

Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae): ATIVIDADE *IN VITRO* FRENTE A ECTOPARASITOS DE IMPORTÂNCIA VETERINÁRIA

Lilian Cristina de Sousa Oliveira Batista¹, Cristiane Nunes Coelho², Amanda Ferreira da Silva³, Yara Peluso Cid⁴, Viviane de Sousa Magalhães⁵, Douglas Siqueira de Almeida Chaves⁶ e Katherina Coumendouros⁷⁺

ABSTRACT. Batista L.C.S.O., Coelho C.N., Silva A.F., Cid Y.P., Magalhães V.S., Chaves D.S.A. & Coumendouros K. [***Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae): activity *in vitro* against ectoparasites of veterinary importance.**] *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae): atividade *in vitro* frente a ectoparasitos de importância veterinária. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35(Supl.2):119-125, 2013. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Anexo 1, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Campus Seropédica, Ecologia, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brasil. E-mail: katherinac@gmail.com

The aim of this work was evaluate the activity of *Rosmarinus officinalis* L. against the ectoparasites *Ctenocephalides felis felis*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus microplus*. The *in vitro* assays was realized according Drummond et al. (1973) using engorged females opposite of *R. microplus* and *R. sanguineus*, and impregnation filter paper test for *C. felis felis*. The crude extract of *R. officinalis* was obtained by maceration and their chemical composition was assessed by pharmacognostical analysis. The phytochemical analysis showed the presence of flavonoids, tannins, terpenes and saponins. Dilutions of the crude extract were prepared in several concentrations (range between 78 and 40,000 ppm). The results showed that the crude extract of *R. officinalis* was activity with dose-dependent effect *in vitro* for *C. f. felis* with efficacy of 95%. The efficacy for *R. microplus* was 28.50% and 45.33% for *R. sanguineus*.

KEY WORDS. *In vitro* test, alecrim, ectoparasites, phenolics, pharmacopeia.

RESUMO. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade de *Rosmarinus officinalis* L. frente aos ectoparasitas *Ctenocephalides felis felis*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Rhipicephalus microplus*. Os bioensaios seguiram a técnica impregnação em papel filtro para *C. felis felis* e teste de imersão de

teleóginas para *R. microplus* e *R. sanguineus*. O extrato de *R. officinalis* L. foi obtido por maceração e sua composição química qualitativa avaliada por testes farmacopeicos. Análise fitoquímica preliminar mostrou a presença de flavonoides, taninos condensados, terpenos e saponinas. Para os testes de

*Recebido em 24 de outubro de 2013.

Aceito para publicação em 22 de novembro de 2013.

¹ Médica-veterinária, MSc. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Campus Seropédica, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brasil. E-mail: liliancsoabatista@hotmail.com - bolsista CAPES.

² Zootecnista, MSc. PPGCV, IV, UFRRJ, Campus Seropédica, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: cnunesc@hotmail.com - bolsista CAPES.

³ Curso de Medicina Veterinária, IV, UFRRJ, Campus Seropédica, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: amandafs.vet@hotmail.com - bolsista de Iniciação Científica do PIBIC/CNPq.

⁴ Farmacêutica Industrial, DSc, Departamento de Química (DEQUIM), Instituto de Ciências Exatas (ICE), UFRRJ, Campus Seropédica, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: yaracid@ufrj.br

⁵ Farmacêutica Industrial, MSc., Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária UFRRJ, Campus Seropédica, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: vsmagalhães@gmail.com.br - bolsista CAPES.

⁶ Farmacêutico, PhD, Laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos (LQBion), DEQUIM, ICE, UFRRJ, Campus Seropédica, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: chavesdsa@ufrj.br.

⁷ Médica-veterinária, DSc, Departamento de Parasitologia Animal, IV, Anexo 1, UFRRJ, Campus Seropédica, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. +Autor para correspondência, E-mail: katherinac@gmail.com

inibição foram preparadas diluições do extrato na faixa de concentração entre 78 e 40.000 ppm. Os resultados mostram que o extrato de *R. officinalis* L. apresentou atividade *in vitro* com resposta proporcional a concentração na faixa de 78 a 2.500 ppm para *C. f. felis* com valores de eficácia máximo de 95%. A eficácia carrapaticida apresentou menores valores de eficácia comparada a eficácia pulguicida em todas as concentrações testadas, com valor de eficácia máximo de 45,33 % para *R. sanguineus* e 28,50% para *R. microplus*.

