ALBUQUERQUE, G.R. Avaliação *in vitro* da ação sobre o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, Canestrini, 1887 (Acari: Ixodidae) de bovinos leiteiros no município de Itamaraju, Bahia, Brasil. **Ciência Animal Brasileira. Goiânia**, v. 11, n. 3, p. 731-736, 2010.

- TRINDADE, T. T. F., STABELI, R. G., FACUNDO, V. A., CARDOSO, C. T., SILVA, M. A., GIL, L. H. S., JARDIM, I. S., SILVA, A. A. Evaluation of larvicidal activity of the methanolic extracts os *Piper alatabaccum* branches and *P. tuberculatum* leaves and compounds isolated against *Anopheles darlingi*. **Rev. Bras. Farmacogn**, 2012.
- TONIN, F.; DEL CARLO, R. J. Estatísticas Brasileiras. Números da Medicina Veterinária e Zootecnia no Brasil. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**. n. 61, ano XX, jan-abr., p.86, 2014.
- TOZONI-REIS, M. F. C. **A pesquisa e a produção de conhecimentos**. In: PINHO, S. Z. (Org.). Cadernos de Formação: Formação de Professores. Educação, Cultura e Desenvolvimento. Volume 3. São Paulo: Cultura Acadêmica. v. 3, p. 111-148. 2010.
- VATSYA, S. et al. *In vitro* acaricidal effect of some medicinal plantas against *Boophilus microplus*. **Journal of Veterinary Parasitology**, v. 20, n. 2, p. 141-143, 2006.
- VENDRAMIM, J.D. Uso de plantas inseticidas no controle de pragas. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE AGRICULTURA ORGÂNICA, 2, 1997, Campinas. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1997, p. 64-69.
- VERÍSSIMO, C. J. **Controle biológico e alternativo do carrapato do boi**. São Paulo: APTA/SAA-SP, 2004. 3 p.
- VIEIRA, P.C.; MAFEZOLI, J.; BIAVATTI, M.W. Inseticidas de origem vegetal, p.105-120. In: CORRÊA, A.G.; VIEIRA, P.C. (eds.), **Produtos naturais no controle de insetos**. São Carlos, EdUFSCar, 150p. 2007.
- VIVAN, M. P. **Uso do cinamomo (*Melia azedarach*) como alternativo aos agroquímicos no controle do carrapato bovino (*Boophilus microplus*)**. Florianópolis, 2005. 72 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina.
- WILLIAMS, L. A. D. Adverse effects of extracts of *Artocarpus altilis* Park. and *Azadirachta indica* A. Juss. on the reproductive physiology of the adult female tick, *Boophilus microplus* (Canest.). **Invertebrate Reproduction and Development**, v. 23, n. 2-3, p. 159-164, 1993.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Artigo: ACARICIDAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM DIFFERENT STRUCTURES OF *Piper tuberculatum* Jacq AGAINST *Rhipicephalus microplus*

REVISTA ACTA AMAZÔNICA - ACEITO

ACARICIDAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM DIFFERENT STRUCTURES OF *Piper tuberculatum* Jacq AGAINST *Rhipicephalus microplus*

Andrina Guimarães Silva Braga^{a,b}, Krishna Ferri Alencar de Souza^{c,d}, Fabio da Silva Barbieri^{b,c}, Cleberson de Freitas Fernandes^{b,c}, Rodrigo Barros Rocha^{b,c}, José Roberto Vieira Junior^c, Caroline Oliveira Celestino^c, Valdir Alves Facundo^{b,e}, Luciana Gatto Brito^{b,c*}

^a Federal University of Amazonas, Manaus, AM, Brazil

^b Graduate Program in Biodiversity and Biotechnology of the Amazon (Bionorte)

^c Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO, Brazil

^d Rondônia Foundation for the Support to the Development of Scientific and Technological Actions and Research of Rondonia State – FAPERO/ Coordination of Training of Higher Education Graduate Foundation (CAPES)

^e Federal University of Rondônia, Porto Velho, RO,

*Corresponding Author:

