

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**STEFÂNIA GARCIA ZENKER**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TOXICOLÓGICO DA QUERCETINA EM  
TELEÓGINAS DE *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS***

**São Gabriel**

**2015**

**STEFÂNIA GARCIA ZENKER**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TOXICOLÓGICO DA QUERCETINA EM  
TELEÓGINAS DE *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS***

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Biotecnologia,  
Universidade Federal do Pampa –  
UNIPAMPA, Campus São Gabriel, como  
requisito necessário à obtenção do grau de  
Bacharel em Biotecnologia,

Orientador: Luís Fabiano Santos da Costa

**São Gabriel**

**2015**

STEFÂNIA GARCIA ZENKER


**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TOXICOLÓGICO DA QUERCETINA EM  
TELEÓGINAS DE *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS***

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Biotecnologia,  
Universidade Federal do Pampa –  
UNIPAMPA, Campus São Gabriel, como  
requisito necessário à obtenção do grau de  
Bacharel em Biotecnologia,

Orientador: Luis Fabiano Santos da Costa


Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 08 de Dezembro de 2015.

Banca examinadora:



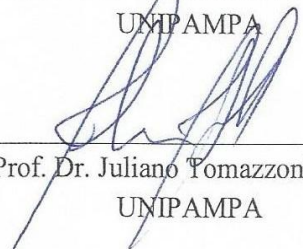
---

Prof. Dr. Luis Fabiano Santos da Costa  
Orientador  
UNIPAMPA



---

Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo  
UNIPAMPA



---

Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo  
UNIPAMPA

## AGRADECIMENTO

Ao meu orientador Prof. Dr. Luís Fabiano Santos da Costa, pela orientação, pela paciência, pela disposição. Pela confiança, por ter me apoiado e contribuído com meu aprendizado. Obrigada!

A todos os professores, pelo aprendizado, por sempre estarem dispostos a sanar dúvidas e sempre incentivar a buscar mais conhecimentos e nunca desistir.

Agradeço a toda minha família, pela oportunidade concedida, por todo apoio quando foi mais necessário. Pelo carinho, suporte e todo amor transmitido. Nas horas do desespero, obrigada por serem meu porto seguro, obrigada por acreditarem que eu seria capaz, sem vocês eu não seria nada!

Agradeço também a família Angst Rohden por me proporcionar a viagem que acarretou o ingresso no curso. Pelas inúmeras vezes que pensei em desistir e vocês, com todo amor e calma possível me incentivavam a seguir em frente. Obrigada!

Com muito carinho, agradeço ao meu pai Cilon, pela confiança, disposição, alegria transmitida, pelas horas em ligações que tranquilizavam e davam força para seguir em frente. Por me ensinar que somos capazes de tudo e me mostrar que sempre estará ao meu lado, pelos ensinamentos, pelas qualidades transmitidas. Muito obrigada pai!

Com todo amor, carinho e admiração agradeço a minha mãe Noemi, por ser meu porto seguro, minha guerreira, minha batalhadora e fazer disto, um dos motivos para eu seguir em frente diante dos vários obstáculos encontrados. Por estar sempre do meu lado, me apoiar nas decisões, pelas conversas, por fazer o impossível para que sempre estivesse bem, pelas horas no telefone me auxiliando, por ser esta pessoa maravilhosa, por tudo já realizado em prol do meu melhor. Eu não seria ninguém se não estivesse você ao meu lado! Eu te amo infinitamente, obrigada por tudo! Mães deveriam ser pra sempre.

Aos meus avós Aracy e João Lory (*in memorian*), Conceição e Alfredo (*in memorian*) por todo afeto, amor, carinho, preocupação, conversas, experiências, conselhos e paciência. Em especial ao meu herói João Lory, por todos os ensinamentos, por todo apoio desde a

infância e por ser minha fonte inspiradora mesmo lá de cima, sigo seus passos e tudo que me foi transmitido aqui na terra.

As minhas amigas de longe Jéssica Ribeiro, Natália Angst, Jeissiquele Conter, obrigada pelo apoio, pelo carinho, pelo amor, pelos momentos que a fraqueza tentava dominar e vocês me apoiavam para seguir sempre. Obrigada!

Aos meus amigos, Alex Freitas, Luiz Fernando Duarte e José Victor Braga, por todo apoio, pelas horas de conversas, pelos conselhos, pelas risadas, obrigado por estarem comigo nesta etapa. Amo muito vocês!

As minhas amigas, Mariele Gomes, Mirelle Manfron, Jéssika Nunes, à turma Biotecnologia 16 e todas as outras amizades que fiz e cultivei durante este trajeto, obrigada a vocês que me ajudaram, me escutaram, que me incentivaram, proporcionaram momentos de alegria, vivências que jamais esquecerei. Muito obrigada, eu amo vocês!

Em especial, a Jessica Tapia, pelo apoio, pelas horas não dormidas me auxiliando, pelo carinho, pelo amor, por me aturar, me aguentar, pelas risadas, pelos mates, pela dedicação e preocupação quando eu mais precisei! Eu Te Amo muito e Obrigada!

A Giane Borges, Matheus Dias, e a todos colegas de laboratório que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada aos mais próximos pelas festas também, pelas socializações, pelas experiências, pelos risos, pelas danças, e pelo companheirismo. Obrigada também aos amigos mais recentes que realizei vocês serão eternos pra mim.