PALAVRAS-CHAVE. Teste *in vitro*, alecrim, ectoparasitas, fenólicos, farmacopeia.

INTRODUÇÃO

Produtos naturais foram amplamente empregados no controle de pragas agrícolas desde meados do século XIX (Braibante & Zappe 2012). Uma das funções das substâncias que compõem estes extratos (metabólitos secundários) é fornecer proteção às plantas ou permitir interações com o ambiente (Schafer & Wink 2009).

O Brasil, com tantas peculiaridades e pluralidade climáticas e geográficas, abriga uma diversidade enorme de plantas (Viegas-Junior 2003) com mais de 56.000 espécies descritas (Giulietti et al. 2005).

A pulga, *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) e o carrapato, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) destacam-se entre os ectoparasitas que acometem cães e gatos, por serem espécies cosmopolitas com capacidade vetorial de uma série de patógenos, não só para os animais mas também para o homem (Dantas-Torres 2008).

O mapeamento do impacto econômico de *Rhipicephalus microplus* Canestrini (1887) no Brasil em 2002 foi calculado em dois bilhões de dólares por ano (Grisi et al. 2002).

Os carrapatos necessitam se alimentar de sangue pelo menos durante uma fase da vida (Fritz 2009) e é justamente por este comportamento é responsável pelas perdas econômicas, irritação intensa e doença de pele nos animais de companhia, além de serem preocupantes pela questão da saúde pública, por transmitirem zoonoses (Taylor 2001). A alimentação é traumática, e espoliativa; podendo inocular de substâncias de alto peso molecular pela saliva; além da depreciação do couro e predisposição a miíases e abscessos (Massard & Fonseca 2004).

As pulgas provocam injúrias pela picada e populações não-controladas de pulgas em cães e gatos

podem provocar prurido intenso, levando a automutilação e anemia (Carlotti & Jacobs 2000).

Atualmente os principais métodos de controle destes ectoparasitos tem se baseado na aplicação de produtos que contém nas suas fórmulas inseticidas/acaricidas tradicionais (Taylor 2001). Para o controle desses vetores a abordagem mais adequada envolve a utilização de várias das ferramentas disponíveis em um programa de manejo integrado.

O alecrim, *Rosmarinus officinalis*, é utilizado como tempero e erva medicinal (Oluwatuyi et al. 2004). Esta espécie apresenta uma química amplamente estudada em que são encontradas mais de 45 substâncias fenólicas, das quais os flavonoides e ácidos fenólicos são os componentes principais (Ozarowski et al. 2013). Antocianinas (Švarc-Gajic et al. 2013) e terpenos como 1,8-cineol (Carvalho Jr et al. 2005). Estes metabólitos são responsáveis pela defesa do vegetal contra microrganismos patogênicos, atuam na sinalização química, são substâncias atrativas para agentes polinizadores, protegem os vegetais contra radiação ultravioleta, além de diversas outras funções (Harborne & Williams 2000).

Em vários países, estudos a partir do uso popular do alecrim têm sido realizados visando a comprovação do potencial terapêutico da espécie. Formulações de unguento com óleo essencial de alecrim são produzidos e utilizados no tratamento de processos inflamatórios e tem ação diurética e carminativa. Atividades inseticida (Porte & Godoy 2001), contra a lagarta-do-repolho *Trichoplusia* e a lagarta da pastagem *Pseudaletia unipuncta*, (Isman et al. 2008) e acaricida contra *R. microplus* (Martinez-Velasquez et al. 2011) também são reconhecidas.

Muitas drogas comerciais surgiram do estudo do efeito de plantas em insetos e fungos, como por exemplo, os piretróides, compostos análogos sintéticos das piretrinas, substância natural extraída das flores de crisântemos. Também podem ser citados os estudos sobre *Azadirachta indica*, conhecido como nim, planta amplamente utilizada como medicinal, cuja molécula azadiractina ainda não pôde ser sintetizada por sua alta complexidade. O extrato de *Capsicum* spp. foi avaliado contra *Boophilus decoloratus* em testes *in vitro* com teleóginas ingurgitadas, tendo demonstrado grande atividade acaricida (Moreira et al. 2010).