Luciana Gatto Brito, Tel.: + 55-69-32195044, fax: +55-69-32220409.

e-mail address: luciana.gatto@embrapa.br

Abstract

The strategies to control the cattle tick *Rhipicephalus microplus* are based mainly on the use of synthetic pesticides. However, the principal chemical groups are becoming ineffective due to the emergence, establishment and development of resistance to these chemicals. Finding new molecules with proven efficiency in controlling infestations by *R. microplus* is necessary to maintain the productivity of cattle herds, particularly of taurine breeds established in equatorial and tropical regions of the world. Ethanol extracts from the leaves, stems and fruits of *Piper tuberculatum* were evaluated in the different bioassays at concentrations of 50.00, 25.00, 12.50, 6.25, 3.12 and 1.56 mg/mL. The concentrations lethal to 50% of the individuals (LC₅₀) observed for the larvae were 3.99, 5.29 and 138.7 mg/mL for the stem, leaf and fruit extracts, respectively. Against the engorged females, the highest efficacy rates were obtained at the concentration of 50 mg/mL, of 71.6%, 68.4% and 37.0% for the fruit, leaf and stem extracts, respectively. The main effect of the ethanol extracts observed was related to egg hatching rate, where the fruit and leaf extracts caused a reduction of 55.6% and the stem extract caused a decline of 20.8%. The results show that *P. tuberculatum* is a promising source of molecules that can be used as active ingredients in pesticide formulations to control cattle tick infestations. The identification and characterization of the bioactive molecules involved in the acaricidal activity of *P. tuberculatum* should be investigated further, in particular to obtain and evaluate different chemical fractions.

Keywords: Cattle tick; active molecules; *Piper tuberculatum*.

1. Introduction

The worldwide economic losses to cattle breeders caused by pests due to lower milk and meat production, hide damage and treatment costs are huge. The latest data indicate that in Brazil alone, these losses amount to US\$ 6 billion a year, of which 50% are attributed to the cattle tick, *Rhipicephalus microplus* (Grisi et al. 2014). The main method used to minimize these losses is the application of synthetic pesticides. However, the incorrect and indiscriminate use of these products has

caused the development of cattle tick populations that are resistant to the various commercially available chemical groups. The search for new molecules with acaricidal activity is currently one of the greatest challenges to maintain the sustainability of cattle breeding in tropical regions.

Studies have demonstrated the promising biocidal activity of various plants to control different pathogenic vectors and agents that impair livestock and human health. The strong research interest in the chemical components produced by the secondary metabolism of plants has led to the isolation of various substances that take part in the defense mechanisms of plants against attack by pests and diseases. Among these substances, alkaloids, steroids, terpenes, phenylpropanoids, lignans, flavonoids and amides stand out as promising bioactive molecules from plants for use in the health field (Parmar et al. 1997).

According to Borges et al. (2011), approximately 55 plants have been evaluated regarding their potential use to control *R. microplus*. Among these, *Piper tuberculatum*, popularly known in Brazil as *pimenta d'arda* or *pimenta longa*, stands out as a promising species that produces bioactive molecules with potential use to control pests and diseases that affect both crops (Scott et al. 2002; Castro et al. 2008; Trindade et al. 2012) and livestock (Chagas et al. 2012; Lima et al. 2014). Extracts of this plant also have proven action against protozoa of medical importance such as *Leishmania amazonensis* (Ferreira et al. 2010) and *Trypanosoma cruzi* (Regasini et al. 2009). Reports have been published as well of the molluscicidal effect of *P. tuberculatum* against *Biomphalaria glabrata*, the intermediate host of *Schistosoma mansoni* (Rapado et al. 2011; Rapado et al. 2013).

This study involved the testing of ethanol extracts of the leaves, stems and fruits of *P. tuberculatum* for control of *R. microplus*, to discover what structures of this plant have stronger acaricidal activity and can thus be used as a source to synthesize new active ingredients for control of cattle tick populations.

