

**EFICÁCIA *IN VITRO* e *IN VIVO* DE BIOTERÁPICOS E PRODUTOS NATURAIS
NO CONTROLE DE *Rhipicephalus microplus* (CANESTRINI, 1887) E SUA RELAÇÃO
COM O BEM-ESTAR ANIMAL**

BELO HORIZONTE

MARÇO-2014

Paula Pimentel Valente

**ESTUDO DA EFICÁCIA *IN VITRO* e *IN VIVO* DE BIOTERÁPICOS E PRODUTOS
NATURAIS NO CONTROLE DE *Rhipicephalus microplus* (CANESTRINI, 1887) E
SUA RELAÇÃO COM O BEM-ESTAR ANIMAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro/ ICB/ UFMG

Co-orientadores: Prof. Dr. Romário Cerqueira Leite/ EV/ UFMG

Prof^a. Dra. Rachel Oliveira Castilho/ FAFAR/ UFMG

BELO HORIZONTE

2014

043 Valente, Paula Pimentel.

Estudo da eficácia *in vitro* e *in vivo* de bioterápicos e produtos naturais no controle de *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887) e sua relação com o bem-estar animal [manuscrito] / Paula Pimentel Valente. – 2014.

162 f. ; il. ; 29,5 cm.

Orientador: Múcio Flávio Barbosa Ribeiro. Co-orientadores: Romário Cerqueira Leite, Rachel Oliveira Castilho.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. *Rhipicephalus microplus* - Teses. 2. Carrapato de bovino – Controle - Teses. 3. Produtos biológicos – Uso terapêutico – Teses. 4. Eugenol – Teses. 5. Bem estar animal. 6. Parasitologia – Teses. I. Ribeiro, Múcio Flávio Barbosa. II. Leite, Romário Cerqueira. III. Castilho, Rachel Oliveira. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 576.88/.89

“A grandeza de uma nação pode ser julgada pelo modo que seus animais são tratados”

(Mahatma Gandhi)

DEDICO

A todos os animais que possibilitaram a execução deste trabalho

À minha mãe Maria Cristina,

por todo apoio, amor incondicional, companheirismo e incentivo para a realização de mais um sonho!

Ao meu pai Paulo,

pela educação, apoio e conselhos nos momentos de dificuldade e dúvidas!

À minha irmã e sobrinho

Carla e Cauã,

pelo amor em nossas vidas!

Ao meu avô e Anna (*in memoriam*),

por terem influenciado, estimulado e iluminado meu caminho com os exemplos de generosidade, gentileza e alegria!

Aos demais familiares

Paulo, Meg, Claudio e Hugo,

pelo apoio e colaboração para a realização deste trabalho!

A Deus,

por iluminar todos os dias e todos os momentos da minha vida!

AGRADECIMENTOS

Ao professor Múcio Flávio Barbosa Ribeiro pela confiança, ensinamentos e oportunidade de aprendizado ao longo deste trabalho.

À professora Rachel Oliveira Castilho pela amizade, palavras de otimismo, dedicação e viabilização do desenvolvimento das formulações homeopáticas, extratos vegetais e substâncias isoladas no Laboratório de Fitoquímica, da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Ao professor Romário Cerqueira Leite pelos ensinamentos e viabilização da execução de procedimentos experimentais no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Escola de Veterinária, da Universidade Federal de Minas Gerais.

Às integrantes do Laboratório de Protozoologia Veterinária Camila Valgas Bastos, Júlia Angélica G. da Silveira, Bruna Torres Silvestre, Maria Mercês Cota Vasconcelos pelo apoio, convivência e amizade ao longo destes anos.

Ao professor Lívio Costa Junior e Sandra Araújo pela coleta e envio de amostras de plantas provenientes do Maranhão.

À Luisa Domingues pelo ensinamento, disponibilidade e treinamento das técnicas *in vitro*. Ao Daniel Sobreira Rodrigues pelo auxílio na obtenção de carrapatos para a realização dos testes *in vitro* realizados no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Escola de Veterinária, da Universidade Federal de Minas Gerais.

Aos médicos veterinários Arildo Pinto da Cunha, Gustavo Moreira, Arthur Prandi e Rodrigo Meneses pelo auxílio na contenção, manipulação e cuidado dos animais referentes ao primeiro experimento.

Ao professor André Faraco, Tatiana Gomes Ribeiro e Juçara Ribeiro Franca pela formulação do *pour on* no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Ao professor Luís Alberto do Lago e aos funcionários Juarez, Pitágoras e Marcelo pela colaboração para a realização de parte experimental, na Fazenda Modelo, em Pedro Leopoldo.

À Juliana Mendes Amorim pela colaboração e dedicação na formulação de extratos vegetais.

À funcionária Raquel por toda colaboração no Laboratório de Fitoquímica, da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Ao Ricardo Rosa, Arildo Pinto da Cunha, Ana Bello, Patrícia Bossi Leite, Tayanne Gouveia e Stéfanie Valgas pela amizade e convivência no Laboratório no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Escola de Veterinária, da Universidade Federal de Minas Gerais.

Aos professores Antônio Último de Carvalho e Elias Jorge Facury Filho pelo carinho, apoio e ensinamentos no transcorrer do experimento, na Clínica de Ruminantes da Escola de Veterinária, da Universidade Federal de Minas Gerais.

Aos pós-graduandos Gustavo Moreira, Rodrigo Meneses, Patrícia de Alencar Auler, Luciele Ferreira, Leandro Calixto, Moisés Freitas, aos residentes Marcella Gallegos e Ronaldo Alves Martins, aos estagiários: Marina Marliéri, Naiara Barcelos, Nathália Indiana de Sousa, Débora Schelemmer, Ana Carolina Werkena, Mayara Riva, Lidiany L. Gomes, Pedro Hugo H. Cunha, Paulo André de Melo, Diogo Jaber e ao funcionário Waguinho pelo apoio, auxílio e convivência no setor da Clínica de Ruminantes, da Escola de Veterinária, da Universidade Federal de Minas Gerais.

Ao estagiário Mateus Ferreira Serafini pela preciosa, diária e indispensável ajuda no experimento IV realizado na Escola de Veterinária, da Universidade Federal de Minas Gerais.

À estagiária Helena Mendes pelo auxílio nos exames hematológicos e leucocitários realizados no Laboratório Clínico, da Escola de Veterinária, da Universidade Federal de Minas Gerais.

À professora Fabíola de Oliveira Paes Leme pelos ensinamentos e viabilização da execução de análises laboratoriais. À pós-graduanda Carol, às residentes de Patologia Clínica Ana e Carla pela cooperação no Laboratório Clínico da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

Ao Programa de Pós-graduação do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) por possibilitar e auxiliar a realização deste trabalho. Às funcionárias Sumara Aparecida Guilherme, Sibeles Abreu e Tatiana Gomes Almeida pela colaboração, auxílio e carinho durante o período de pós-graduação no ICB.

À professora Elisabeth Ribeiro da Silva Camargos pelos ensinamentos na área de microscopia eletrônica de transmissão, no Centro de Microscopia, da Universidade Federal de Minas Gerais.

À funcionária Roberta Carvalho Assunção pela amizade, ajuda indispensável e dedicação nas análises de microscopia eletrônica de transmissão. E aos funcionários Natália Katley Oliveira pelo auxílio no processamento e ao Denilson Eduardo Silva Cunha pela visualização das amostras, no Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais.

À professora Marília Martins Melo do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais pelos ensinamentos e esclarecimentos na área de toxicologia das plantas.

Ao professor José Jurandir Fagliari e ao funcionário Paulo César da Silva pelo acolhimento e por viabilizar a realização de fracionamento eletroforético no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, Campus de Jaboticabal.

Aos professores Ângela Maria Quintão Lana e Ivan Barbosa Machado Sampaio pela orientação nas análises estatísticas realizadas neste trabalho. E ao funcionário Danilo Bastos pelo auxílio nesta etapa.

Ao farmacêutico Marcelo Sibata pela formulação do bioterápico injetável 30DH em Ribeirão Preto, S.P.

Ao Dr. Helcio José Gomes pelo profissionalismo, apoio, amizade e incentivo primordial que possibilitaram a execução e finalização deste trabalho.

Ao Dr. Flávio Cortês pelo auxílio e amizade durante a execução deste trabalho.

Aos amigos Laura Lúcia Oliveira, Luciana Serafim, Luciana Carneiro, Graciela Mazzei, Marcelo Rezende Luz, Flora D`Angelis pela amizade, carinho e apoio no desenvolvimento desse trabalho.

A todos os professores, funcionários e pós-graduandos do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas, pelos ensinamentos adquiridos durante os anos de convivência. Ao Sr Nery pelo companheirismo ao longo destes anos.

Aos funcionários da biblioteca e do transporte que auxiliaram na execução deste trabalho.

À Fazenda São João pelo fornecimento dos animais utilizados neste estudo.

Ao colega de trabalho e professor Rafael Paranhos de Mendonça pela ideia de um projeto com homeopatia e pelos esclarecimentos na área de controle de carrapatos.

A todos os professores que me ensinaram e inspiraram a trilhar no caminho da Homeopatia, Izaio Carneiro Soares (*in memorian*), Aloisio Cunha Carvalho, João Barbudo Filho, Silvana Mantovani, Nelson de Lucca, Rosa Maria Pereira (*in memorian*) e José Carlos Diniz da Gama.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

À CAPES pela concessão de bolsa de pesquisa.

RESUMO

O *Rhipicephalus microplus* causa perdas significativas à pecuária bovina e os prejuízos aumentam proporcionalmente ao desenvolvimento de resistência aos principais acaricidas. Neste cenário, a homeopatia e a fitoterapia têm despontado como possibilidades terapêuticas para o controle deste ixodídeo. Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de bioterápicos, realizar triagem de substâncias naturais bioativas contra *R. microplus* e avaliar eficácia em bovinos artificialmente infestados. Com esse propósito, quatro bioterápicos de *R. microplus*, catorze extratos vegetais da Flora Brasileira e três substâncias isoladas foram avaliadas. Na primeira etapa foi investigada a eficácia do bioterápico injetável na potência 30 DH em bezerros submetidos à infestação artificial. Na segunda foram avaliados três bioterápicos diferentes, de material vivo (MV), dessecado (MD) e calcinado (MC), dinamizados na potência de 6 CH (2×10^{-11} mg/mL) administrados por via oral à bezerros naturalmente infestados. Na terceira etapa foi pesquisada a atividade larvicida *in vitro* de extratos vegetais e substâncias isoladas contra *R. microplus* e foi realizado o teste de imersão de adultas (TIA) com a biomolécula que apresentou maior eficácia larvicida. Na quarta etapa, foi avaliado o efeito do bioterápico MV 6 CH e do eugenol a 5% *pour on* no controle de *R. microplus* associado ao estudo de aspectos hemáticos, leucocitários, bioquímicos, ultraestruturais e sua relação com o bem-estar animal. Nos experimentos com infestação artificial (primeira e quarta etapas) foram utilizados bezerros machos da raça Holandesa, com 8 meses de idade, sem prévio contato com carrapatos. A eficácia da formulação homeopática e do eugenol foi avaliada por meio de contagens de fêmeas ingurgitadas (\geq a 4,5 mm de comprimento), presentes no lado esquerdo dos bezerros. Fêmeas ingurgitadas foram coletadas para avaliação da oviposição, eficiência reprodutiva e percentual de eclodibilidade de larvas. O bioterápico injetável 30 DH administrado uma vez por semana a bezerros, mostrou eficácia acaricida de -12,5 a 63,3%, apenas com 6 aplicações. Os bioterápicos MV, MD e MC 6CH administrados por via oral, a bezerros naturalmente infestados, apresentaram eficácia média respectivamente de 33,0%, 25,8%, 27,5% e os valores de eficiência variaram de -50% até 74,7%, sendo que o maior valor foi obtido com o bioterápico MV. Na terceira etapa, os catorze extratos vegetais avaliados *in vitro* causaram mortalidade que variou de 0 a 40,3% em larvas de *R. microplus*, enquanto a substância isolada nerolidol 30% ocasionou mortalidade de 96,5% e o eugenol na concentração de 0,3% causou 100%. O TIA foi realizado com o eugenol nas concentrações 1, 2, 3, 5, 10, 20 e 30% e a partir de 5% mostrou inibição da

oviposição e eficiência acaricida de 100%. Na concentração de 30%, o eugenol resultou em mortalidade de 100% de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Na quarta etapa experimental, o valor de eficácia do bioterápico MV 6 CH variou de -33,3 a 95,2%, ressaltando que na última semana de tratamento a eficácia média foi 32,5%. A formulação homeopática objetiva produzir uma resposta do hospedeiro contra a infestação por *R. microplus*, utilizando o efeito secundário reacional, diferentemente do eugenol que é formulado pela farmacotécnica clássica e apresenta dose ponderal. A eficácia do eugenol a 5% *pour on* em bezerros variou de -66,6 a 53,5%. O bioterápico sugere inibição da eclodibilidade em 50% das larvas e eficiência de 45,8%, enquanto que, para o eugenol 5% *pour on* foi 12,0%, no 37º dia de tratamento. O bioterápico causou desorganização no exocóxon de oócitos durante a vitelogênese, demonstrando possibilidade de interferência na reprodução de *R. microplus*, enquanto que, para o eugenol *pour on* esta interferência foi baixa. O tratamento com eugenol a 5% *pour on* não causou alterações eritrocitárias, leucocitárias nem efeitos deletérios à função hepática e renal de bezerros. Os bezerros tratados com o bioterápico apresentaram aumento dos valores médios da proteína de fase aguda haptoglobina durante 48 horas após o início do tratamento e aumento global de leucócitos durante todo o período experimental diferentemente do grupo controle, sugerindo ação primária do bioterápico. Os valores médios de haptoglobina e α 1-glicoproteína ácida no 21º, 30º e 39º dias encontravam-se dentro dos parâmetros normais para a espécie bovina, enquanto, os valores médios de transferrina diminuíram no 30º dia após média infestação por *R. microplus*, demonstrando resposta de fase aguda e importância deste parâmetro no parasitismo por *R. microplus*. O bem-estar dos animais foi afetado nos três grupos devido à infestação por *R. microplus*, demonstrando a necessidade de análises mais específicas nos protocolos de bem-estar de bovinos em áreas endêmicas para este carrapato. E o grupo que apresentou menor percentagem de alterações no sistema tegumentar foi o grupo tratado com o bioterápico de *R. microplus* 6 CH. Melhorias na formulação do bioterápico MV 6 CH e estudos a campo por tempo prolongado devem ser realizados, por tratar-se de um produto que apresenta as vantagens de não contaminar o leite e a carne, nem causar impacto ambiental. Da mesma forma, o eugenol *pour on* na concentração 30% deve ser investigado em bovinos, pois apresentou alta eficácia contra larvas e fêmeas ingurgitadas nos testes *in vitro* e importante potencial para a formulação de produto ecologicamente correto no controle de *R. microplus*.

ABSTRACT

Rhipicephalus microplus causes significant losses of cattle livestock and increase in proportion to the development of resistance to the main acaricides. In this scenery, homeopathy and herbal medicine have appeared as therapeutic possibilities for tick control. This study aimed to develop biotherapies, to perform screening of bioactive natural substances against *R. microplus* and evaluate the efficacy in artificially infested cattle. For this purpose four biotherapies of *R. microplus*, fourteen plant extracts from Brazilian Flora and three isolated substances were evaluated. In the first step, was investigated the efficacy of injectable biotherapeutic 30 DH, in calves submitted to artificial infestation. In the second, was evaluated three different biotherapies of living (MV), dried (MD) and calcined (MC) material at the potency 6 CH (2×10^{-11} mg/mL) administered orally to naturally infested calves. In the third step, were investigated *in vitro* larvicidal activity of plant extracts and isolated substances against *R. microplus* and the adult immersion test (AIT) was performed with the biomolecule that showed the highest larvicidal efficacy. In the fourth step, the effect of biotherapeutic MV 6 CH and eugenol 5% *pour on* was evaluated for *R. microplus* control associated with the study of hematic, leukocyte, biochemical, ultrastructural aspects and its relationship with animal welfare. In experiments with artificial infestation (first and fourth steps) Dutch male calves were used, with 8 months of age and with no previous contact with ticks. The efficacy of homeopathic formulation and eugenol was evaluated by counts of engorged females (≥ 4.5 mm in length), present on the left side of the calves. Engorged females were collected for evaluation of oviposition, reproductive efficiency and hatchability larvae rate. Injectable biotherapeutic 30 DH administered once a week to calves showed acaricidal efficacy of -12.5 to 63.3% only with 6 applications. The biotherapies MV, MD and MC 6CH administered orally to naturally infested calves showed average efficacy respectively 33%, 25.8%, 27.5% and efficiency values that ranged from -50 to 74.7%, while the highest value was obtained with the MV biotherapeutic. In the third step, the fourteen plant extracts evaluated *in vitro* caused mortality rate in the *R. microplus* larvae ranging from 0 to 40.3%, while isolated substance nerolidol at the concentration of 30% occasioned 96.5% and 0.3% eugenol caused 100% of mortality. The AIT was performed with eugenol at concentrations 1, 2, 5, 10, 20 and 30% and since 5% showed inhibition of oviposition with 100% efficiency. The concentration of 30% resulted in 100% mortality of engorged *R. microplus* females. In the fourth experimental stage, the value of the efficacy biotherapeutic MV 6 CH ranged from -33.3% to 95.2%, emphasizing that the last week of treatment, the mean

efficacy was 32.5%. The objective of homeopathic formulation is to produce a host response against *R. microplus* infestation, using the secondary reaction, differently of eugenol which is formulated by classical pharmacotechnique and have ponderal dose. The efficacy of eugenol 5% *pour on* in calves ranged from -66.6 to 53.5%. The biotherapeutic suggest inhibition of larval hatchability in 50% and efficiency of 45.8%, whereas, for eugenol 5% *pour on* was 12.03% on the 37th day of treatment. The biotherapeutic caused disruption in oocytes exocórion during vitellogenesis, showing possible interference in the reproduction of *R. microplus*, while eugenol *pour on* resulted in low interference of oviposition. Treatment with eugenol 5% *pour on* caused no changes in erythrocyte, leukocyte or deleterious effects to hepatic and renal calves. Calves treated with biotherapeutic demonstrated higher average values of acute phase protein haptoglobin during 48 hours after the start of treatment and increase of leukocytes throughout the experimental period unlike the control group, suggesting the primary action of the biotherapeutic. The mean values of haptoglobin and α 1-acid glycoprotein in 21, 30 and 39 days were within the normal range for bovine parameters, whereas, mean value of transferrin decreased on 30 day after medium *R. microplus* infestation, demonstrating acute phase response and the importance of this parameter in *R. microplus* parasitism. The welfare of animals in the three groups was affected due to *R. microplus* infestation, demonstrating the need for more specific analyzes on cattle welfare protocols in endemic areas for this ticks. The group with the lowest rate of changes in the integumentary system was treated with the biotherapeutic of *R. microplus* 6 CH. Improvements in the formulation of the MV biotherapeutic 6 CH and studies in field conditions, for long periods should be performed, because this product has advantages of not contaminating milk and meat, neither cause environmental impact. Similarly, eugenol *pour on* at the concentration of 30% should be investigated in cattle, because it showed high efficacy against larvae and engorged in *in vitro* tests and significant potential for formulating ecofriendly product in the control of *R. microplus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Ciclo biológico de <i>Rhipicephalus microplus</i> (Ahid 2008).....	5
Figura 2- Bioensaio com larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> A- Impregnação dos papéis de filtro (2 x 2 cm) com bioterápico 30 DH e com água deionizada (controle) para realização do teste de pacote com larvas. B- Envelope identificado e vedado com canaletas contendo o conjunto composto por dois papéis de filtro impregnados e 100 larvas (técnica de Shaw).....	32
Figura 3- Bioensaio com larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> . A Leitura de Mortalidade. B- Bomba de vácuo e microscópio estereoscópico.....	32
Figura 4- Contagens médias totais de fêmeas de <i>R. microplus</i> presentes em bezerros dos grupos controle e tratados com bioterápico injetável 30 DH, do 21° até o 38° dia após a infestação artificial. Belo Horizonte, MG, 2010.....	39
Figura 5- Eletromicrografias do intestino de fêmea ingurgitada de <i>R. microplus</i> do grupo controle. A- demonstrando a presença dos hemossomos (H), vacúolos (V), membrana celular (MC) íntegra e microvilos. B- célula digestiva (CD), hemossomos (H) e microvilos (MV)...	42
Figura 6- Eletromicrografias do intestino de fêmea ingurgitada de <i>R. microplus</i> do grupo tratado com bioterápico injetável A- demonstrando integridade da membrana basal (MB), núcleo (N), mitocôndria (M) e retículo endoplasmático rugoso (RER) B- hemossomas (H), microvilos (MV) e vacúolos (V) C- núcleo (N), retículo endoplasmático rugoso (RER) e mitocôndria (M).....	43
Figura 7- Cromatogramas obtidos por CCD de gel de sílica das tinturas de <i>R. microplus</i> do material vivo (MV) e do material dessecado (MD). Revelador para terpenóides e fenólicos. A) Revelação com Lieberman-Burchard; B) Revelação com KOH; C) Revelação com AlCl ₃	51
Figura 8- Cromatogramas obtidos por CLAE-FR, para as tinturas de <i>R. microplus</i> com material vivo - MV (A) e dessecado - MD (B). Condições cromatográficas: Coluna C18 (LiChrospher®100, 125x4 mm I.D.; 5 µm); gradiente de eluição linear, A-B (95:5, v/v) a A-B (5:95, v/v) em 60 min H ₂ O (A) e acetonitrile (B); 40°C; 10 µL; λ 210 nm.....	52
Figura 9- Contagem média de fêmeas de <i>R. microplus</i> presentes no lado esquerdo de bezerros dos grupos I (MV), II (MD), III (MC) e IV (controle) do 4° até o 7° dia após o tratamento com os bioterápicos. Pedro Leopoldo, MG, 2011.....	54
Figura 10- Extração ácido-base do eugenol a partir do óleo de cravo.....	65
Figura 11- Contagens médias de fêmeas de <i>R. microplus</i> , maiores ou iguais a 4,5 mm de comprimento, presentes em bezerros dos grupos controle (GI), tratados com bioterápico 6 CH	

(GII) e com eugenol a 5% <i>pour on</i> (GIII) do 21° até o 41° dia após a infestação artificial. Belo Horizonte, MG, 2012.....	74
Figura 12- Contagens médias totais de fêmeas de <i>R. microplus</i> , \geq a 4,5 mm de comprimento, presentes em bezerros dos grupos controle (GI), tratados com bioterápico 6 CH (GII) e com eugenol a 5% <i>pour on</i> (GIII) do 21° até o 41° dia após a infestação artificial. Belo Horizonte, MG, 2012.....	74
Figura 13- Peso total de fêmeas de <i>R. microplus</i> , \geq a 4,5 mm de comprimento dos grupos I (controle), II (bioterápico 6 CH) e III (eugenol <i>pour on</i> a 5%). Belo Horizonte, MG, 2012...	80
Figura 14- Peso total da postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> , \geq a 4,5 mm de comprimento, dos grupos I (controle), II (bioterápico 6 CH) e III (eugenol <i>pour on</i> a 5%). Belo Horizonte, MG, 2012.....	80
Figura 15- Representação gráfica dos valores médios totais obtidos para hemácias (células x $10^3/\mu\text{L}$) em bezerros dos grupos I, II e III.....	83
Figura 16- Representação gráfica dos valores médios totais obtidos para leucócitos (células x $10^3/\mu\text{L}$) em bezerros dos grupos I, II e III.....	84
Figura 17- Representação gráfica das atividades séricas médias obtidas para a fosfatase alcalina (U/L) em bezerros submetidos ao tratamento tópico com o eugenol a 5% (GIII), Belo Horizonte, 2012.....	86
Figura 18- Representação gráfica das atividades séricas médias obtidas para a aspartato aminotransferase (U/L) em bezerros submetidos ao tratamento tópico com o eugenol a 5% <i>pour on</i> (GIII), Belo Horizonte, 2012.....	87
Figura 19- Representação gráfica dos valores médios obtidos para a creatinina sérica (mg/dL) em bezerros submetidos ao tratamento tópico com o eugenol a 5% (GIII), Belo Horizonte, 2012.....	87
Figura 20- Representação gráfica dos valores médios obtidos para a ureia sérica (mg/dL) em bezerros submetidos ao tratamento tópico com o eugenol a 5% (GIII), Belo Horizonte, 2012.....	88
Figura 21- Representação gráfica dos valores médios obtidos para a haptoglobina sérica (mg/dL) em bezerros submetidos ao tratamento oral com o bioterápico de <i>R. microplus</i> 6 CH (GII) durante 41 dias, Belo Horizonte, 2012.....	89
Figura 22- Representação gráfica comparativa entre as contagens de teleóginas e os valores médios de haptoglobina sérica (mg/dL) no 21°, 30° e 39° dias após a infestação artificial por <i>R. microplus</i> em bezerros do grupo II, Belo Horizonte, 2012.....	90

Figura 23- Representação gráfica dos valores médios obtidos para a α 1-glicoproteína ácida sérica (mg/dL) em bezerros submetidos ao tratamento oral com o bioterápico de <i>R. microplus</i> 6 CH (GII) durante 41 dias, Belo Horizonte, 2012.....	91
Figura 24- Representação gráfica comparativa entre as contagens de teleóginas e os valores médios de α 1-glicoproteína ácida sérica (mg/dL) no 21º, 30º e 39º dias após a infestação artificial por <i>R. microplus</i> em bezerros do grupo II, Belo Horizonte, 2012.....	91
Figura 25- Representação gráfica dos valores médios obtidos para a transferrina sérica (mg/dL) em bezerros submetidos ao tratamento oral com o bioterápico de <i>R. microplus</i> 6 CH (GII) durante 41 dias, Belo Horizonte, 2012.....	92
Figura 26- Representação gráfica comparativa entre as contagens de teleóginas e os valores médios de transferrina sérica (mg/dL) no 21º, 30º e 39º dias após a infestação artificial por <i>R. microplus</i> em bezerros do grupo II, Belo Horizonte, 2012.....	93
Figura 27- Eletromicrografias do oócito grau IV de fêmea ingurgitada de <i>R. microplus</i> dos grupos: A- controle (GI), B- bioterápico de <i>R. microplus</i> 6 CH (GII) e C- eugenol a 5% <i>pour on</i> (GIII). LB = lâmina basal, MP = membrana plasmática, Co = córion (exo= exocóron e end= endocóron), C = citoplasma, GV β = grânulos vitelogênicos grandes, GV = grânulos vitelogênicos, M = mitocôndrias, GL = grânulos lipídicos, RER = retículo endoplasmático goso.....	95
Figura 28- Eletromicrografias de oócitos de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> A- oócito grau IV do grupo controle, B- oócitos grau III do grupo bioterápico de <i>R. microplus</i> 6 CH. VG = vesícula germinativa, GV = grânulos vitelogênicos. Nota-se grande número dos grânulos lipídicos (estruturas arredondadas brancas) no grupo bioterápico característico dessa fase.....	95
Figura 29- Eletromicrografias de oócitos grau III de fêmea ingurgitada de <i>R. microplus</i> dos grupos: A- controle (GI), B- bioterápico de <i>R. microplus</i> 6CH (GII) e C- eugenol a 5% <i>pour on</i> (GIII). Nota-se desorganização no córion e mais especificamente no exocóron do GII (seta).....	96
Figura 30- Eletromicrografias de oócitos grau IV de fêmea ingurgitada de <i>R. microplus</i> dos grupos: A- controle (GI) e B- tratado com bioterápico de <i>R. microplus</i> 6CH (GII). Nota-se evidente desorganização no córion e mais especificamente no exocóron do GII (seta).....	96
Figura 31- Hiperemia dérmica em bezerro do grupo I, característica da reação inflamatória causada por metaninfas de <i>R. microplus</i> no 9º dia após a infestação artificial.....	99

Figura 32- Lesões nodulares no testículo de bezerro do grupo I no 37º dia após a infestação artificial por *R. microplus*.....100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Contagem individual, total e média de fêmeas de <i>R. microplus</i> e eficácia obtida em bezerros dos grupos controle e tratado com bioterápico injetável 30 DH, do 21° até o 38° dia após a infestação artificial. Belo Horizonte, MG, 2010.....	38
Tabela 2 - Peso total de fêmeas <i>R. microplus</i> (\geq a 4,5 mm de comprimento), peso da postura em gramas e percentual de eclodibilidade de larvas de <i>R. microplus</i> dos grupos controle (GI), tratado com o bioterápico 30 DH (GII).....	40
Tabela 3 – Gradiente de eluição empregado na obtenção dos perfis por CLAE-FR-DAD para as tinturas-mãe.....	47
Tabela 4- Contagem individual total e média de fêmeas de <i>R. microplus</i> em bezerros dos grupos I (MV), II (MD), III (MC) e IV (controle), no dia inicial e do 4° até o 7° dia após o tratamento com bioterápicos. Pedro Leopoldo, MG, 2011.....	54
Tabela 5- Valores médios de eficácia segundo Amaral 1993, adaptado de Roulston et al. (1968), dos grupos tratados com o bioterápico de material vivo (GI), material dessecado (GII) e de material calcinado (GIII) após 4 a 7 dias de tratamento. Pedro Leopoldo, MG, 2011.....	55
Tabela 6- Peso total de fêmeas <i>R. microplus</i> (Pt), peso da postura (Po) em gramas e percentual de eclodibilidade (ecl) de larvas de <i>R. microplus</i> dos grupos MV (GI), MD (GII), MC (GIII) e controle (GIV) do 4° ao 7° dia de tratamento.....	56
Tabela 7- Valores médios de eficiência segundo Drummond et al. (1973) dos grupos tratados com o bioterápico de material vivo (GI), material dessecado (GII) e de material calcinado (GIII) após 4, 5, 6 e 7 dias após o tratamento. Pedro Leopoldo, MG, 2011.....	57
Tabela 8- Formulação da solução eugenol a 5% <i>pour on</i>	67
Tabela 9- Valores totais e médios de contagens de fêmeas, \geq a 4,5 mm de comprimento, em bezerros dos grupos controle (GI), grupo tratado com bioterápico 6 CH (GII) e tratado com eugenol a 5% <i>pour on</i> (GIII) do 21° até o 41° dia após a infestação artificial. Belo Horizonte, MG, 2012.....	76
Tabela 10- Valores médios de eficácia, segundo Amaral (1993) adaptado de Roulston et al. (1968), dos grupos tratados com o bioterápico oral 6 CH (GII) e com a solução eugenol a 5% <i>pour on</i> (GIII) do 21° até o 41° dia após a infestação artificial. Belo Horizonte, MG, 2012.....	79

Tabela 11- Peso total de fêmeas <i>R. microplus</i> (\geq a 4,5 mm de comprimento), peso da postura em gramas e percentual de eclodibilidade de larvas de <i>R. microplus</i> dos grupos controle (G1), tratado com o bioterápico 6 CH (G2) e com eugenol a 5% <i>pour on</i> (G3).....	81
Tabela 12- Percentagens obtidas para as alterações observadas no princípio de bem-estar II, com base nos critérios conforto térmico e tecnopatias de bezerros dos grupos I, II e III.....	98
Tabela 13- Percentagens obtidas para as alterações observadas no princípio de bem-estar III, com base nas alterações do sistema tegumentar de bezerros dos grupos I, II e III.....	101
Tabela 14- Valores médios obtidos para atividades séricas da fosfatase alcalina (U/L), aspartato aminotransferase (U/L), ureia (mg/dL) e creatinina (mg/dL) em bezerros submetidos ao tratamento tópico com o eugenol a 5% (GIII), Belo Horizonte, 2012.....	136
Tabela 15- Valores médios obtidos para a haptoglobina (mg/dL), α 1-glicoproteína ácida (mg/dL) e transferrina (mg/dL) séricas em bezerros submetidos ao tratamento com o bioterápico de <i>R. microplus</i> MV 6 CH (GII), Belo Horizonte, 2012.....	137

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACN- acetonitrila
- AST- aspartato aminotransferase
- B.O.D.- Biochemical Oxygen Demand
- CCD- cromatografia em camada delgada
- CCS- contagem de células somáticas
- CLAE- FR cromatografia de alta eficiência em fase reversa
- CLAE- FR- DAD cromatografia de alta eficiência em fase reversa com detector de arranjos de iodo
- CETEA- Comitê de Ética em Experimentação Animal
- CG- Comatografia com fase gasosa
- CH- Centesimal Hahnemanniano
- CL- concentração letal
- D ou DH- escala decimal de Hering preparada segundo o método hahnemanniano
- DMSO- dimetilsulfóxido
- EDTA- ácido etilenodiaminotetra-acético di-sódico
- ER- eficiência reprodutiva
- eV- elétron Volt
- FAL- fosfatase alcalina
- FAAF- fator de atração, agregação e fixação
- g- grama
- GF- grupo fitoterapia
- GC- grupo controle
- °GL- graus Gay Lussac
- IL- interleucina
- ISO- International Organization for Standardization
- ITU- índice de temperatura e umidade
- Kg- quilograma
- M- molar
- m- metro
- MC- material calcinado
- MD- material dessecado

mg- miligrama
MG- Minas Gerais
min- minuto
mL - mililitro
mm- milímetro
MV- material vivo
 μ L- microlitro
 μ m- micrômetro
nm- nanômetro
NK- *natural killer*
^{NS}- não significativo
OMS- Organização Mundial de Saúde
p- peso
PO- puro por origem
RPM- rotações por minuto
TC- *Trypanosominum cruzi*
TR- tempo de retenção
v- volume
TIA- teste de imersão de adultas
TIL- teste de imersão de larvas
TNF- α – tumor necrosis factor alpha
TPL- teste do pacote com larvas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (CANESTRINI, 1887).....	3
2.2 Controle de <i>Rhipicephalus microplus</i>	7
2.3 Homeopatia.....	10
2.3.1 Homeopatia e Carrapatos.....	14
2.4 Fitoterapia.....	16
2.4.1 Fitoterapia e Carrapatos.....	18
2.5 Bem-Estar Animal.....	23
2.6 Proteínas de fase aguda.....	27
EXPERIMENTO I- Avaliação do efeito do bioterápico injetável 30 DH de <i>R. microplus</i> em bovinos em condições controladas de infestação e <i>in vitro</i>	30
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo geral.....	30
3.2 Objetivos específicos.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Processamento de bioterápico de carrapatos <i>R. microplus</i>	30
4.2 Bioensaio <i>in vitro</i>	31
4.2.1 Teste do pacote com larvas.....	31
4.2.2 Teste de imersão de adultas.....	33
4.3 Bioensaio <i>in vivo</i>	33
4.3.1 Animais.....	33
4.3.2 Metodologia experimental.....	33
4.3.3 Ação terapêutica do bioterápico em bezerros experimentalmente infestados com <i>R. microplus</i>	34
4.4 Bioensaio <i>in vitro</i> após o tratamento com bioterápico de <i>R. microplus</i>	34
4.4.1 <i>Performance</i> reprodutiva.....	34
4.5 Cálculo de eficácia do bioterápico em fêmeas ingurgitadas.....	35
4.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	35
4.7 Avaliação do Bem-Estar Animal.....	36
4.8 Análise estatística.....	36

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1 Bioensaios <i>in vitro</i>	36
5.2 Bioensaios <i>in vivo</i>	37
5.2.1 Avaliação clínica.....	37
5.2.2 Contagem de teleóginas.....	37
5.3 Bioensaio <i>in vitro</i> após o tratamento com bioterápico de <i>R. microplus</i>	40
5.3.1 <i>Performance</i> reprodutiva.....	40
5.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	41
5.5 Avaliação de Bem-Estar Animal.....	44
6. CONCLUSÃO.....	44
EXPERIMENTO II- Desenvolvimento de bioterápico oral e avaliação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> da atividade em <i>R. microplus</i> e em bovinos naturalmente infestados.....	45
7. OBJETIVOS.....	45
7.1 Objetivo geral.....	45
7.2 Objetivos específicos.....	45
8. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
8.1. Preparo das tinturas-mãe e dos bioterápicos na potência de 6 CH.....	45
8.2 Controle de qualidade das tinturas-mãe.....	46
8.2.1 Cromatografia de cadeia delgada (CCD).....	46
8.2.2 Cromatografia de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR).....	47
8.3 Bioensaios <i>in vitro</i>	47
8.3.1 Teste do pacote com larvas.....	47
8.3.2 Teste de imersão de adultas.....	47
8.4. Bioensaio <i>in vivo</i>	48
8.4.1 Animais	48
8.4.2 Metodologia experimental.....	48
8.4.3 Ação terapêutica dos bioterápicos em bezerros naturalmente parasitados por carrapatos.....	48
8.5 Bioensaios <i>in vitro</i> após o tratamento com o bioterápico de <i>R. microplus</i>	49
8.5.1 <i>Performance</i> reprodutiva e percentual de eclodibilidade.....	49
8.6 Cálculo de eficácia dos bioterápicos	49
8.7 Cálculo de eficiência reprodutiva (ER)	49
8.8 Cálculo de eficiência do bioterápico.....	49

8.9. Análise estatística.....	50
9. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
9.1 Análise cromatográfica.....	50
9.2 Bioensaios <i>in vitro</i>	52
9.3 Bioensaio <i>in vivo</i>	53
9.3.1 Achados clínicos.....	53
9.3.2 Contagem de teleóginas.....	53
9.4 Bioensaios <i>in vitro</i> após o tratamento com o bioterápico de <i>R. microplus</i>	55
9.4.1 Percentual de eclodibilidade e eficiência do bioterápico.....	55
10. CONCLUSÃO.....	57
EXPERIMENTO III- Atividade larvicida de produtos naturais contra <i>R. microplus</i>	58
<i>In vitro</i> acaricidal efficacy of plant extracts from Brazilian flora and isolated substances against <i>Rhipicephalus microplus</i> (Acari: Ixodidae).....	58
EXPERIMENTO IV- Avaliação do efeito do bioterápico de <i>R. microplus</i> 6 CH e do eugenol a 5% na formulação de <i>pour on</i> , em bovinos em condições controladas de infestação.....	66
11. OBJETIVOS	66
11.1 Objetivo geral.....	66
11.2 Objetivos específicos.....	66
12. MATERIAL E MÉTODOS.....	67
12.1 Preparo da solução eugenol a 5% <i>pour on</i>	67
12.2 Preparo do bioterápico de material vivo (MV) de <i>R. microplus</i> 6 CH	67
12.3 Bioensaio <i>in vivo</i>	67
12.3.1 Animais.....	67
12.3.2 Metodologia experimental.....	68
12.4 Exames clínicos e colheita de sangue.....	69
12.5 Ação terapêutica do bioterápico de <i>R. microplus</i> 6 CH e do eugenol a 5% <i>pour on</i> em bovinos experimentalmente infestados com <i>R. microplus</i>	70
12.6 Cálculos de eficiência reprodutiva, eficiência e eficácia.....	70
12.6.1 Cálculo de eficiência reprodutiva (ER).....	70
12.6.2 Cálculo de eficiência dos produtos.....	70
12.6.3 Cálculo de eficácia dos produtos.....	70
12.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	71
12.8 Avaliação do Bem-Estar Animal.....	71

12.9 Análise estatística.....	72
13. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
13.1 Bioensaio <i>in vivo</i>	73
13.1.1 Achados clínicos.....	73
13.1.2 Contagem de fêmeas de <i>R. microplus</i>	73
13.3 Bioensaio <i>in vitro</i>	80
13.3.1 <i>Performance</i> reprodutiva e Percentual de eclodibilidade	80
13.4 Achados hemáticos e leucocitários.....	83
13.5 Achados bioquímicos.....	85
13.6 Proteínas de fase aguda.....	89
13.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão	93
13.8 Avaliação de Bem-Estar Animal.....	97
13.8.1 Princípio I- Alimentação e ingestão de água.....	97
13.8.2 Princípio II- Instalações e conforto térmico.....	97
13.8.3 Princípio III- Boa saúde e alterações no Sistema Tegumentar.....	98
14. CONCLUSÃO.....	102
15. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	103
16. REFERÊNCIAS	104
17. ANEXOS.....	132

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

No Brasil as espécies de ixodídeos de maior importância incluem o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma cajennense* e o *Anocentor nitens*. O *Rhipicephalus microplus* é o ectoparasito mais disseminado no mundo que acomete preferencialmente os bovinos (Shaw 1966) e secundariamente outros animais domésticos e silvestres (Costa & Botelho 2011). Trata-se de um parasito temporário e sua sobrevivência depende de sua fixação e alimentação em hospedeiros vertebrados (Cupp 1991).

Em bovinos as doenças causadas por parasitos externos e internos constituem um dos principais problemas na bovinocultura brasileira (Bianchin et al. 1993; Grisi et al. 2002). Em praticamente todo o país há descrição de ocorrência do *R. microplus* em virtude do clima prevalente, tropical e subtropical úmido (Furlong 1993) sendo este, responsável por expressivas perdas na pecuária bovina, principalmente nas raças de origem européia (Francis 1966; Horn 1985, Jonsson 2006, Furlong et al. 2007).

O efetivo nacional de bovinos em 2011 chegou a 212,8 milhões de cabeças, com maiores concentrações no Centro-Oeste, Norte e Sudeste (IBGE 2012). A relevância dos prejuízos econômicos causados pelo *R. microplus* está associada à multiplicidade de efeitos negativos à produtividade tais como a perda de produção de leite, carne e couro (Galun 1975a), diminuição da qualidade de vida dos animais, além da transmissão das afecções babesiose e anaplasmose bovina (Francis & Little 1964; Horn 1985; Jonsson 2006). Outros danos que estão associados ao parasitismo do *R. microplus* incluem a anemia por hematófagia (Kitaoka & Yajima 1958), inflamação, irritação e lesão no local da picada (Galun 1975a; Tatchell & Moorhouse 1968), desconforto (Galun 1975a), imunossupressão (Inokuma et al. 1993), diminuição do apetite, debilidade, alteração no número de leucócitos sanguíneos e na concentração de proteínas (globulinas e albumina) (O'Kelly et al. 1971), redução da natalidade (Horn 1985), estresse, acidentes (Arantes et al. 1995), intoxicação pelo uso de acaricidas e morte (Galun 1975a; Horn 1985). Além destes prejuízos diretos, existem também os indiretos devido ao custo de aquisição de acaricidas, construção e manutenção de instalações para os banhos carrapaticidas, mão de obra (Sing et al. 1983) e tratamento das afecções que compõem o complexo da Tristeza Parasitária Bovina (Aragão 1936; Shaw 1966; Horn 1985; Arantes et al. 1995). Grisi et al. (2002) assevera que os prejuízos atribuídos aos ectoparasitos de bovinos podem ultrapassar o valor de 2 bilhões de dólares por ano e estão entre as principais causas da perda de produtividade no Brasil.

O bem-estar de animais de produção baseia-se inicialmente nas Cinco Liberdades, em que os animais devem estar livres de fome e sede; de desconforto; de dor, lesões e doenças; de medo e distresse e para expressar o comportamento normal da espécie (FAWC 1993). Os efeitos deletérios sobre o bem-estar animal podem ser oriundos de situações como: doenças, traumatismos, fome e sede prolongada, interações sociais estressantes, condições de alojamento, manejo, tratamento e transporte inadequados, mutilações variadas, dentre outras (Broom & Molento 2004).

O aperfeiçoamento das práticas de manejo associado ao controle de parasitos e à melhorias no bem-estar animal torna a pecuária bovina mais produtiva e economicamente rentável, por aumentar a qualidade dos produtos, evitar perdas e melhorar a qualidade de vida dos animais e dos funcionários envolvidos diretamente com a produção (Leeb et al. 2004; Oliveira et al. 2008; Sant`Anna & Paranhos da Costa 2010; Costa et al. 2013).

Os acaricidas são largamente utilizados para o controle de carrapatos no Brasil e fatores operacionais devido ao emprego de subdosagens e aplicação inadequada favorece o desenvolvimento de resistência aos princípios ativos mais utilizados (Nolan et al. 1979; Oliveira et al. 1986; Nolan 1990; Leite et al. 1995). A situação do controle quimioterápico do carrapato se caracteriza pela ineficácia e alto custo em virtude do aumento da dose e/ou da frequência de aplicação e também pela utilização cada vez maior de associações de bases químicas diferentes (Furlong et al. 2007). Avalia-se que os gastos com acaricidas para o controle de ectoparasitos no país seja de aproximadamente R\$ 800 milhões de reais por ano (Martinez et al. 2004). Estes fatores supracitados são responsáveis pela presença de resíduos químicos na carne e no leite (Willadsen et al. 1995) que vem sendo ingerido pelo homem (Tahori 1975; Galun 1975b; Maia & Brant 1980), além do acúmulo no meio ambiente que compromete a microfauna e a biodiversidade (Wall & Strong 1987).

Mediante este cenário, a homeopatia e a fitoterapia se constituem abordagens terapêuticas em evidência no controle do carrapato. A homeopatia, ciência terapêutica baseada na lei natural de cura *Similia similibus curentur*, designa que os semelhantes sejam curados pelos semelhantes (Kossak 2003a) e compreende igualmente os medicamentos denominados bioterápicos feitos a partir dos agentes causadores da doença, secreções, excreções, tecidos, parasitos e microrganismos (Almeida 2004). O objetivo é induzir uma resposta imunológica no hospedeiro (Nasi et al. 1994a; Kossak 2003a; Ferraz et al. 2011) e assim prevenir (Jonas & Willner 2000, Ferraz et al. 2011), controlar, tratar a doença ou impedir os efeitos deletérios do agente agressor (Ribeiro et al. 1987; Berchieri Jr. et al. 2006; Bellavite et al. 2006). Os bioterápicos de carrapatos têm sido investigados como alternativa no controle de animais

infestados por *R. microplus* (Veríssimo 1988; Almeida et al. 2008; Silva et al. 2008; Deffune & Oliveira 2009; Gazim et al. 2010, Costa-Júnior & Furlong 2011) devido ao baixo custo e por não deixar resíduos na carne, no leite e no ambiente (Mitidiero 2002; Almeida 2004; Berchieri Jr. et al. 2006; Real 2008), porém, os ensaios científicos são escassos e controversos na área.

Várias espécies vegetais produzem substâncias com atividades biológicas e são utilizadas com propriedades medicinais, repelentes, antimicrobianas e inseticidas. Biomoléculas ativas são identificadas com ação acaricida contra o *R. microplus* por meio de testes laboratoriais e cada vez mais vêm sendo alvo de estudos para o desenvolvimento de inseticidas ecologicamente corretos para a espécie bovina (Saito 2004). O histórico de que biomoléculas que apresentam alta eficácia *in vitro* mostram resultados variados e inferior em bovinos é significativo (Borges et al. 2005; Heimerdinger et al. 2006; Agnolin 2009; Gosh et al. 2013). Tal fato deve-se a diversos fatores como a instabilidade química da substância, as condições climáticas (Mulla & Su, 1999; Chagas et al. 2012), os fatores associados ao hospedeiro, a via de administração e a forma farmacêutica empregada. Portanto, são necessários experimentos de infestação controlada ou natural para a validação destes fitoinseticidas, mas em virtude do custo e da complexidade na execução, poucos vêm sendo conduzidos em bovinos (Jonsson 2004).

A ineficiência no controle dos carrapatos é uma realidade e um desafio para os pesquisadores e principalmente para os médicos veterinários. Objetiva-se neste estudo desenvolver bioterápicos de *R. microplus*, realizar triagem *in vitro* de substâncias naturais bioativas, desenvolver uma formulação *pour on* contra *R. microplus*, avaliar a eficácia destas substâncias em bovinos artificialmente infestados e estudar a sua interação com o bem-estar animal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887)

Acredita-se que a origem do *Rhipicephalus microplus* seja proveniente do sudoeste da Ásia, onde parasitava cervídeos e bovinos selvagens (Aragão 1936; Hoogstraal 1985). É um carrapato monoxeno da subordem Ixodides e o mais importante ectoparasito de bovinos na América do Sul. Parasita preferencialmente os bovinos, entretanto pode acometer outros

animais domésticos como equinos (Shaw 1966), asininos, caninos, caprinos, ovinos (Costa & Botelho 2011) e animais silvestres (Aragão 1936; Szabó et al. 2003; Costa & Botelho 2011).

A ocorrência e a dispersão de *R. microplus* em bovinos no país é favorecida por fatores climáticos e pela presença de raças sensíveis aos carrapatos, as raças europeias taurinas e seus cruzamentos. As regiões Sudeste e Centro-oeste do Brasil apresentam temperatura e umidade variadas, mas favoráveis ao desenvolvimento e sobrevivência do carrapato durante todo o ano, com quatro gerações anuais. Diferentemente da região sul que completa três gerações por ano, visto que, no período do inverno a fase não parasitária torna-se mais longa (Furlong 2005; Labruna 2008).

O ciclo biológico dos ixodídeos é completado passando pelos estágios de ovo, larva, ninfa e adultos. No ciclo biológico do *R. microplus* há duas fases, a de vida livre (em média dura 28 a 51 dias) e a parasitária (18 a 26 dias) (Figura 1). Para a fase de vida livre, na região Sudeste, é necessário em torno de três dias para a pré-postura; de três a seis semanas para a postura e de vinte e dois a trinta dias para a eclosão das larvas (Furlong 1993). Essa fase sofre interferências climáticas, especialmente da temperatura e umidade do ar. Nos períodos de temperatura e umidade mais baixas, principalmente entre os meses de abril a setembro, o seu ciclo de vida se prolonga. Nos meses de setembro a março, o desenvolvimento dos carrapatos é favorecido, apresentando ciclo de vida mais curto e conseqüentemente a infestação do gado é maior (Furlong 1993; Rocha 1998). Durante a fase de vida livre, o carrapato não se alimenta e mantém seu metabolismo a partir de reservas energéticas obtidas durante a fase parasitária.