Estudos com óleo essencial da espécie *R. officinalis* L., têm sido realizados apresentando atividade acaricida no controle do carrapato bovino *R. microplus* (Martinez-Velasquez et al. 2011) e de

Tetranychus urticae, importante em várias culturas de importância econômica (Miresmailli & Isman 2006, Laborda et al. 2013).

A utilização de produtos alternativos provenientes de plantas apresentam inúmeras vantagens, quando comparados ao emprego de produtos sintéticos pois são obtidos de recursos renováveis e rapidamente degradados, não deixando resíduos no meio ambiente (Martinez-Velazquez et al. 2011).

Na busca por novas substâncias inseticidas e acaricidas objetivou-se neste trabalho avaliar *in vitro* a atividade de *R. officinalis* sobre adultos não alimentados de *C. f. felis* e sobre fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* e *R. microplus*, e realizar um estudo farmacognóstico de conhecimento da composição química.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do material vegetal e obtenção do extrato seco

O material vegetal seco (folhas) foi adquirido de ervanário localizado no município de Volta Redonda, RJ, Brasil. O preparo do extrato etanólico (RO) foi realizado pelo processo de maceração estática, no qual o material vegetal foi submetido a exaustão por nove dias e troca de solvente a cada três dias.

Análise fitoquímica preliminar

Para determinar a presença ou ausência dos metabólitos secundários em *R. officinalis* L. foram realizados ensaios colorimétricos de acordo com a Farmacopeia Brasileira (Brasil 2010) e Costa (1994), além disso, análises de cromatografia em camada delgada seguida de utilização de reveladores químicos como: difenilborato de aminoetanol e solução etanólica com 5% de polietilenoglicol (NP-PEG - revelação de flavonoides) e anisaldeído sulfúrico - revelação de terpenos.

Foram utilizados testes farmacopeicos para análise do teor de saponinas pelo método de índice de espuma; reações de shinoda, cloreto férrico e cloreto de alumínio para identificação de flavonoides; reações de gelatina, cloreto férrico e acetato de chumbo visando identificar taninos; análise com reagente de Dragendorff e Mayer para identificação de alcaloides; e reação de Borntrager para identificação de antraquinonas.

Ensaio biológico com pulgas

Para a realização de teste *in vitro* com adultos não alimentados de *C. f. felis* foi realizado o teste de impregnação em papel filtro e utilizado o extrato (RO) obtidos a partir das folhas de *R. officinalis*. Foi preparada uma solução-mãe à 200 mg/mL e a partir desta, foram realizadas 10 diluições seriadas 1:2 iniciando na concentração de 40.000 ppm. Estes foram diluídos em acetona, um solvente inócuo capaz de solubilizar o extrato o qual serviu de controle negativo.

Para cada concentração, foram realizadas duas repetições cada uma composta por uma tira de papel filtro com 10 cm² (1 cm de largura e 10 cm de comprimento), totalizando 20 tiras e mais duas tiras referentes ao controle. Cada tira foi impregnada com 0,2 mL da respectiva diluição. Após o tratamento a amostra foi seca no ambiente por 30 minutos. Em cada desa-

fio, as tiras foram alocadas em tubos de ensaio contendo 10 adultos não alimentados de *C. f. felis*, cinco machos e cinco fêmeas. As pulgas são provenientes de uma colônia mantida desde 1998, nas mesmas dependências onde foram realizados os testes. Os tubos foram vedados com tecido não tecido (TNT) e elástico, devidamente identificados com o grupo e mantidos em câmara climatizada com temperatura de 28±1°C e umidade relativa de 75±10%.

A média de pulgas vivas por concentração foi avaliada nos períodos de 10 e 30 minutos, 1, 2, 24 e 48 horas com auxílio de um microscópio estereoscópico.

O critério de avaliação utilizado foi a motilidade, qualquer inseto que apresentasse um mínimo de movimento era considerado vivo.