2. Materials and methods

2.1. Production of the extracts

2.1.1. Collection of the plant material

The samples of *P. tuberculatum* (leaves, stems and fruits) were collected in January 2013 on the campus of Rondônia Federal University. The botanical identification of the samples was performed by Dr. José Gomes of the herbarium of the National Amazonian Research Institute (INPA), where a dried and pressed voucher specimen was deposited under number 211724.

2.1.2. Preparation of the extracts

Samples of leaves (1.4 Kg), stems (1.6 Kg) and fruits (0.3 Kg), after drying and grinding, were submitted to extraction with ethanol PA (3.0 L) for seven days, to obtain extracts from leaves (PTLEt, 87.0 g), stems (PTSEt, 36.0 g) and fruits (PTFEt, 46.9 g)

2.2. Dilution of the extracts

For the bioassays, the solutions of the three ethanol extracts of *P. tuberculatum* were diluted in ethanol (larval packet test) and water + Tween 20 at 2% (adult immersion test). The gross extracts were weighed and diluted in the solvents with the aid of ultrasound and a vortex agitator to maximize the solubilization. The final concentrations of 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12.5 mg/ml, 6.25 mg/ml, 3.12 mg/ml and 1.56 mg/ml were obtained after dissolving the crude extract. The extracts at concentration higher than 50 mg/ml had high density and viscosity, so they were not evaluated.

2.3. Tick preparation and bioassays

Engorged females were collected from naturally infested cattle. Immediately after collection, the ticks were immersed in a 2% sodium hypochlorite solution, dried on paper towels and selected according to integrity, motility and degree of engorgement. Homogeneous groups containing 10 engorged females were formed. Each concentration of the extracts was evaluated in triplicate in each of the bioassays conducted.

The larvae used in the larval packet test (LPT) came from a group of 30 engorged females. These ticks were attached dorsally with two-sided tape in Petri dishes and placed in a BOD chamber at a temperature of 27 +/- 1 °C and relative humidity above 80% for egg laying. After 18 days of oviposition, the egg masses were removed and placed in plastic tubes plugged with hydrophilic cotton and kept in the BOD chamber under the same temperature and humidity conditions previously described, until hatching of the larvae.

2.4. Sensitivity of the larvae on impregnated paper

The bioassays to assess the efficiency of the extract on *R. microplus* larvae were performed according to the method described by Stone and Haydock (1962), as modified by Miller et al. (2002). The packets were made of filter paper and impregnated with the stem, leaf and fruit extracts diluted in alcohol. Packets were also impregnated with ethanol (negative control) and technical grade cypermethrin diluted in acetone at concentration of 25.6 µg/cm² (positive control).

Approximately 100 larvae were placed in each packet, which were immediately sealed with paper clips and placed in the BOD chamber at temperature of 27 +/- 1 °C and humidity greater than 80%, where they remained for 2 hours. After this interval, the packets were opened and the living and dead larvae were counted in each repetition, to calculate the mortality percentage caused by each of the concentrations tested. The 50% lethal concentration (LC₅₀) was obtained by the probit test, performed with the BioStat 2009 Professional 5.8.4 software.

2.5. Immersion test with engorged females

The acaricidal potential of the stem, leaf and fruit extracts of *P. tuberculatum* on engorged females was analyzed by the adult immersion test (AIT), as described by Drummond et al. (1973). Homogeneous groups of 10 females were immersed for five minutes in 10 ml of extract at each of the concentrations evaluated. There were also two controls: positive (technical grade cypermethrin diluted in acetone at concentration of 25.6 µg/cm²) and negative (water + Tween 20 at 2%). After immersion, the engorged females were dried on paper towel and mounted dorsally in Petri dishes with two-sided tape. The plates were then kept in the BOD chamber at temperature of 27 +/- 1 °C and humidity above 80%.