Após a eclosão das larvas, ocorre o endurecimento da cutícula em dois a três dias e por volta do 6º dia tornam-se ativas e aptas a subir em direção à ponta do capim por geotropismo negativo, favorecendo o encontro parasito-hospedeiro (Sonenshine 1991; Furlong 1993). Por meio do odor da pele, vibrações, sombreamento, estímulo visual e exalação de gás carbônico, as larvas localizam e alcançam o hospedeiro (Sonenshine 1991). Quando a larva se instala no hospedeiro, inicia-se a fase de vida parasitária, pouco afetada pelas condições climáticas. As larvas de *R. microplus* tendem a se fixar no períneo, base da cauda, região interna dos membros torácicos e pélvicos, virilha, úbere, região escrotal e no interior das orelhas (Veríssimo 1993; Pereira & Labruna 2008) e alimentam-se preferencialmente de plasma e substratos teciduais (Furlong 1993). Possuem três pares de patas e sofrem ecdise após a alimentação, passando ao estágio de ninfa em sete a oito dias. As ninfas possuem placas espiraculares, quatro pares de patas, imaturidade sexual e se alimentam de linfa e sangue. Após alimentação sofrem ecdise e dão origem aos adultos, primeiramente aos machos e 24 a 48 horas depois às fêmeas. A fêmea logo se fixa no hospedeiro, enquanto o macho realiza a

cópula com várias fêmeas (Aragão 1936; Furlong 1993; Brito et al. 2006). A partir do 17º dia de infestação, após o acasalamento ocorre o rápido ingurgitamento da fêmea. Na fase parasitária são necessários em média de 18 a 26 dias para as etapas de fixação, alimentação, ecdises, cópula, ingurgitamento, desprendimento e queda das teleóginas no ambiente (Furlong 1993).

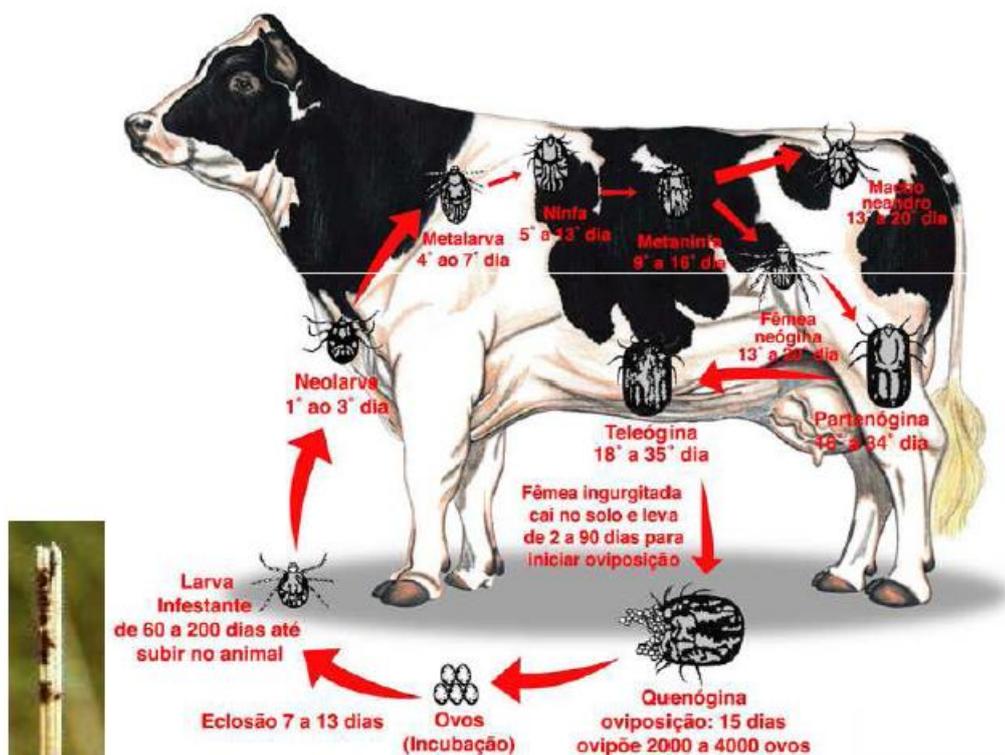


Figura 1- Ciclo biológico de *Rhipicephalus microplus* (Ahid 2008).

As fêmeas adultas ingerem sangue que constitui o principal alimento e cada teleóglia ingere de 300 a 500 μL nas últimas 24 horas, aumentando seu peso em até 200 vezes (Jonsson 2006). Após o desprendimento do hospedeiro, a fêmea de *R. microplus* procura por local apropriado (úmido e escuro) no meio ambiente e em três a seis dias inicia-se a postura e a cada postura uma fêmea produz de 2.000 a 3.000 ovos, que ao eclodirem darão origem a larvas (Furlong 1993).

Fatores como raça (Oliveira & Alencar 1987; Oliveira et al. 1989), grau de sangue (Oliveira & Alencar 1990), sexo (Oliveira et al. 1989), idade, comprimento do pelo, cor e espessura da pele, número de mastócitos cutâneos, número de anastomoses arteriovenosas na derme (Schleger et al. 1981), nutrição, gestação, lactação (Szabó 2008) e estação do ano (Oliveira et al. 1989) podem interferir na resistência dos bovinos às infestações. Porém, a raça tem sido evidenciada como o fator mais determinante na caracterização da resistência (Meltzer 1998;

Carvalho 2006). Roberts (1968) e Wagland (1975) descreveram que zebuínos e taurinos, sem contato prévio com o carrapato *R. microplus*, são igualmente suscetíveis à infestação primária por larvas desta espécie de ixodídeo. Após reinfestações, os bovinos desenvolvem células T e B de memória (Wikel 1996) e o nível de resistência torna-se maior quando comparado com o nível da primeira infestação, sugerindo a presença de resistência adquirida contra *R. microplus* (Roberts 1968; Wagland 1975; Galun 1975a; Wikel 1996). Os bovinos *Bos taurus taurus* (europeus) são mais sensíveis aos carrapatos do que os *Bos taurus indicus* (zebuínos) (Villares 1941), possuem 10,5 vezes mais carrapatos que os zebuínos (Francis & Little 1964; Labruna 2008) e diferença no perfil sérico de imunoglobulinas e anticorpos. Em altas infestações, bovinos da raça Holandesa naturalmente infestados apresentaram alta produção de IgE e diminuição brusca dos níveis de anticorpos IgG1 e IgG2 quando comparados com bovinos da raça Nelore (Carvalho 2006).

Gomes (1995) acredita que a resistência dos *Bos indicus* se deve à seleção natural, enquanto, De Castro, Newson (1993) e Meltzer (1998) sugerem que o fenótipo da resistência seja hereditário. Nos animais mais resistentes, o número de basófilos e eosinófilos e às vezes de neutrófilos é maior no local de fixação do ixodídeo (Ribeiro 1989; de Castro & Newson 1993; Franzin 2009). Constantinoiu et al. (2010) ao estudarem a pele de bovinos sensíveis e resistentes, encontraram o número de linfócitos T gamma-delta significativamente maior próximo ao local da picada de larvas de *R. microplus* em bovinos resistentes. A rejeição aos carrapatos é freqüentemente caracterizada por edema, prurido, reação papular e exsudação serosa (Brown et al. 1984). A hipersensibilidade cutânea induz o comportamento de lambertura, autolimpeza nos bovinos e impede a fixação de larvas (Veríssimo 1993), dificultando a alimentação e ingurgitamento de fêmeas adultas. Estas conseqüentemente apresentam peso menor, redução da ovipostura e da duração da fase parasitária (Rocha 1976; 1984).

O crescimento do rebanho e a expansão da pecuária bovina propiciaram maior agregação de animais, intensificação da pecuária e conseqüentemente maior infestação por carrapatos. A densidade animal média de bovinos na década de 50 era menor que 0,4 cabeça/ha/ano (Leite 1988) e no ano de 2010 passou para 1,44 cabeças/ha no Triângulo Mineiro (IBGE 2011).

Outros fatores que podem influenciar na maior infestação de bovinos por carrapatos é a coloração de pele e do pelo, pois influenciam no comportamento dos bovinos a pasto. Os animais de pelagem mais escura sofrem mais facilmente de estresse calórico e com maior frequência permanecem na sombra, local de preferência das larvas de carrapatos, ficando assim, mais infestados que os de pelagem clara (Oliveira & Alencar 1987).

Muitas lesões e problemas causados ao homem e aos animais podem ser atribuídos aos carrapatos, como: inflamação, prurido, edema e ulceração no local da picada, dermatoses, otocariase, anemia em animais altamente infestados, alterações metabólicas, toxemia, paralisia (Patarroyo Salcedo 1984; Brito et al. 2006), transmissão de patógenos (Aragão 1936; Shaw 1966; Patarroyo Salcedo 1984; Pereira & Labruna 2008), perda de peso e diminuição da produção (Galun 1975a; Horn 1995; Labruna & Veríssimo 2001; Jonsson 2006).

2.2 Controle de *Rhipicephalus microplus*

O Controle de carrapatos é fator indispensável para assegurar produtividade, benefícios econômicos e tornar a pecuária bovina uma atividade competitiva. Consiste na redução da exposição dos animais aos carrapatos em uma área específica durante um período determinado. Para a obtenção de um controle eficiente preconiza-se impedir o processo de alimentação, reprodução e/ou a oviposição de fêmeas de *R. microplus* (Furlong 1993; Brito et al. 2006).

Os métodos de controle do *R. microplus* podem ser aplicados tanto na fase de vida livre, visto que a grande maioria dos carrapatos (95%) encontra-se no ambiente, como na fase parasitária por meio do controle nos bovinos (Bittencourt 1992; Furlong 1993). O método que vem sendo mais utilizado atualmente baseia-se principalmente na aplicação de quimioterápicos e estes se dividem em carrapaticidas de contato e sistêmicos (Furlong 1993; George et al. 2004). Os carrapaticidas que atuam por contato direto pertencem a cinco famílias: organofosforados, amidínicos, piretróides sintéticos, fenilpirazóis e spinosad. Neste grupo ocorre a penetração do produto através da cutícula para que haja intoxicação e morte do carrapato. Os carrapaticidas sistêmicos são representados por dois grupos, as lactonas macrocíclicas e as benzofenilureas que são metabolizados, distribuídos pela circulação a todo corpo do animal, atingindo os carrapatos (Furlong et al. 2007). A ação destes compostos, em geral, é no sistema nervoso do carrapato, afetando os mecanismos de crescimento, neuropeptídeos e o sistema neuroendócrino (Taylor 2001). Entretanto, alguns destes carrapaticidas não podem ser utilizados durante a lactação, nem nos bovinos de corte antes de seis semanas do abate (George et al. 2004; Furlong et al. 2007).

O carrapato *R. microplus* tem desenvolvido progressiva resistência às classes de acaricidas ao longo dos anos. No Brasil, o primeiro relato foi de resistência aos arsenicais em 1946 (Corrêa 1953; Oliveira et al. 1986). Alguns anos depois houve resistência aos organoclorados (Freire

1953), em 1963 aos organofosforados (Wharton 1976), e posteriormente aos piretróides (FAO 1984) seguidos do amitraz no Rio Grande do Sul.

O aumento do uso de produtos à base de amitraz e de associações de piretróides com organofosforados no período compreendido entre 1996 a 2006, favoreceu a seleção de carrapatos *R. microplus* resistentes a estas substâncias no Rio Grande do Sul (Farias et al. 2008).

A resistência a piretróides foi relatada por Leite em 1988 no Rio de Janeiro, no ano seguinte no Rio Grande do Sul e posteriormente nos estados de São Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais (Farias 1994). Mais recentemente, na região Sudeste, Domingues (2011) avaliou populações de *R. microplus* provenientes de 25 fazendas na mesorregião do Triângulo Mineiro e do Alto Paranaíba e todas com exceção de uma, demonstraram-se resistentes à cipermetrina e ao clorpirifós. Semelhante estudo realizado por Mendes et al. (2011), em fazendas de seis diferentes regiões do estado de São Paulo, demonstrou alta ocorrência de resistência aos mesmos acaricidas citados por Domingues (2011) e à deltametrina. Devido às dificuldades no controle de carrapatos em função da resistência às principais bases químicas disponíveis, outras estratégias vêm sendo utilizadas (Furlong et al. 2007).

O controle estratégico foi implantado para o combate do carrapato dos bovinos levando-se em consideração as condições climáticas de cada região associada à ecologia do *R. microplus*. Esta ação promove diminuição de custos ao produtor por meio da redução no número de banhos aplicados anualmente, além de retardar o desenvolvimento da resistência (Oliveira 1993). Magalhães e Lima (1991) ao comparar a utilização do banho estratégico com o convencional na região de Pedro Leopoldo (MG), propuseram o controle de *R. microplus* com seis banhos de imersão a cada 21 dias, durante 126 dias, com início na segunda quinzena do mês de novembro, época em que as formas de vida livre são altamente influenciadas pela temperatura ambiente e apresentam períodos mais curtos de desenvolvimento. Furlong (1993) propôs de cinco a seis tratamentos carrapaticidas com intervalo de 21 dias realizados em dois períodos na região Sudeste, na primavera para atuar na geração mais longa e nos meses de janeiro a março para atuar na geração mais curta. Oliveira (1993) e Delgado (2002) propuseram seis tratamentos, respectivamente na região de Lavras e Entre Rio de Minas (MG) e em Campos das Vertentes e Sul de Minas, entre os meses de outubro a março, com intervalo máximo de 28 dias, considerando que 22 dias é a duração da fase parasitária e seis dias referente ao período de atividade residual média do produto carrapaticida. Mais tarde, Furlong et al. (2003), preconizaram que na região Sudeste e Centro-Oeste, o controle deveria iniciar na primavera, com cinco ou seis banhos de aspersão a cada 21 dias, ou três a quatro aplicações

de carrapaticidas *pour on* a cada 30 dias. E novas aplicações deveriam ser realizadas somente nos animais mais infestados que apresentassem 25 ou mais fêmeas ingurgitadas em um lado do corpo. Domingues et al. (2008), Leite et al. (2010) e Cunha (2011) indicaram tratamento durante o período de 120 dias, com banhos de aspersão em todo o rebanho sempre que forem observadas partenóginas em pelo menos um animal. O tratamento deve iniciar no mês de abril até julho na região Sudeste e fora deste período foi sugerido o controle tático, que consiste no tratamento somente dos animais mais parasitados ou novos no rebanho.

Desde o início do século XX pesquisadores têm documentado vários agentes com perspectiva de controlar biologicamente os carrapatos, incluindo patógenos, parasitoides e predadores dos ixodídeos (Jenkins 1964; Samish et al. 2000). O controle biológico está cada vez mais em evidência devido ao aumento da preocupação em relação à segurança ambiental, alimentar e à saúde humana e animal. Outros fatores corroboram com este fato, dentre estes as exigências do mercado moderno por produtos sem resíduos químicos que respeitem as boas práticas de manejo, o aumento da resistência dos carrapatos aos acaricidas e conseqüentemente o aumento dos gastos com produtos químicos onerando a produção (Samish et al. 2004).

Diversas medidas de controle biológico vêm sendo avaliadas no meio ambiente, assim como, a utilização de pastagens repelentes ou letais, como *Stylosanthes* spp, *Andropogon gayanus*, *Acalypha fruticosa*, *Gynadropsis gynandra* (Jonsson 2004), a utilização de ureia (Cunha et al. 2010) e o uso rotacional das pastagens que dificultam o acesso de larvas aos hospedeiros (Elder et al. 1980; Furlong 1998; Labruna & Veríssimo 2001). O tempo de descanso das pastagens no sistema de rotação deve ser acima de 60 dias para promover redução na contaminação das pastagens, e segundo Gauss e Furlong (2002) mais exatamente são necessários 82,6 dias nas pastagens de *Brachiaria decumbens*. Entretanto esse sistema mostra-se complexo devido à variação de sobrevivência de larvas expostas a diferentes condições de temperatura, umidade, tipo de vegetação e estação do ano.

Predadores naturais são considerados uma alternativa para o controle de carrapatos, como algumas espécies de pássaros (*Buphagus africanus*) (Stutterheim et al. 1988), formigas (*Solenopsis* spp.), aranhas armadeiras (*Phoneutria* spp.), tarântulas (*Lycosa erythognata*) (Rocha 1984), garça-vaqueira (*Egretta ibis*) (Alves-Branco et al. 1983) e moscas (*Megaselia scalaris*) (Andreotti et al. 2003).

Outra forma de controle que vem sendo utilizada para o controle de insetos e carrapatos é a tecnologia de incorporação de semioquímicos (Hamilton 1992; Sonenshine 2004; Borges 2004). Os semioquímicos funcionam como sinalizadores e nos carrapatos são classificados em três categorias: feromônios, alomônios, e cairomônios (Sonenshine 2004). Os feromônios

são secretados por um carrapato no meio externo e recebido por outro indivíduo da mesma espécie, interferindo no seu comportamento (Hamilton 1992). Foram identificados quatro tipos de feromônios nos carrapatos: de assembleia; de atração, agregação e fixação (AAF), sexual e iniciadores de reações fisiológicas (Sonenshine 2004). Vários estudos têm sido realizados com a utilização de semioquímicos isoladamente ou associados a acaricidas para o controle de carrapatos (Sonenshine 1985; Sonenshine et al 1985; Sonenshine 2004; Borges 2004). Exemplo disso é a utilização de feromônios AAF cuja função é atrair e agregar os carrapatos associado à pequena quantidade de quimioterápico com ação acaricida (Norval et al. 1996; Allan et al. 1998). Outra opção é a aplicação do feromônio de atração sexual no corpo do hospedeiro, de forma que a fêmea pela técnica do confundimento, não consegue localizar o macho, impedindo a cópula (Sonenshine 2004; Borges 2004).

Novas alternativas de controle vêm sendo estudadas, destacando-se a utilização de agentes microbianos, bactérias, fungos e nematóides entomopatogênicos (Jonsson 2004; Samish et al. 2004). A bactéria *Cedecea iapagei* utilizada no controle de *R. microplus* destrói o epitélio vaginal de fêmeas ingurgitadas (Brum & Teixeira 1992), o *Bacillus thuringiensis* destrói a parede intestinal (Sonenshine 1991), e os nematóides entomopatogênicos destroem a hemocele (Samish et al. 2000; Carvalho 2008). Os fungos *Metarhizium anisopliae* (Bittencourt 1992) e *Beauveria bassiana* (Bittencourt et al. 1995; Bittencourt et al. 1999; Silva & Bittencourt 2006) infectam e penetram através da cutícula causando diminuição da oviposição e morte de fêmeas ingurgitadas.

Os medicamentos homeopáticos (Veríssimo 1988; Silva et al. 2008; Gazim et al. 2010; Costa-Júnior & Furlong 2011), as vacinas (Willadsen 1997; de La Fuente 1998; Willadsen 2004; Parisi et al. 2009) e os fitoterápicos (Saito & Lucchini 1998; Roel 2001; Borges et al. 2003; Heimerdinger et al. 2006; Martins 2006; Olivo et al. 2009) também vêm sendo investigados como possibilidades terapêuticas para o controle de carrapatos *R. microplus*, além de minimizar os efeitos deletérios dos produtos químicos ao meio ambiente e aos animais.

2.3 Homeopatia

A homeopatia baseia-se na Lei dos Semelhantes que designa que semelhantes curam semelhantes (Kossak 2003a). A lei foi enunciada por Hipócrates no século IV a.c. e desenvolvida pelo médico alemão Christian Friedrich Samuel Hahnemann em 1796.

A experimentação no homem sadio e o uso de doses infinitesimais (medicamento dinamizado) preconizadas por Hahnemann constituem juntamente com a Lei dos Semelhantes

os princípios fundamentais da medicina homeopática (Avendaño 1991). Portanto toda substância atenuada que agir sobre o organismo sadio produzindo determinada sintomatologia pode curar, desde que o indivíduo apresente sintomas semelhantes.

Em 1840, o médico francês Benoit Mure foi quem provavelmente iniciou a pesquisa homeopática no Brasil estudando a patogênese de plantas e animais brasileiros (Pontin 2003). E posteriormente Wurmser (1957) descreveu a cinética das eliminações das doses infinitesimais na experimentação animal na França.

Os medicamentos homeopáticos têm origem nos três reinos da natureza (animal, vegetal e mineral), nos produtos químico-farmacêuticos, em materiais biológicos patológicos ou não, assim como, em outros agentes de diferentes naturezas (Farmacopeia 2011).

Os medicamentos são preparados a partir de substâncias submetidas a triturações sucessivas ou diluições seguidas de succussão (agitação ritmada), com finalidade preventiva ou curativa (ANVISA 2009). Por meio do processo de dinamização, a matéria-prima impregna as moléculas do álcool determinando as suas impressões energéticas, sem alterar a estrutura química original (Kossak 2003a).

A homeopatia visa produzir uma resposta do hospedeiro capaz de impedir ou eliminar o agente causador da doença (Vuaden 2008; Day 2008). Atua equilibrando a energia vital dos seres vivos, ou seja, a energia responsável pela homeostase das funções fisiológicas do organismo (Vuaden 2008).

No campo da experimentação foram realizados ensaios utilizando-se medicamentos homeopáticos com o objetivo de reverter quadros de intoxicação por metais tóxicos (Wurmser 1957; Cazin et al. 1987; Boiron 1985; Fontes et al. 2009). Wurmser (1957) foi um dos precursores, com o estudo das doses infinitesimais na cinética das eliminações utilizando o medicamento *Arsenicum album* em cobaias intoxicadas por bismuto-tartarato de potássio. Foram avaliadas as diferentes potências 4, 5 e 7 CH e todas demonstraram ser ativas na eliminação do bismuto, mas a 7 CH foi a mais eficaz. Outros pesquisadores nessa mesma linha de pesquisa, observaram que o medicamento *Phosphorus* 7 e 15 CH demonstraram efeito hepatoprotetor em ratos intoxicados com tetracloreto de carbono, pois reduziu precocemente a necrose focal dos hepatócitos e aumentou a mitose no grupo tratado em relação ao grupo controle (Bildet et al. 1984). Cazin et al. (1987) avaliaram a cinética de eliminação em ratos intoxicados com arsênico e que foram tratados com *Arsenicum album* 7 CH. Observaram que a concentração sanguínea foi significativamente menor nos animais tratados em relação aos do grupo controle, reafirmando os achados de Wurmser sobre a eficiência do medicamento.

A Farmacopeia Homeopática apresenta diversos medicamentos que agem na cura de doenças (Michaud 1998; Kossak 2003a) e na medicina veterinária homeopática são tratadas afecções agudas, crônicas e comportamentais. Na Alemanha, 90% dos veterinários utilizam medicamentos homeopáticos devido ao grande número de fazendas de criação orgânica existente no país (Rüdinger 1998). Em animais de produção as principais indicações para o tratamento homeopático são os casos de febre, mastite, diarreias, timpanismo, acetonemia, distocia, metrite, baixo índice de prenhez, baixa conversão alimentar, estresse, estereotípias (Arenales 2001; Mitidiero 2002; Almeida 2004; Honorato 2006; Vuaden 2008; Day 2008) e infestação por ectoparasitos (Arenales 2000; Silva et al. 2008; Deffune & Oliveira 2009; Gazim et al. 2010). Essa terapêutica não deixa resíduos tóxicos nos animais, não possui período de carência nem contraindicação ao uso em fêmeas gestantes e lactantes, garantindo o consumo do leite e derivados sem riscos à saúde humana e ao meio ambiente (Arenales 2000; Day 2008; Real 2008; Vuaden 2008). Além das vantagens supracitadas, a utilização da homeopatia pode beneficiar o bem-estar dos animais, visto que, trata o indivíduo na sua totalidade (Honorato 2006) e quando administrada na ração ou no sal mineral facilita o manejo associado ao tratamento de afecções (Arenales 2000; Real 2008).

A isopatia ou isoterapia é indicada no sentido de dessensibilizar um organismo com relação à determinada substância tóxica ou mesmo natural, mas em desequilíbrio no organismo (Kossak 2003b). É considerada uma terapêutica antiga e uma das mais notáveis inovações da homeopatia (Bellavite et al. 2005). O termo foi provavelmente criado pelo médico veterinário homeopata francês e professor da Universidade de Leipzig, Johann Wilhelm Lux, que em 1831 relatou o êxito do tratamento de dois animais, um equino com Mormo e um bovino com carbúnculo. No primeiro caso foi utilizada a secreção nasal do animal enfermo e no segundo o sangue, ambos diluídos e dinamizados na potência 30 CH (Kossak 2003a). Posteriormente, Lux utilizou isoterápicos (bioterápicos) para a cinomose e antraz com sucesso (Bellavite et al. 2005) e relatou que a técnica de diluição infinitesimal e dinamização de produtos contagiosos exercia ação terapêutica sobre os animais infectados. Posteriormente foi ampliada a aplicação dos bioterápicos para afecções alérgicas e não infecciosas. A lei de semelhança *Similia similibus curentur* da Homeopatia, na isoterapia tornou-se a lei dos iguais *Aequalia aequalibus curentur* (Real 2008).

Os bioterápicos, anteriormente denominados nosódios, são considerados medicamentos homeopáticos por serem preparados de acordo com a farmacotécnica homeopática (Almeida 2006). São medicamentos obtidos a partir de produtos biológicos, de culturas de bactérias, fungos, vírus, secreções ou excreções patológicas, ácaros, vermes (Benez 2002), tecidos e

órgãos patológicos ou não, alérgenos (Farmacopeia 2011), dentre outros, de origem animal ou vegetal. A base dos bioterápicos é eliminar os sintomas causados pelos agentes ou alérgenos empregando-se o próprio agente etiológico ultradiluído e dinamizado (Benez 2002; Bellavite et al. 2005; Almeida 2006; Day 2008).

Vários trabalhos experimentais foram conduzidos na área de parasitologia, com a utilização de bioterápicos a partir de células de cultivo de *Trypanosoma cruzi* no tratamento da doença de Chagas (Geraldino 1986; Ribeiro et al. 1987; Ribeiro et al. 1989; Lopes et al. 1994; Mendes et al. 1994; Nasi et al. 1994a; Ribeiro et al. 1994). O primeiro estudo foi realizado utilizando-se o bioterápico *Trypanosominum* TC D30 em pacientes com Doença de Chagas e foi observada melhora significativa dos sintomas na fase inicial e intermediária da infecção, demonstrando evidente ação do bioterápico nos órgãos lesados. Em relação à fase crônica, não foram observados resultados positivos (Geraldino 1986). Ribeiro et al. (1987) ao comparar índices de cura de camundongos infectados com as cepas Y e Bolívia de *T. cruzi* tratados com quimioterápicos (Nifurtimox e Benzonidazol) e bioterápico (*Trypanosominum* TC D30) observaram cura de 60% dos camundongos tratados com bioterápico e 35% para os quimioterápicos supracitados em relação à cepa Y. Para a cepa Bolívia o índice de cura foi de 52% dos camundongos tratados com bioterápico, 18% com o benzonidazol e sem efeito satisfatório para o Nifurtimox.

Nasi et al. (1994a) realizaram tratamento preventivo com o bioterápico *Trypanosominum* TC D30 em 60 camundongos albinos divididos em 4 lotes por um período de 10, 20 e 30 dias antes da infecção com a cepa Y de *T. cruzi* e foram comparados com o grupo controle. Observaram que nos grupos tratados durante 20 e 30 dias antes do desafio ocorreu maior grau de proteção contra a infecção chagásica, pois houve diminuição significativa da parasitemia e eliminação total dos parasitos em alguns animais.

Ferraz et al. (2011) avaliaram o efeito da administração de hemoterápico (bioterápico de sangue) com tripomastigotas de *T. cruzi* na potência 7 DH em camundongos experimentalmente infectados com *T. cruzi*. Nos animais que receberam o bioterápico 7 DH 7 dias antes da infecção foi observada diminuição do pico da parasitemia e da parasitemia total, sem aumento do tempo de sobrevivência dos animais. Porém quando administrado 30 dias antes da infecção, aumentou o pico de parasitemia, não aumentou a parasitemia total, mas com tendência a aumentar o tempo de sobrevivência. Os autores Nasi et al. (1994a) e Ferraz et al. (2011) sugeriram efeito modulador no sistema imune dos camundongos tratados com os respectivos bioterápicos de *T. cruzi*.

Almeida (2007) estudou o efeito do hemoterápico de *Trypanosoma evansi* 12 DH em camundongos experimentalmente infectados sendo que um grupo foi tratado antes (Bai) e outro depois da infecção (Bpi). O aumento precoce no número de linfócitos circulantes no grupo Bai e o aumento do título de IgG no grupo Bpi, sugerem efeito imunomodulador do bioterápico quando comparados com o grupo controle.

Pontin (2003) ao administrar o bioterápico de *Leishmania (Viannia) braziliensis* nas diluições 30 CH e 200 CH observou diminuição no tamanho das lesões de camundongos *Mus musculus* infectados experimentalmente em relação aos animais do grupo controle. E salientou a necessidade da experimentação *in vivo* para medicamentos homeopáticos, tendo em vista que os resultados só foram significativos mediante a utilização do sistema biológico.

O efeito imunomodulador das ultradiluições vem sendo citado em vários trabalhos com bioterápicos (Nasi et al. 1994a; Ribeiro et al. 1994a; Pontin 2003; Almeida 2007; Ferraz et al. 2011; Mamede 2012) e inclui aumento de substâncias citotóxicas e de anticorpos, estímulo à produção de células NK, ativação de macrófagos e mastócitos, liberação de histamina, degranulação de basófilos (Ribeiro et al. 1994; Nasi et al. 1994b; Mendes et al. 1994; Jonas & Dillner 2000), aumento de neutrófilos (Honorato 2006; Mamede 2012), macrófagos, monócitos (Mamede 2012) e linfócitos circulantes (Ribeiro et al. 1994b; Almeida 2007).

2.3.1 Homeopatia e Carrapatos

O Brasil é considerado pioneiro na formulação e utilização de bioterápicos de carrapatos na medicina veterinária para controlar a infestação de ixodídeos em bovinos, equinos e cães (Veríssimo 1988; Arenales 2000; Real 2008), porém, os ensaios científicos são limitados.

Veríssimo (1988) utilizou o bioterápico *carrapatinum* 6 CH diluído na água de beber de 13 bovinos mestiços leiteiros. Inicialmente o bioterápico foi administrado preventivamente por 15 dias e após esse período os animais foram artificialmente infestados com 20 000 larvas de *R. microplus* e tratados por mais 21 dias. Foi observada diferença significativa entre os grupos controle e tratado, mas insuficiente para eliminar as fêmeas ingurgitadas.

Silva et al. (2008) utilizaram 27 novilhas da raça Purunã naturalmente infestadas para avaliar o efeito do bioterápico de *R. microplus* 12 CH no controle de carrapatos. Os animais foram divididos em três grupos, sendo que o primeiro constituiu o grupo controle, o segundo foi tratado com amitraz (4 aplicações no verão com intervalo de 21 dias) e o terceiro foi tratado com o bioterápico comercial de *R. microplus* (C&MC®- Arenales Flora e Fauna) na potência 12 CH, misturado ao sal mineral durante 12 meses. As contagens foram realizadas a cada 14

dias e observaram diminuição significativa na contagem média de teleóginas por ano no grupo tratado com o bioterápico quando comparado com o grupo controle. Neste grupo, houve redução em 50% no número de fêmeas ingurgitadas e os animais demonstraram maior ganho de peso em relação aos demais grupos. Não foi observada diferença estatística nos parâmetros avaliados, entre os grupos tratados com amitraz e com o bioterápico 12 CH. Posteriormente, Deffune e Oliveira (2009) utilizaram bioterápicos de carrapatos e de bernes nas dinamizações 12 CH e 12 DH (Vitae Uberaba), no sal mineral de vacas leiteiras naturalmente infestadas, durante o mesmo período (12 meses) que Silva et al. (2008). E relataram semelhante diminuição nas contagens de carrapatos, mas não no controle de bernes. A redução foi de 46,5% nas contagens médias de teleóginas em relação ao grupo controle, mas não houve diferença significativa entre os grupos.

Gazim et al. (2010) avaliaram 34 fêmeas da espécie bovina, da raça Holandesa divididas em 2 grupos, sendo que o grupo controle recebeu sal mineral sem medicação e o grupo tratado recebeu sal mineral misturado ao bioterápico de *R. microplus*, inicialmente na dinamização 12 CH por 6 meses e posteriormente na 30 CH por 22 meses. O experimento foi conduzido durante 28 meses e no final deste período, as fêmeas ingurgitadas de ambos os grupos foram contadas, coletadas e pesadas para a realização de bioensaios *in vitro* e do cálculo da eficiência reprodutiva. No grupo tratado foram descritas diferenças significativas nos parâmetros: peso das fêmeas ingurgitadas, peso dos ovos, eclodibilidade das larvas e redução em 22% na eficiência reprodutiva em relação ao grupo controle. O menor percentual de eclodibilidade foi 50% no grupo tratado, enquanto no grupo controle permaneceu entre 80 a 95%, demonstrando interferência do bioterápico no ciclo de vida dos carrapatos *R. microplus*. Diferentemente dos resultados supracitados, Almeida et al. (2008) avaliaram os parâmetros biológicos de fêmeas adultas de *Amblyomma cajennense* alimentadas em coelhos tratados com bioterápico de *A. cajennense* 30 CH, durante 20 dias e não observaram efeitos significativos. Costa-Júnior & Furlong (2011) testaram o produto homeopático comercial (fator C&MC®- Arenales Flora e Fauna) em bezerros mestiços Holstein e Zebu (7/8), com 6 a 8 meses de idade sob infestação controlada com 8.000 larvas, 2 vezes por semana, durante 5 meses e observaram eficiência de 26% com a preparação homeopática.

Seguindo a Lei das diluições é preconizado que quanto mais se aproxima de um estado lesional, faz-se necessário utilizar baixas diluições e frequência de administração maior; as baixas diluições agem no plano orgânico e material. As diluições médias agem sobre o plano funcional e sintomático mediante frequência de administração diária. E as altas diluições agem sobre o plano sensorial e psíquico, em etiologias profundas e crônicas, pois atua sobre

reestruturações constitucionais e diatésicas com frequência de administração a cada 3 a 5 dias (Michaud 1998).

A homeopatia por seu custo reduzido, ausência total de toxidez tornou-se a medicina de escolha em rebanhos a nível populacional. A transformação da homeopatia de uso individual para o uso populacional é feita considerando o rebanho ou a propriedade como indivíduo único (Arenales 2001; Real 2008). Essa opção veio da necessidade de tratar vários animais com a mesma afecção e baseou-se na conduta de Hahnemann que tratou indivíduos em uma epidemia de escarlatina com o *Mercurius*, medicamento que apresenta patogenesia semelhante aos sintomas da afecção. A homeopatia populacional veio facilitar o manejo, levar a um número grande de animais os benefícios dos produtos homeopáticos e vem sendo utilizada no controle de carrapatos (Real 2008).

A homeopatia desperta incontáveis questionamentos para o pesquisador tanto em pesquisa básica, como em clínica (Bellavite 2000). E são inúmeras as possibilidades de pesquisa, principalmente em relação ao preparo dos bioterápicos (Almeida 2006), às diluições empregadas, qual matéria-prima utilizar, a forma e frequência de administração, duração do tratamento e local de ação do medicamento. Portanto, análises mais específicas devem ser realizadas com o objetivo de avaliar as ultradiluições e elucidar o mecanismo de ação do bioterápico de carrapatos.

2.4 Fitoterapia

O Brasil possui cerca de 20% das plantas existentes no planeta demonstrando grande biodiversidade vegetal. Por isso apresenta alto potencial de se transformar em um expoente para a obtenção de substâncias bioativas medicinais (Pott & Pott 1994), que venham a ser úteis nas áreas científica, tecnológica e comercial (Chagas 2004).

Há milhares de anos as plantas medicinais têm sido utilizadas com finalidades terapêuticas, possivelmente desde a época dos antigos romanos e seu uso popular vem sendo propagado de geração em geração até os dias de hoje. A partir do desenvolvimento da fitoquímica, foi possível o isolamento de princípios ativos de plantas e a utilização de frações e substâncias isoladas (Turolla & Nascimento 2006) descritas nas diversas farmacopéias.

Estima-se que a comercialização de fitoterápicos represente 7% do total de medicamentos comercializados no Brasil. Vários pesquisadores acreditam que a tendência é de crescimento do mercado em virtude do custo e da rapidez na produção do fitoterápico em relação aos compostos sintéticos (Jorge 2004). Apesar dessa visão predominante, Jonsson (2004) ressalta

que nem sempre os extratos vegetais são mais seguros e com menor custo de produção do que os produtos sintéticos.

Nos países em desenvolvimento, a Organização Mundial de Saúde (OMS) incentiva a pesquisa e recomenda a utilização de fitoterapia nos programas de assistência à Saúde da população, afirmando ser um método seguro e eficaz. Sabe-se que 80% da população de países em desenvolvimento utilizam práticas tradicionais e desse total, 85% fazem uso de plantas medicinais. No Brasil, não se sabe qual percentagem da população utiliza plantas ou fitoterápicos, mas, provavelmente seguem essa tendência (BRASIL 2009).

As plantas acumulam substâncias que podem ser biossintetizadas a partir do metabolismo primário ou secundário. Esses metabólitos podem possuir efeitos terapêuticos, tóxicos ou mesmo podem não possuir efeito biológico e/ou farmacológico. Os metabólitos primários são substâncias amplamente distribuídas na natureza, presentes em praticamente todos os organismos. Os metabólitos secundários são compostos derivados dos metabólitos primários, e que aparentemente não possuem relação com o crescimento e com o desenvolvimento da planta, mas garantem vantagens a sobrevivência das espécies e podem ser utilizados para fins medicinais, agronômicos e alimentares. São produzidos em quantidades menores que os metabólitos primários e tendem a ser sintetizados em estágios particulares de desenvolvimento da planta. Por esse motivo podem ser consideradas biomoléculas especiais e possuem valor econômico e comercial (Balandrin et al. 1985; Chagas 2004).

O estudo das plantas medicinais e seus extratos vegetais são de grande relevância, tendo em vista a utilização das substâncias ativas ou metabólitos secundários como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos sintéticos, adjuvantes e fitofármacos menos tóxicos e mais eficazes (Schulz et al. 2002).

Os produtos naturais apresentam diversas aplicações, dentre essas são usados como praguicidas, nematicidas e acaricidas. Os efeitos dos fitoinseticidas sobre os insetos são variáveis, desde repelência, redução da alimentação e da fertilidade, alteração do comportamento até a morte (Arnason et al. 1990; Bell et al. 1990).

Exemplos de metabólitos secundários de plantas com ação pesticida, utilizados comercialmente são a nicotina, a piretrina e a rotenona (Balandrin et al. 1985). As principais plantas estudadas com ação inseticida são do gênero *Nicotiana* (Solanaceae), *Derris*, *Lonchocarpus*, *Mundulea*, *Tephrosia*, (Leguminosae), *Cassia* (Fabácia), *Croton* (Euphorbiaceae), *Chrysanthemum* (Asteraceae) (Balandrin et al. 1985; Saito & Lucchini 1998) e a *Azadirachta indica* (Meliaceae) (Saito & Lucchini 1998; Vieira et al. 2000; Saito 2004).

O tabaco obtido da planta *Nicotiana tabacum* foi um dos primeiros inseticidas vegetais utilizados (Roel 2001) em função da ação tóxica da nicotina (Saito 2004) e vêm sendo investigado em bovinos naturalmente infestados no controle de *R. microplus* (Nogueira & Barci 2003; Meinrez et al. 2007; Olivo et al. 2009).

Das espécies do gênero *Derris*, *Lonchocarpus* e *Tephrosia*, conhecidas popularmente como timbós, a rotenona produzida por estas plantas apresenta atividade piscicida e inseticida, esta última com grande utilização na pecuária orgânica (Saito 2004).

Com o nome de piretro, são conhecidas algumas espécies do gênero *Chrysanthemum* (Saito & Lucchini 1998) que apresentam atividade inseticida, atribuída às piretrinas, cinerinas e jasmolinas (I e II); sendo a piretrina I a mais ativa. O estudo fitoquímico e o isolamento das piretrinas originaram moléculas sintéticas com maior efeito inseticida e mais estáveis que a original, denominada piretróides (Saito 2004).

Jonsson (2004) compilou alguns trabalhos com plantas que apresentaram atividade acaricida: *Artocarpus altilis* (Williams 1993), *Azadirachta indica* (Williams 1993; Kalakumar et al. 2000; Benavides et al. 2001), óleo da casca de *Citrus spp.* (Chungsamarnyart & Jansawan 1996), *Cleome hirta* (Ndungu et al. 1999), *Commiphora erythraea* (Carroll et al. 1989), *Gynandropsis gynandra* (Lwande et al. 1999), *Gutierrezia spp.* (Miller et al. 1995), *Margaritaria discoidea* (Kaaya et al. 1995), *Ocimum suave* (Mwangi et al. 1995), *Pimenta dioica* (Brown et al. 1998; Martinez-Velazquez et al. 2011a), *Stemona collinsae* (Jansawan et al. 1993), *Stylosanthes scabra* (Khudrathulla & Jagannath 2000) e *Tamarindus indicus* (Chungsamarnyart & Jansawan 2001). E concluiu com base nos resultados que as plantas *A. indica*, *Gutierrezia spp.*, *G. Gynandra* e *S. Collinsae* possuíam potencial para novos produtos, porém, ressaltou a necessidade de ensaios mais específicos quanto à eficácia, concentração efetiva a campo e custo-benefício da produção.

2.4.1 Fitoterapia e Carrapatos

Estudos com plantas têm sido conduzidos na tentativa de encontrar extratos, frações ou substâncias isoladas com propriedades acaricidas e este processo vem se intensificando nos últimos dez anos (Borges et al. 2011). Jonsson (2004) infere que a grande maioria dos bioensaios que avaliaram a eficácia de produtos naturais sobre os ixodídeos são investigações *in vitro*, que são poucos os realizados a campo ou em condições controladas e raros os estudos de toxicidade.

Várias são as vantagens da utilização de extratos vegetais em bovinos, dentre elas, a possibilidade de aplicação em fazendas que adotam a pecuária orgânica, obtenção de novas moléculas para o desenvolvimento de produtos sintéticos, rápida degradação, menor quantidade de resíduos ambientais e no alimento, além do desenvolvimento mais lento de resistência pelos carrapatos (Balandrin et al. 1985; Saito & Lucchini 1998; Chungsamarnyart et al. 1991; Roel 2001; Borges et al. 2011). Por outro lado, existem inseticidas botânicos registrados que apresentam toxicidade a peixes, mamíferos e insetos úteis ao meio ambiente e outros que são mais tóxicos ao homem quando comparados a moléculas sintéticas (Jonsson 2004). Por isso é necessário conhecer a toxicidade da biomolécula e ressaltar que a aplicação de fitoinseticidas não dispensa o uso de equipamento de proteção individual (Moreira et al. 2006). Quanto menor a dose letal 50 (DL50) mais tóxico é o produto ao organismo.

Extratos de diversas espécies de plantas foram avaliadas contra *R. microplus* e componentes acaricidas ativos foram identificados, mas poucos apresentaram alta eficácia acaricida e/ou interferência na reprodução de *R. microplus*. As plantas que merecem ênfase pela presença destes princípios ativos são a *Melia azedarach*, *Cymbopogon spp*, *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus staigeriana*, *Syzygium malacensis com Hesperozygis ringens*, *Cunila sp.*, *Dahlstedtia pentaphyla*, *Hypericum polyanthemum*, *Drimys brasiliensis*, *Annona muricata* (Borges et al. 2011), *Annona dioica* e *Simarouba versicolor* (Catto et al. 2009).

Os extratos de plantas com atividade acaricida contra o *R. microplus* apresentam intensidade e efeitos variados podendo causar mortalidade em um ou mais estágios do ciclo de vida parasitária, impedindo a oviposição ou eclosão. As larvas, ninfas e fêmeas adultas de *R. microplus* apresentam diferenças quanto à composição lipídica da cutícula, sendo que esta se encontra ausente em larvas, presente em ninfas e com quantidade progressivamente maior nas fêmeas adultas após a alimentação. Portanto, neste último estágio o controle é mais difícil, pois o produto deve ser lipossolúvel para dissolver os componentes da epicutícula e hidrossolúvel para passar para as camadas mais polares da cutícula (Hackman & Filshie 1982).

Testes de triagem *in vitro* são baseados nos estágios de vida livre do carrapato e podem ser realizados com larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* para a avaliação da eficácia dos fitoterápicos, frações e substâncias isoladas. Com larvas podem ser realizados o teste de pacote de larvas (TPL) e o teste de imersão com larvas (TIL). Enquanto que com fêmeas ingurgitadas é realizado o teste de imersão de adultas (TIA) para avaliar a suscetibilidade e percentagem de mortalidade aos produtos naturais. O TIA também possibilita avaliar a taxa de oviposição e de eclodibilidade de larvas entre fêmeas do grupo controle e do grupo tratado

para detectar se o princípio ativo tem ação sobre o sistema reprodutivo (Chagas et al. 2002; Chagas 2008; Klafke 2008).

Alta taxa de mortalidade em larvas de *R. microplus* foram obtidas com os extratos clorofórmico, hexânico de frutos maduros de *M. azedarach* a 0,25% com respectivamente 100% e 98% de mortalidade (Borges et al. 2003), diferentemente do etanólico que mostrou 50% de mortalidade. Os extratos hexânicos e metanólicos de *H. polyanthemum* (Ribeiro et al. 2007) e *Calea serrata* ambos a 0,625% (Ribeiro et al. 2008), os extratos etanólicos de *A. muricata* a 2% (Broglia-Micheletti et al. 2009) e o aquoso da casca de *S. versicolor* a 0,78% (Pires 2006) demonstraram 100% de mortalidade larval. Estudo conduzido por Nogueira e Barci (2003) utilizando o decocto de fumo de corda a 5% associado à cal virgem a 1,25% demonstrou mortalidade de larvas de *R. microplus* acima de 95%. Porém outros extratos vegetais demonstraram menor atividade larvicida, como o etanólico 1,25% (12,5 mg/mL) e aquoso 0,826% (8,26 mg/mL) de *Anadenanthera macrocarpa* respectivamente com mortalidade de 76,6% e 71,9% (Filho 2007).

Os extratos clorofórmico, hexânico e etanólico de frutos maduros da *M. azedarach* 0,25% mostraram inibição da eficiência reprodutiva de fêmeas de *R. microplus* respectivamente em 100%, 91,5% e 45,6% (Borges et al. 2003). A atividade dos extratos etanólico da raiz da *A. dioica* a 1% associado ao da casca verde da *S. versicolor* a 2,5% (Catto et al. 2009), aquoso da *S. versicolor* a 1,72% (17,2 mg/mL) (Pires et al. 2007) e etanólico de sementes de *A. muricata* a 2% (Broglia-Micheletti et al. 2009) mostraram 100% de interferência sobre a reprodução, enquanto o extrato de acetato etílico e hexânico de *Piper aduncum* 10% (100 mg/mL) (Silva et al. 2009) mostraram percentagens mais baixas, respectivamente 61% e 54%.

Escassos são os extratos que demonstram alta atividade acaricida sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, dentre estes, foi descrito o etanólico de *Dahlstedtia pentaphyla* a 20% (Pereira & Famadas 2006), o etanólico de *S. versicolor* a 20% (Catto et al. 2009) e o hexânico de frutos verdes de *M. azedarach* a 0,25% (Sousa et al. 2008) que causaram 100% de mortalidade. O extrato etanólico de *Glechon spathulata* a 2% (Buzatti et al. 2011), hidroalcolólico de *Eucalyptus* sp. a 10% (Costa et al. 2008) e o de *S. collinsae* a 50% (Jansawan et al. 1993) apresentaram percentagem de mortalidade semelhantes, 99%, 96% e 93% respectivamente, porém, neste último foi utilizado concentração mais alta. Outros extratos mostraram menor atividade sobre as fêmeas adultas de *R. microplus*, sendo 72% de mortalidade com o extrato aquoso de *Glechon spathulata* a 2% (Buzatti et al. 2011), 70 a 89% com o extrato aquoso e etanólico de frutos de *T. indicus* a 10% (Chungsamarnyart &

Jansawan 2001) e 62% com o extrato hexânico de *P. dioica* a 0,1% (1 mg/g) (Brown et al. 1998).

Os óleos essenciais têm merecido destaque, pois podem causar atração, repelência, toxicidade ou mortalidade de insetos, microrganismos e parasitos (Brown et al. 1998; Saito 2004; Isman & Machial 2006; Santoro et al 2007; Pasay et al. 2010). Algumas substâncias dos óleos voláteis que têm sido empregadas para o controle de insetos e microrganismos, são o citronelal (Chagas et al. 2002), os α - e β -pinenos, o nerol, o limoneno, o mentol, a piperina (Saito 2004), as substâncias sulfuradas do extrato do alho (Saito 2004; Costa-Junior & Furlong 2011), o carvacrol, o timol (Isman & Machial 2006; Martinez-Velazquez et al. 2011b; Cruz et al. 2013), o α -asarone (Ghosh et al. 2011), o geraniol (Chagas et al. 2012) e o eugenol (Brown et al. 1998; Saito 2004; Santoro et al. 2007; Marin 2008; Pasay et al. 2010).

Os óleos essenciais de *C. winterianus* na concentração de 5,5% e 7,14% (Martins 2006), de *E. staigeriana* 10%, *Eucalyptus globulus* 20%, *E. citriodora* 10% (Chagas et al. 2002; Ribeiro et al. 2010), *H. ringens* 0,0625% (Ribeiro et al. 2010), *Cunila angustifolia*, *Cunila incana* 2,5 μ L/mL, *C. spicata* 0,5% (5 μ g/mL) (Apel et al. 2009), *Cuminum cyminum* 1,25%, *P. dioica* 2,5% (Martinez-Velazquez et al. 2011a), *Piper aduncum* 0,01% (Silva et al. 2009) e *Lippia alba* 3% (Lima et al. 2012) mostraram-se eficazes para larvas de *R. microplus* com mortalidade de 100%. E a eficácia larvicida do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* a 20% foi inferior, mostrando mortalidade de 85% para *R. microplus* (Martinez-Velazquez et al. 2011b).

O óleo essencial de *C. winterianus* na concentração de 7,14% mostrou inibição total da eclodibilidade (Martins 2006), o de *C. nardus* a 1% inibiu 92,1% (Olivo et al. 2008), enquanto o de *H. ringens* na concentração de 5% (50 μ L/mL) inibiu 95% da eclodibilidade de larvas (Ribeiro et al. 2010), mostrando ação dos óleos essenciais no sistema reprodutivo destes ixodídeos.