A avaliação da eficácia *in vitro* de cada concentração dos extratos seguiu a fórmula desenvolvida por Abbott (1987): (número médio de pulgas vivas do grupo controle - número médio de pulgas vivas do grupo tratado) / (número médio de pulgas vivas do grupo controle) x 100.

Para o cálculo da DL utilizou-se o programa Minitab® versão 16 (2013, Minitab Inc., Leadtools, Lead Technologies, Inc.) levando em consideração a relação de sobrevivência e utilizando o método de probits.

Ensaio biológico com carrapatos

No teste de imersão de teleóginas (Drummond et al. 1973) utilizou-se uma solução-mãe do extrato à 200 mg/mL em 10 diluições seriadas 1:2 iniciando na concentração de 40.000 ppm diluídos em água. O controle negativo foi feito somente com água destilada. Foram utilizados exemplares de *R. microplus* e *R. sanguineus* mantidos em colônia laboratorial em bezerros e coelhos respectivamente. Cada grupo de teleóginas (n=6) foi submetido à imersão, por cinco minutos, em 10 mL do extrato diluído na concentração a ser testada em duas repetições. Os grupos controles de teleóginas foram imersos em água destilada. Após a imersão o excesso do extrato diluído foi retirado com o auxílio de papel toalha. As teleóginas foram acondicionadas em placa de petri descartável, identificada com data, dia experimental, grupo, peso e número de repetições e fixadas em fita dupla face. O material foi incubado em câmara climatizada com demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.), a 27 ± 0,5°C de temperatura, umidade relativa do ar de 75 ± 10% por 21 dias. Após este período as posturas das teleóginas de cada placa foram pesadas e transferidas para seringas fechadas com algodão. As seringas devidamente identificadas retornaram à estufa, nas mesmas condições de umidade e temperatura anteriores até a eclosão das larvas. A eclodibilidade dos ovos foi avaliada por estimativa de porcentagem em relação àqueles que não eclodiram.

A leitura de postura foi feita 21 dias após o tratamento e a eclodibilidade foi avaliada após 42 dias. A eficácia do extrato foi avaliada através da comparação do índice de eficiência reprodutiva IER= peso dos ovos/peso das fêmeas x 20000 x % eclodibilidade e a Eficácia EC = (IER controle - IER tratamento)/IER controle x 100.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados da análise fitoquímica preliminar, realizada com folhas de *R. officinalis* mostraram a

presença de taninos condensados: reação de gelatina positiva (precipitação), reação do cloreto férrico, positiva (coloração verde) e reação de acetato de chumbo negativa; saponinas com formação de espuma persistente com por mais de 15 minutos e flavonoides: reação de Shinoda positiva (coloração vermelha), reação de cloreto férrico positiva (coloração verde) e reação cloreto de alumínio positiva (fluorescência amarelo-esverdeada), caracterizando a classe, a flavonol (Tabela 1).

As plantas medicinais sintetizam diversos metabólitos secundários (saponinas, antraquinonas, alcaloides, taninos, flavonoides, terpenos, entre outros) (Saúde-Guimarães et al. 2007, Barbosa-Filho et al. 2007, 2008). Sabe-se que estes metabólitos podem sofrer variações na produção devido a diversos fatores como: tipo de cultivo, nível de pluviosidade e insolação, tipo de solo, e diversos outros fatores que dependem das características climáticas-edáficas. Entretanto, devido a rota biossintética de formação dos metabólitos secundários, estas substâncias podem estar presentes em determinadas espécies vegetais, servindo de parâmetro quimiosistemático para sua caracterização e identificação (Hubinger et al. 2009).

A análise fitoquímica preliminar indicou, de forma qualitativa, a presença em grande escala de substâncias fenólicas como flavonoides e taninos condensados. Outros metabólitos com saponinas e terpenos menores também estão presentes nas espécies estudada, no entanto, sua presença não foi tão abundante quanto as substâncias fenólicas. De acordo com as análises colorimétricas realizados observamos que não houve resultado positivo para a presença de alcaloides, o que era de se esperar uma vez que o processo extrativo (maceração em etanol) não favorece o isolamento deste tipo de metabólito secundário que apresenta em sua estrutura química um nitrogênio, e confere assim, uma característica básica à classe. Antraquinonas também não foram identificadas na espécie, sugerindo assim, que estas não fazem este tipo de metabólito, pois até o momento, não são encontradas na espécie.