After the end of oviposition, the egg masses of each group were weighed and allocated in labeled plastic syringes plugged with cotton and incubated in the BOD under the same temperature and humidity conditions for larval hatching. The number of eggs hatched and not hatched were counted after 16 days and the data were used to determine the percent oviposition reduction (% OR) and hatching rate (% HR) as described by Gonzales (2003), as well as the estimated reproduction (ER), used in turn to calculate the treatment efficacy (E) according to Drummond et al. (1973), using the equations below.

$$OR = \frac{\text{mean weight of eggs in controls (g)} - \text{mean weight of eggs in treated group (g)}}{\text{mean weight of eggs in controls (g)}} \times 100$$

$$HR = \frac{\text{hatching rate in controls} - \text{hatching rate in treated group}}{\text{hatching rate in controls}} \times 100$$

$$ER = \frac{\text{weight of eggs (g)} \times \% \text{ hatching rate}}{\text{weight of females (g)}} \times 20000$$

$$E = \frac{ER \text{ controls} - ER \text{ treated}}{ER \text{ controls}} \times 100$$

3. Results

The leaf and stem extracts caused 100% mortality of the larvae starting at the concentration of 12.5 mg/mL, while the fruit extract achieved maximum mortality of 96.2% only at the concentration of 50 mg/mL (Table 1). Although the fruit extract did not produce 100% mortality, at the lowest concentrations it performed better than the leaf and stem extracts. The fruit extract also had the lowest LC₅₀ value, 3.62 mg/mL (Table 2).

The results of the AITs demonstrated that the activity of *P. tuberculatum* on the engorged female cattle ticks was related to the reduction of oviposition. No significant differences of oviposition were observed in relation to the concentration among the three extracts. A significant difference was only observed for the average oviposition reduction caused by the PTLEt at concentrations of 3.12 e 1.56 mg/mL when compared to the other concentrations (Table 3).

With respect to the hatching reduction percentage, the comparison of the averages for the extracts PTLEt, PTSEt and PTFEt revealed a significant difference among the concentrations of 1.56, 6.25 and 12.5 mg/mL for the three extracts, where the highest averages for these concentrations were observed for PTFEt. For all the extracts, the highest hatching reduction percentages occurred at the concentration of 50 mg/mL. For PTFEt, the concentrations of 6.25 and 12.5 mg/mL caused the same reduction (the greatest hatching reduction for this extract) (Table 4).

The average estimated reproduction measures declined significantly for the engorged females immersed in PTLEt and PTSEt. For all the extracts, the concentration of 50 mg/mL was most effective in reducing the estimated reproduction (Table 5).

The average efficacy of *P. tuberculatum* to control the engorged female cattle ticks indicated that the species is a promising source of active molecules that can be used to control those ectoparasites. The concentration of 50 mg/mL of both the PTFEt and PTLEt extracts presented the best performance in the AIT, with efficacy levels of 71.6% and 68.4%, respectively (Table 6).

The extract PTFEt was submitted to silica gel column chromatography and was eluted with pure hexane, chloroform or ethyl acetate or in mixtures with rising polarities, obtaining three secondary metabolites. These were identified as piplartine, dihidropiplartine and 3,4,5-trimethoxy-dihidrocinânmic acid through physical analysis, nuclear magnetic resonance of hydrogen-1 and carbono-13 and infrared mass spectrometry. These metabolites were previously isolated in another extract from the same part of this plant (Facundo et al. 2008).

4. Discussion

Leaf extracts of *P. tuberculatum* have previously been studied as insecticides (Trindade et al. 2012; Castro et al. 2008). However, very few studies have been conducted to assess the use of this plant's extracts against ticks (Chagas et al. 2012). According to Lima et al. (2014), the efficiency of an acaricide can vary according to the extraction method, solvent polarity and plant part used to obtain the extract.

The acaricidal activity of *P. tuberculatum* against the larvae and engorged females was shown by the results for the ethanol extracts evaluated. All three extracts showed promise against the larvae. Chagas et al. (2012) also observed

similar performance of the leaf extract of *P. tuberculatum* ($LC_{50}=0.41\% \approx 4.1\text{mg/mL}$) to control *R. microplus* larvae. Lima et al. (2014) obtained a LC_{50} value approximately 50 times lower than that observed in this study for the ethanol extracts from the fruit of *P. tuberculatum*. The authors found that the extracts obtained with solvents having lower polarity were more effective. We found that the strongest acaricidal activity of *P. tuberculatum* was produced by the leaf extracts, unlike what was reported by Lima et al. (2014). That divergence can be related to the extraction method, solvent polarity or parts of the plant used, as observed by Silva et al. (2009).