Para fêmeas ingugitadas, os óleos essenciais de *E. staigeriana* na concentração de 15%, *E. globulus* 10%, *E. citriodora* 25% mostraram eficácia de 100% (Chagas et al. 2002), enquanto o de *Lippia gracilis* (LGRA- 201) a 0,887% (8,87 mg/mL) (Cruz et al. 2013) e o óleo de citronela a 10% (Olivo et al. 2008) mostraram respectivamente 90% e 81% de mortalidade.

Apesar do grande número de extratos vegetais identificados com atividade para *R. microplus*, são reduzidos os que demonstraram alta eficácia acaricida em bovinos a campo e raros os experimentos com óleos essenciais *in vivo*. A diferença de eficácia dos extratos vegetais observada nos testes *in vitro* e *in vivo* deve-se à degradação do princípio ativo devido a instabilidade da molécula na presença de luz, variações de temperatura, pH e degradação

microbiana (Mulla & Su, 1999; Chagas et al. 2012) e nos óleos essenciais particularmente devido a rápida volatilização (Isman & Machial 2006). Por outro lado, a alta volatilidade e ação local dos óleos essenciais são características vantajosas, pois diminuem a toxicidade e a manutenção de resíduos no ambiente (Isman 2000).

Borges et al. (2005) avaliaram a eficácia do extrato hexânico de frutos maduros de *M. azedarach* a 0,25% em bezerros artificialmente infestados por *R. microplus* e obtiveram eficácia de -1,6 a 63,6% (eficácia média 27,3%), demonstrando baixa ação acaricida. Sousa (2008) avaliou o concentrado emulsionável do extrato hexânico de frutos verdes de *M. azedarach* em diferentes concentrações, em fêmeas mestiças holandês-zebu, artificialmente infestadas e obtiveram eficácia diária superior variando de -46,7 a 82,6% para a concentração 0,25% e -16,6 a 89% para a concentração 0,5%. O extrato hexânico de frutos verdes de *M. azedarach* mostrou efetividade 1,49 vez maior que o de frutos maduros.

Posteriormente Sousa et al. (2011) avaliaram o concentrado emulsionável do extrato hexânico de frutos verdes de *M. azedarach* a 0,25 e 0,5 %, *Beauveria bassiana* ($2,4 \times 10^8$ conídios) e a associação do concentrado emulsionável a 0,25% com *Beauveria bassiana* ($2,4 \times 10^8$ conídios) em fêmeas mestiças Holstein-zebu, artificialmente infestadas. As eficácias médias foram 14,7%, 31,6%, 9,2% e 39,7% respectivamente, mostrando melhor resultado no controle de *R. microplus* para a associação entre o concentrado de *M. azedarach* a 0,25% e *Beauveria*.

Pereira e Famadas (2006) utilizaram extratos de *D. pentaphylla* 10%, em novilhas holandesas artificialmente infestadas por *R. microplus* e obtiveram a máxima eficiência de 76,1% no terceiro dia após a aplicação, enquanto no 7º dia a eficiência foi 68,1%.

Meinrez et al. (2007) avaliaram a eficácia do extrato aquoso de fumo de corda a 5% associado a cal extinta a 2% no controle de teleóginas em bovinos leiteiros naturalmente infestados e obtiveram 62,4% de mortalidade. Enquanto, Olivo et al. (2009) com o extrato aquoso a 1,25% observaram eficácia de 77,5% aos 14 dias após o tratamento, com banhos de aspersão durante três dias consecutivos.

Outros pesquisadores obtiveram eficácia menor, como Moyo et al. (2009) que utilizaram o extrato de *Lantana camara* a 40%, em bovinos infestados por *R. microplus* e obtiveram eficácia de 57%. E Zaman et al. (2012) que avaliaram o extrato composto (frutos de *A. indica*, frutos de *N. tabacum*, flores de *Calotropis pacera* e sementes de *Trachyspermum ammi*) em diferentes concentrações (15, 30, 45%). Na concentração de 45%, observaram que houve redução de 46,9% no número de fêmeas ingurgitadas, no 6º dia após a aplicação.

Com a utilização dos óleos essenciais no controle de *R. microplus*, os resultados obtidos por Heimerdinger et al. (2006) e Agnolin (2009) foram semelhantes. Os primeiros autores

testaram a eficácia de extratos alcoólicos de *C. citratus* em diferentes concentrações, em bovinos da raça Holandesa, naturalmente infestados. E observaram que a solução contendo 2,72% reduziu a infestação em relação ao grupo controle em 40,33%, 46,56% e 41,46%, respectivamente, no 3º, 7º e 14º dias pós-tratamento. Enquanto, Agnolin (2009) testou o óleo de citronela 4% em vacas holandesas e a eficácia foi de 40%, 41,5% e 35,8% respectivamente nos dias 3, 7 e 14 após o banho de aspersão.

Ainda que os resultados a campo sejam inferiores aos ensaios laboratoriais, a eficácia de várias biomoléculas provenientes de produtos naturais tem se mostrado superior a de muitos produtos sintéticos, em virtude do desenvolvimento da resistência de *R. microplus* aos carrapaticidas. Por esse motivo é importante adotar metodologias de manejo com reaplicações adequadas à atividade acaricida de cada planta (Pereira & Famadas 2006).

É fundamental a realização de pesquisas voltadas para a busca e identificação de novas substâncias eficientes contra *R. microplus*, estáveis no meio ambiente, economicamente viáveis e cuja via de administração e manejo sejam facilitados para aplicação na pecuária bovina.

2.5 Bem-Estar Animal

Bem-estar animal é definido por Broom (1986) como o “estado de um organismo em relação às tentativas de enfrentar as condições de seu ambiente”, envolvendo situações de adaptação, equilíbrio ou de risco e quanto maior o desafio ao qual o animal é submetido, mais difícil é a adaptação deste à nova condição, resultando em menor grau de bem-estar (Broom & Molento 2004; Bond et al. 2012). O conceito de bem-estar não se restringe ao conceito simplificado de “estar bem” (Sant`Anna & Paranhos da Costa 2010), trata-se de uma característica mais ampla, individual e variável de acordo com a faixa etária e a espécie. Está relacionado com todos os aspectos referentes ao ambiente, incluindo respostas fisiológicas, neuroendócrinas e comportamentais (Broom 2008).

As cinco liberdades são o ponto de partida para garantir bem-estar aos animais de produção, mas há necessidade de aprofundamento e identificação dos pontos relevantes que interferem na qualidade de vida, conforto e bem-estar dos animais (Cerqueira et al. 2011). O bem-estar pode ser avaliado mediante diferentes enfoques, como: a expectativa de vida e mortalidade do rebanho; taxa de crescimento, de reprodução e de produtividade; presença e severidade de dor; percentagem de animais com lesões, doenças, alterações comportamentais e estereotípias no rebanho.

O conforto dos animais significa produtividade, enquanto a ausência dele interfere de forma negativa, pois diminui o consumo de matéria seca, a taxa de fertilidade e propicia o aparecimento de afecções (Bach et al. 2007) que culminam em menor produção e perda econômica. Os aspectos que vêm sendo utilizados para avaliar o conforto em função das instalações e do tipo de manejo são os valores de temperatura e umidade, presença de abrigo, de sombreamento, espaço físico, tipo de piso, presença e tipo de cama, qualidade do ar e água, dieta nutritiva, ganho de peso, ausência de dor (Pires et al. 2010), ausência de parasitos (Rousing et al. 2000), doenças, injúrias, agressividade (Sant`Anna & Paranhos da Costa 2010) e os efeitos da interação homem-animal (Rosa & Paranhos da Costa 2001; Pires et al. 2010).

O manejo a que os animais são submetidos, independentemente do tipo de sistema adotado, deve garantir conforto e bem-estar. Acredita-se que os sistemas de produção extensivos garantam mais bem-estar, pois permite espaço físico, expressão do comportamento natural da espécie e liberdade de movimentação; enquanto os sistemas intensivos privam essas atividades (Leeb et al. 2004) e estão mais distantes do ambiente natural (Molento 2012). Por outro lado, alguns pastos podem ser inadequados pela ausência de alimento, de abrigo, de sombreamento, de medidas de controle de afecções ou pela presença de predadores (Leeb et al. 2004). Von Keyserlingk et al. (2009) enfatizaram a necessidade de mudanças e aperfeiçoamento no sistema de criação de bovinos integrando três questões: saúde, conforto e manutenção do ambiente natural. Porém, ressaltaram que mudanças que criam deficiências graves são piores aos animais. Exemplo disso ocorre ao favorecer o acesso ao pasto para bovinos de leite propiciando a movimentação dos animais, mas com radiação solar excessiva em virtude da falta de sombreamento (von Keyserlink et al. 2009); ou mesmo, a criação de bezerros em grupos, favorecendo a liberdade de expressar o comportamento natural, mas com exposição a microrganismos patogênicos provocando alta morbidade e mortalidade (Quigley 2002). Paranhos da Costa (2000) destaca a importância de conhecermos a biologia do bovino e Molento (2012) reafirma a necessidade de mais pesquisas sobre o que de fato são necessidades e prioridades para cada espécie animal. Atualmente, sabe-se que o animal se mantém em melhor condição de bem-estar quando possui acesso à água e alimento de boa qualidade, proteção contra predadores, frio, calor e sol, presença de bom sistema de ventilação, vacinação contra doenças endêmicas, vermifugação, controle de ectoparasitos (Broom 2008) e de tratamento adequado, quando necessário. Entretanto, alguns problemas surgem com a intensificação da pecuária bovina, com a realização de mutilações de rotina sem anestesia, aumento da produção acima das possibilidades de cada animal, presença de ferimentos, claudicação pela inadequação das instalações (tecnopatias), agressões por

superpopulação, estereotípias por tédio e uso frequente de antibióticos devido à exposição constante a microrganismos patogênicos.

A alta densidade populacional ou manejo inadequado resulta em estresse social aos animais de produção, que conseqüentemente afeta o desenvolvimento, os índices produtivo e reprodutivo, influenciando diretamente na qualidade da carne e do leite e diminuindo o bem-estar (Broom & Fraser 2010; Pires et al. 2010; Gómez-Laguna et al. 2011).

Os maiores problemas de bem-estar encontrados em bovinos de leite são a ocorrência de mastite, afecções de casco, infertilidade, tecnopatias, alterações comportamentais e as deficiências nutricionais (Broom 2008; Bond et al. 2012). No Brasil, a infestação por carrapatos *R. microplus* também constitui um problema de bem-estar (Costa et al. 2013), visto que, a irritação e o prurido na pele resultam em inflamação, desconforto, aumentam o risco de infecções secundárias e causam dor no local lesionado (Rousing et al. 2000). Além destes aspectos supracitados, podem causar anemia, diminuição de peso e da produção de leite, redução da qualidade do couro e transmissão das afecções anaplasmose e babesiose bovina que podem levar o animal a morte (Francis 1966).

Para a identificação e quantificação do bem-estar animal, há uma série de indicadores e protocolos que vem sendo utilizados. Os indicadores baseiam-se em informações e medidas obtidas no ambiente e no próprio animal (Sant`Anna & Paranhos da Costa 2010). Atualmente há preferência para a avaliação de parâmetros que mantêm o foco principal nos animais mediante aspectos fisiológicos, patológicos e etológicos (Cerqueira et al. 2011).

O protocolo Welfare Quality foi desenvolvido para avaliar o bem-estar na espécie bovina, elaborado por 40 entidades e pesquisadores de institutos de 17 países e vem sendo adotado pela Comunidade Europeia. Constitui um guia para a avaliação e pontuação do bem-estar nos sistemas de produção (Molento 2012) e baseia-se em 12 critérios agrupados em quatro princípios, que são independentes entre si, mas se complementam (Welfare 2009). O primeiro deles visa à manutenção da boa alimentação dos animais pela ausência de fome e sede prolongada, avaliado mediante a disponibilidade, a limpeza de comedouros e bebedouros e o escore corporal. O segundo visa à utilização de instalações adequadas que garantam conforto térmico, higiene e qualidade de instalações. Para avaliar o conforto térmico quantifica-se o tempo que os animais permanecem deitados, enquanto para a avaliação da higiene é feito o escore de sujidade dos animais. A qualidade das instalações é monitorada por meio de parâmetros como tamanho, densidade, facilidade de movimentação dos animais, lesões em decorrência da estrutura física e a possibilidade de acesso à área externa ou pasto. O terceiro princípio visa monitorar alterações clínicas, como a identificação da presença ou ausência de

tosse, secreção ocular e nasal, dificuldade respiratória, timpanismo rumenal, diarreia, claudicação, alterações dermatológicas (edema e alopecia) e mortalidade. Além destas alterações também é avaliada a ausência de dor em função de procedimentos mutilantes; descorna, corte de cauda e castração. O quarto princípio consiste na identificação do temperamento, na presença de estereotípias e na interação homem-animal (Welfare 2009). O estado de bem-estar animal é quantificado mediante a escala de pontuação do Welfare Quality e pode variar de excelente, bom, regular (aceitável) e péssimo (inaceitável).

Outros protocolos podem ser utilizados para a avaliação do bem-estar animal como o Programa Bristol de Avaliação de Bem-Estar (BWAP) (Leeb et al. 2004), o Programa de gestão do Bem-Estar Animal da Escócia, o Índice de Necessidade Animal ANI- 35 da Áustria (Bartussek 1999), o ANI- 200 da Alemanha (Sundrum et al. 1994), QLK- 5 da Dinamarca (Rousing et al. 2000), além de programas específicos para o atordoamento de animais durante o abate e regras para o transporte de animais vivos (Grandin 2010).

Para a avaliação científica do grau de bem-estar animal é necessária à utilização de técnicas de diagnóstico e mensuração direta e indireta de indicadores fisiológicos e imunológicos. Os parâmetros incluem frequência cardíaca, respiratória, temperatura corporal, pressão sanguínea, nível de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), dosagem enzimática das adrenais (tirosina hidroxilase da adrenal, feniletanolamina-N-metil transferase, monoamina oxidase), do metabólito da catecolamina (ácido vanililmandélico), de hormônios adrenocorticais (cortisol e cortisona), de hormônios reprodutivos, ACTH, opióides (endorfina, encefalinas, dinorfinas) (Bristol 2004), imunoglobulinas, citocinas e mais recentemente, as proteínas de fase aguda (haptoglobina, alfa 1-glicoproteína ácida, proteína C reativa, amiloide A sérica) (Petersen et al. 2004; Gruys et al. 2005a; 2005b; Cray et al. 2009; Gómez-Laguna et al. 2011; Ceciliani et al. 2012).

O conhecimento dos parâmetros fisiológicos e comportamentais da espécie bovina associado às boas práticas de manejo tem possibilitado melhorar a produtividade, a qualidade de vida e consequentemente o bem-estar dos animais (Paranhos da Costa & Cromberg 1997, Paranhos da Costa et al. 2002).

2.6 Proteínas de Fase Aguda

A mensuração da concentração das proteínas de fase aguda representa um dos mecanismos da resposta imune inata e uma possibilidade importante de determinação do estado de saúde dos animais. É utilizada no diagnóstico precoce de afecções, na avaliação do grau de severidade, no acompanhamento de enfermidades inflamatórias e infecciosas (Petersen et al. 2004), na diferenciação de condições inflamatórias de não inflamatórias (Gabay & Kushner 2001), de inflamações agudas ou crônicas (Horadagoda et al. 1999), em testes de efetividade de vacinas e medicamentos (Gómez-Laguna et al. 2011), prognóstico, monitoramento de tratamentos (Eckersall 2008) e do estresse (Lomborg et al. 2008; Carvalho et al. 2008), bem como para a avaliação do bem-estar animal (Arthington 2003; Petersen et al. 2004; Ceciliani et al. 2012). Com a mensuração das proteínas de fase aguda é possível obter o diagnóstico prévio ao aparecimento dos sinais clínicos e comportamentais, garantindo sucesso no tratamento e impedindo as perdas de desempenho (Gómez-Laguna et al. 2011).

A resposta de fase aguda é a reação do organismo a distúrbios locais ou sistêmicos à homeostase causadas por infecção, infestação parasitária, injúria tecidual, trauma, cirurgia, crescimento neoplásico ou desordens imunológicas (Ndungu et al. 1991; Baumann & Gauldie 1994; Lobetti et al. 2000; Cerón et al. 2005; Gruys et al. 2005b). A resposta é induzida por glicoproteínas denominadas citocinas proinflamatórias que agem como mensageiros entre o local de injúria e o principal local de síntese das proteínas de fase aguda; os hepatócitos (Suffredini et al. 1999; Petersen et al. 2004; Cerón et al. 2005; Gruys et al. 2005b). As citocinas proinflamatórias podem ser divididas em dois grupos principais em relação à indução de resposta de fase aguda, chamadas de citocinas tipo IL-1 que incluem o fator alfa de necrose tumoral (TNF- α) e as do tipo IL-6 que agem em diferentes receptores na membrana dos hepatócitos. As citocinas IL-1 iniciam o primeiro sinal autoestimulatório que induzem a liberação de IL-6 em vários tipos celulares e estas parecem exercer um papel de *feedback* negativo sobre a IL-1 (Heinrich et al. 1990). As proteínas do tipo I, induzidas pela IL-1 e sinergisticamente pela IL-6 incluem a α 1-glicoproteína ácida, fator complemento C3, amiloide A sérica, haptoglobina (ratos) e proteína C reativa, enquanto as do tipo II induzidas somente pela IL-6 são o fibrinogênio, haptoglobina, alfa 1- antitripsina e ceruloplasmina. Além desta divisão, as proteínas de fase aguda podem ser classificadas de acordo com a intensidade do aumento após a estimulação por citocinas, em positivas como a haptoglobina, amiloide A sérica, proteína C reativa (Steel & Whitehead 1994) e α 1-glicoproteína ácida ou em negativas quando há decréscimo após o estímulo, como a albumina, a pré-albumina, a

transferrina, apoalbumina I e II, alfa 2- HS glicoproteína, inibidor de alfa tripsina, (Gabay & Kushner 2001; Gruys et al. 2005a), transcortina e a proteína de ligação do retinol (Gruys et al. 2005b).

A haptoglobina é a proteína de fase aguda considerada de importância diagnóstica em várias espécies e consagrada como indicadora de processos inflamatórios assim como o fibrinogênio (Wood & Quiroz-Rocha 2010), aumenta nas primeiras 24 a 48 horas após o início da inflamação, se mantém elevada enquanto houver alteração, mas volta rapidamente ao normal (Eckersall 2008). Várias funções foram propostas, dentre as quais atividades imunomodulatórias (Murata et al. 2004), prevenção do estresse oxidativo aos tecidos, atividade antibacteriana indireta (Eckersall 2008), mas a principal tem sido a prevenção na perda de ferro pela formação de complexos estáveis com a hemoglobina livre no sangue (Petersen et al. 2004; Murata et al. 2004; Gruys et al. 2005a; Ceciliani et al. 2012).

Em bovinos é considerada uma proteína de maior atividade e o aumento na concentração de haptoglobina foi descrito em processos inflamatórios (Petersen et al. 2004, Eckersall 2008), trauma cirúrgico (Fisher et al. 1997), doenças virais (Heegaard et al. 1999; Ganheim et al. 2003), doenças bacterianas (Godson et al. 1996; Hirvonen et al. 1996), fotossensibilização hepatógena (Fagliari et al. 2007) e crise hemolítica aguda por babesiose (Bremner 1964). Além disso, a mensuração da haptoglobina em bovinos pode ser utilizada para monitorar a efetividade de diferentes tratamentos (Smith et al. 2010).

A alfa 1- glicoproteína ácida é uma proteína multifuncional, pois atua como proteína de transporte, apresenta atividade imunomodulatória sobre os neutrófilos, proteção contra bactérias e age como acompanhante (Ceciliani et al. 2012). O aumento no soro de bovinos está correlacionado a doenças inflamatórias agudas, doenças respiratórias (Nikunen et al. 2007) e mastite (Eckersall et al. 2001). Lecchi et al. (2009) sugere que esta proteína pode participar da manutenção da homeostase local, reduzindo os danos teciduais provocados pelos processos inflamatórios. Em bovinos é uma proteína de fase aguda com resposta moderada, portanto o aumento da $\alpha 1$ -glicoproteína ácida é mais gradual, se mantém elevado por mais tempo e decresce mais lentamente que a haptoglobina (Dowling et al. 2002; Eckersall 2008), fato este observado em infecções experimentais por *Pasteurella multocida* (Dowling et al. 2002).

A transferrina é uma glicoproteína cuja função principal é o transporte de ferro sérico entre os locais de absorção, estoque e utilização (Kaneko 1997, Smith 1997, Harvey 2008). Outras funções foram constatadas para a transferrina, dentre elas, a modulação indireta da resposta

imune, ação direta sobre macrófagos induzindo a produção de óxido nítrico (Stafford et al. 2004) e atividade antibacteriana e antiviral (Smith & Roberts 1994).

Na parasitologia, foram realizados ensaios sobre o papel das proteínas de fase aguda na infecção por *Plasmodium falciparum* (Graninger et al. 1992), *Leishmania infantum* (Martínez-Subiela et al. 2002; Martínez-Subiela & Cerón 2005), *Trypanosoma brucei brucei* (Eckersall et al. 2001), *Theileria annulata* (Glass et al. 2003; El-Deeb & Iacob 2012), e *R. microplus* (Carvalho et al. 2008). Estes estudos demonstraram a importância da mensuração das proteínas de fase aguda para a avaliação da eficácia do tratamento (Graninger et al. 1992; Martínez-Subiela et al. 2002; Martínez-Subiela & Cerón 2005), como triagem para diagnóstico precoce (Martínez-Subiela et al. 2002; Martínez-Subiela & Cerón 2005; El-Deeb & Iacob 2012), no entendimento da patofisiologia da afecção (Eckersall et al. 2001; Glass et al. 2003) e na identificação de diferenças de suscetibilidade ao agente (Carvalho 2006).

Carvalho (2006) mensurou as proteínas de fase aguda, haptoglobina, amilóide A, α 1-glicoproteína ácida e transferrina em soro de bovinos de dois grupos, um formado por animais de raça resistente (Nelore) e outro da suscetível (Holandês) à infestação de *R. microplus*. E observou que os animais holandeses quando infestados produziram níveis mais altos da proteína de fase aguda α 1-glicoproteína ácida, enquanto animais da raça Nelore produziram mais haptoglobina e amiloide A. Os níveis de haptoglobina e transferrina variaram no soro dos animais de acordo com os níveis de infestação, mas para estas proteínas de fase aguda não houve diferença significativa entre os bovinos suscetíveis e resistentes.

A mensuração das proteínas de fase aguda pode ser mais útil que a das citocinas por permanecerem mais tempo na circulação. Segundo Gruys et al. (2005a) as proteínas de fase aguda se mantêm inalteradas durante 48 horas ou mais, enquanto as citocinas são eliminadas da circulação em algumas horas.

As proteínas de fase aguda são biomarcadores sensíveis e precoces para o monitoramento do grau de saúde dos animais, além de uma ferramenta importante para o monitoramento de tratamentos em bovinos (Ceciliani et al. 2012).

EXPERIMENTO I- Avaliação do efeito do bioterápico injetável de *R. microplus* 30 DH em bovinos em condições controladas de infestação e *in vitro*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho teve por objetivo avaliar a eficácia da terapêutica homeopática no controle de *R. microplus* em bovinos em condições controladas e a interferência sobre o bem-estar dos animais.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar bioensaios *in vitro* para avaliar a eficácia do bioterápico sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*;
- Realizar bioensaios *in vivo* em animais artificialmente infestados por *R. microplus*, tratados com o bioterápico injetável 30 DH, para avaliar a eficácia e a *performance* reprodutiva das fêmeas de *R. microplus* após o tratamento;
- Estudar possíveis alterações morfológicas no intestino de fêmeas de *R. microplus* alimentadas em bezerros tratados com o bioterápico 30 DH, por meio da Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET);
- Avaliar a interferência do tratamento, com o medicamento homeopático, sobre o bem-estar de bezerros infestados por *R. microplus*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Processamento de bioterápico de carrapatos *R. microplus*

Neste experimento a forma farmacêutica básica foi manipulada por uma farmácia especializada em estéreis e injetáveis, localizada na cidade de Riberirão Preto, S.P. Foi empregado o método Hahnemanniano, a partir de 10 gramas de fêmeas ingurgitadas inteiras de *R. microplus* provenientes de animais localizados em Jaboticabal, S.P.

Para a preparação do bioterápico de carrapatos, fêmeas ingurgitadas foram submetidas à trituração em insumo inerte (lactose) até a potência 6 DH e posterior diluição na proporção de 1:10, onde 1 parte era do insumo ativo (carrapatos) e 9 partes do insumo inerte (veículo)

segundo a escala decimal de diluição. A cada diluição o medicamento foi submetido à agitação molecular (100 sucussões) com braço mecânico até atingir a potência 30 DH, segundo a Farmacopeia Homeopática Brasileira (2011). A técnica de preparo está descrita no ANEXO 1.

Para a preparação do veículo isotônico foi utilizada água para injetáveis, obtida por um processo de osmose reversa em duplo passo, que foi empregada na solução de ultradiluição do bioterápico de carrapatos.

Foram seguidas as normas de assepsia para o preparo de injetáveis, ou seja, foi produzido em sala com fluxo laminar (ISO 5), controle de temperatura e umidade, de forma que o produto final (medicamento) foi submetido à esterelização para ser administrado por via parenteral.

Todo o material envolvido na coleta e processamento foi esterilizado antes de ser desprezado como resíduo contaminante biológico, obedecendo à legislação pertinente (Farmacopeia 2011).

4.2 Bioensaios *in vitro*

4.2.1 Teste do pacote com larvas (TPL)

Teleóginas de *R. microplus* coletadas de bovinos foram lavadas em água destilada, secas em papel toalha e individualizadas em placas de polietileno para realizarem a oviposição em estufas B.O.D. (Fanem 347CD, São Paulo, Brasil) a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 85% de umidade relativa. Decorridos 12 dias após o início da postura, os ovos foram recolhidos com auxílio de uma espátula e transferidos para recipientes de vidro, vedadas com algodão, identificadas e mantidas em estufa B.O.D. Larvas com 14 a 21 dias após a eclosão foram utilizadas no TPL segundo a técnica descrita por Shaw (1966) e adaptada por Leite (1988).

Foram utilizados papéis de filtro (Whatmann nº 1) com dimensões de 2x2 cm colocados em placas de petri e impregnados cada um com 200 µl do bioterápico na potência 30 DH e o controle somente com o diluente (água deionizada) em triplicatas (Figura 2A). Sobre o papel impregnado foram depositadas 100 larvas e cobertas com outro papel impregnado com as mesmas dimensões como um *sanduíche*. Este conjunto foi colocado dentro de envelope vedado com canaletas, nas laterais e extremidade superior (Figura 2B). Os envelopes foram dispostos em bandejas plásticas, sendo mantidos em câmaras incubadoras B.O.D. a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 85% de umidade relativa por 24 horas. Após este período, foi realizada a contagem do número de larvas vivas e mortas em cada um dos papéis, com auxílio de uma bomba de vácuo (Fanem CA BF 459, São Paulo, Brasil) e um microscópio estereoscópico (Micronal, Brasesit

11/ 37 São Paulo, Brasil) (Figura 3B). Larvas incapazes de se locomover foram consideradas mortas.

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Escola de Veterinária, da Universidade Federal de Minas Gerais.



Figura 2- Bioensaio com larvas de *R. microplus*. A- Impregnação dos papéis de filtro (2x2 cm) com bioterápico de *R. microplus* 30 DH e com água deionizada (controle) para realização do TPL. B- Envelope identificado e vedado com canaletas contendo o conjunto composto por dois papéis de filtro impregnados e 100 larvas (técnica de Shaw 1966, modificada) (Laboratório de Doenças Parasitárias DMVP/ EV/ UFMG).

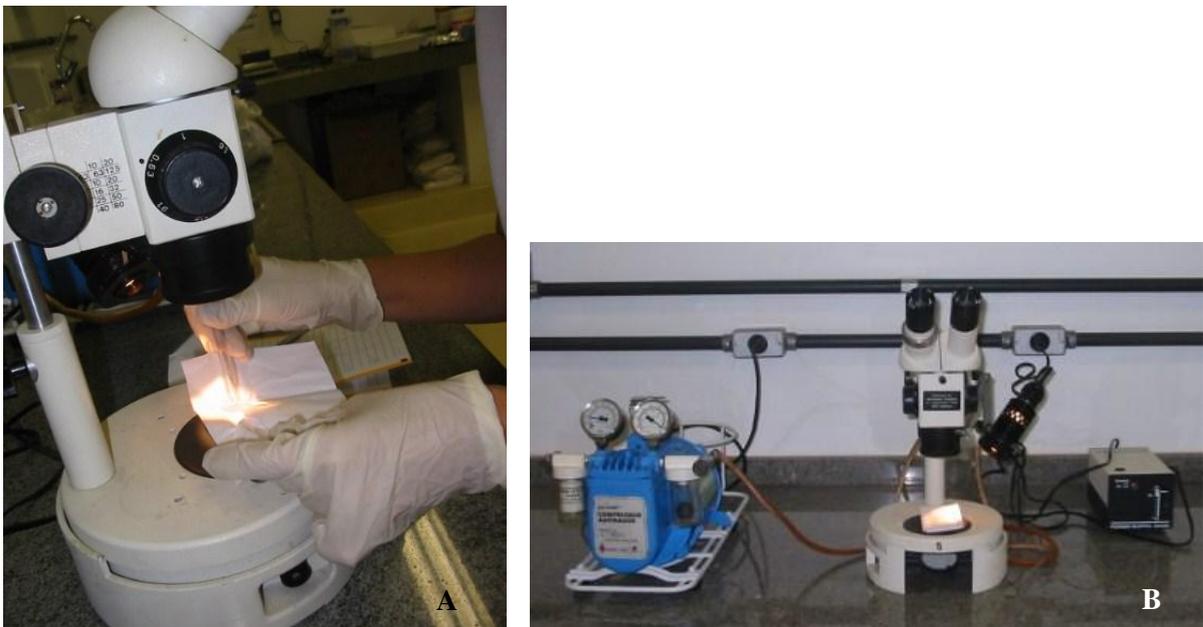


Figura 3- Bioensaio com larvas de *R. microplus*. A- leitura da percentagem de mortalidade. B- bomba de vácuo e microscópio estereoscópico (Laboratório de Doenças Parasitárias DMVP/ EV/ UFMG).

4.2.2 Teste de imersão de adultas (TIA)

Fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram coletadas de bovinos e posteriormente lavadas em água destilada. Para cada bioensaio foram selecionadas 10 fêmeas, agrupadas pelo peso e em seguida imersas em 100 mL de cada solução (bioterápico 30 DH e água deionizada), durante cinco minutos, utilizando-se copos de plástico descartáveis. Decorrido este tempo, os grupos de fêmeas ingurgitadas foram recolhidos e o excesso de solução retirado com papel toalha. Posteriormente, as fêmeas foram colocadas em placas, de forma individualizada devidamente identificadas e mantidas em estufa B.O.D. a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 85% de umidade relativa.

Após 15 dias, a massa de ovos presente em cada placa de Petri foi avaliada para determinar a *performance* reprodutiva, pesada e transferida para seringas plásticas adaptadas, vedadas com algodão, e mantidas em estufa B.O.D., nas mesmas condições previamente citadas. Ao final da eclosão dos ovos foi avaliado o percentual de eclodibilidade. Os percentuais foram calculados, por meio da técnica de quantificação de cascas e ovos com auxílio de um microscópio estereoscópico (Drummond et al. 1973).

4.3 Bioensaio *in vivo*

4.3.1 Animais

Foram utilizados dez bezerros machos da raça Holandesa, com 8 meses de idade, pesando aproximadamente 180 Kg e mantidos em baias individuais, nas instalações da Clínica de Ruminantes, no Setor de Grandes Animais, do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG.

Os bezerros foram criados em galpões telados para impedir a entrada de moscas, e semanalmente, foram banhados com produtos piretróides para impedir infestação por carrapatos. Os banhos foram suspensos 30 dias antes do experimento.

Os animais receberam silagem de milho, capim picado e ração comercial com 18% de proteína bruta, oferecidos em duas porções diárias, além de sal mineral e água “*ad libitum*”.

4.3.2 Metodologia experimental

Os dez bezerros, sem prévio contato com carrapatos, foram infestados com aproximadamente 1500 larvas de *R. microplus*, com 14 dias após a eclosão. As larvas provinham de ovos dos três primeiros dias de postura. Foram distribuídas na região do dorso, lombar e próximo à

cauda de cada animal. Posteriormente, foram realizadas mais duas infestações subsequentes, com intervalos de sete dias, utilizando-se a mesma quantidade de larvas. Os bezerros foram divididos em dois grupos de cinco animais:

- Grupo I os animais receberam 1,1 mL de líquido isotônico dinamizado na potência 30 DH por via subcutânea a cada sete dias por seis semanas (grupo controle);
- Grupo II os animais receberam 1,1 mL do bioterápico na potência 30 DH por via subcutânea a cada sete dias, durante seis semanas (grupo tratado).

As aplicações de bioterápico e solução salina se iniciaram um dia antes da infestação de larvas e totalizaram seis aplicações.

Após a administração dos medicamentos, aguardava-se 60 minutos para realizar exame nos animais para verificar eventuais alterações clínicas decorrentes do tratamento.

O projeto teve autorização do Comitê de Ética em Experimentação Animal, CETEA-UFMG (protocolo 276/ 10) para ser executado.

4.3.3 Ação terapêutica do bioterápico em bezerros experimentalmente infestados com *R. microplus*

A eliminação de *R. microplus* e o efeito residual da formulação homeopática foram avaliados por meio de contagens de todas as fêmeas, maiores ou iguais a 4,5 mm de comprimento, presentes no lado esquerdo de cada bezerro. As contagens foram realizadas nos animais de cada grupo experimental, a partir do 21º dia até o 38º dia após a infestação larval (Villares 1941, modificado por Wilkinson 1955), totalizando 18 determinações por animal. Para obtenção da infestação total por animal, os valores obtidos nas contagens foram multiplicados por dois (Oliveira 1993). E para categorizar o nível de infestação utilizou-se a classificação para a raça Holandesa proposta por Veríssimo et al. (2004), que consideram baixa infestação a contagem de 0 a 25 teleóginas, média infestação de 26 a 100 e alta quando a contagem é maior que 100 teleóginas por animal.

4.4 Bioensaios *in vitro* após o tratamento com o bioterápico de *R. microplus*

4.4.1 Performance reprodutiva

A partir do 21º dia após a infestação artificial foram selecionadas 10 fêmeas ingurgitadas, provenientes dos bezerros de cada grupo experimental (bioterápico 30 DH e controle), agrupadas pelo peso e colocadas em placas de forma individualizada devidamente identificadas e mantidas em estufa B.O.D. a 28°C ± 2°C e 85% de umidade relativa. Após 15

dias, a massa de ovos presente em cada placa de Petri foi avaliada quanto a *performance* reprodutiva, pesada e transferida para seringas plásticas adaptadas, vedadas com algodão, e mantidas em estufa B.O.D., nas mesmas condições previamente citadas. Ao final da eclosão dos ovos foi avaliado o percentual de eclodibilidade. Os percentuais foram calculados, por meio da quantificação de cascas e ovos com auxílio de um microscópio estereoscópico.

4.5 Cálculo de eficácia do bioterápico em fêmeas ingurgitadas

Para o cálculo de percentagem de eficácia do bioterápico em fêmeas ingurgitadas foi utilizada a fórmula de Amaral 1993, adaptada de Roulston et al. (1968):

$$\text{eficácia} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas ingurgitadas do GC} - \text{n}^\circ \text{ de fêmeas ingurgitadas do GT}}{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas ingurgitadas do GC}} \times 100$$

Onde:

GC= grupo controle

GT= grupo tratado

4.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Foram utilizadas duas teleóginas de *R. microplus* de cada grupo experimental (grupos I e II) coletadas no final do período experimental (dia 38) para o processamento por MET.

Os carrapatos foram colocados em uma placa de Petri e cobertos com algumas gotas de solução de NaCl à 0,8%. Com a ajuda de microscópio estereoscópico e lâmina de bisturi, os carrapatos foram seccionados longitudinalmente nos lados direito e esquerdo, expondo a cavidade da hemocele. Em seguida os intestinos foram separados e removidos com a ajuda de um estilete e imediatamente fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato a 0,2M (pH 7,4) durante 24 horas à 4°C para estudo com MET.

Os órgãos foram pós fixados em solução de tetróxido de ósmio a 2% em tampão cacodilato de sódio 0,2 M (pH 7,4), a temperatura de 4°C, durante duas horas. Posteriormente, o material foi lavado duas vezes em tampão cacodilato, e imediatamente submetido à desidratação em álcool etílico, em concentrações crescentes. Este material foi incluído em uma mistura plena de Epon/Araldite e incubado a 60°C, durante 72 horas para polimerização e endurecimento da resina.

Cortes semifinos obtidos em ultramicrótomo foram corados a quente com azul de toluidina a 1% em borato de sódio a 0,5% e examinadas em microscópio óptico.

Ao verificar os tecidos, foram obtidos cortes ultrafinos (60 a 90 nm) que foram colocados em tela de cobre de 300 “mesh” e submetidos à dupla coloração utilizando solução aquosa de acetato de uranila 2% por oito minutos e, em seguida, solução de citrato de chumbo por dez minutos, em atmosfera de hidróxido de sódio.

O material foi examinado e documentado em microscópio eletrônico de transmissão, modelo Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin FEI, operado a 120 kilovolts.

4.7 Avaliação do Bem-Estar Animal

O bem-estar dos animais experimentais foi avaliado mediante alguns fatores, como: a severidade do comprometimento do bem-estar, estado corpóreo, presença e tamanho de lesões, alopecia, reações urticariformes e alterações comportamentais, conforme Leeb et al. (2004).

4.8 Análise estatística

Foi realizada análise não paramétrica de Mann-Whitney para as contagens médias de teleóginas entre os grupos, peso das teleóginas e peso da postura e Kruskal-Wallis para as contagens médias entre os dias. A eclodibilidade de larvas foi associada aos grupos experimentais tomados dois a dois, mediante uma tabela de contingência submetida ao teste qui-quadrado com nível de significância de 5% e foi utilizado o *software* Graph Pad Prism 5.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Bioensaios *in vitro*

No teste de pacote de larvas foram observadas taxas de mortalidade para o bioterápico 30 DH e para o grupo controle (água deionizada) de 1,11% e 0 %, respectivamente, demonstrando baixa ação larvicida do medicamento para *R. microplus*.

No teste de imersão de teleóginas não foi observada eficácia do bioterápico, pois não foram observadas diferenças entre o grupo tratado e o grupo controle; ambos demonstraram 0% de mortalidade de fêmeas ingurgitadas e 90% de eclosão de ovos.

Na literatura não há relatos de realização de bioensaios *in vitro* com bioterápicos de carrapatos. Os resultados obtidos sugerem a necessidade de experimentos *in vivo* ao testar

medicamentos homeopáticos, corroborando com Pontin (2003), que salientou a importância da experimentação *in vivo* para medicamentos homeopáticos, tendo em vista que os resultados só são significativos com a utilização do sistema biológico.

5.2 Bioensaios *in vivo*

5.2.1 Avaliação clínica

A administração do bioterápico de *R. microplus* 30 DH pela via subcutânea nos bezerros do grupo tratado não provocou reações adversas no local da aplicação, nem alterações sistêmicas visíveis.

5.2.2 Contagem de teleóginas

As contagens de teleóginas ingurgitadas maiores ou iguais a 4,5 mm realizadas diariamente nos bezerros a partir do 21º dia após a infestação artificial demonstraram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05\%$) entre quatro animais do grupo controle (5, 17, 25 e 29- GI) e um animal do grupo tratado (23- GII) (Tabela 01). Este fato pode ser atribuído a uma resposta individual deste animal do grupo tratado, podendo sugerir maior resistência aos carrapatos.

Picos de infestação ocorreram nos dias 27, 28, 29 e 35 após a infestação artificial correspondendo a duração da fase parasitária do carrapato *R. microplus* (Tabela 1, Figura 4).

A maior infestação por *R. microplus* foi observada no bezerro 5, do grupo I no 28º dia após a infestação artificial e os menores valores nos bezerros 8, 23 e 28 do grupo II, respectivamente, no 24º, 25º e 32º e 38º dias após a infestação artificial (Tabela 1 e Figura 4).

Tabela 1- Contagem individual, total e média de fêmeas de *R. microplus* e eficácia obtida em bezerros dos grupos controle e tratado com bioterápico injetável 30 DH, do 21° até o 38° dia após a infestação artificial. Belo Horizonte, MG, 2010.

Dias de infestação/ N° do bezerro	Contagem nos grupos														
	Controle (GI)							Tratado (GII)							
	05	17	25	27	29	total	\bar{X}	08	10	18	23	28	total	\bar{X}	eficácia
21	36	46	52	40	42	216	43,2	34	28	40	24	42	168	33,6	22,2
22	26	32	46	48	48	200	40,0	26	28	32	10	40	136	27,2	32
23	22	38	28	20	18	126	25,2	20	24	18	2	18	82	16,4	34,9
24	12	14	12	8	14	60	12,0	2	8	6	2	4	22	4,4	63,3
25	8	44	20	8	36	116	23,2	16	4	20	0	16	56	11,2	51,7
26	22	36	28	18	14	118	23,6	10	10	16	2	10	48	9,6	59,3
27	78	44	56	28	42	248	49,6	42	20	42	6	98	208	41,6	16,1
28	118	48	80	32	54	332	66,4	68	26	72	24	94	284	56,8	17,2
29	94	50	48	30	44	266	53,2	52	46	68	28	26	220	44,0	20,3
30	38	28	38	26	22	152	30,4	20	20	36	18	22	116	23,2	23,7
31	34	22	14	6	18	94	18,8	12	12	40	10	12	86	17,2	8,5
32	20	6	6	8	4	44	8,8	4	4	10	0	12	30	6,0	31,8
33	6	6	4	8	8	32	6,4	8	10	6	6	6	36	7,2	-12,5
34	36	12	16	46	60	170	34,0	26	22	26	6	34	114	22,8	32,9
35	46	12	18	54	92	222	44,4	36	38	28	8	28	138	27,6	37,8
36	56	34	28	40	64	222	44,4	28	34	44	24	16	146	29,2	34,2
37	50	12	26	28	44	160	32,0	16	36	28	18	16	114	22,8	28,7
38	26	18	12	10	16	82	16,4	12	14	10	10	2	48	9,6	41,4
Média Total	40,4	27,8	29,5	25,4	35,5	158,5	39,9	24,0	21,3	29,8	11,0	27,5	114	22,8	30,1
Média Total do grupo	31,7 ^{NS}							22,72 ^{NS}							

Foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os dias 21 e 24, 24 e 28, 24 e 29, 25 e 28, 25 e 29, 28 e 32, 28 e 33, 29 e 32, 29 e 33 após a infestação. Essas diferenças são atribuídas aos maiores valores de contagens de teleóginas quando comparados aos dias de menores infestações (Tabela 1, Figura 4). Ao realizar as médias de contagens dos bezerros do grupo I nos diferentes dias e comparando-as com o grupo II (bioterpico injetável 30 DH) pôde-se observar contagens médias maiores no grupo I em relação ao grupo II durante todo período experimental, exceto no 33° dia (Tabela 1; Figura 4). Entretanto estas diferenças não foram significativas ($p > 0,05\%$) entre os grupos.

Os animais dos grupos I e II mantiveram níveis baixos a médios de infestação ao longo do período experimental, exceto o bezerro 5 (GI) que apresentou níveis altos no 28° dia após a infestação artificial. Nos dias 30, 34 e 37 os bezerros do grupo I estavam com níveis médios de infestação enquanto os do grupo II (bioterpico injetável 30 DH) estavam com níveis baixos.

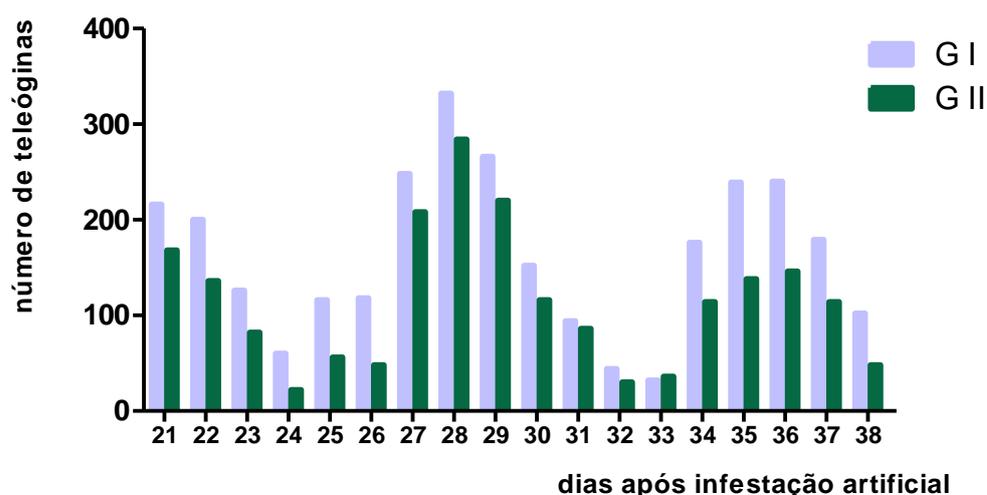


Figura 4- Contagens médias totais de fêmeas de *R. microplus* presentes em bezerros dos grupos controle e tratados com bioterápico injetável 30 DH, do 21º até o 38º dia após a infestação artificial. Belo Horizonte, MG, 2010.

Os valores de eficácia do produto variaram durante o período experimental, de -12,5 até 63,3% (Tabela 1). A eficácia média do bioterápico 30 DH foi 30,1%, sendo que na última semana a eficácia foi de 35,52%. Esse valor foi maior que o obtido por Costa-Júnior & Furlong (2011), que obtiveram eficácia de 26% após 5 meses de tratamento em bezerros Holstein-Zebu com produto homeopático comercial C&MC (Arenales Flora e Fauna). No presente ensaio, a vantagem foi o menor tempo de tratamento (36 dias) com apenas 6 aplicações, uma por semana, do bioterápico 30 DH.

Veríssimo (1988) utilizou o bioterápico *Carrapatinum* dinamizado na potência 6 CH, adicionado diariamente na água de beber, de novilhos mestiços leiteiros artificialmente infestados, durante 36 dias consecutivos; o mesmo período de tratamento deste experimento. A referida autora observou diferença significativa no número de carrapatos no grupo tratado com o bioterápico no 21º, 22º e 23º dias após a infestação artificial, fato este não observado neste experimento. Entretanto, o *Carrapatinum* foi administrado preventivamente durante 15 dias antes da infestação artificial por larvas de *R. microplus*, e mantido por mais 21 dias após a infestação. A diferença observada em relação ao experimento de Veríssimo pode ser atribuída a dois fatores; à administração preventiva um dia e não 15 dias antes da infestação e à ausência de contato prévio com os carrapatos *R. microplus*, pois o nível de resistência torna-se maior depois de repetidas infestações quando comparados com o nível da primeira infestação (Wagland 1975).

5.3 Bioensaio *in vitro* após o tratamento com bioterápico de *R. microplus*

5.3.1 Performance reprodutiva

As fêmeas ingurgitadas e a massa de ovos de cada grupo foram pesadas e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05\%$) entre os grupos em relação aos parâmetros: peso médio das teleóginas e peso médio da postura (Tabela 2).

Tabela 2- Peso total de fêmeas *R. microplus*, (\geq a 4,5 mm de comprimento) peso da postura em gramas e percentual de eclodibilidade de larvas de *R. microplus* dos grupos controle (GI), tratado com o bioterápico 30 DH (GII).

Dias após a infestação	Grupo I Controle			Grupo II bioterápico 30 DH		
	teleóginas (g)	ovos (g)	eclosão (%)	teleóginas (g)	ovos (g)	eclosão (%)
21	3,058	1,728	70	3,636	2,012	90
22	3,779	1,868	90	3,687	1,970	90
27	2,500	1,410	90	2,715	1,418	90
28	3,803	1,426	90	3,964	1,856	90
29	3,574	1,572	90	3,712	1,770	85
30	3,317	1,508	90	3,313	1,790	90
31	2,891	1,806	95	3,349	1,366	70
35	3,421	1,840	90	3,094	1,226	90
37	3,290	1,446	90	3,392	1,628	90
38	2,376	1,360	90	2,661	0,959	85

Em relação ao percentual de eclodibilidade foram observados menores valores no grupo tratado nos dias 29, 31, 34 e 38 após a infestação artificial de larvas. O menor valor de eclodibilidade observado para o grupo tratado com o bioterápico injetável 30 DH foi 70% no 31º dia após a infestação por *R. microplus*, demonstrando baixa interferência do medicamento na reprodução do ixodídeo. Foram observadas associações significativas entre eclosão e o tratamento com o bioterápico nos dias 31, 34 e 38 quando foi realizada a comparação do número de larvas levando-se em consideração a percentagem de eclosão e a estimativa de que 1g equivale a 20000 larvas. Os resultados obtidos diferem dos relatos de Gazim et al. (2010) que descreveram diminuição no peso das fêmeas e dos ovos, além do percentual de eclodibilidade de 50% no grupo tratado com bioterápico de *R. microplus* durante 28 meses. A diferença pode estar relacionada ao menor tempo de tratamento realizado no presente ensaio.

5.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os resultados da microscopia eletrônica do intestino de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* demonstraram estruturas íntegras em ambos os grupos (Figuras 5 e 6), e as principais células observadas foram as células digestivas maduras. No interior das células digestivas, foram visualizadas estruturas especializadas, delimitadas por membrana denominada de hemossomos, além de vesículas digestivas (vacúolos) de diversos tamanhos, organelas como o retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias, ambas no citoplasma e presença do núcleo localizado na região central. Foram observados microvilos preservados nas membranas basais das células epiteliais intestinais e membranas plasmáticas sem modificações, mantendo a integridade das estruturas internas.