Os ensaios biológicos em *C. f. felis* em diferentes concentrações de *R. officinalis* demonstraram níveis de atividade capazes de matar 95% das pulgas na concentração de 2.500 ppm após 48 horas do tratamento (Tabela 2). Todas as outras concentrações, maiores e menores tiveram resultados inferiores, mesmo a concentração de 5.000 ppm apresentou 85% de eficácia, resultado inferior ao esperado,

Tabela 1. Metabólitos secundários encontrados em *Rosmarinus officinalis* L. por ensaios colorimétricos de acordo com a Farmacopeia Brasileira (Brasil 2010) e Costa (1994).

Metabólitos Secundários de <i>Rosmarinus officinalis</i>					
Flavonoides	Taninos	Alcaloides	Terpenos	Saponinas	Antraquinonas
+++	+++	-	+	+	-

+ Encontrados em baixa concentração; +++ encontrados em altas concentrações; - Ausentes na espécie estudada.

Tabela 2. Atividade *in vitro* de *Rosmarinus officinalis* testado em diferentes concentrações (78 - 40000 ppm) sobre adultos não alimentados de *Ctenocephalides felis felis*.

Concentrações (ppm)	Média de pulgas vivas nas repetições 1 e 2						Eficácia com 24h (%) 48h (%)	
	10 min		30min		1h		24h	48h
	10 min	30min	1h	2h	24h	48h		
40.000	10	10	10	10	10	7,5	0	25
20.000	10	10	10	10	8,5	5	15	50
10.000	10	10	10	10	7,5	3,5	25	65
5.000	10	10	10	10	6,5	1,5	35	85
2.500	10	10	10	10	5,5	0,5	45	95
1.250	10	10	10	10	8	5,5	20	45
625	10	10	10	10	9	6	10	40
312	10	10	10	10	9,5	7,5	5	25
156	10	10	10	10	9,5	7,5	5	25
78	10	10	10	10	10	8	0	20
Controle	10	10	10	10	10	10		

mortalidade diretamente proporcional à concentração. Os resultados das contagens de 24 e 48 horas para todas as concentrações evidenciaram um aumento de até quatro vezes de um dia para o outro, sendo que em 2.500 ppm a leitura de 48 horas apresentou mais que o dobro da eficácia de 24 horas. A menor diluição, 40.000 ppm apresentou resultados idênticos aos de 625 e 156 ppm.

A partir dos valores de mortalidade de *C. f. felis* utilizando o extrato em dez concentrações foi possível calcular a $DL_{50} = 1589,2$ ppm.

Os resultados esperados de eficácia diretamente proporcional a dose ou concentração do fármaco está relacionado a biodisponibilidade com que o princípio ativo seja absorvido pelo parasito. Alguns fatores influenciam nessa absorção, como a solubilidade e inversamente a saturação de concentrações crescentes, como ocorreu nesse estudo com *C. f. felis*.

A avaliação da atividade de *R. officinalis* sobre os fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* e *R. microplus*, carrapatos de cães e bovinos respectivamente, em concentrações de 78 a 40.000 ppm demonstraram que o peso médio das posturas se apresentou de forma constante para todos os grupos testados sendo as médias dos grupos de *R. sanguineus* e *R. microplus* tratados menores que dos grupos controles.

Os dados da avaliação da eficiência reprodutiva

dos grupos tratados de *R. sanguineus* e *R. microplus*, nas mesmas concentrações de *R. officinalis*, evidenciou uma discreta diferença de atividade para as duas espécies de carrapato. O percentual de eficácia para *R. sanguineus* foi superior as encontrados em *R. microplus*. Os resultados com maiores percentuais de eficácia encontrados para *R. sanguineus* foram 45,33% a 10.000 ppm e apenas 28,5% a 1.250 ppm para *R. microplus*.