The extract from the fruits of *P. tuberculatum* was the most effective in reducing the egg hatching rate in this study. In turn, Chagas et al. (2012) reported that the leaf extract of *P. tuberculatum* reduced egg hatching by 91.66% at a concentration of 10% ($\approx 100\text{mg/mL}$), but at 5% ($\approx 50\text{mg/mL}$) the efficacy was only 58.61%, near that observed in the present study. Lima et al. (2014), investigating the ethanol extract of *P. tuberculatum* fruits on *R. microplus* females obtained efficacy of 11.4% when using a concentration of 75 mg/mL in the adult immersion test. When they used different solvents and maintained the concentration at 75mg/mL, they observed efficacies of 100% and 96.2% for extracts obtained with hexane and ethyl ether.

Lima et al. (2014) measured the LC_{50} of the ethanol extract of *P. tuberculatum* fruits ($LC_{50}=2.73\text{mg/mL}$) on *R. microplus* larvae, which was about 50 times lower than we observed. They noted that the extracts obtained with solvents having lower polarity were more effective than those with higher polarity, and that the hexane extract was most effective ($LC_{50}=0.04\text{mg/mL}$).

Santos et al. (2015) assessed the *in vitro* effect of the aqueous extract, hydroalcoholic extract, concentrated hydroalcoholic extract and essential oil of lemongrass (*Cymbopogon wynterianus*) on *R. microplus* larvae and engorged females. In their tests with larvae, they used six concentrations (3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100%) of each extract. They found that the samples had acaricidal action, mainly the essential oil, because starting at a concentration of 12.5% it caused 100% larval mortality, and at 25% it had an efficacy index of 100% in the test with engorged females, a better result than observed in our study.

The process of discovering and developing new drugs is complex, lengthy and expensive (Joshi 2007), and depends on investments in scientific and technological innovations. The Amazon region has the world's richest flora and fauna, both in terms of the number of species inhabiting the entire region and coexistence in close proximity. This immense genetic heritage, now scarce in most developed countries, has inestimable economic and strategic value in various fields, especially the development of new therapeutic substances (Cardoso da Silva 2013; Salati et al. 1998).

Modern therapeutic practices, involving the use of drugs with specific actions on receptors, enzymes and ionic channels, would not be possible without the contribution of natural products, notably toxins from higher plants, animals and microorganisms (Calixto 2003). The search for potential molecules for use as pharmacological inputs to develop new acaricide formulations drives efforts to evaluate different species. In this respect, plants stand out due to their synthesis of secondary metabolites. Biosynthetic compounds are involved in various defense mechanisms of plants against attack by pests and diseases. In general, plants produce a wide range of molecules with different chemical makeups to face challenges, be it attacks by pests and diseases or edaphoclimatic changes (Balandrin et al. 1985).

The intensive and indiscriminate use of synthetic acaricides has created selective pressure for the development of *R. microplus* populations that are resistant to most of the chemical groups available in the market. Metabolic molecules produced by plants can have action mechanisms that, if better understood, can be used to control cattle tick infestations, thus retarding the selection and emergence of resistant populations when used as biocides.

Among the plants found in the Amazon region with potential for obtaining biomolecules with pesticidal activity, those of the family Piperaceae have often been mentioned as efficient producers of botanical insecticides. In particular, species of the genus *Piper* contain secondary metabolites such as terpenes, phenylpropanoids, lignans, flavonoids and amides, of which the amines are considered characteristic of the family Piperaceae (Parmar et al. 1998).