Não há estudos prévios de microscopia eletrônica de transmissão de carrapatos coletados de animais tratados com bioterápico de *R. microplus*.

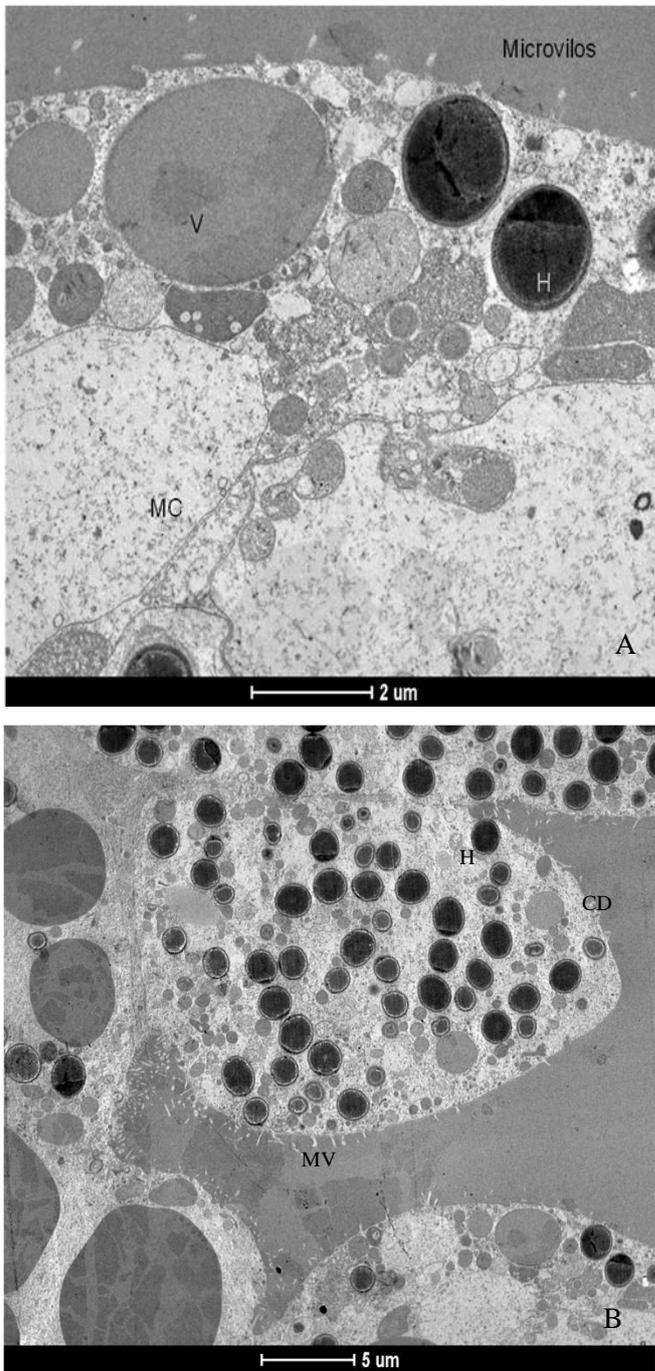


Figura 5- Eletromicrografias do intestino de fêmea ingurgitada de *R. microplus* do grupo controle. A- demonstrando a presença dos hemossomos (H), vacúolos (V), membrana celular (MC) íntegra e microvilos. B- célula digestiva (CD), hemossomos (H) e microvilos (MV).

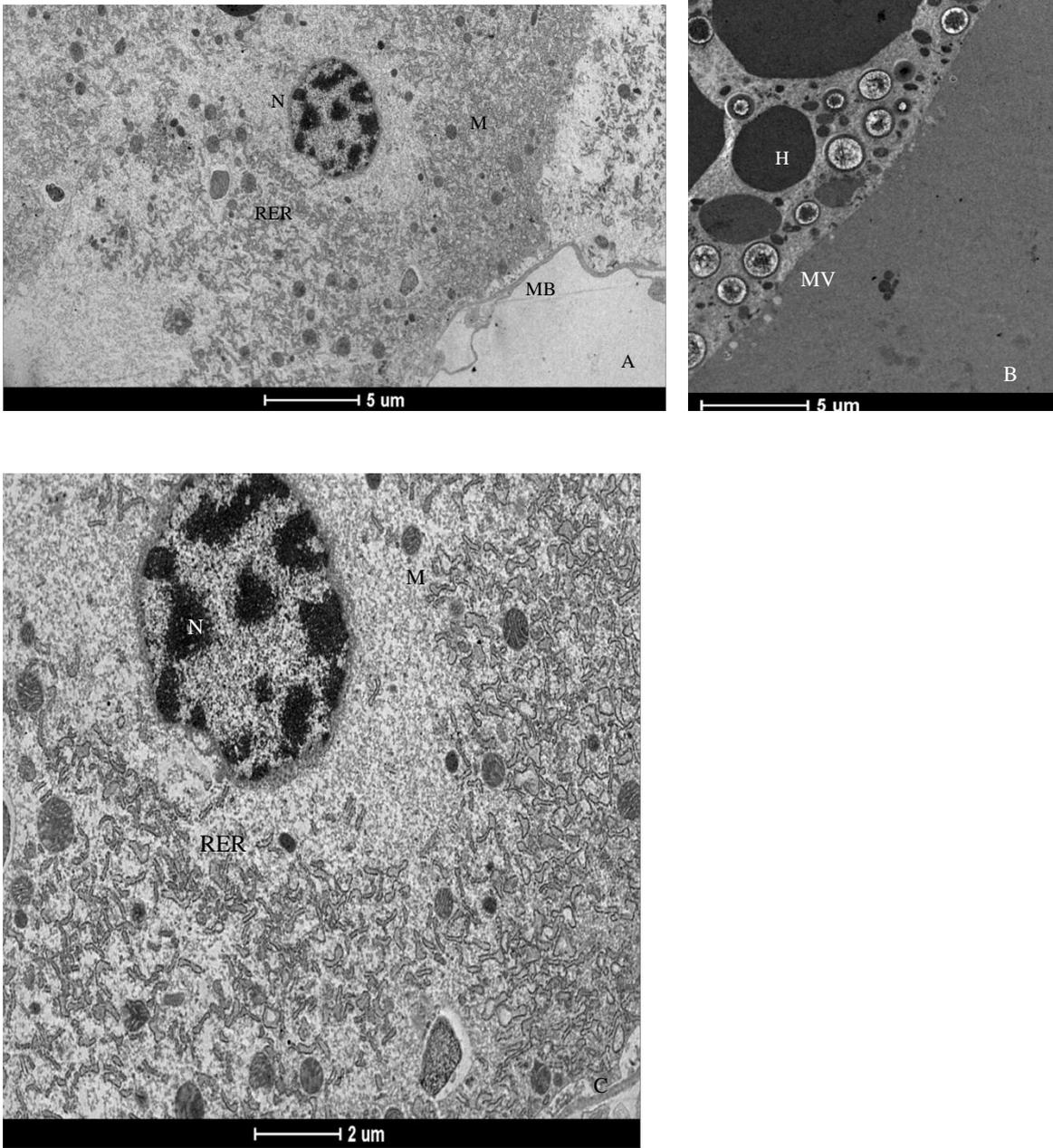


Figura 6- Eletromicrografias do intestino de fêmea ingurgitada de *R. microplus* do grupo tratado com bioterápico injetável A- demonstrando integridade da membrana basal (MB), núcleo (N), mitocôndria (M) e retículo endoplasmático rugoso (RER) B- hemossomas (H), microvilos (MV) e vacúolos (V) C- núcleo (N), retículo endoplasmático rugoso (RER) e mitocôndria (M).

5.5 Avaliação de Bem-Estar Animal

Os animais demonstraram baixo grau de bem-estar, visto que, apresentaram escore corporal de moderado a pobre após 15 dias da infestação por larvas, sem sofrerem restrição alimentar. Três animais, dois do grupo controle e um do grupo tratado apresentaram alteração dermatológica caracterizada por seborreia, lesões nodulares no local da picada e prurido. Durante o período experimental quatro animais apresentaram linfonodos significativamente aumentados de volume, dois do grupo controle e dois do grupo tratado com o bioterápico injetável. Estes resultados são compatíveis com as lesões descritas em decorrência do parasitismo por *R. microplus* (Brito et al. 2006).

O bioterápico injetável 30 DH, administrado uma vez por semana durante 6 semanas, possibilitou controle parcial dos carrapatos, mas não impediu os efeitos indesejáveis do *R. microplus*, portanto, não teve efeito benéfico sobre o bem-estar dos animais.

Com base nos resultados obtidos neste ensaio, os relatos de Veríssimo (1988), a Lei das diluições (Michaud 1998) e objetivando melhorar a eficácia do bioterápico de *R. microplus* sugere-se a formulação de novos extratos (tinturas-mãe) de carrapatos na potência 6 CH para que com a administração diária, os bioterápicos atuem no plano orgânico dos bovinos parasitados com carrapatos.

6. CONCLUSÃO

O bioterápico de *R. microplus* 30 DH não apresentou ação direta sobre larvas, nem fêmeas ingurgitadas de carrapatos nos bioensaios *in vitro*, sugerindo a necessidade da experimentação em bovinos ao testar bioterápicos de *R. microplus*.

O tratamento com o bioterápico injetável 30 DH, administrado uma vez por semana a bezerros holandeses artificialmente infestados com larvas de *R. microplus*, apresentou eficácia acaricida baixa considerando todo o período experimental, mas crescente visto que, na última semana de tratamento a eficácia foi maior.

O bioterápico não provocou efeitos adversos, não interferiu na *performance* reprodutiva das teleóginas, nem no bem-estar dos animais parasitados.

Não foram visualizadas alterações, por meio da microscopia eletrônica de transmissão, no intestino de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* coletadas de bezerros tratados com o bioterápico 30 DH.

EXPERIMENTO II- Desenvolvimento de bioterápico oral e avaliação *in vitro* e *in vivo* da atividade em *R. microplus* e em bovinos naturalmente infestados

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver e avaliar a atividade de bioterápicos no controle de *R. microplus* em bovinos naturalmente infestados.

7.2 Objetivos específicos

- Preparar três tinturas-mãe a partir do material vivo, dessecado e calcinado de *R. microplus* segundo a Farmacopeia Homeopática Brasileira (2011);
- Realizar o controle de qualidade das tinturas-mãe obtidas por técnicas cromatográficas: cromatografia de cadeia delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Preparar três bioterápicos na dinamização 6 CH a partir das tinturas-mãe obtidas anteriormente;
- Realizar bioensaios *in vitro* para avaliar a eficácia e a *performance* reprodutiva dos diferentes bioterápicos sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*;
- Realizar bioensaios *in vivo* em animais naturalmente infestados por *R. microplus* para avaliar a eficácia, a *performance* reprodutiva e o percentual de eclodibilidade dos medicamentos homeopáticos na potência 6 CH.

8. MATERIAL E MÉTODOS

8.1. Preparo das tinturas-mãe e dos bioterápicos na potência de 6 CH

As tinturas-mãe foram desenvolvidas no Laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia da UFMG, sob a orientação da Prof^a Rachel Oliveira Castilho.

Para a obtenção da tintura-mãe 1, ovos, larvas e adultos vivos (8,5 g) de carrapatos *R. microplus* foram submetidos à maceração em etanol 70% (MV). Para a obtenção da tintura-mãe 2, ovos, larvas e adultos vivos (8,5 g) de *R. microplus* foram colocados em estufa a 40° C por 24 horas obtendo-se o material dessecado (MD), e submetido à maceração em etanol a 70%. E para obtenção da tintura-mãe 3, ovos, larvas e adultos vivos (8,5 g) de *R. microplus*

foram calcinados em mufla a 440° C por 4 horas (MC) e em seguida macerado em etanol a 70%.

As tinturas-mãe preparadas respectivamente com o carrapato vivo, dessecado e calcinado, pelo processo de maceração, apresentaram a relação droga/líquido extrator de 1:20 (peso/volume), (5%). A droga animal foi deixada, de acordo com a respectiva monografia de preparo de tinturas a partir de animais, em contato com volume do líquido extrator equivalente ao volume final da tintura-mãe, em ambiente protegido da ação direta de luz e calor, com agitação diária do recipiente por 5 minutos, durante 20 dias. Após este período, o material em maceração foi filtrado sem promover a expressão. A tintura obtida foi mantida em repouso por 48 horas, novamente filtrada e armazenada adequadamente em recipiente de vidro âmbar, bem fechado e protegido do calor (Farmacopeia 2011).

Para o preparo dos bioterápicos a partir das tinturas-mãe 1, 2 e 3 na potência de 6 CH (2×10^{-11} mg/mL) foi utilizada a diluição na proporção de 1:100, onde 1 parte consistiu do insumo ativo (tintura-mãe) e 99 partes do insumo inerte (álcool 70%) segundo a escala centesimal Hahnemanniana de diluição. Na última diluição foi utilizado o álcool 30% para a dispensação e administração aos animais. Este procedimento foi realizado para as três tinturas-mãe obtendo-se três bioterápicos. A técnica de preparo está descrita no ANEXO 2.

8.2. Controle de qualidade das tinturas-mãe

Para o controle de qualidade das tinturas-mãe foi feito o perfil químico utilizando as técnicas de cromatografia de cadeia delgada (CCD) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

8.2.1 Cromatografia de cadeia delgada (CCD)

A prospecção e os perfis químicos das diferentes tinturas preparadas foram obtidos em cromatografia em camada delgada de sílica gel, utilizando reagentes seletivos para diferentes classes químicas, dentre estes: o Liebermann Buchard característico de substâncias terpenoídicas (terpenos e esteroides), Cloreto de Alumínio, Cloreto férrico e KOH característicos de substâncias fenólicas e Dragendorf para substâncias nitrogenadas (Wagner et al. 1984). As soluções e reveladores para cromatografia em camada delgada de sílica (CCD) encontram-se no ANEXO 3.

8.2.2 Cromatografia de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)

Os perfis cromatográficos das tinturas-mãe foram obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, utilizando detector de arranjos de diodo (CLAE-FR-DAD). Foi utilizada coluna LiChrospher® 100 18 RP (partículas de 5 µm, 125 x 4 mm d.i., Merck), e pré-coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) e a temperatura da coluna foi mantida em 30 ± 5 °C. Foram injetados 10 µL de solução de amostra em um fluxo 1 mL/minuto. A leitura foi realizada em λ 210 nm sendo registrados numa faixa espectral de λ 200 a 400 nm. Empregou-se como fase móvel uma mistura de água: acetonitrila em gradiente linear conforme Tabela 3.

Tabela 3 – Gradiente de eluição empregado na obtenção dos perfis por CLAE-FR-DAD para as tinturas-mãe

Tempo (minutos)	H ₂ O (%)	ACN (%)
0	95	5
55	5	95
60	95	5

Para o preparo das soluções, as amostras das tinturas-mãe foram secas em rotaevaporador até obtenção de resíduo, sendo então resuspendidas em metanol em uma concentração de 10 mg/mL. A dissolução foi realizada com o auxílio de banho de ultra-som por 1 minuto. Após esse tempo, as soluções foram centrifugadas a 10000 RPM por 10 minutos e o sobrenadante límpido foi transferido para *vials* de vidro de 2 mL.

8.3 Bioensaios *in vitro*

8.3.1 Teste do pacote com larvas

Foram avaliados no TPL os três bioterápicos desenvolvidos, MV, MD e MC todos na diluição 6 CH (2×10^{-11} mg/mL) e como controle foi utilizado o álcool 30%. A metodologia foi realizada conforme o item 4.2.

8.3.2 Teste de imersão de adultas

A metodologia foi realizada conforme o item 4.3 e foram avaliados os bioterápicos MV, MD e MC na potência 6 CH e como controle foi utilizado o álcool 30%.

8.4. Bioensaio *in vivo*

8.4.1 Animais

Foram selecionados 12 bezerros machos, mestiços Holandês-Zebu, com 5 a 8 meses de idade, pesando entre 150 a 250Kg, naturalmente infestados com *R. microplus*. O experimento foi realizado no mês de novembro, na Fazenda Modelo da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, localizada no município de Pedro Leopoldo.

8.4.2 Metodologia experimental

A seleção dos bezerros foi realizada por meio de contagem prévia de teleóginas ingurgitadas de *R. microplus*, maiores ou iguais a 4,5 mm, presentes no lado esquerdo dos bovinos (Villares 1941, modificado por Wilkinson 1955). Os 12 animais foram distribuídos em quatro grupos de três bovinos de acordo com as infestações e foram tratados:

- Grupo I: os animais receberam 0,5 mL do bioterápico MV 6 CH, por via oral, durante 6 dias;
- Grupo II: os animais receberam 0,5 mL do bioterápico MD 6 CH, por via oral, durante 6 dias;
- Grupo III: receberam 0,5 mL do bioterápico MC 6 CH, por via oral, durante 6 dias;
- Grupo IV: não receberam medicação, pois constituíram o grupo controle.

Após a administração dos bioterápicos, aguardava-se 60 minutos para detecção de eventuais alterações clínicas decorrentes do tratamento. Os animais foram mantidos no mesmo piquete durante todo o período experimental.

8.4.3 Ação terapêutica dos bioterápicos em bezerros naturalmente infestados por *R. microplus*

A ação da formulação homeopática nos bezerros infestados por *R. microplus* foram avaliados por meio de contagens de todas as fêmeas, maiores ou iguais a 4,5 mm de comprimento, presentes no lado esquerdo de cada bovino (Villares 1941, modificado por Wilkinson 1955), a partir do 4º até o 7º dia após o início da administração dos medicamentos em todos os grupos. Para obtenção da infestação por animal, os valores obtidos nas contagens foram multiplicados por dois (Oliveira 1993), e para a categoria do nível de infestação foi utilizada a classificação para a raça Holandesa conforme Veríssimo et al. (2004).

8.5 Bioensaios *in vitro* após o tratamento com o bioterápico de *R. microplus*

8.5.1 Performance reprodutiva e percentual de eclodibilidade

Conforme descrito no item 4.4.1 (experimento I), na página 36

As contagens médias dos grupos foram utilizadas para comparação, assim como o peso das teleóginas, o peso da postura, a percentagem de eclodibilidade e a eficácia de cada bioterápico obtida por grupo.

8.6 Cálculo de eficácia dos bioterápicos

Para o cálculo de percentagem de eficácia dos bioterápicos em fêmeas ingurgitadas foi utilizada a fórmula de Amaral 1993, adaptada de Roulston et al. (1968):

$$\text{eficácia} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas ingurgitadas do GC} - \text{n}^\circ \text{ de fêmeas ingurgitadas do GT}}{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas ingurgitadas do GC}} \times 100$$

Onde:

GC= grupo controle

GT= grupo tratado

8.7 Cálculo de eficiência reprodutiva

Para o cálculo da eficiência reprodutiva foi utilizada a fórmula (Drummond et al. 1973):

$$\text{Eficiência Reprodutiva (ER)} = \frac{\text{peso dos ovos (g)} \times \% \text{ eclosão} \times 20.000}{\text{peso das fêmeas (g)}}$$

Na fórmula acima, 20.000 corresponde à estimativa do número de larvas em um grama de ovos de carrapatos.

8.8 Cálculo de eficiência do bioterápico

A eficiência do bioterápico foi calculada com base no efeito da inibição da oviposição por meio da seguinte fórmula (Drummond et al. 1973):

$$\% \text{ de eficiência do produto} = \frac{\text{ER (grupo controle)} - \text{ER (grupo tratado)}}{\text{ER (grupo controle)}} \times 100$$

8.9 Análise estatística

Foi realizada a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis para as contagens médias de teleóginas entre os grupos, peso das teleóginas e peso dos ovos. Os resultados de eclodibilidade de larvas foram associados aos grupos experimentais mediante uma tabela de contingência submetida ao teste qui-quadrado com nível de significância de 5% e foi utilizado o *software* Graph Pad Prism 5.

9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1 Análise cromatográfica

Análise química das tinturas-mãe por cromatografia em camada delgada (CCD) e reagentes seletivos demonstrou a presença de substâncias fenólicas e terpenoídicas (terpenos e/ou esteroides) para as tinturas MV e MD (Figura 7). Para a tintura com o material calcinado (MC), por apresentar somente compostos inorgânicos, os resultados foram negativos para as classes químicas avaliadas.

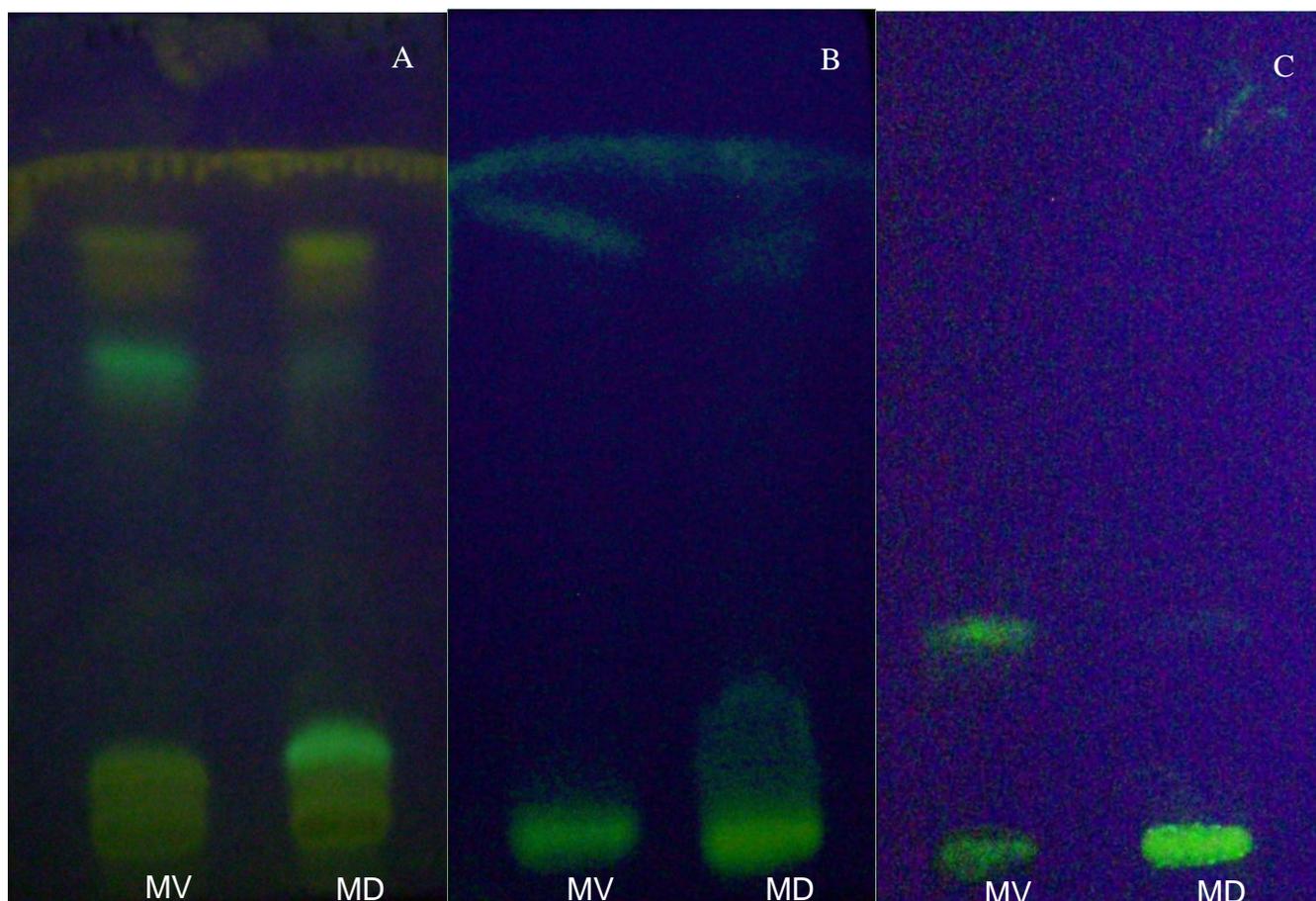


Figura 7- Cromatogramas obtidos por CCD de gel de sílica das tinturas de *R. microplus* do material vivo (MV) e do material dessecado (MD). Revelador para terpenóides e fenólicos. A) Revelação com Lieberman-Burchard; B) Revelação com KOH; C) Revelação com AlCl₃.

Adicionalmente, um perfil químico por CLAE foi obtido para MV e MD utilizando gradiente linear de acetonitrila e água. Os perfis cromatográficos obtidos para as duas tinturas foram semelhantes, apresentando picos com tempo de retenção entre 0 a 5 min e picos entre 18 e 20 min, ou seja, eluídos em alta e média polaridade, respectivamente (Figura 8).

Na tintura MV os picos eluídos em maior polaridade apresentaram maior área e absorvidade, enquanto na tintura MD foram os eluídos em média polaridade.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é utilizada em trabalhos de fitoquímica para monitorar as etapas de isolamento, bem como, avaliar a pureza final das substâncias isoladas. Além disso, o perfil cromatográfico obtido por CLAE para tinturas e extratos vegetais, em condições padronizadas, denominadas “impressão digital”, revela sua constituição qualitativa e permite caracterizar o material analisado. A obtenção deste perfil é importante por permitir comparações qualitativas entre a composição química de materiais oriundos de coletas ou produtos distintos, sendo particularmente úteis no caso de tinturas e

extratos bioativos, servindo como referência para coletas futuras e, também para subsidiar o controle de qualidade das tinturas e extratos usados no processo de fabricação de fitoterápicos e bioterápicos. A obtenção da “impressão digital” objetiva, ainda, identificar metabólitos secundários nos primeiros estágios do trabalho fitoquímico e no caso de fitoterápicos, estabelecer marcadores químicos, que são indispensáveis para o planejamento e monitoramento das ações de transformação tecnológica e para os estudos de estabilidade dos produtos intermediário e final.

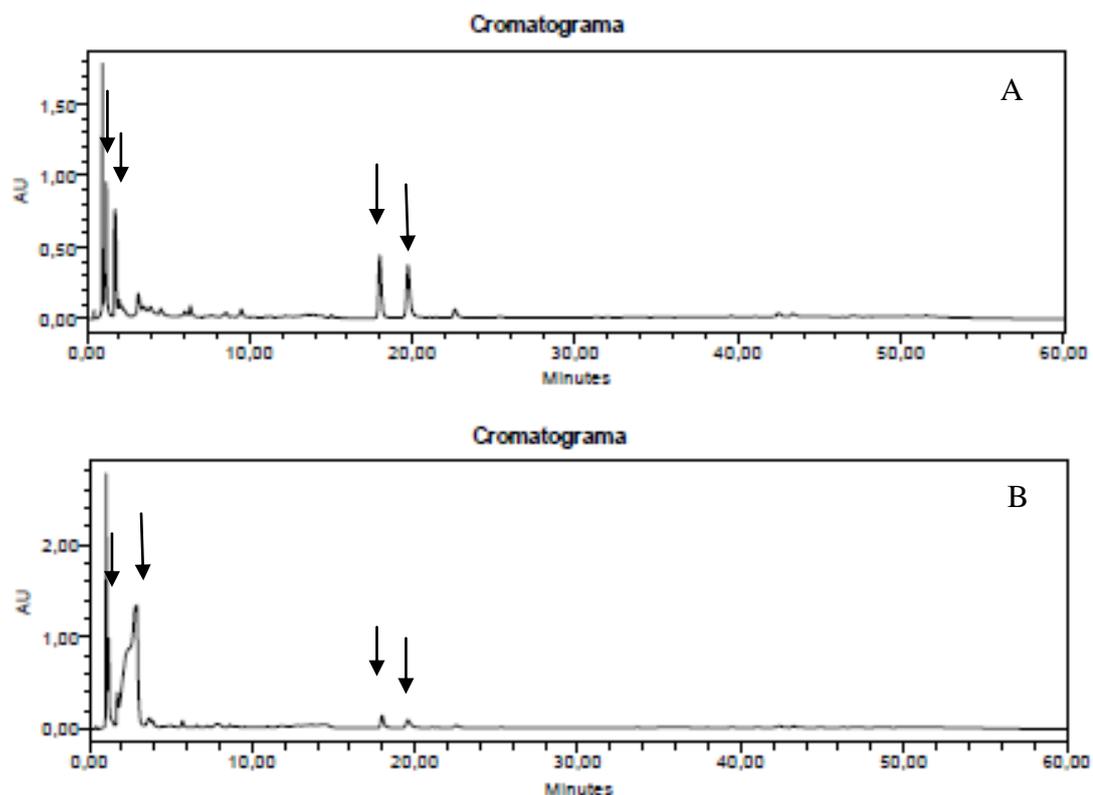


Figura 8- Cromatogramas obtidos por CLAE-FR, para as tinturas de *R. microplus* com material vivo – MV (A) e dessecado – MD (B). Condições cromatográficas: Coluna C18 (LiChrospher®100, 125x4 mm I.D.; 5 µm); gradiente de eluição linear, A-B (95:5, v/v) a A-B (5:95, v/v) em 60 min H₂O (A) e acetonitrila (B); 40°C; 10 µL; λ 210 nm.

9.2 Bioensaios *in vitro*

No TPL foram observadas taxas de mortalidade para os bioterápicos MV, MD e MC de 2,14%, 2,30% e 2,19%, respectivamente, e para o controle (álcool 30%), a mortalidade foi de 0,95%, demonstrando baixa eficácia do produto em larvas de *R. microplus*.

No TIA não foi observada mortalidade das fêmeas adultas nem alteração na oviposição com os bioterápicos MV, MD e MC. E a taxa de eclodibilidade das larvas foi de 90%, sem diferir

estatisticamente ($p > 0,05\%$) do grupo controle que apresentou 80% de eclodibilidade. Estes resultados demonstram que os bioterápicos não tiveram ação direta no ixodídeo nem interferiram na reprodução de fêmeas de *R. microplus*. Os resultados dos testes *in vitro*, reafirmam a necessidade de experimentos com bovinos para avaliar a ação dos medicamentos homeopáticos para carrapatos, corroborando com Pontin (2003) e com o ensaio prévio realizado com o bioterápico injetável na dinamização 30 DH.

9.3 Bioensaio *in vivo*

9.3.1 Achados clínicos

A administração do medicamento por via oral foi considerada adequada, e não foram observadas reações adversas com a utilização dos bioterápicos durante o período experimental.

Os animais permaneceram sadios em todos os dias de avaliação. Um animal pertencente ao grupo II (MD) apresentou reação urticariforme leve em decorrência da infestação por carrapatos, e outro animal do grupo I (MV) apresentou tosse seca, mas ambos mantiveram-se normorréxicos e ativos.

9.3.2 Contagem de teleóginas

As contagens de teleóginas ingurgitadas, maiores ou iguais a 4,5 mm, realizadas do 4º ao 7º dia após a administração dos bioterápicos aos animais, demonstraram valores médios menores nos grupos tratados com os bioterápicos (grupos I, II e III) em relação ao grupo controle (grupo IV). Entretanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05\%$) (Figura 9).

Ao avaliar as contagens individuais de teleóginas ingurgitadas nos animais foi possível evidenciar diferenças significativas ($p < 0,05\%$) durante o período experimental entre os animais 6 (grupo II) e 9 (grupo III) e 9 e 12 (grupo IV), conforme a Tabela 4.

Tabela 4- Contagem individual total e média de fêmeas de *R. microplus* em bezerros dos grupos I (MV), II (MD), III (MC) e IV (controle) no dia inicial e do 4º até o 7º dia após o tratamento com bioterápicos. Pedro Leopoldo, MG, 2011.

Dia	ANIMAIS															
	GI MV				GII MD				GIII MC				GIV Controle			
	1	2	3	\bar{x}	4	5	6	\bar{x}	7	8	9	\bar{x}	10	11	12	\bar{x}
0	40	40	28	36	40	26	38	34,6	46	30	16	32	42	28	28	34,6
4	100	56	180	112	84	62	224	123,3	174	146	28	116	172	168	150	163,3
5	232	126	226	194,6	158	112	284	184,6	172	262	110	181,3	244	162	296	234
6	106	146	208	153,3	198	110	284	197,3	146	310	90	182	206	248	402	285,3
7	140	178	170	162,6	226	94	252	190,6	210	340	58	202,6	192	212	380	261,3

A maior infestação por *R. microplus* no 7º dia de experimento foi observada no animal 12, do grupo controle e a menor foi no animal 9 do grupo III (MC) (Tabela 4). Os animais do grupo I (MV) demonstraram menores valores médios totais de contagens de teleóginas no último dia de tratamento. Os animais do grupo controle (GIV) e dos grupos tratados (I, II e III) mantiveram níveis altos de infestações ao longo do período experimental (Tabela 4, Figura 9).

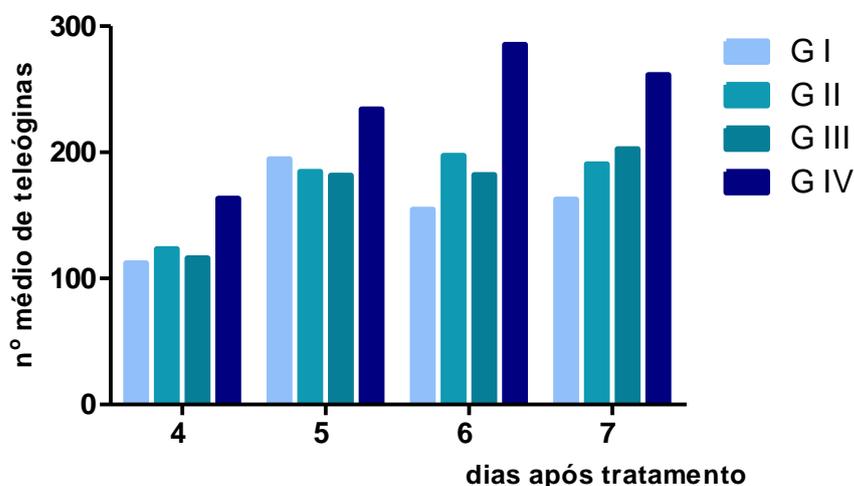


Figura 9- Contagem média de fêmeas de *R. microplus* em bezerros dos grupos I (MV), II (MD), III (MC) e IV (controle) do 4º até o 7º dia após o tratamento com os bioterápicos. Pedro Leopoldo, MG, 2011.

Os valores de eficácia dos bioterápicos MV (GI), MD (GII) e MC (GIII) no 6º dia de tratamento foram respectivamente 46,26%, 30,84% e 36,21%, enquanto, no 7º dia de tratamento foram 37,76%, 27,04% e 22,45%. A eficácia média dos bioterápicos MV, MD e

MC foi 33,06%, 25,86% e 27,53% respectivamente, demonstrando melhor eficácia do bioterápico MV (Tabela 5).

Tabela 5- Valores médios de eficácia segundo Amaral 1993, adaptado de Roulston et al. (1968), dos grupos tratados com o bioterápico de material vivo (GI), material dessecado (GII) e de material calcinado (GIII) após 4 a 7 dias de tratamento. Pedro Leopoldo, MG, 2011.

Dias após tratamento	Eficácia (%)		
	GI MV	GII MD	GIII MC
4	31,42	24,49	28,97
5	16,81	21,08	22,50
6	46,26	30,84	36,21
7	37,75	27,04	22,45
\bar{x}	33,06	25,86	27,53

Os resultados obtidos diferem dos relatados por Veríssimo (1988), que descreveu menor número de fêmeas ingurgitadas no grupo tratado diariamente com Carrapatinum 6 CH por 36 dias quando comparado com o grupo controle. Entretanto, o tempo de tratamento no presente ensaio foi menor que o da autora supracitada. Como a homeopatia visa produzir uma resposta secundária do hospedeiro, sugere-se estudos para investigar se o tratamento prolongado com o bioterápico aumenta a eficácia no controle de *R. microplus*.

9.4 Bioensaios *in vitro* após o tratamento com o bioterápico de *R. microplus*

9.4.1 Percentual de eclodibilidade e eficiência do bioterápico

As fêmeas ingurgitadas coletadas no 6º dia de tratamento após o período de oviposição e eclosão das larvas tiveram percentual de eclodibilidade respectivamente de 50 e 60% para os grupos I (MV) e II (MD), 65% para o grupo III (MC) e 90% para o IV (controle) (Tabela 6). Os valores de eficiência obtidos para os bioterápicos MV, MD e MC, no 6º dia, foram 74,76%, 44,87% e 44,79%, respectivamente (Tabela 7).

No 7º dia de tratamento o percentual de eclodibilidade de larvas foi 50% para os grupos I (MV) e II (MD), 55% para o grupo III (MC) e 90% para o grupo IV (controle) (Tabela 6). E os valores de eficiência obtidos para os bioterápicos MV, MD e MC foram 56,37%, 61,82% e 61,04%, respectivamente (Tabela 7).

Tabela 6- Peso total de fêmeas *R. microplus* (Pt), peso da postura (Po) em gramas e percentual de eclodibilidade (ecl) de larvas de *R. microplus* dos grupos MV (GI), MD (GII), MC (GIII) e controle (GIV), do 4º ao 7º dia de tratamento.

Dias	G I MV			G II MD			G III MC			G IV controle		
	Pt	Po	Ecl	Pt	Po	Ecl	Pt	Po	ecl	Pt	Po	ecl
4	1,336	0,522	85	1,236	0,400	90	1,287	0,496	85	1,412	0,476	80
5	1,768	0,771	90	1,366	0,455	70	1,209	0,505	70	1,143	0,427	70
6	1,460	0,298	50	1,119	0,416	60	0,985	0,340	65	1,684	0,757	90
7	1,074	0,325	50	1,282	0,340	50	1,263	0,311	55	1,333	0,514	90

Foram observadas associações significativas entre a eclosão e o tratamento com os bioterápicos nos diferentes dias. Todos os bioterápicos diferiram do grupo controle no 6º e 7º dias de tratamento demonstrando inibição na eclodibilidade. No 6º dia todos os bioterápicos diferiram entre si, mas o melhor resultado foi com o MV, enquanto no 7º dia foram com o MV e o MD.

Estes resultados demonstram inibição da eclodibilidade de larvas em 50% nos bezerros tratados com os bioterápicos MV e MD, enquanto o MC inibiu em 45%, após 6 dias de administração por via oral. Este fato sugere interferência dos bioterápicos 6 CH na reprodução de *R. microplus* corroborando os resultados de Gazim et al. (2010), que também descreveram redução de 50% na eclodibilidade de larvas de animais tratados com bioterápicos por 28 meses de tratamento. Portanto, no presente ensaio a redução na eclodibilidade ocorreu em tempo 25 vezes menor que Gazim et al. (2010). Estes pesquisadores relataram diferença no peso das fêmeas ingurgitadas e dos ovos de *R. microplus*, fato este não foi observado no presente ensaio.

Os bioterápicos demonstraram valores de eficiência variando de -50% até 74,7%, sendo que o maior valor foi obtido com o bioterápico preparado com o material vivo (MV) (Tabela 7).

Tabela 7- Valores médios de eficiência segundo Drummond et al. (1973) dos grupos tratados com o bioterápico de material vivo (GI), material dessecado (GII) e de material calcinado (GIII) após 4, 5, 6 e 7 dias após o tratamento. Pedro Leopoldo, MG, 2011.

Dias após tratamento	Eficiência (%)		
	GI MV	GII MD	GIII MC
4	-23,05	-8,00	-21,47
5	-50,08	10,84	-11,81
6	74,76	44,87	44,54
7	56,37	61,82	61,04

10. CONCLUSÃO

Os bioterápicos de *R. microplus* 6 CH não mostraram ação direta nos ixodídeos quando utilizados nos bioensaios *in vitro*, reafirmando a necessidade da experimentação em bovinos ao testar bioterápicos de *R. microplus*.

Os bioterápicos de material vivo, dessecado e calcinado de *R. microplus* na dinamização 6 CH, administrados a bezerros naturalmente infestados, mostraram eficácia acaricida baixa e inibição da eclodibilidade de larvas de *R. microplus*, sugerindo interferência dos mesmos na reprodução de *R. microplus*. Os melhores resultados de eficácia e eficiência foram obtidos com o bioterápico de material vivo.

In vitro acaricidal efficacy of plant extracts from Brazilian flora and isolated substances against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)

Paula Pimentel Valente · Juliana Mendes Amorim · Rachel Oliveira Castilho · Romário Cerqueira Leite · Múcio Flávio Barbosa Ribeiro

Received: 30 September 2013 / Accepted: 25 October 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract The tick *Rhipicephalus microplus* causes significant losses in livestock cattle and has developed increasing resistance to the primary acaricides that are used to treat these infections. The objective of this study was to identify new biomolecules or isolated substances showing acaricidal activity from plants. Larval packet tests were conducted to evaluate the effects of 11 species of plants and three isolated substances (betulinic acid, eugenol, and nerolidol) on *R. microplus*. An adult female immersion test was performed with the substance that showed the highest larvicidal activity, which was evaluated for inhibition of reproduction. Tests using *Licania tomentosa*, *Hymenaea stigonocarpa*, *Hymenaea courbaril*, *Stryphnodendron obovatum*, *Jacaranda cuspidifolia*, *Jacaranda ulei*, *Struthanthus polyrhizus*, *Chrysobalanus icaco*, *Vernonia phosphorea*, *Duguetia furfuracea*, and *Simarouba versicolor* extracts as well as the isolated substance betulinic acid indicated lower acaricidal effects on *R. microplus* larvae. The extract displaying the best larvicidal activity was the ethanolic extract from *L. tomentosa* at a concentration of 60 %, resulting in a mortality rate of 40.3 %. However, nerolidol and eugenol showed larvicidal

activity, which was highest for eugenol. Nerolidol caused a 96.5 % mortality rate in the *R. microplus* larvae at a high concentration of 30 %, and eugenol caused 100 % mortality at a concentration of 0.3 %. In the adult immersion test, 5 % eugenol was identified as a good biomolecule for controlling *R. microplus*, as demonstrated by its high acaricidal activity and inhibition of oviposition.

Introduction

The tick *Rhipicephalus microplus* is responsible for significant losses of cattle livestock, particularly in breeds of European origin (Francis 1966; Jonsson 2006; Furlong et al. 2007). Brazil, which exhibits a predominantly tropical and humid subtropical climate, shows a high occurrence of this parasite (Furlong 1993), except during the winter in the southern region of the country (Grisi et al. 2002). Current chemotherapeutic control of ticks is characterized by resistance to the main acaricides used, which results in ineffective treatment, increasing the necessary doses and frequency of drug application (Furlong et al. 2007), leading to high costs, toxic waste in the body of the animals (Galun 1975), and residues in the environment, which compromise human health (Kunz and Kemp 1994; Samish et al. 2004). Therefore, it is necessary to identify new drugs that are efficient, economically viable, and easily administered. Of the new pesticides registered in the USA from 1997 to 2010, 69.3 % originated as natural products, demonstrating the important role of biomolecules in the discovery and development of new products (Cantrell et al. 2012). Bioactive natural products from plants, such as extracts, fractions, and isolated substances, that may constitute prototypes for the development of acaricides against *R. microplus* are highly relevant in this context and have been shown to represent promising alternatives.

P. P. Valente (✉) · M. F. B. Ribeiro
Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627,
31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
e-mail: paula13v@hotmail.com

J. M. Amorim · R. O. Castilho
Departamento de Fitoquímica, Faculdade de Farmácia, Universidade
Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte,
Minas Gerais, Brazil

R. C. Leite
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de
Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais,
31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

The use of therapeutic plants in veterinary medicine has developed progressively during the last 10 years (Borges et al. 2011). Active substances that show larvicidal and acaricidal activity against *R. microplus* have been identified in extracts from certain plant (Mansingh and Williams 1998; Borges et al. 2011), including *Melia azedarach* (Borges et al. 1994; Borges et al. 2003), *Pimenta dioica* (Brown et al. 1998), *Ricinus communis* (Mansingh and Williams 1998; Zahir et al. 2009), *Symphytum officinale* (Mansingh and Williams 1998), *Stylosanthes scabra* (Khudrathulla and Jagannath 2000), *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus staigeriana* (Chagas et al. 2002), *Dahlstedtia pentaphylla* (Pereira and Famadas 2004), *Cymbopogon winterianus* (Martins 2006), *Simarouba glabra* (Mansingh and Williams 1998), *Simarouba versicolor* (Pires et al. 2007; Catto et al. 2009), *Achyranthes aspera*, *Anisomeles malabarica*, *Gloriosa superba* (Zahir et al. 2009), *Annona muricata* (Broglio- Micheletti et al. 2009), *Cunila angustifolia*, *Cunila incana* (Apel et al. 2009), *Piper aduncum* (Silva et al. 2009), *Aegle marmelos*, *Andrographis lineata*, *Andrographis paniculata*, *Cocculus hirsutus*, *Eclipta prostrata* (Elango and Rahuman 2011), *Acorus calamus* (Ghosh et al. 2011), *Cymbopogon martinii*, *Piper tuberculatum* (Chagas et al. 2012), *Annona squamosa* (Madhumitha et al. 2012), and *Guarea kunthiana* (Barbosa et al. 2013).

The essential oils found in some plants have been investigated due to causing attraction, repellence, and toxicity or mortality in insects and parasites (Brown et al. 1998; Saito 2004; Isman and Machial 2006; Santoro et al. 2007; Pasay et al. 2010). A number of volatile oils have been used for the control of insects, parasites, and microorganisms, including citronellal, α - and β -pinene, nerol, limonene, menthol, piperine (Saito 2004), carvacrol, thymol (Isman and Machial 2006; Martinez-Velazquez et al. 2011), α -asarone (Ghosh et al. 2011), and eugenol (Saito

2004; Santoro et al. 2007; MMWDV (2008); Pasay et al. 2010).

The objective of this study was to evaluate the effects of natural products against *R. microplus* larvae, to identify the extract from Brazilian flora or pure compound displaying the highest larvicidal activity, and to test its efficacy against engorged females.

Materials and methods

Collection and identification of plant material

Samples of plant material from 11 species were collected for analysis in the states of Mato Grosso, Minas Gerais, and Maranhão, and a voucher specimen of each species was deposited in the herbarium, as specified in Table 1.

Preparation of plant extracts

Extracts were obtained from different parts (leaves, roots, bark, and stems) of the plants (Table 1). The plant material was dried in an oven with air circulation at 40 °C. Next, the plant material was sprayed into a rotating knife mill and extracted with hexane, followed by maceration in commercial ethanol (96° GL–92.8° INPM). Twelve extracts were obtained from ten plants. The solvent was subsequently evaporated under reduced pressure in a vacuum bomb (Büchi, Flawil, Switzerland) to obtain a solid extract. *S. versicolor* was treated differently. It was dried in the shade, and after drying, the stem bark was sprayed on an electric forage chopper. The extraction of this specimen was performed via maceration in dichloromethane followed by commercial ethanol (96° GL–92.8° INPM) in an ultrasonic bath (Thornton, Bedford, USA) for 30 min to obtain two additional extracts. The extract was

Table 1 Botanical data for the plants

Botanical name	Popular name	Family	Part of plant	Collection site	Voucher specimen
<i>Duguetia furfuracea</i> (St. Hil) Benth. and Hook	Araticum miúdo	Annonaceae	Leaves	UCDB	HMS 4445
<i>Hymenaea courbaril</i> L.	Jatobá grande	Fabaceae	Leaves	UCDB	CGMS 11696
<i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. Ex. Hayne	Jatobá pequeno	Fabaceae	Leaves	UCDB	HUFMS 11695
<i>Jacaranda ulei</i> Bureau and K. Schum.	Caroba	Bignoniaceae	Leaves, roots	UCDB	CGMS 11972
<i>Jacaranda cuspidifolia</i> Mart.	Caroba branca	Bignoniaceae	Leaves	Aquidauana, MS	CGMS 11923
<i>Licania tomentosa</i> Benth.	Oiti	Chrysobalanaceae	Leaves	UFMG	BHCB 152.221
<i>Struthanthus cf polyrhizus</i> Mart.	Erva de passarinho	Loranthaceae	Leaves	UCDB	CGMS 11700
<i>Stryphnodendron obovatum</i> Benth.	Barbatimão	Leguminosae	Bark, roots	UCDB	CGMS 32997
<i>Simarouba versicolor</i> St. Hill	Mata-cachorro	Simaroubaceae	Stem bark	UFM	BHCB 154096
<i>Vernonia phosphorea</i> Vell.	Assa-peixe	Asteraceae	Leaves	UCDB	CGMS 11970
<i>Chrysobalanus icaco</i> L.	Abajeru	Chrysobalanaceae	Leaves	Cabo Frio, RJ	R195942

UCDB Campus da Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul; UFMG Campus da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais; UFM Campus da Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha, Maranhão

filtered and dried in a rotary evaporator (Büchi, Flawil, Switzerland).

Isolated substances

Eugenol was obtained through the acid–base extraction of clove oil (*Eugenia caryophyllata*). Gas chromatography coupled to mass spectrophotometry (GC/MS) was used to identify the composition of the clove oil. The primary substance was identified as eugenol, at 97.36 %, showing a retention time of 18.64 min.

The other two tested substances, nerolidol and betulinic acid, were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA).

Larval packet test

Filter papers (2×2 cm) were impregnated with the samples and evaluated in triplicate. Approximately 100 larvae at 14 to 21 days after eclosion were transferred to the impregnated filter paper and covered with another impregnated paper to construct a sandwich, which was placed inside an envelope. The sides and the top of the envelope were sealed with channels according to the method of Shaw (1966), as adapted by Leite (1988). The envelopes were placed in plastic trays and maintained in biochemical oxygen demand (B.O.D.) incubator chambers (Fanem, São Paulo, Brazil) at 28±2 °C under 85 % relative humidity for 24 h. Following this incubation, the number of live and dead larvae in each envelope was counted using a vacuum pump (Fanem, São Paulo, Brazil). The plant extracts were prepared with different solvents and analyzed at different concentrations, as presented in Table 2.

Eugenol was evaluated at concentrations of 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, and 1 %. Nerolidol was evaluated at concentrations of 5, 20, and 30 % and betulinic acid at a concentration of 5 mg/mL (Table 3). The respective solvents were used as controls, which included 3 % Tween 20, 3 % Triton X-100, and 3 % dimethyl sulfoxide (DMSO).