Não foram observados mortalidade das teleóginas, diminuição da oviposição e da eclodibilidade, os três mecanismos de atividade dos extratos vegetais sobre os carrapatos. Os dados obtidos demonstram a baixa atividade do extrato de alecrim nas concentrações testadas (Tabelas 3 e 4).

A Figura 1 mostra os resultados de eficácia do extrato de alecrim frente as três espécies avaliadas. Pode-se observar que o extrato apresentou eficácia pulguicida com resposta linear com o aumento da

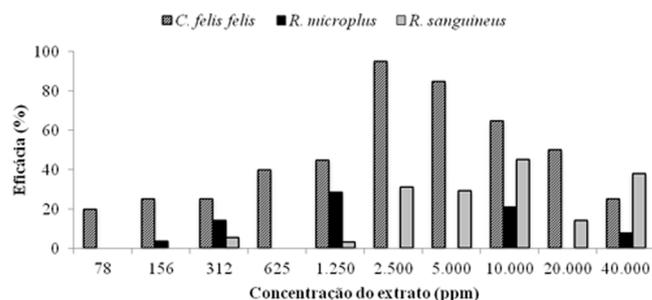


Figura 1. Eficácia *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis* na faixa de concentração de 78 a 40000 ppm frente a *Ctenocephalides felis felis*, *Rhipicephalus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus*.

concentração na faixa de 78 a 2.500 ppm. A eficácia carrapaticida apresentou menores valores de eficácia comparada a eficácia pulguicida em todas as concentrações testadas. Não foi possível determinar uma relação linear com o aumento da concentração da atividade carrapaticida do extrato para as duas espécies de carrapato avaliadas.

Na literatura não existem trabalhos com extrato etanólico de alecrim frente aos ectoparasitos testados neste trabalho, no entanto alguns estudos com espécies vegetais da família Lamiaceae são encontrados (Rasikari et al. 2005, Ravindran et al. 2011a, 2011b). Em estudo de espécies da família Lamiaceae, Ravindran et al. (2011a) demonstraram que o extrato etanólico das folhas de *Leucas aspera* apresentou atividade *in vitro* frente a *Rhipicephalus annulatus* na faixa de concentração de 1560 a 100.000 ppm. Em nosso estudo observamos que o extrato etanólico de alecrim foi muito mais ativo do que o extrato da espécie *L. aspera*, uma vez que apresentou uma DL₅₀ de 1589,2 ppm. Apesar desta atividade frente ao gênero *Rhipicephalus*, não podemos fazer uma relação direta com a química da espécie, pois os autores (Ravidran et al. 2011a) não apresentam a composição química da planta, nem o valor de DL₅₀, como apresentamos neste manuscrito.

Os resultados encontrados indicam que o extrato de alecrim possui em sua composição constituintes com potencial ação pulguicida. Apesar deste ser o primeiro relato para atividade do extrato etanólico de alecrim frente aos modelos biológicos testados, estudos de isolamento e identificação dos constituintes químicos estão em andamento, visando identificar o componente responsável pela atividade relatada.

CONCLUSÃO

O extrato de *R. officinalis* apresentou alta atividade *in vitro* frente a *C. f. felis* e baixa atividade

Tabela 3. Atividade *in vitro* de *Rosmarinus officinalis* testado em diferentes concentrações (78 - 40000 ppm) sobre fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*.

Concentração (ppm)	Média peso teleóginas (g) ¹	Média peso postura teleóginas (g) ²	Média eclosões (%)	Eficiência reprodutiva (%)	Eficácia (%)
40.000	0,116	0,043	100	744252,87	38,17
20.000	0,122	0,063	100	1034199,73	14,09
10.000	0,104	0,034	100	658146,96	45,33
5.000	0,129	0,055	100	851804,12	29,24
2.500	0,125	0,052	100	828877,00	31,14
1.250	0,123	0,071	100	1162474,51	3,43
625	0,122	0,076	100	1243353,78	0
312	0,105	0,060	100	1138314,78	5,44
156	0,126	0,077	100	1225763,61	0
78	0,102	0,062	100	1210784,31	0
Controle	0,124	0,075	100	1203765,97	

¹Média do peso das 12 teleóginas; ² Média das posturas oriundas das 12 teleóginas.