Other *Piper* species have been evaluated for control of *R. microplus* larvae and adults. Silva et al. (2009) verified, through *in vitro* tests, the toxic potential of the hexane extract and essential oil of the leaves of *P. aduncum* against *R. microplus* larvae and adults. Essential oils of *P. amalago*, *P. mikanianum* and *P. xylosteoides* were also evaluated for their acaricidal potential on cattle tick larvae by Ferraz et al. (2010), who observed that the essential oil of *P. mikanianum* ($LC_{50}=2.33 \mu\text{L/mL}$) caused the greatest larval mortality, followed by the essential oil of *P. xylosteoides*. But they did not observe any acaricidal activity of *P. amalago* on *R. microplus* larvae.

A wider range of plants should be evaluated regarding their acaricidal potential against *R. microplus* larvae and engorged females. One phytochemical study indicated that 94.84% of the composition of the essential oil of *P. aduncum* consists of dillapiole (Silva et al. 2009). Another study found that the majority component of *P. mikanianum* essential oil is apiole (67.88%) and of *P. xylosteoides* is safrol (47.83%), while the essential oil of *P. amalago* contains 20.52% limonene (Ferraz et al. 2010). The differences in the chemical constituents isolated from different *Piper* species can be related to the genetic diversity of these species, as well as the foliar age of the plant, edaphoclimatic variations and different extraction methods applied (Facundo et al. 2008).

The ethanol extracts obtained from the three structures of *P. tuberculatum* presented acaricidal activity *in vitro* against larvae and engorged females of *R. microplus*. Further research is needed to obtain and identify the constituents of these extracts responsible for that action, since biomolecules appear to have great promise for use as biocides against pests and diseases that afflict plants and animals, including humans. Phytochemical studies aimed at isolating these substances, as well as *in vitro* tests with fractions of plant extracts and substances isolated from the metabolism of plants, should be conducted to identify new acaricidal molecules for use in the pharmaceutical industry.

5. Acknowledgments

We thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq – grant no. 406156/2013-1) for financial support and research scholarships; Foundation for the Support to the Development of Scientific and Technological Actions and Research of Rondônia State/Coordination of Training of Higher Education Graduate Foundation (FAPERÓ/CAPES) for research scholarship; Amazonas State Research Support Foundation (FAPEAM) for doctoral grant; and Brazilian Agriculture Research Corporation (Embrapa - SEG 02.14.00.004.00.00) for financial support.