The 50 % lethal concentration (LC₅₀) was determined via linear regression of a graph of the number of dead larvae versus the concentration required to achieve the effective concentration for 50 % lethality. Lower LC₅₀ values indicate high lethality.

Adult immersion test

The effect of eugenol at concentrations of 1 to 30 %, solubilized in 3 % Triton X-100, was evaluated in adult immersion tests (AITs). Engorged *R. microplus* females were collected from naturally infested cattle and subsequently washed in distilled water. For each evaluated concentration, ten engorged females were selected, grouped by weight, and immersed in

Table 2 Mean values of larval mortality determined in the larval packet test of Shaw (1966) with some modifications, testing solvents, and natural products against *R. microplus* larvae

Samples	Solvent	Concentration (%)	Mean larval mortality (%)
<i>Simarouba versicolor</i>	Ethanol	1	0.75
		5	0.54
		10	2.15
		60	17.69
<i>Simarouba versicolor</i>	Dichloromethane	1	7.61
		5	18.23
		10	30.08
<i>Licania tomentosa</i>	Ethanol	1	0.43
		5	0.11
		10	0.69
		20	1.12
		30	10.2
		50	20.2
<i>Hymenaea stigonocarpa</i>	Ethanol	60	40.26
		10	0
		30	1.05
<i>Hymenaea courbaril</i>	Ethanol	50	5.79
		10–30	0.68
		10–50	0
<i>Stryphnodendron obovatum</i>	Ethanol	10–50	0
<i>Jacaranda cuspidifolia</i>	Ethanol	10–50	0
<i>Jacaranda ulei</i>	Ethanol	10–50	0
<i>Struthanthus polyrhizus</i>	Ethanol	100	1.52
<i>Struthanthus polyrhizus</i>	Hexane	100	1.24
<i>Chrysobalanus icaco</i>	Ethanol	100	1.02
<i>Vernonia phosphorea</i>	Ethanol	100	0.45
<i>Vernonia phosphorea</i>	Hexane	100	8.20
<i>Duguetia furfuracea</i>	Hexane	100	6.03
Triton X-100	–	3	0
Tween 20	–	3	0.74
DMSO	–	3	0.38
Water	–	–	0

solution for 5 min (Drummond et al. 1973). Then, the groups of engorged females were removed, and the excess solution was removed with a paper towel. Subsequently, the females were individually placed in an environmental chamber maintained at 28±2 °C under 85 % relative humidity. Triton X-100 (3 %) was used as the control solution. The mortality rate and reproductive efficiency of the engorged females in the treated and control groups were evaluated.

The formula of Drummond et al. (1973) was used to calculate the reproductive efficiency (RE).

Table 3 Mean larval mortality determined in the larval packet test of Shaw (1966), with some modifications, testing the isolated substances eugenol, nerolidol, and betulinic acid against *R. microplus* larvae

Isolated substances	Concentration	Mean larval mortality (%)
Eugenol	0.1 %	9.91
	0.3–1 %	100
	5 %	29.29
Nerolidol	20 %	32.01
	30 %	96.53
	5 mg/mL	8.70

$$RE = \frac{\text{Weight of eggs(g)} \times \% \text{ Hatching} \times 20.000*}{\text{Weight of engorged females(g)}}$$

* constant indicating the number of eggs present in 1 g.

The formula of Drummond et al. (1973) was used to calculate the efficiency of eugenol.

$$\text{Efficiency} = \frac{RE(\text{control group}) - RE(\text{experimental group})}{RE(\text{control group})} \times 100.$$

Results

The larval packet test (LPT) was conducted to evaluate the susceptibility of the larvae to natural products. The solvents Triton, Tween, and DMSO showed low toxicity in *R. microplus* larvae, resulting in mortality rates of less than 1 %.

For the plant extracts, the resultant *R. microplus* larval mortality rates ranged from 0 to 40.3 % (Table 2). The extract

displaying the best larvicidal activity was the ethanolic extract from *Licania tomentosa* at a concentration of 60 %, followed by the dichloromethane extract of the stem bark of *S. versicolor* at a concentration of 10 %, resulting in a mortality rate of 30.1 %.

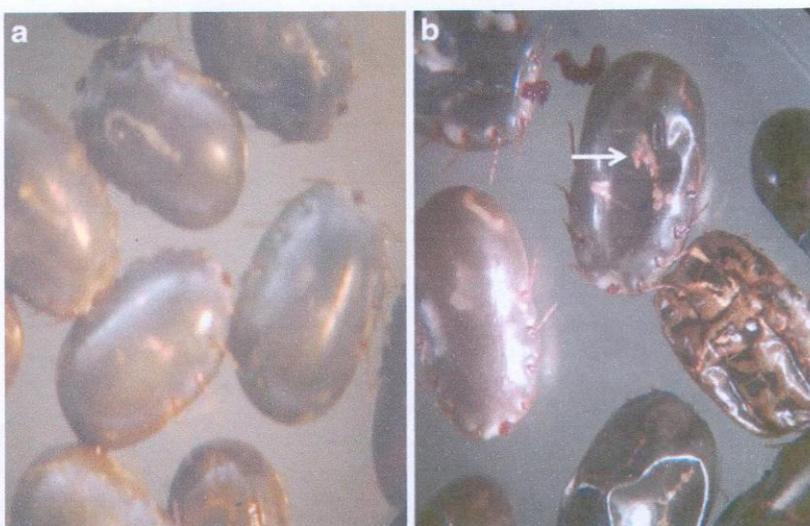
The other plant extracts showed low acaricidal activity in the *R. microplus* larvae, causing mortality rates ranging from 0 to 15.3 % (Table 2).

Among the isolated substances, betulinic acid had a low acaricidal effect (8.7 %), while nerolidol caused a 96.5 % mortality rate in the *R. microplus* larvae, but only at a high concentration of 30 % (Table 3). Eugenol at a concentration of 0.1 % caused 9.91 % larval mortality, whereas 0.3 % eugenol caused 100 % mortality of the *R. microplus* larvae. Because of the high larvicidal activity of eugenol, the AITs were performed at different concentrations. The LC_{50} value of eugenol against the *R. microplus* larvae was 0.17 % (5.89 $\mu\text{L/mL}$). In the AIT, 2 % eugenol was found to interfere with the reproduction of *R. microplus* with an efficiency of 45.04 %, whereas 3 % eugenol was 79.29 % efficient. At a concentration of 5 %, eugenol inhibited the oviposition of engorged *R. microplus* females with 100 % efficiency (Fig. 1). Eugenol at 30 % resulted in 100 % mortality of engorged females 24 h after completion of the test. The LC_{50} value for eugenol against the engorged females was 1.32 % (13.21 $\mu\text{L/mL}$).

Discussion

In vitro testing is important during the early stages of research on new acaricide products to determine whether they constitute novel therapeutic options for the control of *R. microplus* (Chagas 2004).

Fig. 1 Stereoscopic microscope view of engorged *R. microplus* females in AIT, with 5 % eugenol (a before AIT, b 120 h after AIT). Note the hemorrhagic lesions (arrow), shrinkage of the tick cuticle, and the absence of viable posture



The plant species evaluated in this study were selected using ethnopharmacological and chemosystematics criteria. *S. versicolor* and eugenol were selected because of their high acaricidal activity, as reported by Pires et al. (2007), Catto et al. (2009), and Brown et al. (1998), whereas *Hymenaea courbaril* was described as showing insecticidal activity by Aguiar et al. (2010). Chemosystematics was used to select species in relation to their cytotoxicity. The plant species were prioritized based on their occurrence on the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) campus or having available extracts in the bank of extracts of the Phytochemistry Laboratory, Faculty of Pharmacy, UFMG. The *S. versicolor* extract showed low larvicidal activity against *R. microplus* (Table 2). This finding differs from the results of Pires et al. (2007) who applied an ethanol extract of *S. versicolor* at a concentration of 0.75 mg/mL and obtained 100 % larval mortality. The low acaricidal activity observed in the present study may be attributed to the low concentration of active substances in this plant species. A number of factors influence the concentrations of biomolecules in plants, such as the soil, climate, vegetative stage, and the part of the plant used. Climatic factors, such as rainfall, brightness of the region, and the composition of the soil, interfere with plant physiology and consequently influence the occurrence and concentration of secondary metabolites (Melo 2006). Intense and continuous rainfall can result in the loss of water-soluble substances from the leaves and roots via leaching (Gobbo-Neto and Lopes 2007). The low concentration of active ingredients detected in this bioassay may be associated with the harvesting season of the species in Maranhão, which occurs after a long rainy season. Moreover, this region is known for its high levels of rainfall.

In the last years, several plant extracts, isolated and synthesized substances, have been evaluated, and some of them did not demonstrated activity against *R. microplus* (Ghosh et al. 2011; Chagas et al. 2012). However, some examples of plant extracts with high larvicidal activity (100 %) are *A. aspera*, *A. malabarica*, *R. communis*, *G. superba* (Zahir et al. 2009), *A. marmelos*, *A. lineata*, *A. paniculata*, *C. hirsutus*, *E. prostrate* (Elango and Rahuman 2011), and *A. squamosa* (Madhumitha et al. 2012), all of them at the concentration of 2 ppm. The results obtained for the extracts evaluated in this assay showed a little activity regarding the control of *R. microplus* larvae. The plant extract displaying the highest larvicidal activity was *L. tomentosa* at a concentration of 60 %, causing a mortality rate of 40.3 % (Table 2). In contrast, the substance isolated from *L. tomentosa*, betulinic acid, showed lower activity, resulting in a mortality rate of 8.7 % (Table 3).

There are no reports regarding the activity of *Hymenaea stigonocarpa*, *Duguetia furfuracea*, and *Vernonia phosphorea* extracts against *R. microplus* larvae. However, Barbosa et al. (2011) tested a *Vernonia ferruginea* extract

against engorged *R. microplus* females and obtained an efficacy of 11.5 %. The extracts of these plants proved to be insufficient for the control of *R. microplus* larvae, even at high concentrations (100 %).

The isolated substance nerolidol demonstrated a high larvicidal efficacy (96.5 %), but only at a high concentration (30 %). At low concentrations, nerolidol showed reduced efficacy against *R. microplus* larvae, which is consistent with the findings of Bogni et al. (2010).

Eugenol, the primary component of *E. caryophyllata* oil, resulted in the best control of *R. microplus* larvae. At a concentration of 0.3 % (LC₅₀=0.17 %), eugenol caused 100 % mortality of *R. microplus* larvae. Monteiro et al. (2012) tested 0.5 % eugenol and reported the larvicidal effects (100 %) for *R. microplus* and *Dermacentor nitens*. In this assay, 0.3 % eugenol caused 100 % mortality in *R. microplus* larvae (Table 3); differently from other essential oils, the concentration was higher, 0.8 % *Callitris sulcata*, 1.25 % *Neocallitropsis pancheri*, 5 % *Araucaria columnaris* (Lebouvier et al. 2013), 1.25 % *Cuminum cyminum*, and 2.5 % *P. dioica*, that caused the same mortality in *R. microplus* (Martinez-Velazquez et al. 2011). Eugenol at a concentration of 5 % effectively inhibited the oviposition of engorged *R. microplus* females, suggesting its potential efficacy for the environmental control of *R. microplus*. At a concentration of 30 % (LC₅₀=1.32 %), eugenol showed high acaricidal activity. The reproductive efficacy and acaricidal activity of eugenol were also observed by Brown et al. (1998); however, the methodology applied by these authors does not allow comparison with the results obtained in this study.

Conclusions

The 14 plant extracts evaluated in this study are not potential acaricide candidates because they demonstrated a low efficacy against *R. microplus* larvae. In contrast, the isolated substances eugenol and nerolidol showed high larvicidal efficacy, with eugenol both inhibiting oviposition and showing acaricidal efficacy. This substance is a potential candidate for use in efficacy studies in cattle and for the development of new therapeutics for the control of *R. microplus*.

Acknowledgments The authors are grateful to the botanists Dr. Amildo Pott, Dr. Vali J. Pott, and Ubirazilda Maria Resende at the Federal University of Mato Grosso do Sul and to Dr. João Renato Stehmann, a professor in the Department of Botany at the Institute of Biological Sciences at the Federal University of Minas Gerais, for the collection and identification of plant species. We also thank Dr. Livio Martins Costa Junior and Sandra Araujo at the Federal University of Maranhão for the collection of *Simarouba versicolor*. We thank Dr. Maria Auxiliadora Coelho Kaplan of the Center for Natural Products Research at the Federal University of Rio de Janeiro for the GC/MS analysis. We thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for aid through a scholarship.

References

- Aguiar JCD, Santiago GMP, Lavor PL, Veras HNH, Ferreira YS, Lima MAA, Arriaga AMC, Lemos TLG, Lima JQ, de Jesus HCR, Alves PP, Braz-Filho R (2010) Chemical constituents and larvicidal activity of *Hymenaea courbaril* fruit peel. *Nat Prod Commun* 5:1977–1980
- Apel MA, Ribeiro VLS, Bordignon SAL, Henriques AT, Poser GV (2009) Chemical composition and toxicity of the essential oils from *Cunila* species (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasitol Res* 105:863–868
- Barbosa CS, Borges LMF, Miguita CR, Garcez FR, Garcez WS, Violante IMP, Alves RD, Nicácio J (2011) Ensaios in vitro com extratos brutos e metabólitos secundários de plantas do cerrado sul-matogrossense sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887). In: Anais 63ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC), Goiânia, Goiás
- Barbosa CS, Borges LMF, Nicácio J, Alves RD, Miguita CR, Violante IMP, Hamerski L, Garcez WS, Garcez FR (2013) In vitro activities of plant extracts from the Brazilian Cerrado and Pantanal against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol* 60:421–430
- Bogni SI, Chagas ACS, Silva IC, Boschini L, Vieira LCC, Corrêa AG (2010) Ação acaricida de terpenos sobre o carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: Anais XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, p 16
- Borges LMF, Silva AC, Neves BP (1994) Teste in vitro de eficácia de cinamomo (*Melia azedarach*, L) sobre fêmeas ingurgitadas do *Boophilus microplus*, Can. (Acari: Ixodidae). *Rev Patol Trop* 23: 175–179
- Borges LMF, Ferri PH, Silva WJ, Silva WC, Silva JG (2003) In vitro efficacy of extracts of *Melia azedarach* against the tick *Boophilus microplus*. *Med Vet Entomol* 17:228–231
- Borges LMF, Sousa LAD, Barbosa CS (2011) Perspectives for the use of plants extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev Bras Parasitol Vet* 20:89–96
- Broglio-Micheletti SMF, Valente ECN, Souza LA, Dias NS, Araújo AMN (2009) Extratos de plantas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. *Rev Bras Parasitol Vet* 18:44–48
- Brown HA, Minott DA, Ingram CW, Williams LAD (1998) Biological activities of the extracts and constituents of pimento, *Pimenta dioica* L. against the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Sci Appl* 18:9–16
- Cantrell CL, Dayan FE, Duke SO (2012) Natural products as sources for new pesticides. *J Nat Prod* 75:1231–1242
- Catto JB, Bianchini I, Saito ML (2009) Efeito acaricida in vitro de extratos de plantas do Pantanal no carrapato de bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Embrapa, Campo Grande, pp 1–25
- Chagas ACS (2004) Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. *Rev Bras Parasitol Vet* 13:S156–S160
- Chagas ACS, Passos WM, Prates HT, Leite RC, Furlong J, Fortes ICP (2002) Efeito acaricida de *Eucalyptus* em *Boophilus microplus*: óleos essenciais e concentrados emulsionáveis. *Braz J Vet Res Anim Sci* 39:247–253
- Chagas ACS, de Barros LD, Continguiça F, Furlan M, Gigliotti R, Oliveira MCS, Bizzo HR (2012) In vitro efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res* 110:295–303
- Drummond RO, Ernst SE, Trevino JL, Gladney WJ, Grahan OH (1973) *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. *J Econ Entomol* 1:130–133
- Elango G, Rahuman AA (2011) Evaluation of medicinal plant extracts against ticks and fluke. *Parasitol Res* 108:513–519
- Francis SJ (1966) Resistance of zebu and other cattle tick infection and babesiosis with special reference in Australia: an historical review. *Brit Vet J* 122:301–307
- Furlong J (1993) Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. Caderno Técnico da Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, 8:49–61
- Furlong J, Martins JRS, Prata MCA (2007) O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? *Hora Vet* 159:26–32
- Galun R (1975) Control de las plagas del ganado mediante reguladores del crecimiento del insecto Parte II. In: Seminário sobre Ectoparasitas: Ecología y control de los parasitos externos de importancia economica que afectan el ganado en America Latina. Cali, Colombia, pp 185–193
- Ghosh S, Sharma AK, Kumar S, Tiwari SS, Ratogi S, Srivastava S, Singh M, Kumar R, Paul S, Ray DD, Rawat AJS (2011) In vitro and in vivo efficacy of *Acorus calamus* extract against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasitol Res* 108:361–370
- Gobbo-Neto L, Lopes NP (2007) Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim Nova* 30:374–381
- Grisi L, Massard CL, Moya-Borja GE, Pereira JB (2002) Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora Vet* 21:8–10
- Isman MB, Machial CM (2006) Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. In: Rai M, Carpinella MC (eds) *Advances in phytomedicine: naturally occurring bioactive compounds*. Elsevier, New York, pp 29–44
- Jonsson NN (2006) The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet Parasitol* 137:1–10
- Khudrathulla M, Jagannath MS (2000) Effect of methanol extract of *Stylosanthes scabra* on ixodid ticks of animals. *Indian J Anim Sci* 70:1057–1058
- Kunz SE, Kemp NH (1994) Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 13:1249–1286
- Lebouvier N, Hue T, Hnawia E, Lesaffre L, Menut C, Nour M (2013) Acaricidal activity of essential oils from five endemic conifers of New Caledonia on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasitol Res* 112:1379–1384
- Leite RC (1988) *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) Susceptibilidade, uso atual e retrospectivo de carrapaticidas em propriedades das regiões fisiográficas da Baixada do Grande Rio e Rio de Janeiro. Uma abordagem epidemiológica. Tese, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, p 151
- Madhumitha G, Rajakumar G, Roopan SM, Rahuman AA, Priya KM, Saral AM, Khan FRN, Khanna VG, Velayutham K, Jayaseelan C, Kamaraj C, Elango G (2012) Acaricidal, insecticidal, and larvicidal efficacy of fruit peel aqueous extract of *Annona squamosa* and its compounds against blood-feeding parasites. *Parasitol Res* 111: 2189–2199
- Mansingh A, Williams LAD (1998) Pesticidal potential of tropical plants—II. Acaricidal activity of crude extracts of several Jamaican plants. *Int J Trop Insect Sci* 18:149–155
- MMWDV (2008) Marin Municipal Water District Vegetation Management Plan: Herbicide risk assessment. http://www.marinwater.org/documents/Chap6_CloveOil_8_28_08.pdf. Accessed 24 Aug 2011
- Martinez-Velazquez M, Castillo-Herrera GA, Rosario-Cruz R, Flores-Fernandez JM, Lopez-Ramirez J, Hernandez-Gutierrez R, Lugo-Cervantes E (2011) Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res* 108:481–487
- Martins RM (2006) Estudo in vitro da ação acaricida do óleo essencial da gramínea Citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) no carrapato *Boophilus microplus*. *Rev Bras Plant Med* 8:71–78

- Melo MM (2006) Plantas tóxicas para animais domésticos. Cad Téc Vet Zootec 49:1–3
- Monteiro CM, Maturano R, Daemon E, Catunda-Junior FEA, Calmon F, Senra TS, Faza A, Carvalho MG (2012) Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. Parasitol Res 111: 1295–1300
- Pasay C, Mounsey K, Stevenson G, Davis R, Arlian L, Morgan M, Vyszynski-Moher D, Andrews K, McCarthy J (2010) Acaricidal activity of eugenol based compounds against scabies mites. PLoS One 5(8):e12079
- Pereira JR, Famadas KM (2004) Avaliação in vitro da eficiência do extrato da raiz do timbó (*Dahlstedtia pentaphylla*) (Leguminosae, Papilionoideae, Millettidae) sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) na região do Vale do Paraíba, São Paulo, Brasil. Arq Inst Biol 71:443–450
- Pires JEP, Fernandes RM, Fernandes MZLCM, Viana GEN, Dourado JCL, Sousa SAA (2007) Determinação da concentração inibitória média (CI50) do extrato aquoso de *Simarouba versicolor*, St. Hill sobre a ovipostura do carrapato bovino (*Boophilus microplus*, Canestrini, 1887). Rev Bras Plant Med 9:23–26
- Saito ML (2004) As plantas praguicidas: alternativa para o controle de pragas da agricultura, Embrapa, Jaguariúna, pp 1–4
- Samish M, Ginsberg H, Glazer I (2004) Biological control of ticks. Parasitology 129:S389–S403
- Santoro GF, Cardoso MG, Guimarães LGL, Mendonça LZ, Soares MJ (2007) *Trypanosoma cruzi*: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. Exp Parasitol 116:283–290
- Shaw RD (1966) Culture of an organophosphorus-resistant strain of *Boophilus microplus* (Can.) and an assessment of its resistance spectrum. Bull Entomol Res 56:389–404
- Silva WC, Martins JRS, Souza HEM, Heizen H, Cesio MV, Mato M, Albrecht F, Azevedo JL, Barros NN (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
- Zahir AA, Rahuman AA, Kamaraj C, Bagavan A, Elango G, Sangaran A, Kumar BS (2009) Laboratory determination of efficacy of indigenous plant extracts for parasites control. Parasitol Res 105:453–461

O eugenol foi obtido por extração ácido base do óleo de cravo (Georges Broemmé GB 1885, Carmo da Mata, M.G.) proveniente da planta *Eugenia caryophyllata*, conforme figura 10.

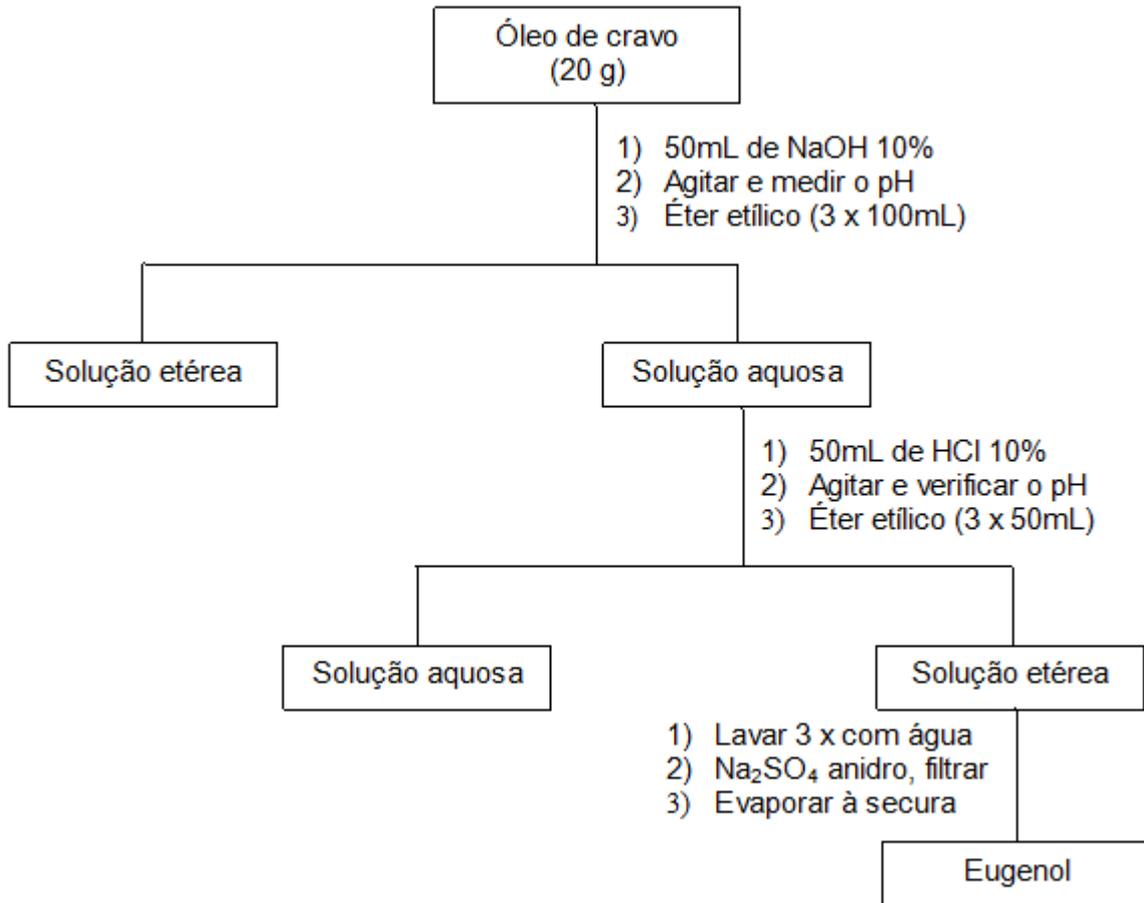


Figura 10- Extração ácido-base do eugenol a partir do óleo de cravo.

EXPERIMENTO IV- Avaliação do efeito do bioterápico de *R. microplus* 6 CH e do eugenol a 5% na formulação de *pour on*, em bovinos em condições controladas de infestação e sua interferência no Bem-Estar Animal

11. OBJETIVOS

11.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia do bioterápico de material vivo (MV) de *R. microplus* 6 CH e do eugenol *pour on* no controle de *R. microplus* em bovinos em condições controladas de infestação e a interferência dos tratamentos sobre o bem-estar dos animais.

11.2 Objetivos específicos

- Avaliar a eficácia do bioterápico MV na potência 6 CH e eugenol a 5% *pour on* em bezerros artificialmente infestados por *R. microplus*;
- Avaliar a eficiência reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* após o tratamento de bezerros com o bioterápico MV de *R. microplus* 6 CH e com eugenol a 5% *pour on*;
- Estudar possíveis alterações morfológicas no ovário de fêmeas de *R. microplus* obtidas de bezerros tratados com o bioterápico e com o eugenol a 5% *pour on* por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET);
- Avaliar as alterações leucocitárias e eritrocitárias antes e após os tratamentos com o bioterápico MV de *R. microplus* 6 CH e com o eugenol a 5% *pour on*;
- Avaliar a atividade de enzimas séricas hepáticas e renais de bezerros antes e após a aplicação do eugenol na concentração 5% *pour on*;
- Avaliar por meio das proteínas de fase aguda (haptoglobina, α 1-glicoproteína ácida e transferrina) a magnitude da resposta inflamatória evocada pela utilização do bioterápico de carrapato de *R. microplus* em bezerros artificialmente infestados por *R. microplus*, sem contato prévio com este ixodídeo;
- Avaliar a interferência do bioterápico e do eugenol *pour on* sobre o bem-estar dos animais parasitados.

12. MATERIAL E MÉTODOS

12.1 Preparo da solução eugenol a 5% *pour on*

A solução eugenol a 5% *pour on* foi desenvolvida pelo professor André Faraco, no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG, conforme a tabela 8.

Tabela 8- Formulação da solução eugenol a 5% *pour on*.

Composição	Porcentagem (%)
Eugenol	5
Óleo de amêndoas	10
Óleo de girassol	29
Óleo mineral	29
Lanolina	5
Monoesterato de glicerila	2
Álcool etílico	20

A formulação *pour on* para o eugenol foi utilizada devido à facilidade e menor estresse na administração do produto, menor quantidade de óleo essencial quando comparado com o banho de aspersão, além de não ser necessária a utilização de brete e de pulverizadores.

12.2 Preparo do bioterápico de material vivo (MV) de *R. microplus* 6 CH

A metodologia de preparo do bioterápico de material vivo foi realizada conforme item 8.1 (Experimento II)

12.3 Bioensaio *in vivo*

12.3.1 Animais

Foram utilizados 18 bezerros machos da raça Holandesa (PO), com 6 meses de idade, pesando aproximadamente 145 Kg, mantidos nas instalações do tipo *tie stall* da Clínica de Ruminantes do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG, durante 42 dias.

No período pré-experimental os bezerros foram vacinados contra botulismo, carbúnculo sintomático, edema maligno e enterotoxemia (Poli Star- Vallée) e foi administrada enrofloxacina na dose única de 7,5 mg/kg de peso vivo, por via intramuscular profunda (Kinetomax - Bayer). Os animais foram criados em galpões telados para impedir a entrada de moscas, e semanalmente, foram banhados com produtos piretróides para impedir infestação por carrapatos. Os banhos foram suspensos 30 dias antes do experimento.

Os bezerros foram alojados separadamente em instalações com dimensões de 4,6 m de largura por 7,0 m de comprimento, piso cimentado coberto por placas emborrachadas, com cochos individuais e um bebedouro automático para cada dois animais. Os animais receberam silagem de milho e ração formulada pela fazenda da UFMG, oferecida em duas porções diárias, sal mineral (Itambé) e água “*ad libitum*”.

As instalações e os bebedouros foram higienizados diariamente e no período de aproximadamente 2 horas, os animais foram soltos para socialização em baias maiores, constituindo grupos de dois a três animais.

12.3.2 Metodologia experimental

Os 18 bezerros sem prévio contato com carrapatos foram infestados com aproximadamente 1500 larvas de *R. microplus*, com 14 a 21 dias após a eclosão. As larvas provinham de ovos dos três primeiros dias de postura. Foram realizadas 3 infestações, uma por semana, em que as larvas foram distribuídas na região dorsal do pescoço, lombar e próximo à cauda de cada animal. Os animais foram divididos em três grupos de seis animais:

- Grupo I: os animais não receberam medicação, constituindo o grupo controle;
- Grupo II: os animais receberam 1,0 mL do bioterápico MV de *R. microplus* na potência 6 CH, por via oral, administrado duas vezes ao dia, durante 42 dias.
- Grupo III: os animais foram tratados com eugenol a 5% na formulação *pour on*, na dose de 10 mL para cada 100 Kg de peso vivo, bilateralmente ao longo da coluna vertebral, em aplicação única no 21º dia após a infestação artificial.

A administração do bioterápico 6 CH foi realizada no dia anterior à infestação larval nos animais do grupo II. Após a administração dos medicamentos (bioterápico e eugenol *pour on*), os animais foram monitorados durante 4 horas para observação de eventuais reações adversas.

12.4 Exames clínicos e colheita de sangue

Os animais foram submetidos a exame clínico diário, englobando os parâmetros: temperatura retal, frequências respiratória e cardíaca e em caso de anormalidades nestes parâmetros foi realizado exame físico completo do animal (tempo de preenchimento capilar, coloração e aspecto de mucosas ocular e oral, auscultação pulmonar e abdominal, avaliação do aspecto e consistência das fezes) e exames laboratoriais (exame parasitológico de fezes e esfregaço de sangue capilar para pesquisa de hematozoários).

Amostras sanguíneas foram obtidas por venopunção em frasco vacutainer contendo ácido etilenodiaminotetracético di-sódico (EDTA 10%). Os parâmetros eritrocitários e leucocitários foram determinados utilizando-se o contador automático de células Abacus Jr. Vet (Diation).

As colheitas de sangue para as determinações eritrocitárias e leucocitárias dos animais dos grupos I, II e III foram realizadas nos dias 0, 2, 10, 21, 30 e 39 após a infestação por larvas de *R. microplus* para monitoração da saúde dos animais.

Para obtenção de soro dos animais do grupo III, amostras sanguíneas foram colhidas em tubos vacutainer sem anticoagulante. Os tubos foram centrifugados e as alíquotas de soro acondicionadas à temperatura de -20° C. Para a realização dos testes bioquímicos e avaliar a concentração de fosfatase alcalina (FA), aspartato aminotransferase (AST), ureia e creatinina foi utilizado o espectrofotômetro Cobas Mira Plus (Roche). Estas determinações foram realizadas nos dias 0, 2, 4, 6, 9 e 18 após a aplicação do *pour on*, com o objetivo de avaliar a possível toxicidade do eugenol nos tecidos hepático e renal.

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da UFMG, sob orientação da professora Dra. Fabíola Paes Leme.

Amostras de soro dos animais do grupo II, tratados com bioterápico, foram colhidas em tubos vacutainer e centrifugadas. Alíquotas foram acondicionadas à temperatura de -20° C para a mensuração das proteínas de fase aguda: haptoglobina, α 1-glicoproteína ácida e transferrina, de acordo com a técnica proposta por Laemmli (1970). O fracionamento eletroforético foi realizado em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Como referência foi utilizada uma solução marcadora com diferentes pesos moleculares (SigmaMarkerTM). As mensurações foram realizadas nos dias -1, 0, 1, 2, 3, 7, 10, 15, 21, 30 e 39 após a infestação por larvas de *R. microplus*, com o objetivo de avaliar a resposta inflamatória desencadeada pela administração do bioterápico e pela infestação por *R. microplus*. As análises foram realizadas no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV, UNESP, Campus de Jaboticabal, sob orientação

do professor Dr. José Jurandir Fagliari. A determinação da proteína sérica total, para a realização dos cálculos das proteínas de fase aguda, foi realizada pelo método de refratometria segundo a técnica de Schalm's no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da UFMG.

12.5 Ação terapêutica do bioterápico de *R. microplus* 6 CH e do eugenol a 5 % *pour on* em bovinos experimentalmente infestados com *R. microplus*

12.5.1 Contagem de teleóginas

A eliminação de *R. microplus* e o efeito residual da formulação homeopática e do *pour on* foram avaliados por meio de contagens diárias de todas as fêmeas, maiores ou iguais a 4,5 mm de comprimento, presentes no lado esquerdo de cada bovino (Villares 1941, modificado por Wilkinson 1955). As contagens foram realizadas do 21º dia até o 41º dia após a primeira infestação, totalizando 21 determinações por animal. Para obtenção da infestação por animal, os valores obtidos nas contagens foram multiplicados por dois (Oliveira 1993) e para a categoria do nível de infestação foi utilizada a classificação para a raça Holandesa conforme Veríssimo et al. (2004).

12.5.2 Performance reprodutiva e percentual de eclodibilidade

Conforme descrito no item 4.4.1

12.6 Cálculos de eficiência reprodutiva, eficiência e eficácia

12.6.1 Cálculo de eficiência reprodutiva (ER)

Conforme descrito no item 8.5 (experimento II).

12.6.2 Cálculo de eficiência dos produtos

Conforme descrito no item 8.6 (experimento II).

12.6.3 Cálculo de eficácia dos produtos

Conforme descrito item 4.7 (experimento I).

12.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Foram utilizadas duas teleóginas de *R. microplus* de cada grupo experimental (grupos I, II e III), maiores ou iguais a 4,5 mm de comprimento, coletadas no 35º e 36º dias após a primeira infestação (36º e 37º dias após o tratamento com o bioterápico), para o processamento por microscopia eletrônica no Centro de Microscopia da UFMG.

Os carrapatos foram processados conforme descrição no item 4.8.

12.8 Avaliação do Bem-Estar Animal

A avaliação do bem-estar dos animais foi realizada com base em três princípios do protocolo Welfare Quality (2009) mediante a análise de seis critérios com adaptações. O primeiro princípio envolveu a boa alimentação dos animais com base em dois critérios objetivando-se a ausência de fome e sede por período prolongado. Foi avaliado mediante a disponibilidade de comedouros e bebedouros, escore corporal dos animais e o ganho de peso durante o período experimental, visto que a deficiência nutricional diminui a resistência dos animais aos carrapatos *R. microplus*.

O método de avaliação do escore de condição corporal utilizado baseou-se na visualização de características em quatro regiões do corpo dos bezerros. A primeira característica observada foi a presença de afundamento na região da cabeça e sob a cauda. A segunda característica baseou-se na presença de depressões na região do quadril e da espinha dorsal. A terceira foi na presença de processos transversos bem visíveis e delimitáveis, e a quarta incluiu a presença de caquexia e a somatória das características supracitadas. Animais com condição corporal satisfatória receberam o escore 0 e incluíam aqueles que possuíam até duas destas características corporais e o escore 2 para aqueles muito magros com mais de 3 características envolvidas.

O ganho de peso dos animais durante o período experimental foi calculado e comparado com a recomendação de ganho de peso diário de 600 a 800 g para bovinos de raças leiteiras (Allen 2008) atribuindo escore 0 para a condição considerada satisfatória e 2 para a insatisfatória. Da mesma forma foi atribuída pontuação para a disponibilidade de comedouros e bebedouros. Em seguida foi feita a somatória dos escores e valores acima de 2 demonstraram comprometimento do bem-estar para o princípio I (Alimentação e ingestão de água) .

O segundo princípio englobou a avaliação das instalações visando o conforto térmico e a qualidade de manutenção dos animais. Para estimar o conforto térmico foram utilizados os

parâmetros: índice de temperatura e umidade (ITU), temperatura retal, frequências respiratória e cardíaca dos animais. Foram registrados diariamente os valores máximos e mínimos de temperatura e umidade relativa do ar mediante a instalação de um termômetro digital no galpão onde os animais estavam alojados. O ITU adaptado para bovinos, avalia os efeitos combinados da temperatura e da umidade do ar sobre os animais, quantificando o nível de estresse calórico a que os animais estão submetidos (Pires et al. 2010). Os valores de ITU foram obtidos mediante a tabela adaptada por Smith et al. (1998), cruzando-se os valores de temperatura ambiente com os de umidade relativa do ar. Segundo essa classificação valores de ITU até 72 demonstram ausência de estresse e condições ideais para o bom desempenho produtivo dos animais, de 72 a 79 indicam estresse brando e início de comprometimento produtivo, de 79 a 89 indicam estresse moderado, de 90 a 98 estresse severo e nestas duas últimas classificações, todas as funções orgânicas encontram-se comprometidas. Valores de ITU acima de 98 apresentam risco de vida com morte de animais e providências urgentes devem ser tomadas (Pires et al. 2010).

Nos dias em que os valores de ITU foram maiores que 72, foram investigadas a presença de taquipnéia e hipertermia nos animais e calculada a percentagem de animais acometidos em cada grupo.

A qualidade das instalações foi medida por meio da percentagem de animais com ferimentos em decorrência de acidentes nas instalações (tecnopatias) durante o período experimental.

O terceiro princípio de boa saúde utilizado para avaliar o bem-estar dos animais foi o mais enfocado neste trabalho e baseou-se na identificação e cálculo de percentagem de animais com alterações dermatológicas associadas à infestação por *R. microplus* como prurido, hiperemia da pele, lesões nodulares, crostosas e alopecias, seborreia, aspecto do pelo e aumento de linfonodos. Inspeções diárias foram realizadas nos animais durante o período experimental.

Convém ressaltar que não foram realizados os procedimentos de descorna e castração nos bezerros, portanto não foi observada presença de dor em função de procedimentos cirúrgicos mutilantes.

12.9 Análise estatística

A análise estatística dos dados gerados foi realizada utilizando o software Graph Pad Prism 5.0. A análise não paramétrica de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn`s foi feita para as contagens médias de teleóginas (entre os grupos e entre os momentos), dosagens de

aspartato aminotransferase, ureia, α 1-glicoproteína ácida, haptoglobina e transferrina. A eclodibilidade de larvas foi associada aos grupos experimentais tomados dois a dois, através de uma tabela de contingência submetida ao teste qui-quadrado.

Análise paramétrica pelo teste de variância (ANOVA), seguidos pelo Teste de Tukey foi feita para múltiplas comparações dos parâmetros referentes ao peso das teleóginas, peso da oviposição, valores médios de hemácias e de leucócitos totais, dosagens de fosfatase alcalina e creatinina.

As diferenças obtidas foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor que 0,05.

13. RESULTADOS E DISCUSSÃO

13.1 Bioensaio *in vivo*

13.1.1 Achados clínicos

A administração por via oral do bioterápico MV de *R. microplus* 6 CH, aos seis animais do grupo II, não provocou reações adversas e os animais mantiveram-se ativos e normorréxicos durante todo o experimento.

A aplicação tópica da solução eugenol a 5% *pour on* foi satisfatória, visto que os seis animais do grupo III não apresentaram sinais de desconforto, nem irritação no local de aplicação e mantiveram apetite e comportamento normal.

13.1.2 Contagem de fêmeas de *R. microplus*

As contagens de fêmeas de *R. microplus*, maiores ou iguais a 4,5 mm, realizadas nos animais a partir do 21º até o 41º dia após a infestação artificial, não demonstraram diferenças significativas ($p > 0,05\%$) entre os grupos (Figura 11).

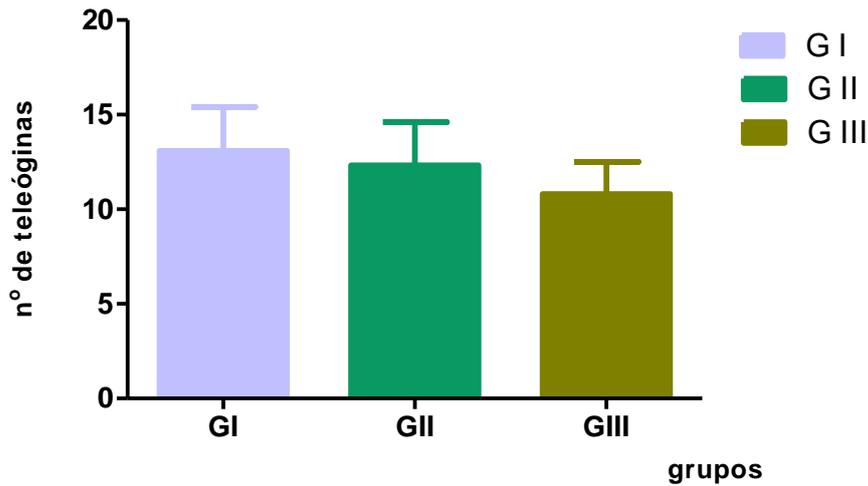


Figura 11- Contagens médias de fêmeas de *R. microplus*, \geq a 4,5 mm de comprimento, em bezerros dos grupos controle (GI), tratados com bioterápico 6 CH (GII) e com eugenol a 5% *pour on* (GIII) do 21º até o 41º dia após a infestação artificial. Belo Horizonte, MG, 2012.

Picos de infestação ocorreram nos animais dos grupos I, II e III nos dias 21, 22, 28, 29, 35 e 36 após a infestação artificial correspondendo a duração da fase parasitária do carrapato *R. microplus* (Figura 12).

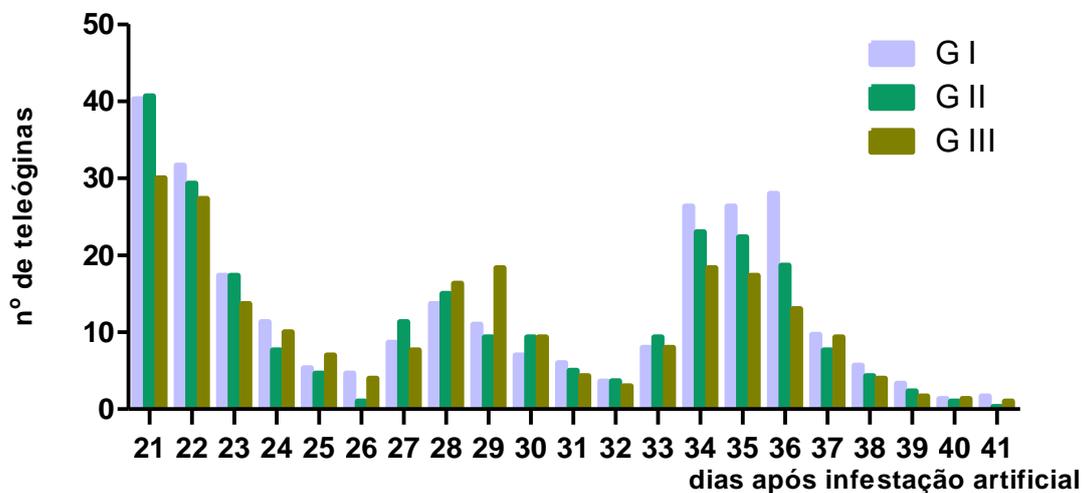


Figura 12- Contagens médias totais de fêmeas de *R. microplus*, \geq a 4,5 mm de comprimento, em bezerros dos grupos controle (GI), tratados com bioterápico 6 CH (GII) e com eugenol a 5% *pour on* (GIII) do 21º até o 41º dia após a infestação artificial. Belo Horizonte, MG, 2012.

A maior infestação por *R. microplus* foi observada no animal 13, do grupo I (controle) seguida do animal 21 do grupo II (tratado com o bioterápico), ambos no 21º dia após a infestação artificial. Em relação à média total de contagem por animal foi observado que os

que apresentaram menores contagens foram os animais 4 (GII) e 26 (GIII) (Tabela 9). Foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os dias de maior e menor infestação correspondente a duração da fase parasitária do carrapato *R. microplus*.

No presente ensaio, foi utilizada a classificação de Veríssimo et al. (2004) para diferenciar as categorias de infestação. Os animais dos grupos I, II e III mantiveram níveis baixos de infestação ao longo do período experimental, exceto nos dias 21 e 22 que apresentaram níveis médios de infestação (de 26 a 100 carrapatos). E nos dias 34, 35 e 36 apenas os animais do grupo I estavam com níveis médios de infestação enquanto os dos grupos II e III estavam com níveis baixos (de 0 a 25 carrapatos) (Tabela 9). Foi observada diferença significativa ($p < 0.0001$) entre o 21º e 41º dias após a infestação inicial.

Tabela 9- Valores totais e médios de contagens de fêmeas de *R. microplus*, \geq a 4,5 mm de comprimento, em bezerros dos grupos controle (GI), grupo tratado com bioterápico 6 CH (GII) e tratado com eugenol a 5% *pour on* (GIII) do 21° até o 41° dia após a infestação artificial. Belo Horizonte, MG, 2012.

Dias após a infestação artificial	Número total e médio de fêmeas de <i>R. microplus</i>					
	Grupo I		Grupo II		Grupo III	
	Controle		Bioterápico 6 CH		Eugenol <i>pour on</i>	
21	242	40,30	244	40,66	180	30,00
22	190	31,66	176	29,33	164	27,33
23	104	17,33	104	17,33	82	13,66
24	68	11,33	46	7,66	60	10,00
25	32	5,33	28	4,66	42	7,00
26	28	4,66	6	1,00	24	4,00
27	52	8,66	68	11,33	46	7,66
28	82	13,66	90	15,00	98	16,33
29	66	11,00	56	9,33	110	18,33
30	42	7,00	56	9,33	56	9,33
31	36	6,00	30	5,00	26	4,33
32	22	3,60	22	3,66	18	3,00
33	48	8,00	56	9,33	48	8,00
34	160	26,66	138	23,00	110	18,33
35	158	26,33	134	22,33	104	17,33
36	168	28,00	112	18,66	78	13,00
37	58	9,66	46	7,66	56	9,33
38	34	5,66	26	4,33	24	4,00
39	20	3,33	14	2,33	10	1,66
40	8	1,33	6	1,00	8	1,33
41	10	1,66	2	0,33	6	1,00
Média	77,5	13,91 ^{NS}	69,5	11,58 ^{NS}	64,3	10,71 ^{NS}

^{NS} - não significativo

O método que é utilizado para avaliar a eficácia de produtos formulados mediante a farmacotécnica clássica (dose ponderal), baseia-se em considerar a eficácia média contra *R. microplus*, dividindo o resultado da somatória das eficácias diárias pelo número de contagens ou pelos dias de tratamento. É importante chamar a atenção, que muitas vezes esses produtos são tóxicos e podem levar a intoxicação dos animais e à contaminação da carne, do leite e do meio ambiente. Diferentemente, os bioterápicos que são produzidos segundo a farmacotécnica homeopática, não possuem dose ponderal e trata-se de uma formulação ultradiluída (doses mínimas) e dinamizada do princípio ativo. Portanto, não possuem toxicidade, período de carência, nem causam efeitos adversos e contaminação da carne, leite e ao meio ambiente. Esses aspectos são desconsiderados quando o mesmo método é adaptado para avaliar a eficácia de formulações homeopáticas.

A eficácia do bioterápico de *R. microplus* 6 CH administrado por via oral, a bezerros que não tiveram prévio contato com carrapatos, variou entre – 33,33 a 95,18% e a eficácia média foi 12,31% após 42 dias de tratamento (Tabela 10). É importante destacar que a eficácia média da primeira semana foi 13,10%, na segunda -3,71% e na última semana de tratamento foi 32,53%. Portanto, o mesmo método para avaliação do *pour on* eugenol, parece não ser, em uma primeira análise, o mais adequado para avaliar a eficácia dos bioterápicos, visto que a utilização da formulação homeopática objetiva produzir uma resposta do hospedeiro contra a infestação por *R. microplus*, utilizando-se o efeito secundário reacional. Porém, não há descrições de quanto tempo essa resposta se processa. Arenales (2002) relata que em bovinos leiteiros, mais suscetíveis à infestação por *R. microplus*, são necessários de 12 a 36 meses para que ocorra limpeza efetiva das pastagens. Estudos específicos devem ser realizados com este objetivo.

Costa-Júnior & Furlong (2011) administraram o bioterápico comercial 12 CH (C&MC®-Arenales Flora e Fauna) no sal mineral de bezerros Holstein-Zebu por 5 meses. Realizaram contagens de fêmeas ingurgitadas a cada 14 dias e obtiveram eficácia de 26%. Este resultado é superior à eficácia média obtida neste ensaio, mas inferior à eficácia observada na última semana de tratamento com o bioterápico 6 CH.

Além do aspecto supracitado, Wikel (1996) descreve que bovinos que não tiveram prévio contato com carrapatos não produzem linfócitos T e B de memória, nem resposta imune eficiente, diferentemente de bovinos naturalmente infestados. O valor de eficácia média do mesmo bioterápico 6 CH em animais naturalmente infestados realizado no experimento 2 foi 33,06% após 7 dias de tratamento. Portanto, 2,5 vezes maior e em tempo 6 vezes menor do que em animais sem prévio contato com carrapatos. Esses resultados sugerem que bovinos

infestados naturalmente com carrapatos respondem melhor e mais rapidamente ao tratamento com o bioterápico 6 CH.