Tabela 4. Atividade *in vitro* de *Rosmarinus officinalis* testado em diferentes concentrações (78 - 40000 ppm) sobre fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*.

Concentração (ppm)	Média peso teleóginas (g) ¹	Média peso postura teleóginas (g) ²	Média eclosões (%)	Eficiência reprodutiva (%)	Eficácia (%)
40.000	0,121	0,032	100	533149,17	7,84
20.000	0,123	0,042	100	677943,17	0
10.000	0,111	0,025	100	457142,86	20,98
5.000	0,119	0,035	100	582865,17	0
2.500	0,134	0,042	100	624378,11	0
1.250	0,127	0,026	100	413657,26	28,50
625	0,135	0,045	100	664607,78	0
312	0,115	0,028	100	496360,99	14,20
156	0,121	0,034	100	556857,34	3,74
78	0,140	0,048	100	688915,38	0
Controle	0,114	0,033	100	578524,47	

¹Média do peso das 12 teleóginas; ² Média das posturas oriundas das 12 teleóginas.

frente aos carrapatos *R. microplus* e *R. sanguineus*, entretanto, torna-se importante dar continuidade ao estudo bioguiado, e processo de purificação deste extrato visando identificar a(s) molécula(s) ativa(s) nos modelos testados até o momento. Sabe-se que efeitos sinérgicos entre substâncias químicas podem aumentar ou diminuir a atividade de tais substâncias.

Estes estudos de purificação bioguiado, isolamento e testes de sinergismo encontram-se em andamento nos laboratórios envolvidos neste trabalho visando identificar as substâncias responsáveis pela atividade encontrada até o momento.

Sem dúvida a política do uso de produtos naturais deve ser incentivada, no entanto, os produtos finais, os quais serão aplicados nos animais e pastagens, devem ser eficazes e seguros. Desta forma, pontos importantes devem ser considerados como a avaliação da toxidez ao animal, ao ser humano e ao meio ambiente de forma que possam ser empregados no controle de ectoparasitas de importância veterinária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 3:302-303, 1987.
- Barbosa-Filho J.M., Alencar A.A., Nunes X.P., Tomaz A.C.A., Sena Filho J.G., Athayde-Filho P.F., Silva M.S., Souza M.F.V. & da-Cunha E.V.L. Sources of alpha-, beta-, gamma-, delta- and epsilon-carotenes: A twentieth century review. *Rev. Bras. Farmacogn.* 18:135-154, 2008.
- Barbosa-Filho J.M., Nascimento-Júnior F.A., Tomaz A.C.A., Athayde-Filho P.F., Silva M.S., Cunha E.V.L., Souza M.F.V., Batista L.M. & Diniz M.F.F.M. Natural products with antileprotic activity. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 17:41-148, 2007.
- Braibante M.E.F. & Zappe J.A. A Química dos Agrotóxicos. *QNEsc.*, 34: 0-15, 2012.
- Brasil. Farmacopeia Brasileira, 5ª Edição, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 546p., 1v/il.
- Carlotti D.N. & Jacobs D.E. Therapy, control and prevention of flea allergy dermatitis in dogs and cats. *Vet. Dermatol.*, 11:83-98, 2000.
- Carvalho Jr R.N., Moura L.S., Rosa P.T.V. & Meireles M.A.A. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. *J. Supercrit. Fluids*, 35:197-204, 2005.
- Costa A.F. *Farmacognosia* III vol. 5ª ed. Oficina A. Coelho Dias S.A, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, Portugal, 1994. 544p.
- Dantas-Torres F. The brown dog tick, *R. sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. *Vet. Parasitol.*, 152:173-185, 2008.
- Drummond R.O., Ernst S.E., Trevino J.L., Gladney W.J. & Graham O.H. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: Laboratory tests of insecticides. *J. Econ. Entomol.*, 66:130-133, 1973.
- Fritz C.L. Emerging Tick-borne Diseases. *Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.*, 39:265-278, 2009.
- Giulietti A.M., Harley R.M., Queiroz L.P., Wanderley M.G.L. & Vandenberg C. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. *Rev. Megadiversidade*, 1:52-61, 2005.
- Grisi L., Massard C.L., Moya Borja G.E. & Pereira J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora Vet.* 21:8-10, 2002.
- Harborne J.B. & Williams C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55:481-504, 2000.
- Hubinger S.Z., Salgado H.R.N. & Moreira R.D. Controles físico, físico-químico, químico e microbiológico dos frutos de *Dimorphandra mollis* Benth., Fabaceae. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 19:690-696, 2009.
- Isman M.B., Wilson J.A. & Bradbury R. Insecticidal Activities of Commercial Rosemary Oils (*Rosmarinus officinalis*) Against Larvae of *Pseudaletia unipuncta* and *Trichoplusia ni* in Relation to Their Chemical Compositions. *Pharm. Biol.*, 46:82-87, 2008.
- Laborda R., Manzano I., Gamón M., Gavidia I., Pérez-Bermúdez P. & Boluda R. Effects of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* essential oils on *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Ind. Crop. Prod.* 48:106-110, 2013.
- Martinez-Velazquez M., Flores-Fernandez J.M., Rosario-Cruz R., Alvarez A.H., Castillo-Herrera G. & Lugo-Cervantes E. 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, 2011.
- Massard C.L. & Fonseca A.H. Carrapatos e doenças transmitidas comuns ao homem e aos animais. *Hora Vet.*, 135:15-23, 2004.
- Miresmailli S. & Isman M.B. Efficacy and persistence of Rosemary oil as an Acaricide Against *Twospotted Spider Mite* (Acari: Tetranychidae) on Greenhouse Tomato. *J. Econ. Entomol.*, 99:2015-2023, 2006.
- Moreira T.M.S., Salgado H.R.N. & Pietro R.C.L.R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 20:435-440, 2010.
- Oluwatuyi M., Kaatz G.W. & Gibbons S. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. *Phytochemistry*, 65:3249-3254, 2004
- Ozarowski M., Mikolajczak P.L., Bogacz A., Gryszczynska A., Kujawska M., Jodynys-Liebert J., Piasecka A., Napieczynska H., Szulc M., Kujawski R., Bartkowiak-Wieczorek J., Cichocka J., Bobkiewicz-Kozłowska T., Czerny B. & Mrozkiewicz P.M. *Rosmarinus officinalis* L. leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat brain. *Fitoterapia*, 91:261-271, 2013.
- Porte A. & Godoy R.L.O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. *Boletim CEPPA.*, 19:193-210, 2001.
- Rasikari H.L., Leach D.N., Waterman P.G., Spooner-Hart