6. References

- Balandrin, M.F., Klocke, J.A., Wurtele, E.S., Bollinger, W.H., 1985. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science* 228, 1154-1160.
- Borges, L.M.F., Sousa, L.A.D., Barbosa, C.S., 2011. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 20, 89–96.
- Calixto, J.B., 2003. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Cienc. Cult.* 55, 37-39.
- Castro, M.J.P., Silva, P.H.S., Pádua, L.E.M., 2008. Atividade de extratos de *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae) sobre *Shodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Rev. Ciênc. Agron.* 3, 437-442.
- Chagas, A.C.S., Barros, L.D., Cotinguiba, F., Furlan, M., Giglioti, R., Oliveira, M.C.S., Bizzo, H.R., 2012. In vitro efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* 110, 295-303.
- Drummond, R.O., Ernest, S.E., Trevino, J.L., Gladney, W.J., Graham, O.H. 1973. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory tests of insecticides. *J. Econ. Entomol.* 66,130-133.
- Facundo, V.A., Polli, A.R., Rodrigues, R.V., Militão, J.S.L.T., Stabeli, R.G., Cardoso, C.T. 2008. Constituintes químicos fixos e voláteis dos stems e fruits de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *Piper hispidum* H. B. K. *Acta Amazon.* 38, 733–742.
- Ferraz, A.B.F., Balbino, J.M., Zini, C.A., Ribeiro, V.L., Bordignon, S.A., Von Poser, G. 2010. Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three Piper species. *Parasitol. Res.* 10, 243–248.
- Ferreira, M.G.P.R., Kayano, A.M., Silva-Jardim, I., Silva, T.O., Zuliani, J.P., Facundo, V.A., Calderon, L.A., Silva, A.A., Ciancaglini, P., Stabeli, R.G., 2010. Antileishmanial activity of 3-(3,4,5-trimethoxyphenyl) propanoic acid purified from Amazonian *Piper tuberculatum* Jacq., Piperaceae, fruits. *Rev. bras. farmacogn.* 20, 1003-1006.
- Gonzales, J.C., 2003. O controle do carrapato do boi, terceira ed.. Universidade de Passo Fundo, RS, 128p.
- Grisi, L., Leite, R.C., Martins, J.R.S., Barros, A.T.M., Andreotti, R., Cançado, P.H.D., León, A.A.P., Pereira, J.B., Villela, H.S., 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 23, 150-156.
- Joshi, H.N., 2007. Drug development and imperfect design. *Int. J. Pharmac.* 343, 1-3.
- Miller, R.J., Davey, R.B., George, J.E., 2002. Modification of the food and agriculture organization larval packet test to measure amitraz susceptibility against ixodidae. *J. Med. Entomol.* 39, 645-651.
- Lima, A.S., Sousa Filho, J.G.N., Pereira, S.G., Guillon, G.M.S.P., Santos, L.S., Costa Júnior, L.M. 2014. Acaricide activity of different extracts from *Piper tuberculatum* fruits against *Rhipicephalus microplus*. *Parasitol. Res.* 113, 107–112.
- Parmar, V.S., Jain, S.C., Bisht, K.S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O.D., Prasad, A.K., Wengel, J., Olsen, C.E., Boll, P.M. 1997. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* 46, 597-673.
- Rapado, L.N., Nakano, E., Ohlweiler, F.P., Kato, M.J., Yamaguchi, L.F., Pereira, C.A.B., Kawano, T., 2011. Molluscicidal and ovicidal activities of plant extracts of the Piperaceae on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *J. Helminthol.* 85, 66–72.
- Rapado, L.N., Lopes, P.O.M., Yamaguchi, L.F., Nakano, E. 2013. Ovicidal effect of Piperaceae species on *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* host. *Rev. Inst. Med. Trop.* 55, 421-424.

- Regasini, L.O., Cotinguiba, F., Passerini, G.D., Bolzani, V.S., Cicarelli, R.M.B., Kato, M.J., Furlan, M., 2009. Trypanocidal activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). *Rev. bras. farmacogn.* 19, 199-203.
- Salati, E., Santos, A.A., Lovejoy, T.E., Klabin, I., 1998. Porque Salvar a Floresta Amazônica ? INPA - Manaus, AM. 114 pp.
- Santos, T.R.B., Castro, N.A., Bretanha, L.C., Schuch, L.F.D., Freitas, R.A., Nizoli, L.Q., 2015. Estudo *in vitro* da eficácia de citronela (*Cymbopogon wynterianus*) sobre o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Sci. An. Health* 3, 135-149.
- Scott, I.M., Puniani, E., Durst, T., Phelps, D., Merali, S., Assabgui, R.A., Sánchez-Vindast, P., Poveda, L., Philogène, B.J.R., Arnason, J.T., 2002. Insecticidal activity of *Piper tuberculatum* Jacq. extracts: synergistic interaction of piperamides. *Agric. For. Entomol.* 4, 137-144.
- Silva, W.C., Martins, J.R.S., Souza, H.E.M., Heinzen, H., Cesio, M.V., Mato, M., Albrecht, F., Azevedo, J.L., Barros, N.M., 2009. Toxicity of *Piper aduncum* L. (Piperales: Piperaceae) from the amazon forest for the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 164, 267-274
- Stone, B.F., Haydoc, K.P., 1962. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). *Bull. Entomol. Res.* 53, 563-578.
- Trindade, F.T.T., Stabeli, R.G., Facundo, V.A., Cardoso, C.T., Silva, M.A., Gil, L.H.S., Silva-Jardim, I., Silva, M.A., 2012. Evaluation of larvicidal activity of the methanolic extracts of *Piper alatabaccum* branches and *P. tuberculatum* leaves and compounds isolated against *Anopheles darlingi*. *Rev. bras. farmacogn.* 22, 979-984.