Silva et al. (2008) ao utilizarem o produto comercial contendo uma mistura de 16 bioterápicos na dinamização 12 CH (Arenales Flora e Fauna) observaram redução de 50% de fêmeas ingurgitadas, fato este não observado no presente ensaio, podendo estar associado a menor quantidade de formas adultas utilizadas no processamento do bioterápico.

O valor de eficácia do eugenol a 5% *pour on* variou de -66,6 a 53,5%, sendo que o maior valor foi observado no 15º dia após aplicação (36º dia após a infestação por *R. microplus*) (Tabela 10). O valor de eficácia média do eugenol durante 21 dias após a aplicação foi 10,47%. Com base nas análises cromatográficas realizadas nas tinturas de *R. microplus*, foi possível detectar a predominância de compostos terpenóides nos ixodídeos, portanto, sugere-se que a ação do eugenol seja de inibição da via biossintética dos terpenóides (Dewick, 2009). Os dados de literatura envolvendo experimentos em bovinos objetivando-se a avaliação da eficácia de extratos vegetais, frações e substâncias isoladas contra *R. microplus*, demonstram que as concentrações, frequência de aplicação e eficácia são variadas. Para um produto químico ser considerado de alta eficácia este precisa eliminar mais que 95% dos carrapatos do animal, de média eficácia entre 90 e 95% e de baixa eficácia eliminam menos que 90% (Brasil 1990). Porém, vários produtos sintéticos vêm apresentando eficácia baixa em testes *in vitro* (Arantes 1995; Campos-Junior & Oliveira 2005; Farias et al. 2008; Camillo et al. 2009, Domingues 2011; Mendes et al. 2011), e a campo podendo chegar a percentagens abaixo de 35% (Pereira 2006; Davey et al. 2008).

Conforme essa classificação, vários extratos vegetais mostraram eficácia acaricida baixa em bovinos naturalmente infestados, dentre estes, o hexânico de frutos maduros de *M. azedarach* a 0,25% e 0,5% (Borges et al. 2003; Sousa et al. 2011), o etanólico de *C. citratus* a 2,72% (Heimeredinger et al. 2006), o aquoso de fumo de corda a 1,25% (Olivo et al. 2009), o de *Lantana camara* a 40% (Moyo et al. 2009) e do complexo de frutos de *A. indica*, *N. tabacum*, flores de *Calotropis pacera* e sementes de *Trachyspermum ammi* a 45% (Zaman et al. 2012). Ressalta-se que o extrato hexânico de frutos maduros de *M. azedarach* a 0,5% (Sousa 2008) apresentou eficácia que variou de -16,6 a 89%, sendo o maior valor no 20º dia após tratamento. E o extrato aquoso de fumo de corda com cal extinta a 1,25% (Olivo et al. 2009) ao ser utilizado em três aplicações consecutivas com intervalos de 24 horas, apresentou eficácia maior (77,5%), quando comparado com apenas uma aspersão, do extrato em detergente neutro a 3,75% (25,3% de eficácia), ambos no 14º dia. Com base nos dados de literatura sugere-se o aumento da concentração ou maior frequência de aplicação do eugenol

pour on, visto que, pela classificação do Ministério da Agricultura, o eugenol na concentração 5% apresentou baixa eficácia acaricida.

Tabela 10- Valores médios de eficácia, segundo Amaral (1993) adaptado de Roulston et al. (1968), dos grupos tratados com o bioterápico oral 6 CH (GII) e com a solução eugenol a 5% *pour on* (GIII) do 21º até o 41º dia após a infestação artificial. Belo Horizonte, MG, 2012.

Dias após a infestação artificial	Eficácia sobre fêmeas de <i>R. microplus</i>	
	Grupo II bioterápico 6 CH	Grupo III eugenol <i>pour on</i>
21	-8,26	_*
22	7,37	13,68
23	0	21,15
24	32,35	11,76
25	12,50	-31,25
26	78,54	14,28
27	-30,77	11,53
28	-9,75	-19,51
29	0	-66,66
30	-33,33	-33,33
31	20,00	27,77
32	0	18,18
33	-16,66	0
34	13,75	31,25
35	15,18	34,17
36	33,33	53,57
37	20,68	3,45
38	23,52	29,41
39	30,00	50,00
40	25,00	0
41	80,00	40,00
Média Geral	13,97	10,47

* A aplicação do eugenol 5% *pour on* foi realizada no 21º dia por isso a eficácia foi avaliada a partir do 22º dia no grupo III.

13.3 Bioensaio *in vitro*

13.3.1 Performance reprodutiva e percentual de eclodibilidade

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05\%$) entre os grupos em relação aos parâmetros: peso das teleóginas e peso da postura (Figuras 13 e 14, Tabela 11). Estes resultados corroboram com os resultados obtidos no experimento I, utilizando o bioterápico injetável 30 DH em animais artificialmente infestados e no experimento II com bioterápicos de material vivo, dessecado e calcinado na potência 6 CH, administrados por via oral, em animais naturalmente infestados.

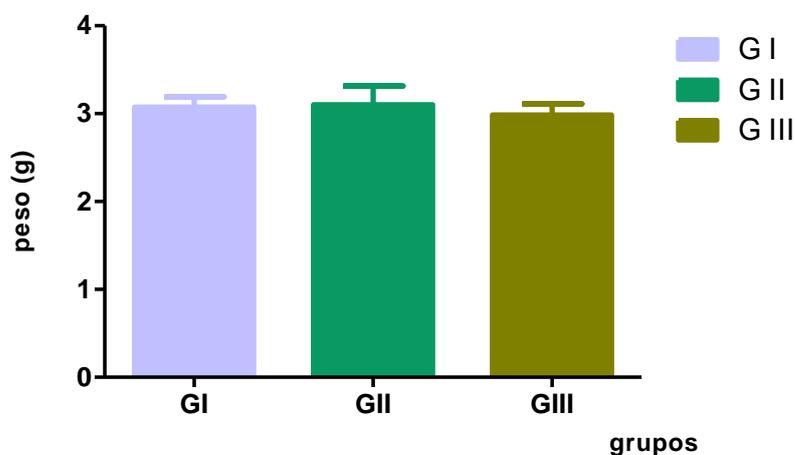


Figura 13- Peso total de fêmeas de *R. microplus* \geq a 4,5 mm de comprimento, dos grupos I (controle), II (bioterápico 6 CH) e III (eugenol *pour on* a 5%). Belo Horizonte, MG, 2012.

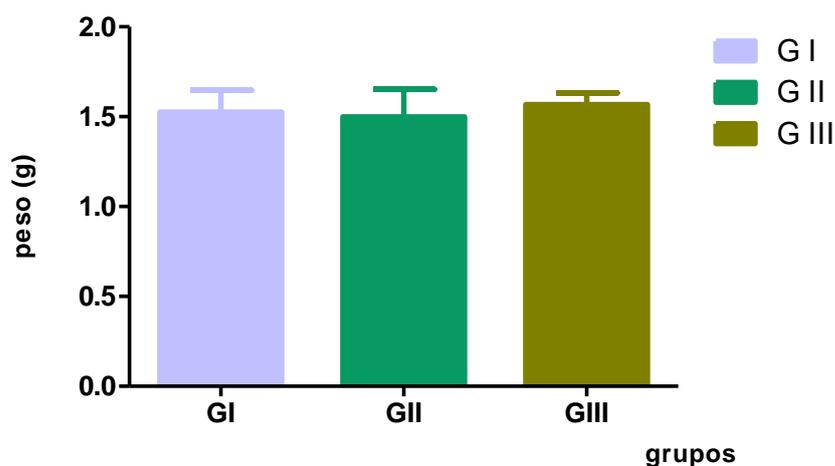


Figura 14- Peso total da postura de fêmeas de *R. microplus* \geq a 4,5 mm de comprimento, dos grupos I (controle), II (bioterápico 6 CH) e III (eugenol *pour on* a 5%). Belo Horizonte, MG, 2012.

Diante da impossibilidade de avaliar estatisticamente, o percentual de eclodibilidade, a dispersão de frequência de ovos eclodidos em relação aos tratamentos (tomados dois a dois) foi testada em uma tabela de contingência qui-quadrado. Foi possível avaliar associação significativa entre a eclosão e os tratamentos, mostrando melhores resultados no dia 23 para o grupo III, nos dias 24, 35, 36 e 37 para o grupo II, enquanto no dia 21 os grupos II e III mostraram resultados semelhantes e nos dias 22 e 29 após a infestação por *R. microplus* não foram significativas.

O percentual de eclodibilidade de larvas no 36º dia após a infestação artificial foi respectivamente 90, 50 e 75 % para os grupos I, II e III, portanto, neste dia, o melhor resultado de inibição da eclodibilidade de larvas foi para o grupo 2 (Tabela 11).

Tabela 11- Peso total de fêmeas *R. microplus* (\geq a 4,5 mm de comprimento), peso da postura em gramas e percentual de eclodibilidade de larvas de *R. microplus* dos grupos controle (GI), tratado com o bioterápico 6 CH (GII) e com eugenol a 5% *pour on* (GIII).

Dias após a infestação	Grupo I controle			Grupo II bioterápico 6 CH			Grupo III eugenol a 5% pour on		
	teleóginas (g)	ovos (g)	eclosão (%)	teleóginas (g)	ovos (g)	eclosão (%)	teleóginas (g)	ovos (g)	eclosão (%)
21	3,530	0,786	85	3,364	0,619	80	3,272	1,611	80
22	3,318	1,735	80	3,942	1,928	80	3,331	1,658	80
23	3,239	1,936	90	3,925	2,006	85	3,428	1,836	75
24	3,112	1,558	90	2,664	1,522	75	2,649	1,291	90
29	2,603	1,420	90	2,833	1,585	90	3,109	1,671	90
35	2,822	1,553	90	2,661	1,505	85	2,423	1,310	90
36	3,289	1,747	90	3,141	1,626	50	2,850	1,598	75
37	2,688	1,473	90	2,279	1,201	70	2,809	1,568	75

Estes resultados sugerem inibição da eclodibilidade de larvas no grupo II tratados com o bioterápico 6 CH via oral, duas vezes ao dia, e possível interferência deste na reprodução de *R. microplus* corroborando os resultados de Gazim et al. (2010), e com os resultados obtidos no experimento II em animais naturalmente infestados. Porém, nos animais naturalmente infestados tratados com o mesmo bioterápico, a inibição da eclodibilidade ocorreu mais

rapidamente, após 6 dias de tratamento e nos animais artificialmente infestados sem prévio contato com carrapatos, ocorreu no 37º dia de tratamento (36º dia após a infestação). A diferença observada pode ser atribuída a vários fatores, dentre os quais a idade, raça, a nutrição, estação do ano (Oliveira & Alencar 1987), e a ausência de contato prévio com os carrapatos *R. microplus*, visto que, bovinos infestados naturalmente com carrapatos produzem linfócitos T e B de memória que permitem uma resposta imune mais eficiente em futuras infestações (Wikel 1996).

A eficiência do bioterápico segundo a fórmula de Drummond et al. (1973) foi 45,86% no 37º dia de tratamento (equivalente ao 36º dia após a infestação) (ER= 517669,5), superior à ação do eugenol 5% *pour on* que foi de 12,03% (ER= 841052,6) no 15º dia de tratamento. Gazim et al. (2010), utilizando bioterápico de *R. microplus* 12CH e 30CH, durante 28 meses, verificaram eficiência de 22%. Portanto, o bioterápico *R. microplus* 6 CH utilizado neste experimento apresentou eficiência 23,86% maior, mesmo sendo utilizado em menor tempo de uso. Os resultados de eficiência obtidos para o eugenol na concentração 5% administrado por via cutânea em bezerros, mostraram baixa interferência na reprodução de *R. microplus*. Ressalta-se que no teste de pacote com larvas com o eugenol, a concentração 0,3% mostrou 100% de mortalidade e após o teste de imersão de teleóginas na solução eugenol a 5% a inibição da eclodibilidade foi de 100%. Os óleos essenciais apresentam alta volatilidade e ação local, características consideradas vantajosas, pois diminuem a toxicidade e a manutenção de resíduos no ambiente. Por outro lado, exigem maiores concentrações da substância isolada e maior frequência de reaplicações (Isman 2000). Com base nos resultados obtidos de contagens de fêmeas ingurgitadas e eclodibilidade do *pour on* sugere-se a utilização do eugenol em formulações com concentrações maiores e/ou com aplicações a cada 15 dias.

Como o bioterápico *R. microplus* 6 CH sugere inibição da oviposição e não deixa resíduos na carne, no leite e no meio ambiente (Real 2008; Vuaden 2008) e o eugenol *pour on* apresenta ação em fêmeas ingurgitadas, propõe-se a associação do bioterápico administrado na ração ou sal mineral com o eugenol *pour on* em concentrações maiores (30%) para o controle de *R. microplus*, esperando-se a obtenção de efeitos sinérgicos. A associação possibilitaria o controle do animal parasitado e o controle ambiental em longo prazo, visto que a maioria da população de carrapatos encontra-se no meio ambiente. A combinação de efeitos pode beneficiar reduzindo a infestação de pastagens, a necessidade de tratamentos quimioterápicos, os custos, o impacto ambiental, e conseqüentemente retardando o desenvolvimento de resistência. Ensaio devem ser conduzidos para avaliar a eficácia dessa associação.

13.4 Achados hemáticos e leucocitários

Os valores médios globais de hemácias dos grupos I e II estão dentro dos valores normais para a espécie bovina, enquanto os do grupo III mantiveram-se abaixo dos valores normais até o 21º dia, a partir do 30º e 39º dia após a infestação artificial apresentaram-se normais. No grupo III, foram observadas diferenças estatísticas para os valores médios de hemácias entre o dia 0 e os demais dias, entre o dia 2 e 21 e entre o dia 4 e 21 após a aplicação do eugenol a 5% *pour on*. Foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos I e III; II e III para os valores médios de hemácias (Figura 15).

Os valores hemáticos e leucocitários do animal 5 (GI) foram retirados da análise estatística, pois se apresentaram discrepantes dos demais animais do grupo I.

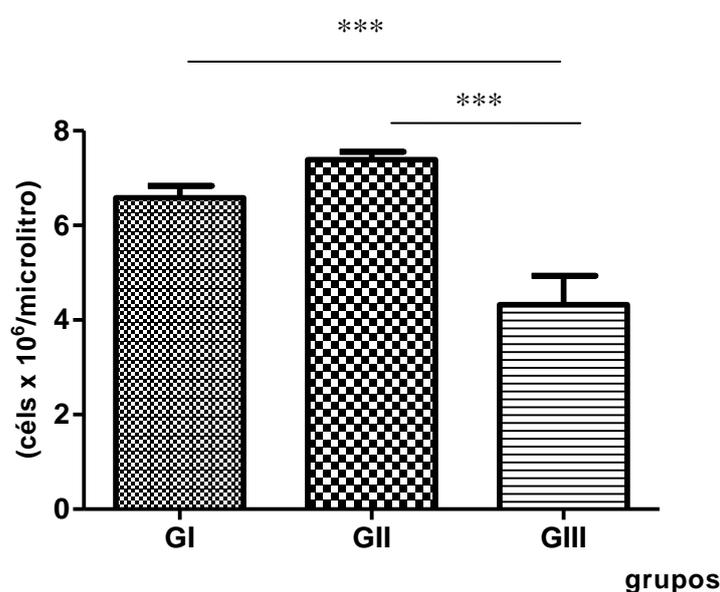


Figura 15- Representação gráfica dos valores médios totais obtidos para hemácias (células x 10⁶/μL) em bezerros dos grupos I (controle), II (bioterápico 6 CH) e III (eugenol *pour on* 5%). *** diferença significativa entre GI e GIII e entre GII e GIII para P < 0,001.

Os valores médios globais de leucócitos do grupo I mantiveram-se dentro dos valores normais para a espécie bovina, os do grupo II mantiveram-se acima dos valores normais durante todo o período experimental. E os animais do grupo III mantiveram-se dentro da normalidade nos dias 0, 2, 10, mas no 21º até 39º dia após a infestação artificial apresentaram-se acima dos valores considerados normais. Foram observadas diferenças significativas entre os grupos I e II para os valores médios de leucócitos totais (Figura 16).

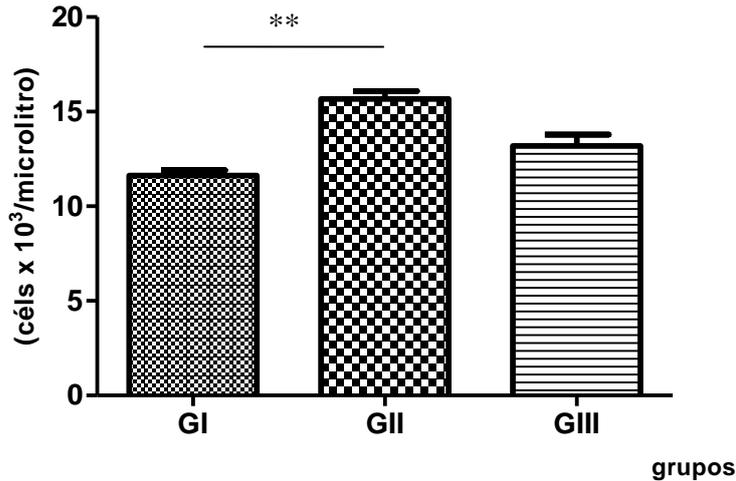


Figura 16- Representação gráfica dos valores médios totais obtidos para leucócitos (células x 10³/μL) em bezerras dos grupos I (controle), II (bioterápico 6 CH) e III (eugenol *pour on* 5%). ** diferença significativa entre GI e GII para P < 0,01

Portanto, os animais infestados por *R. microplus* do grupo I apresentaram valores globais médios de hemácias e leucócitos totais normais, diferentemente dos animais do grupo II que apresentaram leucocitose. Nos animais do grupo III os valores médios globais de hemácias aumentaram e mantiveram-se dentro dos valores normais para a espécie bovina, enquanto não foram observadas alterações nos valores médios totais de leucócitos em relação aos valores iniciais.

Mitidiero (2002) ao utilizar um complexo homeopático com seis medicamentos homeopáticos, autoisoterápico de leite e o bioterápico *Staphylococcinum* 12 CH em bovinos para o tratamento de mastite, relatou que nos primeiros meses de uso foi observado aumento na contagem de células somáticas. A autora atribuiu este aumento dos polimorfonucleares ao fator de agravamento descrito por Hahnemann. A agravamento é a reação do organismo sensível ao reconhecer a presença do agente causal quando se inicia o tratamento homeopático, mesmo com uma dose infinitesimal e reduzida deste agente (Organon 1996). Barzon et al. (2008) relataram resultados semelhantes em 25 vacas leiteiras ao utilizar um complexo homeopático com oito medicamentos homeopáticos e o bioterápico de *Staphylococcus aureus* 200 CH. Descreveram aumento de polimorfonucleares (CCS) durante 15 dias após o início do tratamento e a redução da mastite ocorreu em 82% dos animais após 75 dias de tratamento com o complexo homeopático.

No presente trabalho, acredita-se que a manutenção de valores aumentados de leucócitos durante todo o período de avaliação no grupo II, diferentemente dos animais do grupo I, pode

ser atribuída ao fator de agravação. O fator de agravação ocorre devido à ação primária do bioterápico ao reconhecer o agente causal, visto que, esses animais não tiveram contato prévio com carrapatos.

Na literatura científica, não há referência de avaliação de contagem global de leucócitos sanguíneos com a administração de bioterápicos de *R. microplus* para o controle de carrapatos, impossibilitando a comparação de resultados.

13.5 Achados bioquímicos

Não existem relatos sobre a utilização do eugenol *in vivo* para o controle de *R. microplus* e nem sobre a dose tóxica do eugenol em bovinos, porém, são descritos efeitos tóxicos agudos em seres humanos na dose acima de 1,190 mg/Kg e em ratos acima de 250 mg/Kg/dia. O eugenol é imediatamente absorvido pela pele e pode causar irritação ocular e dérmica, queimadura e edema pulmonar em situações de prolongada inalação (Marin 2008), mas o potencial de induzir hipersensibilidade cutânea é baixo, em concentrações de 0,05 a 0,09% (Rothenstein et al. 1983). Em caso de ingestão de doses altas de eugenol, pode ocorrer gastrite, necrose hepatocelular, insuficiência hepática fulminante, alterações urinárias, depressão do sistema nervoso central, coma (Marin 2008), distúrbios de coagulação (Valente et al. 2009) e morte (Marin 2008).

Do ponto de vista toxicológico, toda substância pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição: dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição, espécie e vias de administração (Gwaltney-Brant 2012). Devido à ausência de informações sobre a toxicidade do eugenol na espécie bovina, foi avaliada a atividade de enzimas hepáticas e renais dos bezerros utilizados nesse estudo, por meio de uma análise pareada antes e após a aplicação do eugenol *pour on* na concentração 5%,

A enzima fosfatase alcalina está amplamente distribuída pelo organismo, sendo encontrada em altas concentrações nos osteoclastos, mucosa intestinal, células tubulares renais, hepatócitos, epitélio biliar e placenta. Podem apresentar aumento em decorrência da metabolização de fármacos, estase da bile, aumento da atividade osteoclástica e produção de corticosteroides endógenos (Kaneko 1997; Jackson 2007). Os valores médios da atividade da fosfatase alcalina demonstraram queda após a aplicação do eugenol *pour on* e a partir do 2º dia apresentaram tendência crescente. Foram observadas diferenças significativas entre o 2º e o 18º dia, 4º e 18º dia e entre o 9º e o 18º dia após o tratamento com o eugenol. E esse

aumento no 18º dia pode ser atribuído à metabolização dos fármacos, mas mantiveram-se dentro dos valores nomais para a espécie bovina durante todo o período avaliado (Figura 17).

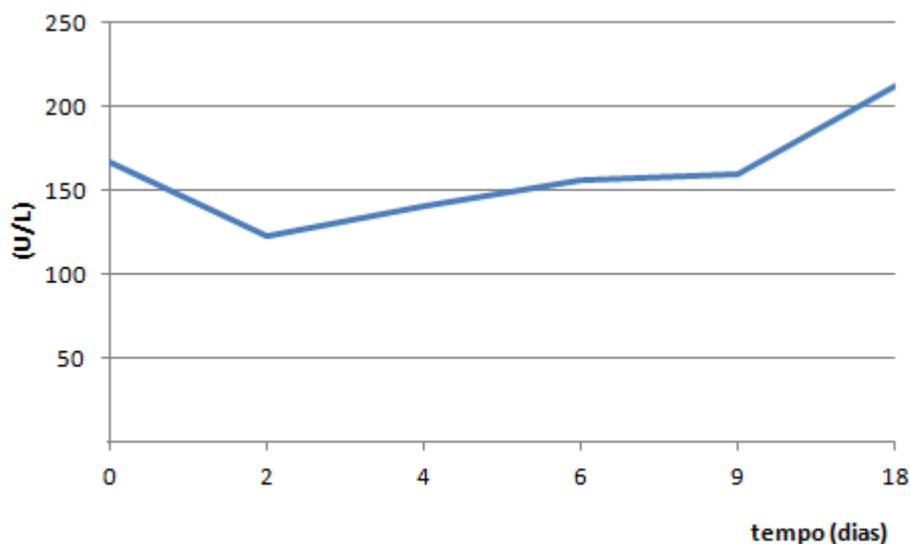


Figura 17- Representação gráfica das atividades séricas médias obtidas para a fosfatase alcalina (U/L) em bezerras submetidos ao tratamento tópico com o eugenol a 5% (GIII), Belo Horizonte, 2012.

A enzima aspartato aminotransferase (AST) se origina no fígado, miócitos do músculo esquelético e cardíaco, rins e intestino delgado. Aumento de atividade da enzima AST ocorre nos casos de degeneração e necrose hepática aguda, nas lesões agudas dos músculos cardíaco e esquelético e na gestação avançada. Os valores médios demonstraram tendência crescente após a aplicação do eugenol *pour on* e depois decrescente a partir do 2º até o 9º dia. Foram observadas diferenças significativas entre o 4º e 9º dia e entre o 9º e o 18º dia após a aplicação do eugenol, provavelmente pela metabolização dos fármacos administrados, mas os valores mantiveram-se dentro dos níveis normais para a espécie bovina (Figura 18).

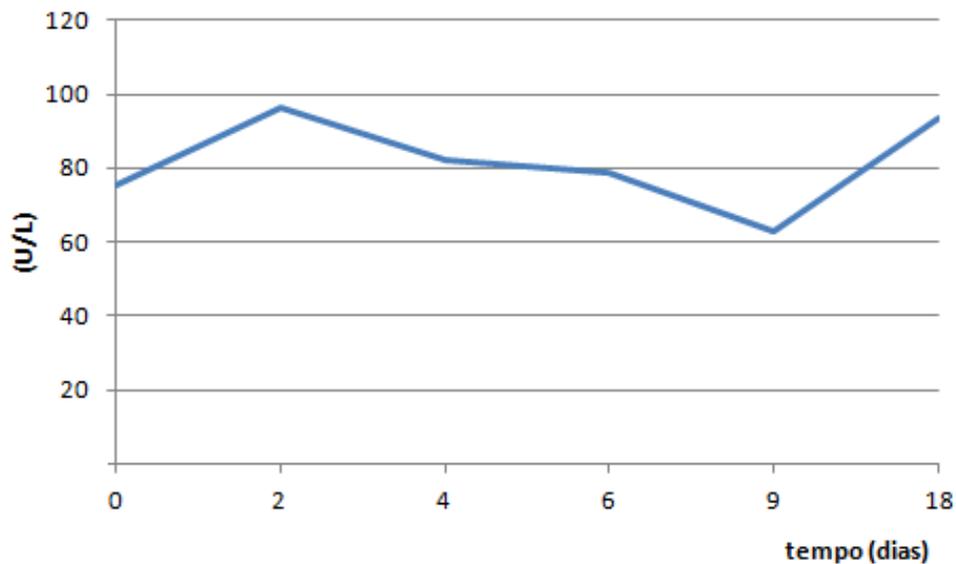


Figura 18- Representação gráfica das atividades séricas médias obtidas para a aspartato aminotransferase (U/L) em bezerros submetidos ao tratamento tópico com o eugenol a 5% *pour on* (GIII), Belo Horizonte, 2012.

Os valores médios de creatinina não apresentaram diferenças estatisticamente significativas e mantiveram-se dentro dos valores normais para a espécie bovina durante o período avaliado (Figura 19).

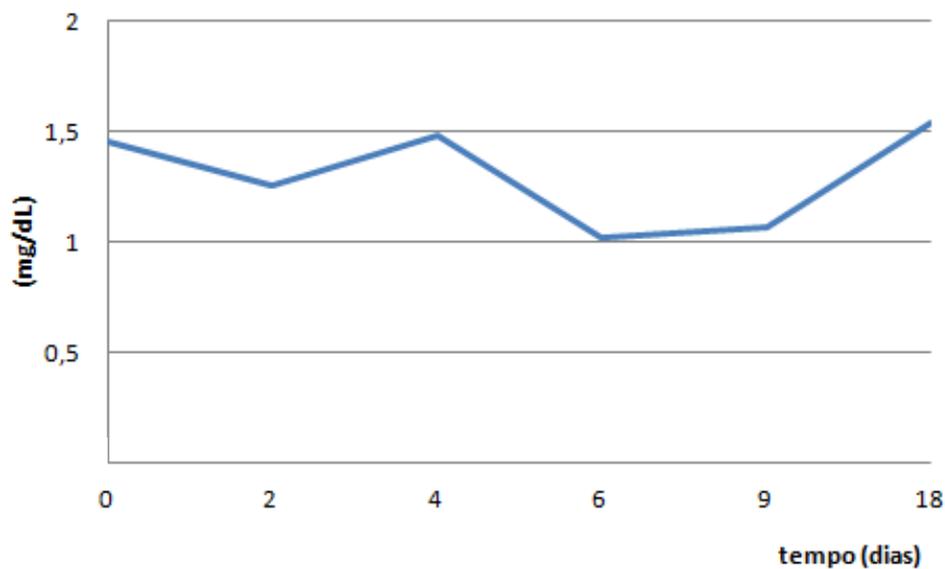


Figura 19- Representação gráfica dos valores médios obtidos para a creatinina sérica (mg/dL) em bezerros submetidos ao tratamento tópico com o eugenol a 5% (GIII), Belo Horizonte, 2012.

A ureia é sintetizada pelo fígado, representando o principal produto final do catabolismo protéico e em condições normais é excretada quase inteiramente pelos rins. Aumento nos valores de ureia sérica pode ocorrer na uremia pré-renal, na uremia devido a intoxicação por amônia, estado metabólico de catabolismo protéico, *déficit* energético ou na insuficiência renal. E a sua diminuição indica dieta hipoproteica ou disfunção hepática (Kaneko 1997). Os valores médios de ureia mantiveram-se abaixo dos valores normais para espécie bovina durante o período avaliado (Figura 20), podendo sugerir associação com o nível de proteína da dieta. Para constatação deste fato, foram feitas dosagens de ureia nos animais do grupo controle (GI) e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos I e III, demonstrando que os valores baixos encontrados não estão associados à aplicação do eugenol a 5% *pour on*.

Foi observada diferença significativa nos valores médios de ureia sérica nos animais do grupo III entre o dia 0 e o 9º dia após a aplicação do eugenol, sugerindo níveis proteicos da dieta mais baixos no dia 9 (Figura 20).

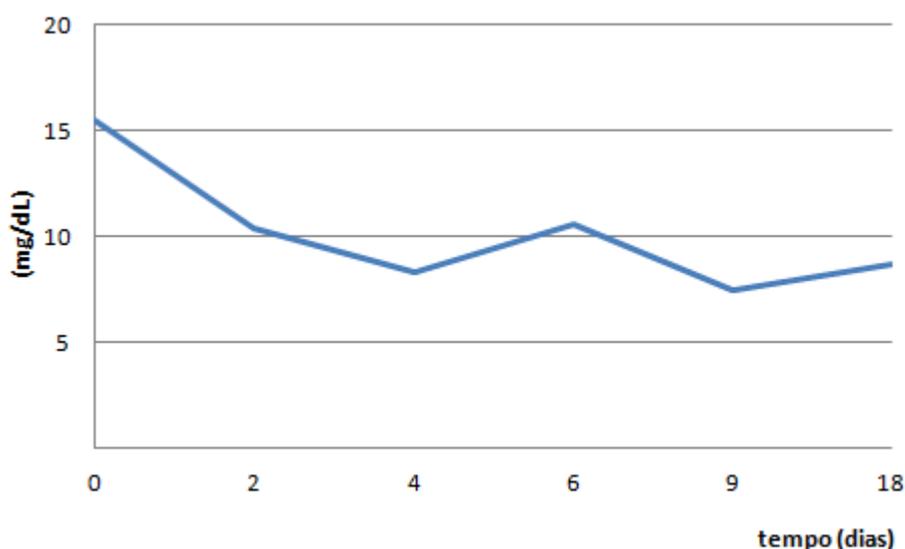


Figura 20- Representação gráfica dos valores médios obtidos para a ureia sérica (mg/dL) em bezerros submetidos ao tratamento tópico com o eugenol a 5% (GIII), Belo Horizonte, 2012.

Os resultados da atividade das enzimas fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase, creatinina e ureia sugerem que a aplicação do eugenol a 5% *pour on* não causou efeitos deletérios à função hepática e renal. Os valores médios e o desvio padrão das análises bioquímicas estão listados no ANEXO 4.

13.6 Proteínas de fase aguda

As proteínas de fase aguda apresentam utilidade na medicina veterinária e podem ampliar o entendimento sobre o efeito primário dos bioterápicos. Este efeito foi previamente citado por Hahnemann (Organon 1996) com medicamentos homeopáticos e pesquisadores que avaliaram o uso de bioterápicos em animais para o tratamento de afecções inflamatórias (Mitidiero 2002, Barzon 2008). Além disso, pode propiciar a avaliação da efetividade do tratamento com o bioterápico de *R. microplus* por meio do monitoramento do grau de saúde nos animais infestados com *R. microplus*. No presente ensaio foi realizada análise pareada no grupo II antes e depois do início do tratamento com o bioterápico de *R. microplus* 6 CH e da infestação larval.

Segundo Ceciliani et al. (2012) a concentração de haptoglobina menor que 10 mg/dL é encontrada em bovinos saudáveis e acima destes valores é considerada resposta de fase aguda. Os valores médios de haptoglobina sérica dos bezerros do grupo II no momento (-1) antes da aplicação do bioterápico apresentaram-se dentro dos valores de normalidade para a espécie bovina (5,47 mg/dL). Após 24 horas da administração do bioterápico 6 CH por via oral e antes da infestação por larvas de *R. microplus* (momento 0), os valores médios aumentaram (11,82 mg/dL) e mantiveram-se acima dos valores normais por 48 horas demonstrando resposta de fase aguda leve (Figura 21). Segundo Hahnemann no início do tratamento homeopático o organismo sensível pode induzir uma resposta devido à ação primária do medicamento (Organon 1996) justificando o aumento de haptoglobina. Após este período os valores apresentaram tendência decrescente e mantiveram-se dentro da normalidade.

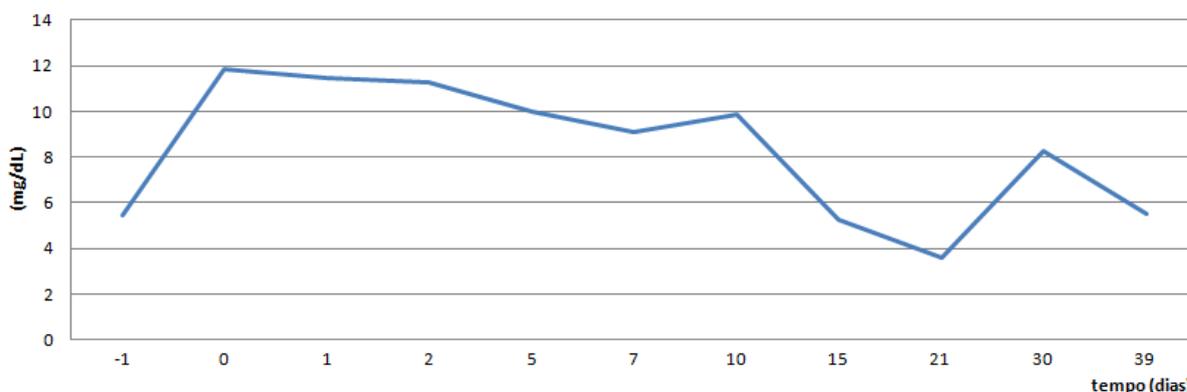


Figura 21- Representação gráfica dos valores médios obtidos para a haptoglobina sérica (mg/dL) em bezerros submetidos ao tratamento oral com o bioterápico de *R. microplus* 6 CH (GII) durante 41 dias, Belo Horizonte, 2012. O momento -1 é referente ao momento antes da

administração do bioterápico, o momento 0 após 24h da administração do bioterápico e o momento 1 corresponde a 24h após a infestação com larvas .

No 21º dia após a primeira infestação artificial, os bezerros do grupo II apresentaram média infestação por *R. microplus* (X= 40,66 fêmeas ingurtadas) e os valores médios de haptoglobina foram os menores valores (3,58 mg/dL) obtidos durante o período avaliado. No 30º e 39º dias, os animais do grupo II demonstraram baixa infestação de *R. microplus* (X= 9,33 e 2,33 fêmeas ingurtadas) e os valores de haptoglobina foram maiores (respectivamente 8,25 mg/dL e 5,49 mg/dL) que no pico de infestação, mas dentro dos valores normais para a espécie bovina (Figuras 21 e 22). Não foi encontrada diferença significativa entre os dias para os valores de haptoglobina sérica.

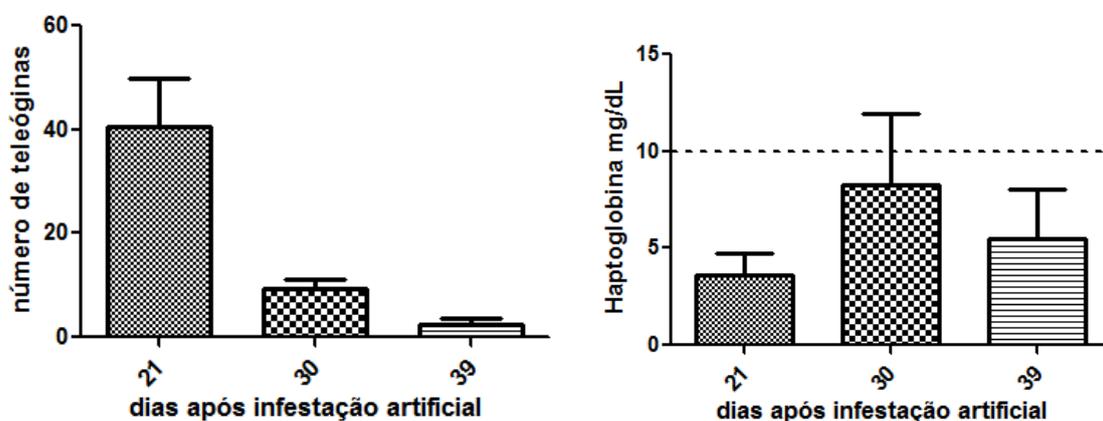


Figura 22- Representação gráfica comparativa entre as contagens de teleóginas e os valores médios de haptoglobina sérica (mg/dL) no 21º, 30º e 39º dias após a infestação artificial por *R. microplus* em bezerros do grupo II, Belo Horizonte , 2012.

Os valores médios de α 1-glicoproteína ácida sérica dos bezerros do grupo II no momento inicial foi 2,72 mg/dL e após 24 horas da administração do bioterápico 6 CH por via oral e antes da infestação por larvas de *R. microplus*, aumentaram (6,24 mg/dL) e mantiveram-se abaixo deste valor nos demais dias de avaliação (Figura 23). Não foram observadas diferenças significativas entre os momentos avaliados.

Carvalho (2006) mensurou a α 1-glicoproteína ácida por imunodifusão radial em bovinos holandeses e obteve valores menores que no presente ensaio (< 1,4 mg/dL), porém, a diferença de técnica impede comparações de resultados. Os valores de resposta aguda para a α 1-glicoproteína ácida encontrados na literatura são variados, Fagliari et al. (2007) descrevem valores médios de resposta aguda de 29,9 a 41,5 mg/dL ($35.7 \pm 5,8$ mg/dL), em bezerros entre 6 a 12 meses, mesma faixa etária utilizada no presente ensaio, Ceciliani et al. (2012) de 20 a

45 mg/dL e Juliano et al. (2009) de 0 a 78,17 mg/dL bem acima dos valores encontrados nestas análises, demonstrando ausência de resposta de fase aguda com base nos valores médios de α 1-glicoproteína ácida.

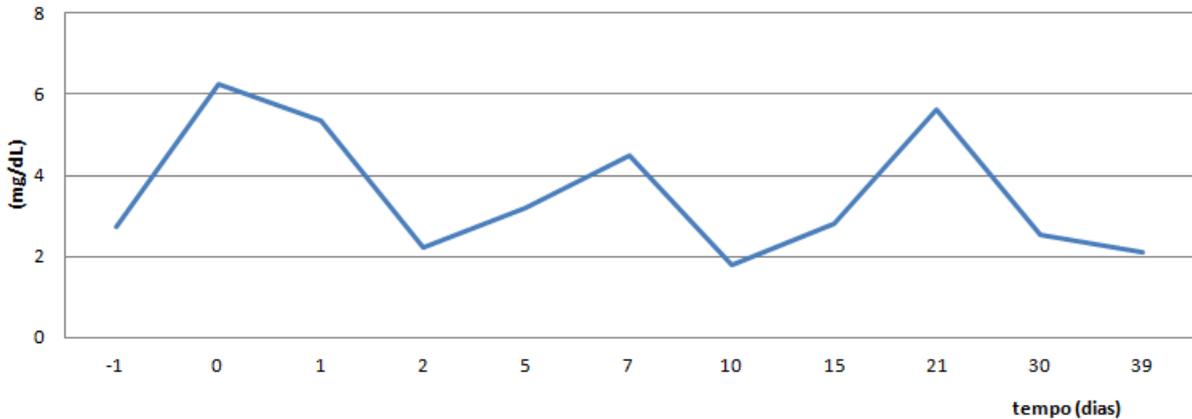


Figura 23- Representação gráfica dos valores médios obtidos para a α 1-glicoproteína ácida sérica (mg/dL) em bezerros submetidos ao tratamento oral com o bioterápico de *R. microplus* 6 CH (GII) durante 41 dias, Belo Horizonte, 2012.

No 21º dia após a primeira infestação artificial por larvas de *R. microplus* os valores médios de α 1-glicoproteína ácida demonstraram aumento (5,62 mg/dL) e decresceram no 30º (2,53 mg/dL) e no 39º (2,10 mg/dL) dias (Figuras 23 e 24), mas dentro dos parâmetros citados na literatura.

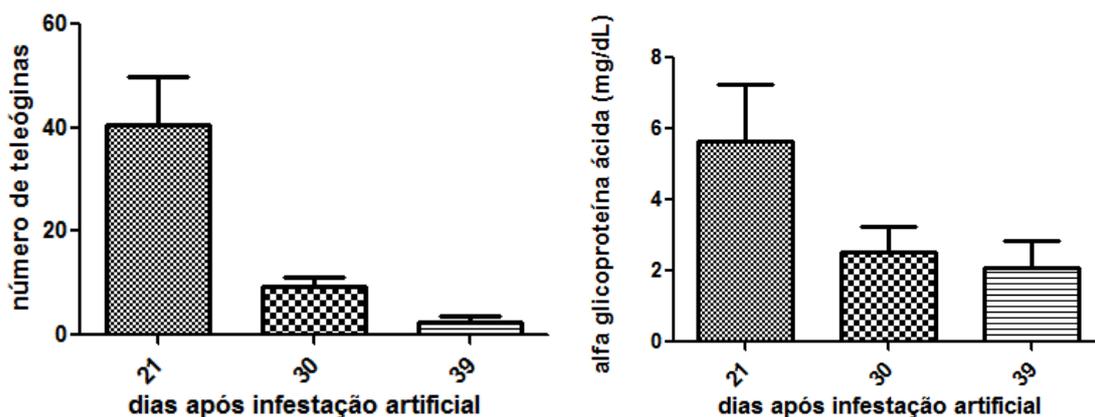


Figura 24- Representação gráfica comparativa entre as contagens de teleóginas e os valores médios de α 1-glicoproteína ácida sérica (mg/dL) no 21º, 30º e 39º dias após a infestação artificial por *R. microplus* em bezerros do grupo II, Belo Horizonte, 2012.

A transferrina sérica é uma proteína de fase aguda negativa, ou seja, sua produção diminui durante uma reação de fase aguda (Gruys et al. 2005a), entretanto, são escassos os dados de transferrina na espécie bovina. Mc Nair et al. (1998) descreveram valores de 200 a 280 mg/dL (média 254 mg/dL) para bovinos sadios e animais com lesões leves e severas de *Haemophilus sommus* respectivamente de 190 mg/dL e 137 mg/dL. Por falta de dados de referência de transferrina sérica na literatura para bovinos, os dados foram comparados com o valor médio obtido no momento inicial ($210,39 \pm 27,19$ mg/dL). Foram observadas diferenças significativas entre os dias -1 e 30; 5 e 21; 7 e 21; 5 e 30 após a infestação artificial (Figura 25). As diferenças ocorreram devido à diminuição nos valores médios de transferrina sérica no 21º e 30º dias ($160,56 \pm 23,73$ mg/dL e $142,41 \pm 65,76$ mg/dL, respectivamente). O decréscimo ocorreu no pico de infestação por *R. microplus* (infestação média), momento de maior expoliação sanguínea devido à fase de ingurgitamento das teleóginas, e continuou após o pico de infestação, no 30º dia após a infestação artificial (Figuras 25 e 26). Portanto, sugere-se associação dos valores de transferrina com a infestação por *R. microplus*, visto que a transferrina tem a principal função de transportar ferro sérico. Convém ressaltar que os valores médios de hemácias dos bezerros do grupo II apresentavam-se dentro dos parâmetros normais para a espécie em todos os momentos.

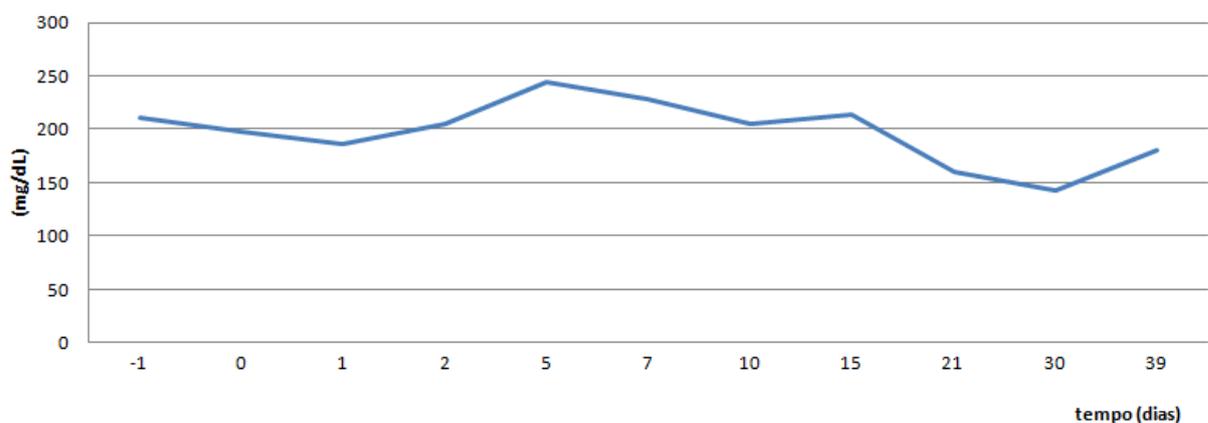


Figura 25- Representação gráfica dos valores médios obtidos para a transferrina sérica (mg/dL) em bezerros submetidos ao tratamento oral com o bioterápico de *R. microplus* 6 CH (GII) durante 41 dias, Belo Horizonte, 2012.

Carvalho et al. (2008) também obtiveram diminuição nos valores de transferrina em bovinos da raça Holandesa, mas após altas infestações por *R. microplus*. A diferença de técnica utilizada pelos referidos autores não permitiu comparação dos valores de transferrina com o presente ensaio.

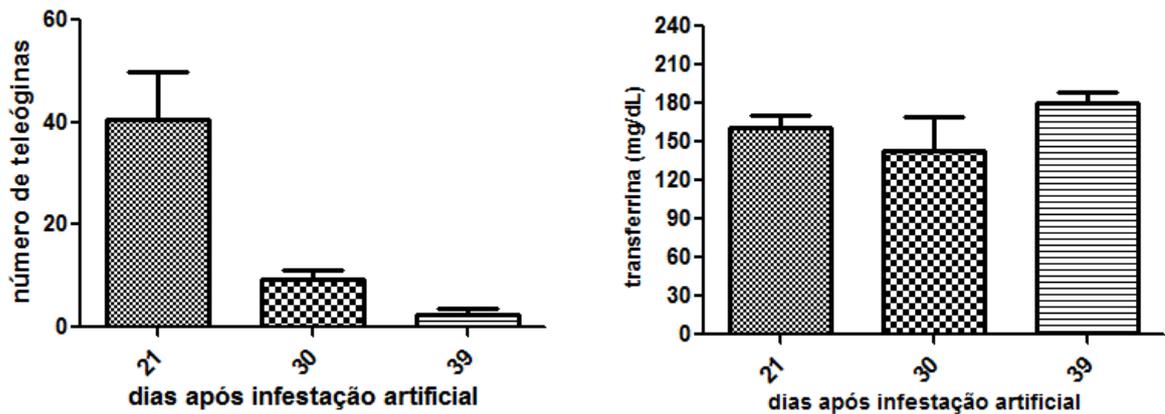


Figura 26- Representação gráfica comparativa entre as contagens de teleóginas e os valores médios de transferrina sérica (mg/dL) no 21º, 30º e 39º dias após a infestação artificial por *R. microplus* em bezerros do grupo II, Belo Horizonte , 2012.

Em relação à infestação por *R. microplus*, os bezerros holandeses com níveis médios e baixos de infestação apresentaram valores normais de haptoglobina e α 1-glicoproteína ácida demonstrando ausência de resposta destas proteínas no 21º, 30º e 39º dias. Porém, os valores de transferrina demonstraram resposta de fase aguda no 30º dia, após média infestação por *R. microplus*, demonstrando que essa proteína de fase aguda é sensível e importante na avaliação da saúde de bovinos infestados por *R. microplus* e por isso uma possibilidade de utilização em testes de avaliação de eficácia de fármacos em bovinos para o controle de *R. microplus*.

Os valores médios e desvio padrão das proteínas de fase aguda estão listados no ANEXO 5.

13.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão

No oócito de fêmea ingurgitada de *R. microplus* do grupo controle (GI) houve predomínio de oócitos maduros de grau IV e V. Foi possível observar estruturas preservadas, presença da lâmina basal íntegra, invaginações da membrana plasmática e deposição normal de córion mostrando as camadas de exocóron e endocóron (material eletrodense) bem definidas. No citoplasma foram visualizados grânulos vitelogênicos grandes e bem desenvolvidos, grânulos vitelogênicos menores, mitocôndrias (27A, 29A, 30A) e no estágio IV poucos grânulos lipídicos (Figura 28A), corroborando os resultados de Saito et al. (2005) ao investigar o aspecto ultraestrutural de ovário de *R. microplus*.

O córion é a membrana responsável pela preservação estrutural dos oócitos do embrião e proteção contra choques mecânicos, dessecação (Wigglesworth 1946 citado por Quattropiani & Anderson 1969), predação e variações de temperatura (Hinton 1981 citados por Saito et al.

2005). No *R. microplus* o córion é produzido pelo próprio oócito, cuja composição é basicamente lipoproteica (Saito et al. 2005) e encontra-se depositado nos oócitos mais desenvolvidos, dividindo-se em duas camadas, o exocóron e o endocóron (Denardi et al. 2011).