- R.N., Basta A.H., Banbury L.K. & Forster P.I. Acaricidal and Cytotoxic Activities of Extracts from Selected Genera of Australian Lamiaceae. *J. Econ. Entomol.*, 98:1259-1266, 2005.
- Ravindran R., Juliet S., Kumar K.G.A., Sunil A.R., Nair S.N., Amithamol K.K., Rawatd A.K.S. & Gosh S. Ecllosion blocking effect of ethanolic extract of *Leucas áspira* (Lamiaceae) on *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. *Vet. Parasitol.*, 179:287-290, 2011a.
- Ravindran R., Juliet S., Kumar K.G.A., Sunil A.R., Nair S.N., Amithamol K.K., Rawatd A.K.S. & Gosh S. Toxic effects of various solvents against *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. *Ticks Tick Borne Dis.*, 2:160-162, 2011b.
- Santos P.L., Prando M.B., Morando R., Pereira G.V.N. & Kronka A.Z. Utilização de extratos vegetais em proteção de plantas. *Enciclop. Biosf.*, 9:2562- 2576, 2013.
- Saúde-Guimarães D.A. & Faria A.R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 17:455-465, 2007.
- Schafer H., Wink M. Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: progress in alkaloid biosynthesis. *Biotechnol. J.*, 4:684-1703, 2009.
- Švarc-Gajic J., Stojanovic Z., Carretero A.S., Román D.A., Borrás I. & Vasiljevic I. Development of a microwave-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis*. *J. Food Eng.*, 119:525-532, 2013.
- Taylor M.A. Recent developments in ectoparasiticides. *Vet. J.*, 161:253-268, 2001.
- Viegas-Júnior C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quím. Nova*, 26:390-400, 2003.