Os resultados da microscopia eletrônica do ovário de teleóginas de *R. microplus* coletadas do grupo tratado com bioterápico de *R. microplus* 6 CH (GII) demonstraram que houve alteração na deposição de córion com desorganização dos componentes celulares do exocóron (Figuras 27B, 29B e 30B) quando comparado com o grupo controle (Figuras 27A, 29A e 30A) e com o tratado com eugenol (Figuras 27C e 29C). Esses resultados sugerem interferência na maturação de oócitos e na reprodução de *R. microplus*. Nesse grupo foi observado predomínio de oócitos em estágios imaturos grau II e III e grande número de grânulos lipídicos característicos da fase de grau III (Figura 28B) conforme Saito et al. (2005).

Nos oócitos de fêmea ingurgitada de *R. microplus* do grupo tratado com eugenol 5% *pour on* (GIII) não foram observadas alterações ultraestruturais e houve predomínio de oócitos III, mas também foram encontrados oócitos II e IV na mesma proporção. A lâmina basal e a membrana plasmática apresentaram-se íntegras, o córion com deposição normal e demais estruturas preservadas (Figuras 27C e 29C).

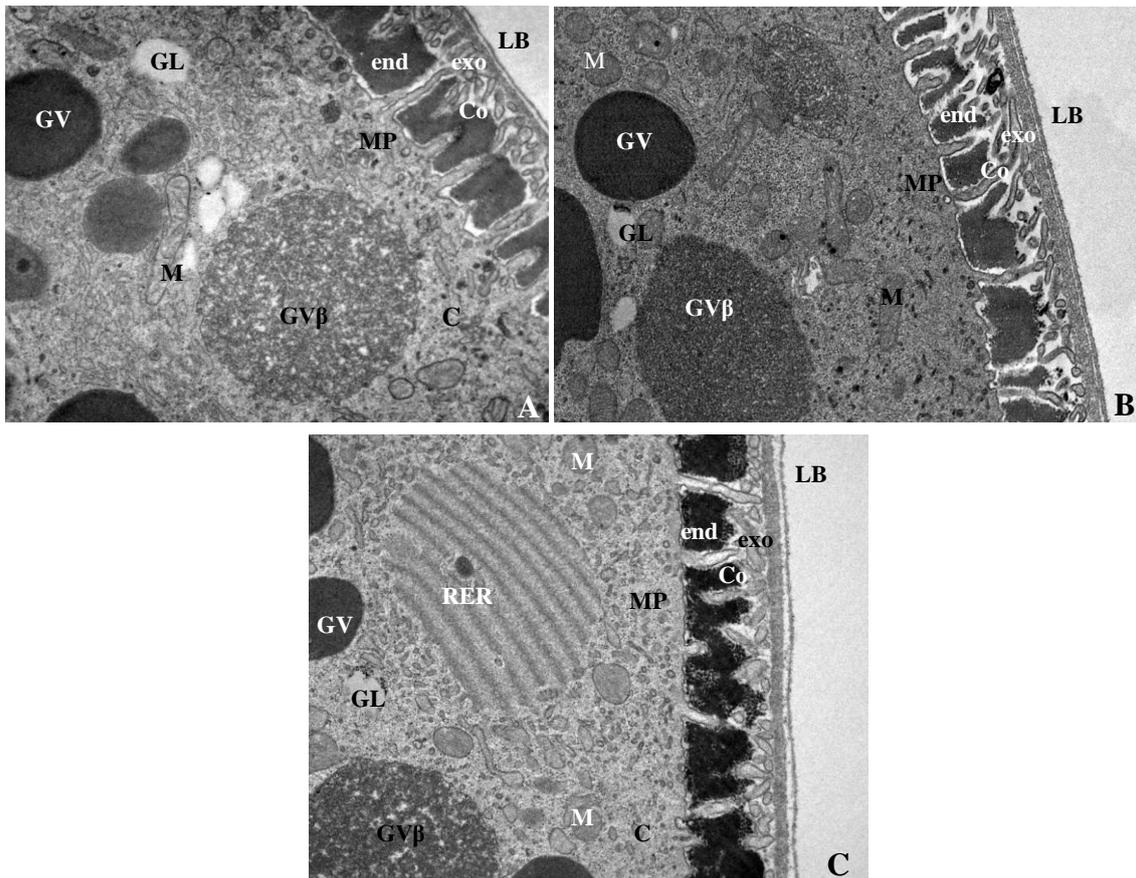


Figura 27- Eletromicrografias do oócito grau IV de fêmea ingurgitada de *R. microplus* dos grupos: A- controle (GI), B- bioterápico de *R. microplus* 6 CH (GII) e C- eugenol a 5% *pour on* (GIII). LB = lâmina basal, MP = membrana plasmática, Co = córion (exo= exocóron e end= endocóron), C = citoplasma, GVβ = grânulos vitelogênicos grandes, GV = grânulos vitelogênicos, M = mitocôndrias, GL = grânulos lipídicos, RER = retículo endoplasmático rugoso.

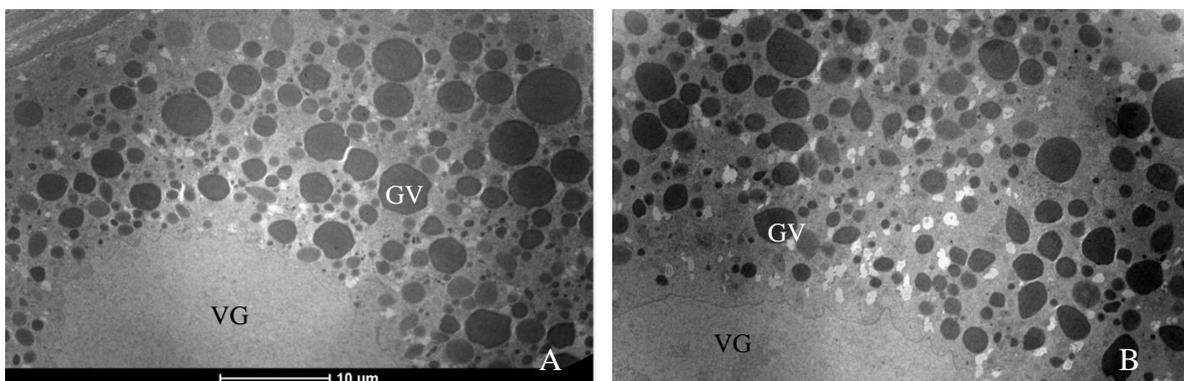


Figura 28- Eletromicrografias de oócitos de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* A- oócito grau IV do grupo controle, B- oócito grau III do grupo bioterápico de *R. microplus* 6 CH. VG = vesícula germinativa, GV = grânulos vitelogênicos. Nota-se grande número dos grânulos lipídicos (estruturas arredondadas brancas) no grupo bioterápico característico dessa fase.

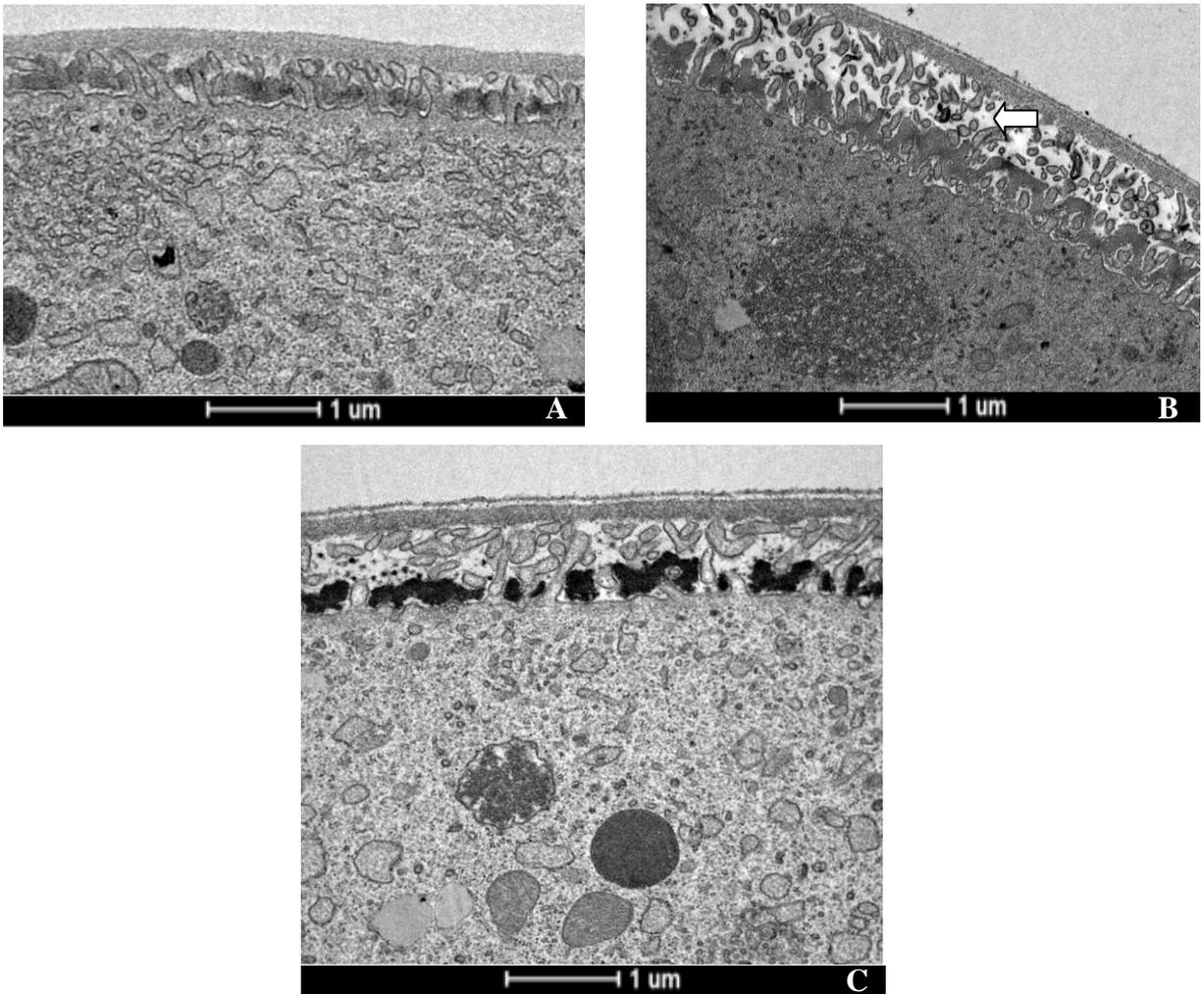


Figura 29- Eletromicrografias de oócitos grau III de fêmea ingurgitada de *R. microplus* dos grupos: A- controle (GI), B- bioterápico de *R. microplus* 6CH (GII) e C- eugenol a 5% *pour on* (GIII). Nota-se desorganização no córion e mais especificamente no exocóron do GII (seta).

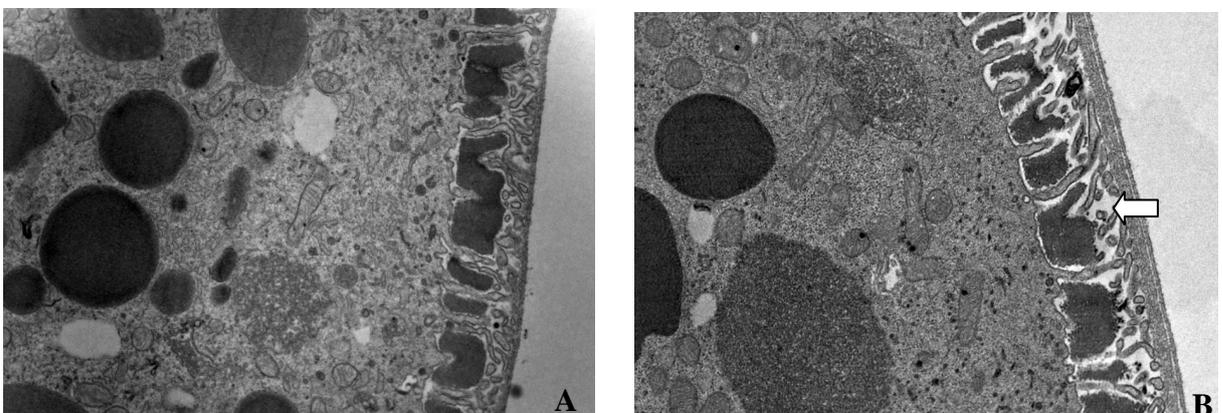


Figura 30- Eletromicrografias de oócitos grau IV de fêmea ingurgitada de *R. microplus* dos grupos: A- controle (GI) e B- tratado com bioterápico de *R. microplus* 6CH (GII). Nota-se evidente desorganização no córion e mais especificamente no exocóron do GII (seta).

Não foram realizados estudos prévios de avaliação de microscopia eletrônica em fêmeas coletadas de animais tratados com bioterápicos. Este estudo sugere a ação do bioterápico em processos metabólicos com ênfase na reprodução de *R. microplus*.

13.8 Avaliação de Bem-Estar Animal

O sistema de confinamento adotado foi considerado inerente ao objetivo do ensaio de avaliar a eficácia de diferentes formulações para o controle de *R. microplus* em bovinos submetidos à infestação controlada, garantindo a confiabilidade dos resultados, impedindo a reinfestação ambiental e impedindo a autolimpeza dos animais. Neste sistema há o comprometimento da habilidade de expressar comportamento normal da espécie e de movimentação, entretanto possibilita a manutenção de um programa alimentar individual, inspeções clínicas diárias, esquema profilático de doenças e higiene adequada das instalações.

13.8.1 Princípio I- Alimentação e ingestão de água

Os comedouros individuais possibilitaram a ingestão de alimentos de forma adequada de todos os grupos, visto que todos os animais demonstraram condição corporal satisfatória. O ganho de peso médio obtido para os grupos I, II e III foi respectivamente de 33,33 Kg, 28,66 Kg e 34,33 kg. A recomendação do ganho de peso para bovinos da raça leiteira é de no mínimo 600 gramas por dia, portanto, durante o período experimental (42 dias), o ganho de peso mínimo de 25,2 kg foi obtido nos três grupos, sem diferença entre os mesmos.

Os bebedouros automáticos e em número de um para cada dois animais possibilitaram ingestão de água adequada para todos os grupos.

No princípio de bem-estar I, levando-se em conta os parâmetros score corporal, comedouros, bebedouros e ganho de peso médio não houve diferença entre os grupos I, II e III.

13.8.2 Princípio II- Instalações e conforto térmico

Os bovinos das raças leiteiras possuem uma zona térmica considerada zona de conforto entre a temperatura de 10°C a 21°C, na qual a temperatura do corpo se mantém constante com o mínimo de esforço do sistema termorregulador e obtendo-se eficiência máxima de produção e reprodução. Em uma maior amplitude de temperatura ambiente conhecida como zona termoneutra, entre 24 a 26°C, os animais mantêm a homeotermia por meio de trocas de calor

com o ambiente, lançando mão dos mecanismos fisiológicos comportamentais e metabólitos. (Pires et al. 2010). As temperaturas ambientais máximas registradas pelo termômetro digital colocado no galpão, durante 27 dias do período experimental, foram abaixo de 26°C, 3 dias abaixo de 27° C e 10 dias acima de 27°C nos últimos dias do período experimental. Nesse último período de 10 dias foram intensificados os mecanismos de termorregulação dos animais com o objetivo de evitar a produção de calor endógeno e dissipá-lo para o ambiente. Apenas nos dias 38, 40 e 41 pela classificação do índice de temperatura e umidade (ITU) foi observado índice de estresse calórico brando, com respiração taquipnéica em quatro animais (5 e 13 do GI, 32 do GII e 26 do GIII), mas sem hipertermia demonstrando que os animais mantiveram-se dentro da zona termoneutra (Tabela 12). Da mesma forma foram observados os mesmos sinais nos animais 5 e 13 (GI) e 32 (GII) no 42° dia. Para melhoria do conforto térmico foram utilizados ventiladores e as instalações foram umidificadas e como não foi observada hipertermia pôde-se concluir que o equilíbrio foi mantido.

A maioria dos animais não apresentou ferimentos durante o período experimental em decorrência das instalações (tecnopatias) (Tabela 12). A claudicação é o principal problema de bem-estar de bovinos leiteiros mantidos estabulados, indicando sempre que a condição de bem-estar é inadequada (Broom 2008), fato este não observado no presente ensaio.

Tabela 12- Percentagens obtidas para as alterações observadas no princípio de bem-estar II, com base nos critérios conforto térmico e tecnopatias de bezerros dos grupos I, II e III.

Critérios de bem-estar	Alteração	Percentagens (%)		
		GI	GII	GIII
conforto térmico e tecnopatias	taquipneia	33,32	16,66	16,66
	hipertermia	0	0	0
	ferimentos (tecnopatias)	0	16,66	16,66
	Somatória	33,32	33,32	33,32
	% sem alterações	66,68	66,68	66,68

13.8.3 Princípio III- Boa saúde e alterações no Sistema Tegumentar

O protocolo Welfare Quality foi elaborado para avaliar pontos críticos de bem-estar de gado leiteiro mundialmente, entretanto, há algumas diferenças importantes em relação ao cenário

brasileiro. Uma delas é em relação ao critério de avaliação de lesões dermatológicas como indicadores não só de alterações patológicas, mas também de qualidade de instalações e a relação do animal com o meio ambiente no qual se encontra inserido. O protocolo sugere a identificação de lesões como edema e alopecia associadas às instalações (Wechsler et al. 2000), mas não especificamente as lesões causadas por carrapatos e nem as doenças transmitidas pelo *R. microplus*. Outros protocolos descrevem a investigação de alterações tegumentares em decorrência de parasitos em geral como o Bristol Welfare Assurance Programme (Leeb et al. 2004) e Welfare Assessment Protocol for Dairy Cows – QLK 5 (Rousing et al. 2000), mas não especificamente para os carrapatos. Como a ocorrência deste ectoparasito é de aproximadamente 80% em bovinos no Brasil (Grisi et al. 2002) e causam expressivos prejuízos econômicos, lesões, desconforto e afecções (Francis 1966; Horn 1985; Jonsson 2006), sugere-se a adaptação do protocolo Welfare Quality com a inclusão de novos parâmetros referente aos carrapatos na avaliação de bem-estar animal no país.

Todos os bezerros (100%) apresentaram prurido após a infestação por larvas de 14 a 21 dias de *R. microplus* e os animais com pelagem clara (13, 16, 23- GI -50%; 4, 8, 21- GII- 50% e 7, 12, 15- GIII- 50%) apresentaram hiperemia ao redor do local de fixação das ninfas e fêmeas adultas (Figura 31 e Tabela 13).



Figura 31- Hiperemia dérmica em bezerro do grupo I, característica da reação inflamatória causada por metaninfas de *R. microplus* no 9º dia após a infestação artificial.

Após o 34º dia do período experimental (20º dia após a 3ª infestação por larvas de *R. microplus*), foram observadas lesões crostosas nos testículos do bezerro 3 (GI- 16,66%), lesões nodulares nos testículos dos bezerros 2, 3 (GI- 33,3%, Figura 32) e 1 (GII-16,6%), lesões nodulares no pescoço do bezerro 23 (GIII- 16,66%), 4 (GII- 16,66%) e 14 (GIII- 16,66%), duas lesões circulares, alopecicas e hiperêmicas próximas à cauda do bezerro 7 (GIII- 16,66%), presença de seborréia no pescoço dos bezerros 2 (GI- 16,66%), 7 e 15 (GIII- 33,33%) e pelo opaco nos animais 12, 14 e 15 (GIII- 66,6%) em decorrência de três infestações artificiais, uma por semana de *R. microplus* (Tabela 13).

Além destas alterações foi observado aumento de linfonodos em todos os animais ao final do período experimental quando comparado com o período inicial.



Figura 32- Lesões nodulares no testículo de bezerro do grupo I no 37º dia após a infestação artificial por *R. microplus*.

Tabela 13- Percentagens obtidas para as alterações observadas no princípio de bem-estar III, com base nas alterações do sistema tegumentar de bezerras dos grupos I, II e III.

Critério de bem-estar	Alteração		Percentagens (%)		
			GI	GII	GIII
III- alterações do sistema tegumentar	prurido		100	100	100
	hiperemia dérmica		50	50	50
	lesões na pele	nodulares	50	33,33	16,66
		crostosas	16,66	16,66	0
		alopécicas	0	0	16,66
	pelo opaco		0	0	66,66
	seborreia		16,66	0	33,33
	Somatória		233,32	199,99	266,64
	% Média de alterações		46,66	39,99	53,32
	% Média sem alterações		53,34	60,01	46,68

Com base nos resultados dos escores atribuídos ao critério I, alimentação e ingestão de água, os grupos I, II e III apresentaram bem-estar satisfatório.

Os estressores ambientais podem afetar o desempenho, a saúde e o bem-estar (Pinheiro & Brito 2009), mas em relação ao critério II, conforto térmico e tecnopatias (Tabela 13), os grupos I, II e III apresentaram a mesma pontuação e o bem-estar foi considerado satisfatório, ressaltando que o sistema adotado foi o *tie-stall* e que o acesso ao pasto é um fator importante para o comportamento e bem-estar dos bovinos leiteiros.

Em relação ao critério III, os animais do grupo II demonstraram menor percentagem média de alterações no sistema tegumentar (39,99%), seguidos pelo grupo I (46,66%) e por último pelo grupo III (53,32%), demonstrando que o bem-estar foi melhor no grupo II com base nas alterações dermatológicas (Tabela 13). Os animais do grupo I constituíram o grupo controle e não recebeu tratamento carrapaticida durante o período experimental (42 dias), o que justifica as alterações observadas. E os animais do grupo III receberam aplicação única do eugenol *pour on* no 21º dia após a primeira infestação e mostrou eficácia acaricida baixa com necessidade de reaplicação a cada 15 dias, possivelmente esta tenha sido a causa de maior comprometimento do bem-estar dos animais deste grupo. Entretanto, nos três grupos foi observada interferência e prejuízo do bem-estar em decorrência do parasitismo por *R. microplus*.

Estes resultados demonstram a importância da avaliação das alterações causadas pelo carrapato *R. microplus* nos protocolos de bem-estar de bovinos que são mantidos em áreas endêmicas deste ectoparasito, além da relevância da realização do controle do *R. microplus*.

14. CONCLUSÃO

- O bioterápico de *R. microplus* 6 CH quando aplicado em bezerros artificialmente infestados por *R. microplus* causou inibição parcial da eclodibilidade, desorganização na deposição do exocório de oócitos durante a vitelogênese, sugerindo interferência na vitelogênese e na reprodução de *R. microplus*. Estudos por períodos prolongados devem ser realizados com a utilização do bioterápico de *R. microplus* 6 CH.
- O eugenol *pour on*, na concentração de 5% apresentou baixa eficácia, pouca interferência na eficiência reprodutiva, e manteve a integridade de oócitos de *R. microplus* à microscopia eletrônica de transmissão.
- O bioterápico de *R. microplus* 6 CH administrado a bezerros sem prévio contato com carrapatos mostrou eficácia baixa, porém crescente, sendo maior na última semana de tratamento.
- O tratamento com eugenol 5% *pour on* não causou alterações eritrocitárias, leucocitárias nem efeitos deletérios à função hepática e renal de bezerros.
- Os bezerros tratados com o bioterápico de *R. microplus* 6 CH por via oral apresentaram resposta de fase aguda durante 48 horas após o início do tratamento e leucocitose durante o período experimental diferentemente do grupo controle, sugerindo ação primária do bioterápico. Apresentaram valores normais para haptoglobina e α 1-glicoproteína ácida no 21º, 30º e 39º dias após a infestação por *R. microplus* e diminuição nos valores de transferrina no 30º dia após a infestação artificial, demonstrando resposta de fase aguda após níveis médios de infestação por *R. microplus*.
- Os animais dos três grupos apresentaram interferência no bem-estar em decorrência do parasitismo por *R. microplus* e o grupo que apresentou menor percentagem de alterações no sistema tegumentar foi o grupo tratado com o bioterápico de *R. microplus* 6 CH.

15- CONSIDERAÇÕES GERAIS

- O bioterápico 30 DH (fêmeas ingurgitadas) aplicado por via SC semanalmente em bezerros sem prévio contato com carrapatos e submetidos à infestação artificial, demonstrou eficácia média de 30,1% após seis aplicações.
- O bioterápico 6CH (fêmeas ingurgitadas, larvas e ovos) administrado por via oral diariamente a bezerros naturalmente infestados, demonstrou eficácia média de 33,06% após 7 dias de tratamento, semelhante ao bioterápico 30 DH .
- O bioterápico 6 CH (fêmeas ingurgitadas, larvas e ovos) administrado por via oral a bezerros sem prévio contato com carrapatos e submetidos à infestação artificial, demonstrou menor eficácia média de 12,31% após 42 dias de tratamento, ressaltando que na última semana de tratamento a eficácia média foi 32,53%.
- A eficiência do bioterápico 6 CH administrado por via oral, uma vez ao dia a bezerros naturalmente infestados foi de 56,35% no 7º dia de tratamento. Enquanto o mesmo bioterápico, administrado duas vezes ao dia, a bezerros sem prévio contato com carrapatos, mostrou eficiência de 45,9% no 37º dia de tratamento.
- Os bezerros naturalmente infestados e tratados com o bioterápico 6 CH por via oral, demonstraram resposta maior e em menor tempo que os animais artificialmente infestados sem contato prévio com carrapatos. Estudos detalhados devem ser realizados para comprovar este fato.
- A fase de desenvolvimento do carrapato *R. microplus* empregada como matéria-prima no processamento do bioterápico sugere influenciar no efeito do bioterápico.
- A mensuração da transferrina pode auxiliar na avaliação da eficácia de quimioterápicos para o controle do *R. microplus*.
- A associação do bioterápico de *R. microplus* e do eugenol *pour on* para o controle do *R. microplus* podem atuar de forma complementar, por apresentar mecanismos de ação diferentes.
- Como perspectivas futuras, melhorias na formulação do bioterápico MV 6 CH e estudos a campo por tempo prolongado devem ser realizados, por tratar-se de um medicamento que apresenta as vantagens de não contaminar o leite e a carne, nem causar impacto ambiental. Da mesma forma, o eugenol *pour on* na concentração 30% deve ser investigado em bovinos, pois apresentou alta eficácia contra larvas e fêmeas ingurgitadas nos testes *in vitro* e importante potencial para a formulação de produto ecologicamente adequado no controle de *R. microplus*. Estudos bioquímicos e toxicológicos devem ser realizados.

16. REFERÊNCIAS

- Adams RP 2001. *Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectroscopy*, 2 ed., Carol Stream, Illinois, Allured Publishing Corporation, 804 pp.
- Agnolin CA 2009. *Óleo de citronela no controle de ectoparasitas de bovinos*. Dissertação de mestrado em Produção Animal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 65 pp.
- Aguiar JCD, Santiago GMP, Lavor PL, Veras HNH, Ferreira YS, Lima MAA, Arriaga AMC, Lemos TLG, Lima JQ, de Jesus HCR, Alves PB, Braz-Filho R 2010. Chemical constituents and larvicidal activity of *Hymenaea courbaril* Fruit Peel. *NPC 5*: 1977-1980.
- Allan SA, Barré N, Sonenshine DE, Burridge MJ 1998. Efficacy of tags impregnated with pheromone and acaricide for control of *Amblyomma variegatum*. *Med Vet Entomol* 12: 141-150.
- Allen DM 2008. Criação de bezerros. In Andrews AH, Blowey RW, Boyd H, Eddy RG, 2008 *Medicina Bovina, Doenças e criação de bovinos*, 2 ed, Roca, São Paulo, p. 2-5.
- Almeida LAB 2004. *Avaliação do tratamento alopático e homeopático de mastite bovina em animais inoculados com Staphylococcus aureus*. Dissertação de mestrado em Epidemiologia Experimental e aplicada às Zoonoses, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 105 pp.
- Almeida LR 2006. Pesquisa em Bioterápicos. *Cult Homeopat* 16: 6-17.
- Almeida LR 2007. *Efeitos de medicamentos homeopáticos e bioterápicos em camundongos experimentalmente infectados por Trypanosoma evansi (STEEL, 1885) BALBIANI, 1988 e Trypanosoma cruzi CHAGAS, 1909*. Tese de doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 88 pp.
- Almeida LR, Cunha NC, Lisbôa RS, Madureira RC, Rangel CP, Viana EB, Fonseca AH 2008. Parâmetros biológicos de fêmeas adultas *Amblyomma cajennense* alimentadas em coelhos tratados com bioterápico ultradiluído. *Cienc Rural* 38: 1476-1478.
- Alves-Branco FPJ, Echevarria FAM, Siqueira AS. 1983. *Garça vaqueira (Egretta ibis) e o controle biológico do carrapato (Boophilus microplus)*. *Embrapa* 1: 1-4.
- Amaral NK 1993. Guidelines for the evaluation of ixodidicides against the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Rev Bras Parasitol Vet* 2: 144-151.

Andreotti R, Koller WW, Tadei WJ, Prado AP, Barros JC, Santos F, Gomes A. 2003. Occurrence of the *Megaselia scalaris* (Loew, 1866) (Diptera, Phoridae) as a parasitoid of *Boophilus microplus* in Campo Grande, MS, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 12: 46-47.

ANVISA Medicamentos dinamizados. [acesso em 2009 set 27]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/medicamentos>.

Apel MA, Ribeiro VLS, Bordignon SAL, Henriques AT, Poser GV 2009. Chemical composition and toxicity of the essential oils from *Cunila* species (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasitol Res* 105: 863–868.

Aragão HB 1936. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrofes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 31: 759-844.

Arantes GJ, Marques AO, Horner MR 1995. O carrapato do bovino *Boophilus microplus*, no município de Uberlândia, MG: análise da sua resistência contra carrapaticidas comerciais. *Rev Bras Parasitol Vet* 4: 89-93.

Arenales MC 2000. Homeopatia em gado de corte. Anais II Seminário Brasileiro sobre homeopatia na agropecuária orgânica, Espírito Santo do Pinhal, São Paulo, p. 53-90.

Arenales MC 2001. Estratégias de conversão para sistemas de produção de leite orgânico. In Fernandes EN; Bressan M; Vilela D 2001. *Produção orgânica de leite no Brasil*, Juiz de Fora-MG. Embrapa, p. 39-47.

Arenales MC 2002. Homeopatia em gado de corte. I Conferência Virtual Global sobre Produção Orgânica de Bovinos de Corte. [acesso em 2011 set 27]. Disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br/agencia/congressovirtual/02sumario.htm>.

Arnason JT, Philogène BJR, Morand P 1990. Insecticide of plant origin. *Am Chem Soc* 387: 214.

Avendaño H 1991. La ley de los semejantes “*Similia Similibus Curentur*” el semejante se cura com el semejante. *Rev Homeop Nat* 1: 5-9.

Bach A, Dinare M, Devant M, Carre X 2007. Associations between lameness and production, feeding and milking attendance of Holstein cows milked with an automatic milking system. *J Dairy Res* 74: 40-46.

Balandrin MF, Klocke JA, Wurtele ES, Bollinger WH 1985. Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. *Science* 228: 1154-1160.

Barbosa CS, Borges LMF, Miguita CH, Garcez FR, Garcez WS, Violante IMP, Alves RD, Nicácio J 2011. Ensaios *in vitro* com extratos brutos e metabólitos secundários de plantas do

cerrado sul-mato-grossense sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887). Anais 63^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC), Goiânia, Goiás.

Barbosa CS, Borges LMF, Nicácio J, Alves RD, Miguita CH, Violante IMP, Hamerski L, Garcez WS, Garcez FR 2013. *In vitro* activities of plant extracts from the Brazilian Cerrado and Pantanal against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol* 60: 421-430.

Bartussek H 1999. A review of the animal needs index (ANI) for the assessment of animals well-being in the housing systems for Austrian proprietary products and legislation. *Livest Prod Sci* 61: 179-192.

Barzon CD, Medeiros F, Moraes RE, Silva LCM, Massambani C, Takemura OS, Gazim ZC 2008. Preliminary study of homeopathic treatment of subclinical mastitis evaluated through somatic cells count and California mastitis test. *Int J High Dilution Res* 7: 147-151.

Baumann H, Gauldie J 1994. The acute phase response. *Immunol Today* 15: 74-80.

Bell A, Fellows LE, Simmonds MSJ 1990. Natural products from plants for the control of insect pests. In Hodgson E, Kuhr RJ *Safer insecticide development and use*. New York and Basel, Marcel Dekker, p. 337-383.

Benez SM 2002. *Manual de homeopatia veterinária: indicações clínicas e patológicas*. Robe editorial, São Paulo, 593 pp.

Bellavite P 2000. Basic Research on Homeopathy II. From life force to biodynamics and Biophysics. Anais Conference Homeopathy in the XXI Century; Campinas, SP, 3 pp.

Bellavite P, Conforti A, Piasere, A, Ortolani R 2005. Immunology and homeopathy 1. Historical background. *Evid Based Compl Alt* .2: 441-452.

Bellavite P, Conforti A, Pontarollo F, Ortolani R 2006. Immunology and homeopathy 2. Cells of the immune system and inflammation. *Evid Based Compl Alt* 3: 13-24.

Benavides E, Hernández G, Romero N, Castro A, Rodrigues B 2001. Preliminary evaluation of Neem (*Azadirachta indica*) extracts as an alternative for cattle tick, *Boophilus microplus* control. *Rev Colomb Entomol* 27: 1-8.

Berchieri-Junior A, Turco WCP, Paiva JB, Oliveira GH, Sterzo EV 2006. Evaluation of isopathic treatment of *Salmonella enteritidis* in poultry. *Homeopathy* 95: 94-97.

Bianchin I, Honer MR, Nunes SG, Nascimento YA, Curro JBE, Costa FP 1993. *Epidemiologia dos nematódeos gastrintestinais em bovinos de corte nos cerrados e controle estratégico no Brasil*. Embrapa, 24: 122 pp.

Bildet J, Guere JM, Saurel J, Aubin M, 1984. Etude de l'action préventive de différentes dilutions de *Phosphorus* sur l'hépatique toxique Du rat. *Homeopath Fr* 72: 205-209.

Bittencourt VREP 1992. *Ação do fungo Metarhizium anisopliae (Metchnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato Boophilus microplus (Canestrini, 1887)*. Tese de doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 105 pp.

Bittencourt VREP, Peralva SLFS, Viegas EC 1995. Eficácia *in vitro* dos isolados 747 e 986 do fungo *Beauveria bassiana* no carrapato *Boophilus microplus*. *Rev Bras Parasitol Vet* 4: 86.

Bittencourt VREP, Mascarenhas, AG, Faccini, JLH 1999. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. *Cienc Rural* 29: 351-354.

Bogni SI, Chagas ACS, Silva IC, Boschini L, Vieira LCC, Corrêa AG 2010. Ação acaricida de terpenos sobre o carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Anais XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

Boiron J 1985. Comparation de l'action d'*Arsenicum album* 7 CH normal et chauffé à 120° sur l'intoxication arsenicale provoquée. *Homeopathie* 5: 49-54.

Bond GB, Almeida R, Ostrensky A, Molento CFM 2012. Métodos de diagnóstico e pontos críticos de bem-estar de bovinos leiteiros. *Cienc Rural* 42: 1286-1293.

Borges LMF 2004. Feromônios – uso no controle de carrapatos. *Rev Bras Parasitol Vet* 13: S125-128.

Borges LMF, Ferri PH, Silva WC, Silva WJ, Melo LS, Souza LAD, Soares SF, Faria KA, Gomes NA, Mori A, Silva NF 2005. Ação do extrato hexânico de frutos maduros de *Melia azedarach* (Meliaceae) sobre *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) em bezerros infestados artificialmente. *Rev Patol Trop* 34: 53-59

Borges LMF, Ferri PH, Silva WJ, Silva WC, Silva JG 2003. *In vitro* efficacy of extracts of *Melia azedarach* against the tick *Boophilus microplus*. *Med Vet Entomol* 17: 228-231.

Borges LMF, Sousa LAD, Barbosa CS 2011. Perspectives for the use of plants extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev Bras Parasitol Vet* 20: 89-96.

Brasil 1990. Ministério da Agricultura. Portaria n. 90 de 04 de dezembro de 1989. Normas para produção, controle e utilização de produtos antiparasitários. Diário Oficial, 22 de jan. 1990.

Brasil 2009. Ministério da Saúde. 1º Relatório do Seminário Internacional de Práticas Integrativas e Complementares em Saúde, Brasília, [acesso em 2012 jun 10]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/seminario_praticas_integrativas_complementares_saude.pdf.

Bremner KC 1964. Studies on haptoglobin and haemopexin in the plasma of cattle. *Aust Exp Biol Med Sci* 42: 643-656.

Bristol 2004. Indicadores fisiológicos I e II e imunológicos de bem-estar animal. In Conceitos em Bem-Estar Animal [CD-ROM]. WSPA & Universidade de Bristol, Reino Unido.

Brito LG, Netto FGS, Oliveira MCS, Barbieri, FS 2006. *Bio-ecologia, importância médico veterinária e controle de carrapatos, com ênfase no carrapato dos bovinos, Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Embrapa, Porto Velho 104: 24 pp.

Broglia-Micheletti SMF, Valente ECN, Souza LA, Dias NS, Araújo, AMN 2009. Extratos de plantas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. *Rev Bras Parasitol Vet* 18: 44-48.

Broom DM 1986. Indicators of poor welfare. *Brit Vet J* 142: 524-526.

Broom DM 2008. Bem-estar. In Andrews AH, Blowey RW, Boyd H, Eddy RG, *Medicina bovina, doenças e criação de bovinos*, 2 ed., Roca, São Paulo, p. 846-858.

Broom DM, Fraser AF 2010. Bem-estar de bovinos. In Broom D, Fraser AF *Comportamento e bem-estar de animais domésticos*, 4 ed., Manole, p. 261-280.

Broom DM, Molento CFM 2004. Bem estar animal: conceito e questões relacionadas-Revisão. *Arch Vet Sci* 9: 1-11.

Brown HA, Minott DA, Ingram CW, Williams LAD 1998. Biological activities of the extracts and constituents of pimento, *Pimenta dioica* L. against the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Sci Appl* 18: 9-16.

Brown SJ, Shapiro SZ, Askenase PW 1984. Characterization of tick antigens inducing host immune resistance: I. Immunization of guinea pig with *Amblyomma americanum*- derived salivary gland extracts and identification of an important salivary gland protein antigen with guinea pig anti-tick antibodies. *J Immunol* 133: 3319-3325.

Brum JGW, Teixeira MO 1992. Doença em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) causada por *Cedecea lapagei* e *Escherichia coli*. *Arq Bras Med Vet Zootec* 44: 441-443.

Buzatti A, Krawczak FS, Pivoto FL, Vogel FSF, Botton SA, Zanetti GD, Manfron MP, Sangioni LA 2011. Atividade acaricida *in vitro* de *Glechon spathulata* Benth. sobre teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Cienc Rural* 41: 1813-1817.

Camillo G, Vogel FF, Sangioni LA, Cadore GC, Ferrari R 2009. Eficiência *in vitro* de acaricidas sobre carrapatos de bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Cienc Rural* 39: 490-495.

Campos-Júnior DA, Oliveira PR 2005. Avaliação *in vitro* da eficácia de acaricidas sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) de bovinos no município de Ilhéus, Bahia, Brasil. *Cienc Rural* 35: 1386-1392.

Carroll JF, Maradufu A, Warthen Jnr JD 1989. An extract of *Commiphora erythraea*: a repellent and toxicant against ticks. *Ent Exp Appl* 53: 111-116.

Carvalho LB 2008. *Efeitos in vitro e in vivo de nematóides entomopatogênicos (RHABDITIDA) sobre o carrapato dos bovinos Rhipicephalus (Boophilus) microplus (ACARI: IXODIDAE)*, Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 37 pp.

Carvalho WA 2006. *O papel das imunidades na relação parasito/hospedeiro: o carrapato Rhipicephalus (Boophilus) microplus e bovinos resistentes ou susceptíveis*. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 113 pp.

Carvalho WA, Bechara GH, Moré DD, Ferreira BR, da Silva JS, Santos IKFM 2008. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: distinct acute phase proteins vary during infestations according to the genetic composition of the bovine hosts, *Bos taurus* and *Bos indicus*. *Exp Parasitol* 118: 587-591.

Catto JB, Bianchin I, Saito ML 2009. *Efeito acaricida in vitro de extratos de plantas do Pantanal no carrapato de bovinos, Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, Embrapa, Campo Grande 26: 25 pp.

Cazin JC, Cazin M, Gaborit JL, Chaoui AQ, Boiron J, Belon P, Cherruault Y, Papapanayotou C 1987. A study of the effect of decimal and centesimal dilutions of arsenic on the retention and mobilization of arsenic in the rat. *Hum Toxicol* 6: 315-320.

Ceciliani F, Cerón JJ, Eckersall PD, Sauerwein H 2012. Acute phase proteins in ruminants. *J Proteomics* 75: 4207-4231.

Cerón JJ, Eckersall PD, Martínez-Subiela SM 2005. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Path* 34: 85-99.

Cerqueira JL, Araújo JP, Sorensen JT, Ribeiro JN 2011. Alguns indicadores de avaliação de bem-estar em vacas leiteiras – revisão. *Rev Port Cien Vet* 110: 5-19.

Chagas ACS 2004. Controle de parasitos utilizando extratos vegetais. Anais XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e I Simpósio Latino- Americano de Ricketisioses, Ouro Preto, Minas Gerais.

Chagas ACS 2008. Metodologias *in vitro* para avaliação de fitoterápicos sobre parasitas e resultados de testes a campo [CD-ROM]. Anais XV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, II Seminário de Parasitologia dos Países do Mercosul, Curitiba, Paraná, 13 pp.

Chagas ACS, Barros LD, Cotinguiba F, Furlan M, Giglioti R, Oliveira MCS, Bizzo HR 2012. *In vitro* efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res* 110:295–303.

Chagas ACS, Leite RC, Furlong J, Prates HT, Passos WM 2003. Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. *Cienc Rural* 33: 109-114.

Chagas ACS, Passos WM, Prates HT, Leite RC, Furlong J, Fortes ICP 2002. Efeito acaricida de *Eucalyptus* em *Boophilus microplus*: óleos essenciais e concentrados emulsionáveis. *Braz J Vet Res An Sci* 39: 247-253.

Chungsamarnyart N, Jansawan W 1996. Acaricidal activity of peel oil of *Citrus* spp. on *Boophilus microplus*. *Kasetsart J (Nat Sci)* 30: 112-117.

Chungsamarnyart N, Jansawan W 2001. Effect of *Tamarindus indicus* L. against the *Boophilus microplus*. *Kasetsart J (Nat Sci)* 35: 34-39.

Chungsamarnyart N; Jiwajinda S; Rattanakreetakul C, Jansawan W 1991. Practical extraction of sugar apple seeds against tropical cattle ticks. *Kasetsart J (Nat Sci)* 25: 101-105.

Constantinoiu CC, Jackson LA, Jorgensen WK, Lew-Tabor AE, Piper EK, Mayer DG, Venus B, Jonsson NN 2010. Local immune response against larvae of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Int J Parasitol* 40: 865–875.

Corrêa O 1953. A resistência aos inseticidas, carrapaticidas e antibióticos. *B Diret Prod Anim* 9: 75-80.

Costa FB, Vasconcelos PSS, Silva AMM, Brandão VM, Silva IA, Teixeira WC, Guerra RMSN, Santos ACG 2008. Eficácia de fitoterápicos em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus*, provenientes da mesorregião oeste do Maranhão, Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet* 17 (Supl. 1): 83-86.

Costa JHC, Hotzel MJ, Longo C, Balcão LF 2013. A survey of management practices that influence production and welfare of dairy cattle on family farms in southern Brazil. *J Dairy Sci* 92: 4101-4111.

Costa JW, Botelho JR 2011. Classe Aracnida In: Neves DP, de Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA 2011. *Parasitologia Humana*, 12 ed., Atheneu, São Paulo, 449-458.

Costa-Júnior LM, Furlong J 2011. Efficiency of Sulphur in garlic extract and non-sulphur homeopathy in the control of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Med Vet Entomol* 25: 7-11.

Cray C, Zaias J, Altman NH 2009. Acute phase response in animals: a review. *Comp Med* 59: 517-526.

Cruz EMO, Costa-Junior LM, Pinto JAO, Santos DA, Araujo AS, Arrigoni-Blank MF, Bacci L, Alves PB, Cavalcanti SCH, Blank AF 2013. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Parasitol* 195: 198-202.

Cunha AP, Bello ACP, Domingues LN, Martins JR, Oliveira PR, Freitas CMV, Bastianetto E, Silva MX, Leite RC 2010. Effects of urea on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol* 174: 300-304.

Cunha AP 2011. *Controle integrado de parasitos em bovinos de leite*, Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 80 pp.

Cupp EW 1991. Biology of ticks. *Vet Clin N Am -Small Animal* 21: 1-25.

Davey RB, Miller RJ, George JE 2008. Efficacy of amitraz applied as a dip against an amitraz-resistant strain of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) infested on cattle. *Vet Parasitol* 152, p. 127-135.

Day CEI 2008. Medicina Alternativa. In Andrews AH; Blowey RH; Boyd H; Eddy RG. *Medicina Bovina, doenças e criação de bovinos*. 2 ed. Roca, São Paulo, p. 958-978.

de Castro JJ, Newson RM 1993. Host resistance in cattle tick control. *Parasitol Today*, 9: 13-17.

de la Fuente J, Rodriguez M, Monteiro C, Redondo M, Garcia-Garcia, JC, Mendez L et al. 1998. Field studies and cost-effectiveness of vaccination with GAVAC TM, against the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vaccine* 16: 366-73.

Deffune G, Oliveira WC 2009. Sistemas orgânicos versus convencionais no controle de ectoparasitas em bovinocultura leiteira sustentável. [acesso em 2009 set 27]. Disponível em: <http://www.pronaf.gov.br/dater/arquivos/20144419964>.

Delgado FEF 2002. *Avaliação do controle estratégico do Boophilus microplus (Canestrini, 1887) pelo Programa BABSIM, em propriedades dos Campos das Vertentes e Sul de Minas*, Dissertação de mestrado em Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 28 pp.

Denardi SE, Bechara GH, de Oliveira PR, Mathias MIC 2011. Ultrastructural analysis of the oocytes of female *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks subjected to the action of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem). *Ultrastruct. Pathol.* doi: 10.3109/01913123.2011.588819

Dewick PM 2009. *Medicinal natural products: A biosynthetic approach* 3 ed Wiley, United Kingdom p. 189-190.

Domingues LN, Cunha AP, Bello ACP, Bastianetto E, Leite RC 2008. Epidemiologia das principais parasitoses de bovinos no Brasil Central. Parte II: controle estratégico de parasitos. *V&Z em Minas* 8: 27-37.

Domingues LN 2011. *Práticas de controle e perfil de suscetibilidade de Haematobia irritans irritans (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) e Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) à cipermetrina e clorpirifós na mesorregião do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba*, MG, 2010, Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 62 pp.

Dowling A, Hodgson JC, Schock A, Donachie W, Eckersall PD, Mckendrick IJ 2002. Experimental induction of pneumonic pasteurellosis in calves by intratracheal infection with *Pasteurella multocida* biotype A:3. *Res Vet Sci* 73: 37-44.

Drummond RO, Ernst SE, Trevino JL, Gladney WJ, Grahan OH 1973. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. *J Econ Entomol* 1: 130-133.

Eckersall PD 2008. Proteins, proteomics and the dysproteinemias. In Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic Press. Amsterdam, p. 117-155.

Eckersall PD, Gowb JW, McComba C, Bradley B, Rodgersa J, Murraya M, Kennedy PGE 2001. Cytokines and the acute phase response in post-treatment reactive encephalopathy of *Trypanosoma brucei brucei* infected mice. *Parasitol Int* 50: 15-26.

El-Deeb WM, Iacob OC 2012. Serum acute phase proteins in control and *Theileria annulata* infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Vet Parasitol* 190: 12-18.

Elder JK, Kearnan JF, Waters KS, Dunwell GH, Emmerson FR, Knott SG 1980. A survey concerning cattle tick control in Queensland. 4. Use of resistance cattle and pasture spelling. *Aust Vet J* 56: 219-231.

Fagliari JJ, Passipieri HT, Okuda HT, Silva SL, Silva PC 2007. Serum protein concentrations, including acute phase proteins, in calves with hepatogenous photosensitization. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 59: 1355-1358.

Farias NA 1994. Resistência do carrapato *Boophilus microplus* a acaricidas no noroeste do estado de São Paulo. Anais Workshop acaricide resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. Porto Alegre, RS, p. 10-13.

Farias NA, Ruas JL, Santos TRB 2008. Análise da eficácia de acaricidas sobre o carrapato *Boophilus microplus*, durante a última década, na região sul do Rio Grande do Sul. *Cienc Rural* 38: 1700-1704.

Farmacopeia 2011. Farmacopeia Homeopática Brasileira. 3 ed., [acesso em 2011 mar 27]. [364 pp.] Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/farmacopeiabrasileira/conteudo/3a_edicao.pdf.

FAO 1984. *Ticks and tick borne disease control. A practical field manual*. Tick control. Rome, 299 pp.

FAWC (Farm Animal Welfare Council) 1993. Five freedoms. [acesso em 2008 mar 02]. Disponível em: <http://www.fawc.org.uk>.

Ferraz FN, Simoni GK, Nascimento A, Melo CS, Aleixo DL, Gomes ML, Spack M, Araújo SM 2011. Different forms of administration of biotherapy 7 DH in mice experimentally infected by *Trypanosoma cruzi* produce different effects. *Homeopathy* 100: 237-243.

Filho MLS 2007. *Avaliação in vitro da ação antiparasitária do extrato aquoso e etanólico do Angico preto (Anadenanthera macrocarpa) (Benth.) Brenan sobre o carrapato Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini, 1887)*, Dissertação de mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Piauí, 59 pp.

Fisher AD, Crowe MA, O`Nuallain EM, Monaghan ML, Larkin JA, O`Kiely P, Enright WJ 1997. Effects of cortisol on *in vitro* interferon-gamma production, acute-phase proteins, growth, and feed intake in a calf castration model. *J Anim Sci* 75, 1041-1047.

Fontes OL, Farhat FCLG, Cesar AT, Lara MG, Montebelo MIL, Luizetto CMB, Chaud MV 2009. Evaluation of the effect of different concentrations of *Arsenicum album* 6 CH on intoxicated rats. *Int J High Dilution Res* 8: 119-127.

Francis SJ 1966. Resistance of zebu and other cattle tick infection and babesiosis with special reference in Australia: an Historical review. *Brit Vet J* 122: 301-307.

Francis J, Little DA 1964. Resistance of droughtmaster cattle to tick infestation and Babesiosis. *Aust Vet J* 40: 247-253.

- Franzin AM 2009. *Imunobiologia das infestações de bovinos pelo carrapato Rhipicephalus (Boophilus) microplus: estudo dos correlatos imunes de resistência e de susceptibilidade*. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 134 pp.
- Freire JJ 1953. Arsênico e cloro, resistência e emprego do tiofosfato de dietil parametiofelina (parathion) na luta anti-carrapato *Boophilus microplus*. *B Prod Anim* 9:3-31.
- Furlong J 1993. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. Belo Horizonte: *Escola de Veterinária da UFMG* 8: 49-61.
- Furlong J 1998. Poder infestante de larvas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixododae) em pastagem de *Melinis minutiflora*, *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria mutica*. *Cienc Rural* 28: 635-640.
- Furlong J 2005. *Carrapatos: problemas e soluções*. Embrapa, Juiz de Fora, 65 pp.
- Furlong J, Martins JRS, Prata MCA 2003. *Carrapato-dos-bovinos: controle estratégico nas diferentes regiões brasileiras*. Embrapa, Juiz de Fora 36: 1-6.
- Furlong J, Martins JRS, Prata MCA 2007. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? *Hora Vet* 159: 26-32.
- Gabay C, Kushner I 2001. *Acute-phase proteins*, Encyclopedia of Life Sciences- Nature, 1-6.
- Galun R 1975a. Investigaciones sobre las medidas alternativas de control de artrópodos contra las plagas del ganado. Anais Seminário sobre ectoparasitas: ecologia y control de los parasitos externos de importancia economica que afetan el ganado en America Latina, Cali, Colombia, p. 177-182.
- Galun R 1975b. Control de las plagas del ganado mediante reguladores del crecimiento del insecto. Anais Seminário sobre ectoparasitas: ecologia y control de los parasitos externos de importancia economica que afetan el ganado en America Latina, Cali, Colombia, p. 185-193.
- Ganheim C, Hulten C, Carlsson U, Kindahl H, Niskanen R, Waller KP 2003. The acute phase response in calves experimentally infected with bovine viral diarrhoea virus and/or *Mannheimia haemolytica*. *J Vet Med B* 50: 183–190.
- Gauss CLB, Furlong J 2002. Comportamento de larvas infestantes de *Boophilus microplus* em pastagem de *Brachiaria decumbens*. *Cienc Rural* 32: 467-472.
- Gazim ZC, Ferreira FBP, Silva AV, Bolognese KC, Merlin E, Messa V, Jesus RA, Coutinho, CA, Silva LCM 2010. Efficiency of tick biotherapeutic on the control of infestation by

Rhipicephalus (Boophilus) microplus in Dutch dairy cows. *Int J High Dilution Res* 9: 156-164.

George JE, Pound JM, Davey RB 2004. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitol* doi: 10.1017/S0031182003004682.

Geraldino JM 1986. Ensaios clínicos com o bioterápico *Trypanosoma cruzi* D30 nas formas crônicas e sintomáticas da doença de Chagas. *Pesqui Homeopática* 2: 49-64.

Ghosh S, Sharma AK, Kumar S, Tiwari SS, Ratogi S, Srivastava S, Singh M, Kumar R, Paul S, Ray DD, Rawat AJS 2011. *In vitro* and *in vivo* efficacy of *Acorus calamus* extract against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasitol Res* 108: 361-370.

Glass EJ, Craigmile SC, Springbett A, Preston PM, Kirvar E, Wilkie GM, Eckersall PD, Hall FR, Brown CGD 2003. The protozoan parasite, *Theileria annulata*, induces a distinct acute phase protein response in cattle that is associated with pathology. *Int J Parasitol* 33: 1409-1418.

Gobbo-Neto L, Lopes NP 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quím Nova* 30: 374-381.

Godson DL, Campos M, Attah-Poku SK, Redmond MJ, Cordeiro DM, Sethi MS, Harland, RJ, Babiuk LA 1996. Serum haptoglobin as an indicator of the acute phase response in bovine respiratory disease. *Vet Immunol Immunop* 51: 277-292.

Gomes A 1995. *Dinâmica populacional de Boophilus microplus (Canestrini, 1987) (Acari: Ixodidae) em bovinos nelore (bos indicus) e cruzamentos em infestações experimentais*, Tese de doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 120 pp.

Gómez-Laguna J, Salguero FJ, Pallares FJ, Rodríguez-Gómez IM, Barranco I, Carrasco L 2011. Acute phase proteins as biomarkers in animal health and welfare In Veas F *Acute Phase proteins as early non-specific biomarkers of human and veterinary diseases*. Intechopen, p. 264-280.

Gonçalves K, Toigo E, Ascoli B, Poser GV, Ribeiro VLS 2007. Effects of solvents and surfactant agents on the female and larvae of cattle tick *Boophilus microplus*. *Parasitol Res* 100: 1267-1270.

Gosh S, Tiwari SS, Srivastava S, Sharma AK, Kumar S, Day DD, Rawat AKS 2013. Acaricidal properties of *Ricinus communis* leaf extracts against organophosphate and pyrethroids resistant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Parasitol* 192: 250-257.

Grandin T 2010. Recommended animal handling guidelines and audit guide: A Systematic Approach to Animal Welfare, AMI Foundation, Washington, 109 pp.

- Graninger W, Thalhammer F, Hollenstein U, Zotter GM, Kreamsner PG 1992. Serum protein concentrations in *Plasmodium falciparum* malaria. *Acta Trop* 52: 121-128.
- Grisi L, Massard CL, Moya-Borja GE, Pereira JB 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora Vet* 21: 8-10.
- Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ 2005b. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci* 11: 1045-1056.
- Gruys E, Toussaint MJM, Upragarin N, Van Ederen AM, Adewuyi AA, Candiani D, Nguyen TKA, Sabeckiene J. 2005a. Acute phase reactants, challenge in the near future of animal production and veterinary medicine. *J Zhejiang Univ Sci* 10:941-94.
- Gwaltney-Brant SM 2012. Epidemiology of animal poisonings in the United States. In Gupta RC *Veterinary Toxicology*, 2 ed., Academic Press, London, p. 80-87.
- Hamilton JGC 1992. The role pheromones in tick biology. *Parasitol Today* 6: 130-132.
- Harvey JW 2008. Iron metabolism and its disorders. In Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic Press. Amsterdam, p. 259-285.
- Heegaard PMH, Godson DL, Toussaint MJM, Tjørnehoj K, Larsen LE, Viuff B, Ronsholt L 2000. The acute phase response of haptoglobin and serum amyloid A (SAA) in cattle undergoing experimental infection with bovine respiratory syncytial virus. *Vet Immunol Immunop* 77: 151-159.
- Heimerdinger A, Olivo CJ, Molento MB, Ziech MF, Scaravelli LFB, Skonieski FR, Both JF, Charão PS 2006. Extrato alcoólico de Capim cidreira (*Cymbopogon citratus*) no controle do *Boophilus microplus* em bovinos. *Rev Bras Parasitol Vet* 15: 37-39.
- Heinrich PC, Castell TA, Andus T 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 334: 297-314.
- Hinton HE 1982. Biology of insects. In Saito KC, Bechara GH, Nunes ET, Oliveira PR, Denardi SE, Camargo-Mathias MI 2005. Morphological, histological and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol* 129: 299-311.
- Hirvonen J, Pyörälä S, Jousimies-Somer H. 1996. Acute phase response in heifers with experimentally induced mastitis. *J Dairy Res* 63: 351-60.

Honorato LA 2006. *A interação humano-animal e o uso de homeopatia em bovinos de leite*. Dissertação de mestrado em Agroecossistemas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 120 pp.

Hoogstraal H 1985. Argasid and nuttallied ticks as parasites and vectors. *Adv Parasit* 1: 135-238.

Horadagoda NU, Knox KMG, Gibbs HA, Reid SWJ, Horadagoda A, Edwards SER, Eckersall PD 1999. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *Vet Rec* 17: 437-441.

Horn SC 1985. Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos. *Bol Def San Ani*, Brasília: Ministério da Agricultura, 38 pp.

IBGE 2011. Estimativas populacionais para os municípios brasileiros [acesso em 2013 fev 10]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2011>.

IBGE 2012. Senso Agropecuário [Acesso em 2013 fev 10]. Disponível em: <http://www.ibge.com.br/home/presidencia/noticias>.

Inokuma H, Kerlin RL, Kemp DH, Willadsen P. 1993. Effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on the bovine immune system. *Vet Parasitol* 47: 107-118

Isman MB 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protect* 19: 603-608.

Isman MB, Machial CM 2006. Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. In Rai M, Carpinella MC. *Advances in Phytomedicine, Naturally Occurring Bioactive Compounds*. Elsevier, New York, 2: 29-44.

Jackson ML 2007. *Veterinary Clinical Pathology: an introduction*. Blackwell, Ames, Iowa, 363 pp.

Jansawan W, Jittapalapong S, Jantaraj N 1993. Effect of *Stemona collinsae* extract against cattle ticks (*Boophilus microplus*). *Kasetsart J (Nat Sci)* 27: 336-340.

Jenkins DW 1964. *Pathogens, parasites and predators of medically important arthropods*. Bulletin 30, WHO, Genève, 150 pp.

Jonas WB, Dillner DK 2000 Protection of mice from Tularemia infection with ultra-low, serial agitated dilutions prepared from *Francisella tularensis*-infected tissue. *J Scientific Explor* 14: 35-52.

Jonsson NN 2004. *Integrated control programs for ticks on cattle: an examination of some possible components*. FAO animal production and health paper. School of Veterinary Science, University of Queensland, Australia, 82 pp.

Jonsson NN 2006. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet Parasitol* 137:1-10.

Jorge MHA 2004. *A Domesticação de plantas nativas do Pantanal*, Embrapa, Corumbá 100: 20 pp.

Juliano RS, Fioravanti MCS, Fagliari JJ, Silva PC, Silva LAF 2009. Proteinograma sérico de bovinos da raça Curraleiro. *Arq Bras Vet Zootec* 61: 533-538.

Kaaya GP, Mwangi EN, Malonza MM 1995. Acaricidal activity of *Margaritaria discoidea* (Euphorbiaceae) plant extracts against the ticks *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum* (Ixodidae). *Int J Acarol* 21:123-129.

Kalakumar B, Kumar HSA, Kumar BA, Reddy KS 2000. Evaluation of custard seed oil and neem oil as acaricides. *J Vet Parasitol* 14: 171-172.

Kaneko JJ 1997. Serum proteins and the dysproteinemias. In Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, *Clinical biochemistry of domestic animals*, 5 ed., Academic Press. San Diego, 142-163.

Khudrathulla M, Jagannath MS 2000. Effect of methanol extract of *Stylosanthes scabra* on ixodid ticks of animals. *Indian J Anim Sci* 70: 1057-1058.

Kitaoka S, Yajima A 1958. Physiological and ecological studies on some ticks I. Process of growth by blood-sucking. *Bull Nati Inst Anim Health* 34: 135-147.

Klafke GM 2008. Resistência de *R. (B.) microplus* contra os carrapaticidas In Pereira MC, Labruna MB, Szabó MPJ, Klafke GM 2008. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Biologia, Controle e Resistência, Medvet, São Paulo, p. 81-105.

Kossak AR 2003a. *Homeopatia em 1000 conceitos*, 2th Ed, Elcid, São Paulo, 561 pp.

Kossak AR 2003b. *Imunomodulação, ultradiluições hahnemannianas e isotermia*, Elcid, São Paulo, 330 pp.

Kutchan TM 2001. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiol* 125: 58-60.

Labruna MB, Veríssimo CJ 2001. Observações sobre a infestação por *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) em bovinos mantidos em rotação de pastagem, sob alta densidade animal. *Arq Inst Biol* 68: 115-120.

Labruna MB 2008. As gerações anuais. In Pereira MC, Labruna MB, Szabó MPJ, Klafke GM *Rhipicephalus (Boophilus) microplus Biologia, Controle e Resistência*, São Paulo, Medvet, p.57-62.

Laemmli UK 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lecchi C, Avallone G, Giurovich M, Roccabianca P, Ceciliani F 2009. Extra hepatic expression of the acute phase protein alpha 1-acid glycoprotein in normal bovine tissues. *Vet J* 180: 256-258.

Leeb C, Main DCJ, Whay HR, Webster AJF 2004. Bristol Welfare Assurance Programme: Cattle Assessment. University of Bristol, Reino Unido, 17p.

Leite RC 1988. *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) - Susceptibilidade, uso atual e retrospectivo de carrapaticidas em propriedades das regiões fisiográficas da Baixada do Grande Rio e Rio de Janeiro. Uma abordagem epidemiológica. Tese de doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 151 pp.

Leite RC, Labruna MB, Oliveira, PR 1995. *In vitro* susceptibility of engorged females from different populations of *Boophilus microplus* to commercial acaricides. *Rev Bras Parasitol Vet* 4: 283-294.

Leite RC, Cunha AP, Bello ACPP, Domingues L, Bastianetto E 2010. Controle dos ectoparasitos em bovinocultura de corte. In Pires AV *Bovinicultura de corte*. Piracicaba: FEALQ, 2: 1171-1196.

Lima AS, Sousa JR, Peixoto MG, Arrigoni-Blank MF, Costa-Júnior LM 2012. Ação carrapaticida do óleo essencial de *Lippia alba* sobre larvas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, São Luís, Maranhão.

Lobetti RG, Möhr AJ, Dippenaar T, Myburgh E 2000. A preliminary study on the serum protein response in canine babesiosis. *J S Afr Vet Assoc* 71:38-42.

Lomborg SR, Nielsen LR, Heegaard PMH, Jacobsen S 2008. Acute phase proteins in cattle after exposure to complex stress. *Vet Res Commun* 32:575-582.

Lopes NP, Kato MJ, Andrade EH, Maia JG, Yoshida M, Planchart AR, Katzin AM 1999. Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. by Waiapi Amazon Indians. *J Ethnopharmacol* 67: 313-319.

Lopes RA, Ribeiro RD, Nasi AMTT 1994. Parasitismo tissular e histomorfometria em órgãos de camundongos tratados com Bioterápico D30 e desafiados com cepas do *T. cruzi* morfológicamente distintas. *Pesqui Homeopática* 9: 24-25.

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

Magalhães FEP, Lima JD 1991. Controle estratégico do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em bovinos da região de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil. *Arq Bras Med Vet Zootec* 43: 423-431.

Maia R, Brant PC 1980. *Resíduos de pesticidas clorados em carne bovina. In: Sabatini GA Eficácia do Spinosad no tratamento de bovinos naturalmente ou artificialmente infectados por Boophilus microplus (Canestrini, 1887)*, Dissertação de mestrado em Patologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 64 pp.

Mamede, KP 2012. *Estudo das propriedades biológicas de bioterápicos homeopáticos obtidos por bioterápicos homeopáticos obtidos por diferentes metodologias farmacotécnicas sobre a Leishmania (Viannia) braziliensis*. Tese de doutorado em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 91 pp.

Marin Municipal Water District Vegetation Management Plan Herbicide Risk Assessment 2008. Clove Oil (Eugenol), p. 18-20 [acesso em 2011 fev 10]. Disponível em: http://www.marinwater.org/documents/Chap6_CloveOil_8_28_08.pdf.

Martinez ML, Silva MVGB, Machado MA, Teodoro RL, Verneque RS 2004. A biologia molecular como aliada ao combate aos carrapatos. Anais V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, Pirassununga, São Paulo.

Martínez-Subiela S, Tecles F, Eckersall PD, Cerón JJ 2002. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet Rec* 150; 241-244.

Martínez-Subiela S, Cerón, JJ 2005. Evaluation of acute phase protein indexes in dogs with leishmaniasis at diagnosis, during and after short-term treatment. *Vet Med* 50: 39-46.

Martinez-Velazquez M, Castilho-Herrera GA, Rosario-Cruz R, Flores-Fernandez JM, Lopez-Ramirez J, Hernandez-Gutierrez R, Lugo-Cervantes EC 2011a. Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res* 108: 108-481.

Martinez-Velazquez M, Rosario-Cruz R, Castilho-Herrera GA, Flores-Fernandez JM, Alvarez AH, Lugo-Cervantes EC 2011b. Acaricidal effect of essential oils from *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 48: 822-827.

- Martins RM 2006. Estudo *in vitro* da ação acaricida do óleo essencial da gramínea Citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) no carrapato *Boophilus microplus*. *Rev Bras Plantas Med* 8: 71-78.
- Mc Nair J, Elliott C, Bryson DG, Mackie DP 1998. Bovine serum transferrin concentration during acute infection with *Haemophilus somnus*. *Vet J* 155: 251-255.
- Meinrez GR, Agnolin CA, Foletto V 2007. Fumo em corda no controle do carrapato de bovinos. *Rev Bras Agroecol* 2: 1711-1714.
- Melo MM 2006. Plantas tóxicas para animais domésticos. *Cad Tec Vet Zootec* 49: 1-3.
- Meltzer MI 1998. Reply to comment on "A possible explanation of the apparent breed-related resistance in cattle to bont tick (*Amblyomma hebraeum*) infestations". *Vet Parasitol* 79: 265-266.
- Mendes KAC, Garcia TAR; Fernandes LC; Nasi AATT; Lopes RA; Ribeiro RD 1994. Testes sorológicos para pesquisa de anticorpos em soros de camundongos tratados pelo *Trypanosominum* TC D30. *Pesqui Homeopática* 9: 26- 27.
- Mendes MC, Lima CKP, Nogueira AHC, Yoshihara E, Chiebao DP, Gabriel FHL, Ueno TEH, Namindome A, Klafke GM 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. *Vet Parasitol* 178: 383-388.
- Michaud J 1998. *Ensino superior de Homeopatia*, 2 ed., Andrei, São Paulo, p. 120-125.
- Miller RJ, Byford RL, Smith GS, Craig ME, Vanleeuwen D 1995. Influence of snakeweed foliage on engorgement, fecundity and attachment of the lone star tick (Acari: Ixodidae). *J Agr Entomol* 12: 137-143.
- Mitidiero AMA 2002. *Potencial do uso de homeopatia, bioterápicos e fitoterapia como opção na bovinocultura leiteira: Avaliação dos aspectos sanitários e de produção*. Dissertação de mestrado em Agrossistemas na Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 132 pp.
- Molento CFM 2012. Bem-Estar de Animais de Produção: perspectiva brasileira. *Revista CFMV* 56: 19-23.
- Moreira MD, Picanço MC, Silva EM, Moreno SC, Martins JC 2006. Uso de inseticidas botânicos no controle de pragas. In Venzon M, Paula Júnior TJ, Pallini A *Controle alternativo de pragas e doenças*. Viçosa: Epamig/CTZM p. 89-120.

- Mwangi EN, Hassanali A, Essuman S, Myandat E, Moreka L, Kimondo MG 1995. Repellent and acaricidal properties of *Ocimum suave* against *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Exp App Acarol* 19: 11-18.
- Moyo B, Masika PJ, Dube S, Maphosa V 2009. An *in vivo* study of the efficacy and safety of ethno-veterinary remedies used to control cattle ticks by rural farmers in the Eastern Cape Province of South Africa. *Trop Anim Health Prod* 41: 1569-1576.
- Mulla MS, Su T 1999. Activity and biological effects of neem products against arthropods of medical and veterinary importance. *J Am Mosq Contr Assoc* 15: 133-152.
- Murata H, Shimada N, Yoshioka M 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J* 168: 28-40.
- Nasi AMTT, Ribeiro RD, Lopes RA 1994a. Ativação de macrófagos de camundongos com o emprego de Bioterápico. *Pesqui Homeopática* 9: 3-4.
- Nasi AMTT, Ribeiro RD, Lopes RA 1994b. Utilização de soros de camundongos e ratos tratados com bioterápico D30 em reações de aglutinação com *T. cruzi*. *Pesqui Homeopática* 9: 13- 14.
- Ndungu MW, Chhabra SC, Lwande W 1999. *Cleome hirta* essential oil as livestock tick (*Rhipicephalus appendiculatus*) and maize weevil (*Sitophilus zeamais*) repellent. *Fitoterapia* 70: 514-516.
- Ndungu JM, Eckersall PD, Jennings FW 1991. Elevation of the concentration of acute phase proteins in dogs infected with *Trypanosoma brucei*. *Acta Trop* 49:77-85.
- Nikunen S, Härtel H, Orro T, Neuvonem E, Transkanen R, Kivelä SL, Sankari S, Aho P, Pyörälä S, Saloniemi H, Soveri T 2007. Association of bovine respiratory disease with clinical status and acute phase proteins in calves. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 30: 143-151.
- Nogueira AHC, Barci LAG 2003. Avaliação da atividade acaricida do fumo de corda associado à cal virgem no controle de larvas de *Boophilus microplus* em condições de laboratório. *Arq Inst Biol* 70 (Suppl 3): 3.
- Nolan J 1990. Acaricide resistance in single and multi-host ticks and strategies for control. *Parasitol* 32: 145-153.
- Nolan J, Roulston WJ, Schnitzerling HJ 1979. The potencial of some synthetic pyrethroids for the control of the cattle tick (*Boophilus microplus*). *Aust Vet J* 55: 463-466.

Norval RA, Sonenshine DE, Allan SA, Burrige MJ 1996. Efficacy of pheromone-acaricide impregnated tail-tags decoys for controlling the bont tick, *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae), on cattle in Zimbabwe. *Exp Appl Acarol* 20, 31–46.

Hackman RH, Filshie BK 1982. The tick cuticle In Odhiambo TR, Current themes in tropical science: physiology of ticks, Pergamon press, Oxford, 1-39.

O'Kelly JC, Seebeck RM, Springell PH 1971. Alterations in host metabolism by the specific and anorectic effects of the cattle-tick (*Boophilus microplus*) II- Changes in blood composition. *Aust J Biol Sci* 24: 381-389.

Oliveira GP; Alencar MM 1987. Resistência de bovinos ao carrapato *Boophilus microplus* em infestação artificial. *Pesq Agropec Bras* 22: 433-438.

Oliveira GP; Alencar MM 1990. Resistência de bovinos de seis graus de sangue Holandês-Guzerá ao carrapato (*Boophilus microplus*) e ao berne (*Dermatobia hominis*). *Arq Bras Med Vet Zoot* 42: 127-135.

Oliveira GP; Alencar MM; Freitas AR 1989. Resistência de bovinos ao *Boophilus microplus* II. infestação natural. *Pesq Agropec Bras* 24: 1267-1271.

Oliveira CB; Bortoli EC; Barcellos JOJ 2008. Diferenciação por qualidade da carne bovina: a ótica do bem-estar animal. *Cienc Rural* 38: 2092-2096.

Oliveira PR 1993. *Controle estratégico do Boophilus microplus (Canestrini, 1887) em bovinos de propriedades rurais dos municípios de Lavras e Entre Rio de Minas*, Dissertação de mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 97 pp.

Oliveira TCG, Salcedo JHP, Massard CL 1986. Susceptibilidade de amostras de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887), do Rio de Janeiro, Brasil, à carrapaticidas organofosforados. *Arq Bras Med Vet Zoo* 38: 205-214.

Olivo CJ, Carvalho NM, Silva JHS, Vogel FF, Massariol P, Meinerz G, Agnolin C, Morel AF, Viau LV 2008. Óleo de citronela no controle do carrapato de bovinos. *Cienc Rural* 38: 406-410.

Olivo CJ, Heimerdinger A, Ziech MF, Agnolin CA, Meinerz GR, Both F, Charão OS 2009. Extrato aquoso de fumo em corda no controle do carrapato de bovino. *Cienc Rural* 39: 1131-1135.

Organon 1996. *Organon da arte de Curar*. Hahnemann S. Tradução Villela EM, Soares IC, 6 ed., IHFL & Robe, São Paulo, 248 pp.

Paranhos da Costa MJR 2000. Ambiência na produção de bovinos de corte a pasto. Anais de Etologia, Florianópolis, 18: 26-42.

Paranhos da Costa MJR, Cromberg VU 1997. Alguns aspectos a serem considerados para melhorar o bem-estar de animais em sistema de pastejo rotacionado. In Peixoto AM, Moura JC, Faria VC *Fundamentos do pastejo rotacionado*, FEALQ: Piracicaba, p. 273-296.

Paranhos da Costa MJR, Silva EV, Chiquitelli Neto M, Rosa MS 2002. Contribuição dos estudos de comportamento de bovinos para implementação de programas de qualidade de carne. Anais do XX Encontro Anual de Etologia, Sociedade Brasileira de Etologia, Natal, RN, p. 71-89.

Parisi LF, Pohl PC, Masuda A, Vaz Junior IS 2009. New approaches toward anti-*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick vaccine. *Rev Bras Parasitol Vet* 18: 1-7.

Pasay C, Mounsey K, Stevenson G, Davis R, Arlian L, Morgan M, Vyszynski-Moher D, Andrews K, McCarthy J 2010. Acaricidal activity of eugenol based compounds against scabies mites. *PLoS ONE* 5: 1-9.

Patarroyo Salcedo JH 1984. Métodos e alternativas de controle do *Boophilus microplus*. UFV, Viçosa, 9 pp.

Pereira JR 2006. Eficácia *in vitro* de formulações comerciais de carrapaticidas em teleóginas de *Boophilus microplus* coletadas de bovinos leiteiros do Vale do Paraíba, estado de São Paulo. *Rev Bras Parasitol* 15: 45-48.

Pereira JR, Famadas KM, 2006. Avaliação *in vitro* da eficiência do extrato da raiz do timbó (*Dahlstedtia pentaphylla*) (Leguminosae, Papilionoidae, Millettidae) sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) na região do Vale do Paraíba, São Paulo, Brasil. *Arq Insect Biol* 71: 443-450.

Pereira MC, Labruna 2008. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* In Pereira MC, Labruna MB, Szabó MPJ, Klafke GM 2008. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* *Biologia, Controle e Resistência*, Medvet, São Paulo, 15-54 pp.

Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PMH 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res* 35: 163-187.

Pinheiro AA, Brito IF 2009. *Bem-estar e produção Animal*, Embrapa, Ceará, 25 pp.

Pires JEP 2006. Efeito dos extratos aquoso e etanólico de planta *Simarouba versicolor*, St. Hill sobre larvas e teleóginas de carrapatos *Boophilus microplus*, Canestrini, 1887 e *Rhipicephalus sanguineus*, Latreille, 1806, Dissertação de mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 62 pp.

Pires JEP, Fernandes RM, Fernandes MZLCM, Viana GEN, Dourado JCL, Sousa SAA 2007. Determinação da concentração inibitória média (CI50) do extrato aquoso de *Simarouba versicolor*, St. Hill sobre a ovipostura do carrapato bovino (*Boophilus microplus*, Canestrini, 1887). *Rev Bras Pl Med* 9: 23-26.

Pires MFA, Castro CRT, Oliveira VM, Paciullo DSC 2010. Conforto e bem-estar para bovinos leiteiros. In Auad AM *Manual de Bovinocultura de Leite*, SENAR & Embrapa, Minas Gerais, p. 397-426.

Pontin K 2003. *Determinação da atividade biológica de bioterápico e extrato de própolis in vitro e in vivo na infecção experimental determinada por Leishmania (Viannia) Braziliensis*, Dissertação de mestrado em Parasitologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 105 pp.

Pott A, Pott VJ 1994. *Plantas do Pantanal*. Embrapa, Corumbá 320 pp.

Quigley J 2002. Calf note 82- Housing and behaviour revisited. [acesso em 2013 fev 11] Disponível em: <http://www.calf-notes.com/pdffiles/CN082.pdf>

Real CM 2008. Homeopatia populacional- Fundamentos para ruptura de um paradigma. *Hora Vet* 28: 13-20.

Ribeiro JM 1989. Role of saliva in tick host interactions. *Exp Appl Acarol* 7: 15-20.

Ribeiro RD, Lopes RA, Garcia TA, Rissato TA, Toldo AS, Alonso PR 1987. Estudo comparativo dos índices de cura de camundongos tratados com quimioterápicos e *Trypanosominum* TC D30. *Pesqui Homeopática* 3: 45-49.

Ribeiro RD, Lopes RA, Nasi AMTT, Garcia TAR, Carraro AA 1989. Efeitos de fatores humorais do camundongo tratado com *Trypanosominum* TC D30 em testes de lise do *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Pesqui Homeopática* 4: 10-14.

Ribeiro RD, Lopes RA, Nasi AMTT 1994b. Estudo da participação da imunidade humoral e celular na doença de Chagas experimentalmente em camundongos tratados com bioterápico D30. *Pesqui Homeopática* 9: 9- 10.

Ribeiro RD, Nasi AMTT, Lopes RA 1994a. Comportamento de tripomastigotas sanguíneas do *Trypanosoma cruzi* inoculados endovenosamente em camundongos normais e tratados com bioterápicos. *Pesqui Homeopática* 9: 5- 8.

Ribeiro RD, Lopes RA, Nasi AMTT, Rissato TA, Carraro GAA 1994. Efeitos de fatores humorais do camundongo tratado com *Trypanosominum* D30, em testes de lise de *Trypanosoma cruzi* “in vitro”. *Pesqui Homeopática* 9: 11- 14.

- Ribeiro VLS, Avancini C, Gonçalves K, Toigo E, Von Poser GL 2008. Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet Parasitol* 151: 351–354.
- Ribeiro VLS, dos Santos JC, Bordignon AS, Apel MA, Henriques AT, Von Poser GL 2010. Acaricidal properties of the essential oil from *Hesperozygis ringens* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Bioresour Technol* 101: 2506–2509.
- Ribeiro VLS, Toigo E, Bordignon SAL, Gonçalves K, Von Poser GL 2007. Acaricidal properties of extracts from the aerial parts of *Hypericum polyanthemum* on the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol* 147: 199–203.
- Roberts JR 1968. Resistance of cattle to the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini 1887). Development of ticks on *Bos Taurus*. *J Parasitol* 54: 663-666.
- Rocha UF 1976. *Panorama da parasitologia na África e na Austrália*. Instituto de Ciências Biomédicas da USP, São Paulo, 35 pp.
- Rocha UF 1984. *Biologia e controle biológico do carrapato Boophilus microplus (Canestrini)*. Boletim Técnico Unesp 3: 1-32.
- Rocha CMBM 1998. *Aspectos relevantes da Biologia do Boophilus microplus* Boletim Técnico UFLA 32: 1-20.
- Roel AR 2001. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. *Rev Inter Desenv Local* 1: 43-50.
- Rosa MS; Paranhos da Costa MJR 2001. Interações entre retireiros e vacas leiteiras no momento da ordenha. Anais 19º Congresso Brasileiro de Etologia, Sociedade Brasileira de Etologia, Juiz de Fora, Minas Gerais, 217 pp.
- Rothenstein AS, Booman KA, Dorsky J, Kohrman KA, Schwoeppe EA, Sedlak RI, Steltenkamp RJ 1983. A survey of consumer patchtest sensitization. *Food Chem Toxicol* 21: 727-733.
- Roulston WJ, Stone BF, Wilson JT, White LI 1968. Chemical control of an organophosphorus- and carbamate- resistant strain of *Boophilus microplus* (Can.) from Queensland. *Bull Entomol Res* 58: 379-392.
- Rousing T, Bonde M, Sorensen JT 2000. Indicators for the assessment of animal welfare in a dairy cattle herd with a cubicle housing system. *EAAP Publication* 102: 37-44.
- Rüdinger B 1998. Clinical research in veterinary homeopathy. *Homit R&D newsletter* 2: 19-22.

Saito ML, Lucchini F 1998. *Substâncias obtidas de plantas e a procura por praguicidas eficientes e seguros ao meio ambiente*, Embrapa, Jaguariúna, 12: 1-43.

Saito ML 2004. *As plantas praguicidas: alternativa para o controle de pragas da agricultura*, Embrapa, Jaguariúna, 4 pp.

Saito KC, Bechara GH, Nunes ET, Oliveira PR, Denardi SE, Mathias MIC 2005. Morphological, histological and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol* 129: 299-311.

Samish M, Alekseev EA, Glazer, I. 2000. Mortality rate of adult ticks due to infection by entomopathogenic nematodes. *J Parasitol* 86, 679–684.

Samish M, Ginsberg H, Glazer I 2004. Biological control of ticks. *Parasitol* 129: S.389-403.

Sant`Anna A, Paranhos da Costa MJR 2010. Avaliação do bem-estar de animais de produção. *Ciênt vet tróp* 13: 29-35.

Santoro GF, Cardoso MG, Guimarães LGL, Mendonça LZ, Soares MJ 2007. *Trypanosoma cruzi*: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Exp Parasitol* 116: 283–290.

Schleger AV, Lincoln DT, Bourne AS 1981. Arteriovenous anastomoses in the dermal vasculature of the skin of *Bos taurus* cattle, and their relationship with resistance to the tick, *Boophilus microplus*. *Aust J Bioi Sci*, 34: 27-35

Schulz V, Hänsel R, Tyler VE 2002. *Fitoterapia Racional. Um guia de fitoterapia para as ciências da saúde*, Manole, Barueri, 386 pp.

Shaw RD 1966. Culture of an organophosphorus resistant strain of *Boophilus microplus* (Can.) and an assessment of its resistance spectrum. *Bull Ent Res* 56: 389-404.

Silva SB, Bittencourt VREP 2006. Avaliação da resposta celular de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) inoculadas com *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Penicillium corylophilum* ou *Fusarium oxysporum*. *Rev Bras Parasitol Vet* 15: 151-152.

Silva NL, Moletta JL, Minho AP, Filippsen LF 2008. Use of biotherapeutic in the control of natural infestation by *Boophilus microplus*: pilot study. *Int J High Dilution Res* 7: 36-38.

Silva WC, Martins JRS, Souza HEM, Heizen H, Cesio MV, Mato, M, Albrecht F, Azevedo JL, Barros NM 2009. Toxicity of *Piper aduncum* L. (Piperales: Piperaceae) from the Amazon forest for the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol* 164: 267–274.

Sing NC, Johnston LAY, Leatch G 1983. The economic of cattle tick control in dry tropical Australia. *Aust Vet J* 60: 37-39.

Smith JE 1997. Iron metabolism and its disorders. In Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, *Clinical biochemistry of domestic animals*, 4 ed., Academic Press, California, 223–240.

Smith BI, Kauffold J, Sherman L 2010. Serum haptoglobin concentrations in dairy cattle with lameness due to claw disorders. *Vet J* 186: 162–165.

Smith DJ, Roberts D 1994. Effects of high volume and/or intense exercise on selected blood chemistry parameters. *Clin Biochem* 27: 435-440.

Sonenshine DE, Taylor D, Corrigan G 1985. Pheromone-impregnated formulations for control of populations of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say) (Acari: Ixodidae). *Exp App Acarol* 1: 23-34.

Sonenshine DE 1985. Pheromones and other semiochemicals of the Acari. *Annu Rev Entomol* 30: 1-28.

Sonenshine DE 1991. *Biology of ticks*. Oxford: Oxford University Press, p. 51-66.

Sonenshine DE 2004. Pheromones and other semiochemicals of ticks and their use in tick control. *Parasitol* 129: S405–S425.

Sousa LAD, Júnior HBP, Soares SF, Ferri PH, Ribas P, Lima EM, Furlong J, Bittencourt VREP, Perinotto WMS, Borges LMF 2011. Potential synergistic effect of *Melia azedarach* fruit extract and *Beauveria bassiana* in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in cattle infestations. *Vet. Parasitol.* 175: 320-324.

Sousa LAD, Soares SF, Pires Júnior HB, Ferri PH, Borges LMF 2008. Avaliação da eficácia de extratos oleosos de frutos verdes e maduros de cinamomo (*Melia azedarach*) sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Rev Bras Parasitol Vet* 17: 36-40.

Sousa LAD 2008. Concentrado emulsionavel de *Melia azedarach* (Meliaceae) no controle de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). Dissertação de mestrado em Sanidade Animal, Universidade Federal do Goiás, Goiânia, 55 pp.

Stafford JL, Wilson EC, Belosevic M 2004. Recombinant transferrin induces nitric oxide response in goldfish and murine macrophages. *Fish Shellfish Immunol* 17: 171-185.

Steel DM, Whitehead AS 1994. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today* 15: 81- 88.

Stutterheim IM, Bezuidnhout, JD, Elloit EGR 1988. Comparative feeding behavior and food preferences of oxpeckers in captivity. *Onderstepoort J Vet Res* 55: 173-179.

Suffredini AF, Fantuzzi G, Badolato R, Oppenheim JJ, O`Grady NP 1999. New insights into the biology of the acute phase response. *J Clin Immunol* 19: 203-214.

Sundrum A, Andersson R, Postler G 1994. Tiergerechtheitsindex – 200: Ein Leitfaden zur Beurteilung von Haltungssystemen für Rinder, Kälber, Legehennen und Schweine, Kollen Bonn, Germany, 211pp.

Szabó MPJ 2008. Imunopatologia da resistência de bovinos ao carrapato *R. (B.) microplus Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In Pereira MC, Labruna MB, Szabó MPJ, Klafke GM *Rhipicephalus (Boophilus) microplus Biologia, Controle e Resistência*, Medvet, São Paulo, p. 107-126.

Szabó MPJ, Labruna MB, Pereira MC, Duarte JMB 2003. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild marsh-deer (*Blastocerus dichotomus*) from Southeast of Brazil: Infestations prior and after habitat loss. *J Med Entomol* 40: 268-274.

Tahori AS 1975. Acaricidas y resistencia de las garrapatas a los acaricidas. Anais Seminário sobre ectoparasitas: ecologia y control de los parasitos externos de importancia economica que afetan el ganado en America Latina, Cali, Colombia, p. 163-175.

Tatchell RJ, Moorhouse DE 1968. The feeding processes of cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). *Parasitol* 58: 441-459.

Taylor MA 2001. Recent developments in ectoparasiticides. *Vet J* 161: 253- 268.

Turolla MSR, Nascimento ES 2006. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Braz J Pharm Sci* 42: 289-306.

Valente RO, Sampaio FC, Souza IA, Higino JS 2009. Estudo toxicológico pré-clínico (agudo) do extrato do *Syzygium aromaticum* (L) em roedores. *Rev Bras Farmacogn* 19: 557-560.

Veríssimo CJ 1988. Utilização de nosódio *Carrapatinum* em bovinos sensíveis ao carrapato *Boophilus microplus* (CANESTRINI). *Pesqui Homeopática* 5: 21-24.

Veríssimo CJ 1993. *Controle do carrapato dos bovinos*. Funep, Jaboticabal 27 pp.

Veríssimo CJ, Lara MAC, Arcaro JRP, Deodato AP, Bechara GH 2004. Associação entre marcadores protéicos e grau de infestação pelo carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) Canestrini, 1887, em bovinos. Anais ZOOTEC, Abz & Upis, Brasília, DF, 1-5.

Vieira PC, Fernandes JB, Andrei CC 2000. Plantas inseticidas In Simões CMO, Sckenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Wentz LA, Petrovick PR *Farmacognosia da planta ao medicamento*, 2 ed., Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p 739-754.

Villares JB 1941. Climatologia zootécnica III Contribuição ao estudo da resistência e susceptibilidade genética dos bovinos ao *Boophilus microplus*. *Bol Ind Anim* 4: 60- 86.

von Keyserlingk MAG, Rushen J, Passillé AM, Weary DM 2009. Invited review: the welfare of dairy cattle – Key concepts and the role of science. *J Dairy Sci* 92: 4101-4111.

Vuaden ER Homeopatia: uma alternativa na suinocultura. [acesso em 2008 abr 15]. Disponível em: http://www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=publicacoes&cod_publicacao=525.

Wagland BM 1975. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos Indicus*) cattle. I Responses of previously unexposed cattle to four infestations with 20.000 larvae. *Aust J Agric Res* 26: 1073–80.

Wagner H, Bladt S, Zgainski EM 1984. *Plant drug analysis*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, 320 pp.

Wall R, Strong L 1987. Environmental consequences of treating cattle with the antiparasitic drug, ivermectin. *Nature* 327: 418-421.

Wharton, RH 1976. Tick- borne livestock diseases and their vectors. Acaricides resistance and alternative methods of tick control. *World Animal Review (FAO)* 20: 8-15.

Wechsler B, Schaub J, Friedli K, Hauser R. 2000. Behaviour and leg injuries in dairy cows kept in cubicle systems with straw bedding or soft lying mats. *Appl Anim Behav Sci* 69:189-197.

Welfare Quality 2009. *Assessment protocol for cattle*. Lelystad, Netherlands, 181 pp.

Wigglesworth VB 1946. The principles of insect physiology. In Quattropani SL, Anderson E 1969. The origin and structure of the secondary coat of the egg of *Drosophila melanogaster* *Z Zellforsch* 95: 495-510.

Wikel, SK 1996. Host immunity to ticks. *Annu Rev Entomol* 41: 1-22.

Wilkinson PR 1955. Observations on infestations of undipped cattle of British breeds with the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). *Aust J Agr Res* 6: 655-665.

Willadsen P 1997. Novel vaccines for ectoparasites. *Vet Parasitol* 71: 209-222.

Willadsen P 2004. Anti- tick vaccines. *Parasitol* 129: S367-387.

Willadsen P, Bird P, Cobon GS, Hungerford J 1995. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitol* 110: S43-50.

Williams LA 1993. Adverse effects of extracts of *Artocarpus altius* Park. and *Azadirachta indica* (A. Juss) on the reproductive physiology of the adult female tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). *Invertebr Reprod Dev* 23: 159-164.

Wood D, Quiroz-Rocha GF 2010. Normal hematology of cattle. In Weiss DJ, Wardrop KJ *Schalm's Veterinary Hematology*, 6 ed., Wiley Blackwell, Philadelphia, p.829-835.

Wurmser L 1957. Influence des doses infinitesimales sur La cinétique des eliminations. *Doc LHF* 39: 80-90.

Zaman MA, Iqbal Z, Abbas RZ, Khan MN, Muhammad G, Younus M, Ahmed S 2012. *In vitro* and *in vivo* acaricidal activity of a herbal extract. *Vet Parasitol* 186: 431-436.

17. ANEXOS

ANEXO 1

Técnica de preparo do bioterápico 30 DH (conforme a Farmacopeia Homeopática Brasileira, 2011)

01. Dividir a quantidade total de lactose a ser utilizada, em 3 partes iguais. Uma terça parte de lactose será colocada em gral de porcelana e triturada para tapar os poros do gral.
02. Sobre este terço de lactose, colocar uma parte do insumo ativo a ser triturado, obedecendo a escala decimal.
03. Homogenizar com espátula de porcelana ou de aço inox.
04. Triturar, vigorosamente, durante 6 minutos.
05. Raspar, com espátula de porcelana ou de aço inox, o triturado aderido ao gral e ao pistilo, durante 4 minutos, homogenizando-o.
06. Triturar, vigorosamente, durante 6 minutos, sem acréscimo de lactose.
07. Raspar o triturado durante 4 minutos.
08. Acrescentar a segunda terça parte de lactose.
09. Triturar, vigorosamente, durante 6 minutos.
10. Raspar o triturado durante 4 minutos.
11. Triturar, vigorosamente, durante 6 minutos, sem acréscimo de lactose.
12. Raspar o triturado durante 4 minutos.
13. Acrescentar o último terço de lactose.
14. Triturar, vigorosamente, durante 6 minutos.
15. Raspar o triturado durante 4 minutos.
16. Triturar, vigorosamente, durante 6 minutos.
17. Raspar o triturado durante 4 minutos.
18. Este triturado será acondicionado em frasco bem fechado e protegido da luz solar direta, recebendo o nome da substância medicinal e a designação de primeiro triturado: 1/10, denominado bioterápico de *R. microplus* 1 DH trit.
19. Para obtenção do segundo triturado, 1/100, usar como insumo ativo 1 parte do primeiro triturado, para 10 partes de lactose (escala decimal) repetindo-se o procedimento anterior (itens 3 a 17).

20. Este triturado será acondicionado em frasco bem fechado e protegido da luz solar direta, recebendo o nome da substância medicinal e a designação de segundo triturado: 1/100, denominado bioterápico de *R. microplus* 2 DH trit.
21. Para obtenção do terceiro triturado, 1/1000, usar como insumo ativo 1 parte do segundo triturado, 10 partes de lactose (escala decimal) repetindo-se o procedimento anterior (itens 3 a 17).
22. Este triturado será acondicionado em frasco bem fechado e protegido da luz solar direta, recebendo o nome da substância medicinal e a designação de terceiro triturado: 1/1000, denominado de bioterápico de *R. microplus* 3 DH trit.
23. No caso de trituração na escala decimal (D ou DH), para obtenção das triturações subseqüentes, repetir o procedimento anterior até a obtenção da 6ª trituração (itens 3 a 17).
24. Para solubilizar a 6ª trituração DH, dissolver 1 parte da trituração em 80 partes de água destilada. Completar com 20 partes de álcool 96% (V/V) e sucussionar 100 vezes, obtendo assim, a 7 DH em solução hidroalcoólica a 20% (p/p). A preparação com este grau de dinamização não será estocada. As demais dinamizações são preparadas em solução aquosa para dispensar e assim sucessivamente até a 30ª potência (30 DH).

ANEXO 2

Técnica de preparo do bioterápico 6 CH (conforme a Farmacopeia Homeopática Brasileira, 2011)

1. Colocar em cada frasco, volume de insumo inerte na proporção indicada, conforme escala centesimal.
3. Acrescentar no 1º frasco 1 parte do ponto de partida (tintura-mãe) em 99 partes do insumo inerte (álcool 70%). Sucussionar 100 vezes. Obtendo-se assim a 1 CH.
4. Transferir para o 2º frasco 1 parte da 1 CH em 99 partes do insumo inerte. Sucussionar 100 vezes. Obtendo-se assim a 2 CH.
5. Transferir para o 3º frasco 1 parte da 2 CH em 99 partes do insumo inerte. Sucussionar 100 vezes. Obtendo-se assim a 3 CH.
6. Proceder de forma idêntica para as preparações subsequentes até atingir a dinamização 6 CH. Na última diluição foi utilizado o álcool 30% para a dispensação.

ANEXO 3

Soluções e reveladores para cromatografia em camada delgada de sílica (CCD)

Reagente Lieberman–Burchard: Adicionaram-se 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado à 10 mL de anidrido acético.

Solução metanólica de cloreto de alumínio hexahidratado a 12% m/v: dissolveram-se 12 g de cloreto de alumínio hexahidratado em balão volumétrico de 100 mL, utilizando metanol para dissolver e completar o volume do balão.

Solução de cloreto férrico a 2% m/v: dissolveram-se 2 g de FeCl_3 em 100 mL de etanol.

Solução de hidróxido de potássio a 5% m/v: dissolveram-se 5 g de KOH em 100 mL de etanol.

Solução de hidróxido de potássio a 10% m/v: dissolveram-se 10 g de KOH em 100 mL de etanol.

Reagente de Dragendorff e solução de nitrito de sódio. Dissolveram-se 1,7 g de nitrato de bismuto (III) e 20 g de ácido tartárico em 80 mL de água (solução A). Posteriormente, dissolveram-se 16 g de iodeto de potássio em 40 mL de água (solução B). Misturaram-se, então, partes iguais das soluções A e B. Para preparo da solução de nitrito de sódio, 5 g de NaNO_2 foram solubilizadas em 100 mL de água. Para revelação das placas primeiramente era borrifado o Reagente de Dragendorff, seguido pela solução de NaNO_2 .

ANEXO 4

Tabela 14- Valores médios obtidos para atividades séricas da fosfatase alcalina (U/L), aspartato aminotransferase (U/L), ureia (mg/dL) e creatinina (mg/dL) em bezerros submetidos ao tratamento tópico com o eugenol a 5% (GIII), Belo Horizonte, 2012.

Tempo após tratamento (dias)	Fosfatase alcalina	Aspartato aminotransferase	Ureia	Creatinina
0	166,8 ± 48,24	75,37 ± 8,55	15,46 ± 4,50	1,45 ± 0,27
2	121,8 ± 51,84	96,35 ± 32,40	10,43 ± 4,08	1,26 ± 0,57
4	140,7 ± 28,48	82,40 ± 9,90	8,30 ± 1,97	1,48 ± 0,22
6	156,1 ± 25,25	78,75 ± 8,76	10,57 ± 7,66	1,63 ± 0,11
9	136,3 ± 55,59	62,82 ± 12,53	7,43 ± 3,65	1,07 ± 0,49
18	211,9 ± 28,41	93,26 ± 9,55	8,72 ± 2,42	1,54 ± 0,19

ANEXO 5

Tabela 15- Valores médios obtidos para a haptoglobina (mg/dL), α 1-glicoproteína ácida (mg/dL) e transferrina (mg/dL) séricas em bezerros submetidos ao tratamento com o bioterápico de *R. microplus* MV 6 CH (GII), Belo Horizonte, 2012.

Tempo após Tratamento (dias)	Haptoglobina	α 1-glicoproteína ácida	Transferrina
-1	5,47 \pm 7,92	2,72 \pm 1,30	210,4 \pm 27,19
0	11,82 \pm 8,70	6,24 \pm 2,37	198,2 \pm 83,09
1	11,47 \pm 7,73	5,35 \pm 2,67	186,0 \pm 60,01
2	11,30 \pm 10,12	2,22 \pm 1,91	204,4 \pm 16,61
5	9,99 \pm 6,73	3,21 \pm 3,65	243,7 \pm 45,46
7	9,10 \pm 7,55	4,49 \pm 2,72	228,7 \pm 29,90
10	9,89 \pm 8,47	1,78 \pm 1,38	205,5 \pm 63,38
15	5,27 \pm 6,14	2,79 \pm 0,74	213,4 \pm 27,76
21	3,58 \pm 2,81	5,62 \pm 4,01	160,6 \pm 23,73
30	8,55 \pm 8,78	2,53 \pm 1,72	142,4 \pm 65,76
39	5,49 \pm 6,27	2,10 \pm 1,81	180,2 \pm 19,61