Enfim à todos que de uma forma direta ou indireta contribuíram para esta conquista. Meu muito obrigada!

Dedico esta monografia aos meus amados pais,  
Cilon e Noemi, maiores incentivadores e fontes  
inesgotáveis de amor, carinho e compreensão.

Ao meu avô, João Lory, esta conquista é tua.

Saudade eterna!

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.” (Charles Chaplin).

## RESUMO

A pecuária bovina no Brasil apresenta fragilidades devido a vários fatores que causam prejuízos na produtividade do rebanho. Entre os agentes que causam danos à produção em bovinos encontra-se o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, mais conhecido como carrapato, que entre os mais variados prejuízos causados por esse ácaro são evidentes a alteração na produção de leite, alterações no couro, transmissão de doenças e alterações na carne. O controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* baseia-se na aplicação de acaricidas em sua maioria de forma errônea. Com isso, o aparecimento de resistência aos diversos princípios ativos utilizados comercialmente tem sido acelerado. Métodos alternativos usando fitoterápicos e controle biológico com fungos tem sido propostos na tentativa de controle. Existem flavonoides naturais com interesse científico e terapêutico que estão sendo estudados destacando o potencial antioxidante e antimutagênico. A quercetina, flavonoide encontrado em vegetais, como maçã, chás e em plantas medicinais, apresenta propriedades farmacológicas, antioxidantes e antimutagências. Em contrapartida, há estudos referentes à substância quercetina presente em *Araucaria angustifolia* realizados em baratas da espécie *Phoetalia pallida* demonstrando que o seu extrato é um inseticida natural constatado através do bloqueio neuromuscular irreversível no animal. Essa toxicidade pode estar relacionada à presença de quercetina no seu extrato. Com isso, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial toxicológico da quercetina em teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Para tanto, foram utilizados um total de 440 teleóginas ingurgitadas coletadas manualmente de animais parasitados, transportados e armazenados em refrigeração (em torno de 15 horas) até o momento do manuseio. Foram utilizadas as concentrações de 0,1µg/ml, 1µg/ml, 2µg/ml de quercetina e o grupo controle (0,0 µg/ml), todos em DMSO 20%. Foram feitas soluções com álcool etílico nas concentrações de 10%, 50%, absoluto e o grupo controle, todos em água destilada. Em seguida, os grupos contendo 20 carrapatos para cada concentração foram submetidos a embebição por 10 (dez) minutos nas soluções de quercetina e mantidos em placas de petri revestidas com papel filtro. Foram utilizados 50 carrapatos para cada concentração de álcool etílico e também submetidos a embebição. Os carrapatos foram mantidos em temperatura ambiente e avaliados diariamente quanto a sua viabilidade e mortalidade durante 7 (sete) dias. Os testes foram feitos em triplicata e as análises estatísticas realizadas através do teste de ANOVA. Foi possível observar que em concentrações de 2µg/ml de quercetina a média da mortalidade foi de 5% e em concentrações de 1µg/ml a média de percentagem de mortalidade foi de 10%. Já a concentração de 0,1µg/ml apresentou



média de percentagem alta de morte, aproximadamente 42%. O grupo controle (0,0 µg/ml) teve percentagem de morte avaliada em 35%. Os resultados em relação ao álcool etílico nos apresentaram taxa de mortalidade 30%, já em 50% e se equiparando ao grupo controle obteve-se 4% de mortalidade. Nas demais concentrações não houve taxas de mortalidade significativas no período de 7 dias de análise. A postura de ovos não foi influenciada com o uso da quercetina. Os resultados mostram que a quercetina em concentrações de 2µg/ml e 1µg/ml acabaram prevenindo a morte dos carrapatos.

**Palavras-chave:** Flavonoide. Carrapatos. Controle biológico. Pecuária. Toxicidade.

## ABSTRACT

The cattle raising in Brazil has weaknesses due to several factors that cause losses in the herd productivity. Among the agents that cause damage to production in cattle is *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, known as tick, that among the various damages caused by mites are apparent change in milk production, changes in the leather transmission disease and changes in meat. The control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is based on acaricides application mostly erroneously. Thus, the emergence of resistance to many active principles used commercially has been accelerated. Alternative methods using herbal medicines and biological control with fungi has been proposed in an attempt to control. There are natural flavonoids with scientific and therapeutic interest being studied highlighting the antioxidant and antimutagenic potential. Quercetin, flavonoid found in vegetables such as apples, teas and medicinal plants, has pharmacological properties, antioxidants and antimutagens. In contrast, studies related to quercetin substance present in *Araucaria angustifolia* carried out in kind of cheap *Phoetalia pallida* demonstrating that its extract is a natural insecticide found through irreversible neuromuscular blockade in the animal. This toxicity may be related to the presence of quercetin on your statement. Thus, the main objective of this study was to evaluate the toxicological potential of quercetin in engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. For this, we used a total of 440 engorged females manually collected from infected animals, transported and stored in refrigeration (around 15 hours) until the time of handling. Concentrations were used in 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml quercetin and the control group (0,0 µg/ml), all in 20% DMSO. Solutions were made with ethyl alcohol in concentrations of 10%, 50%, and absolute control group, all in distilled water. Then, the groups of 20 ticks per concentration were submitted to soaking for ten (10) minutes in the solutions quercetin and kept in petri dishes lined with filter paper. 50 ticks were used for each concentration of ethyl alcohol and also subjected to soaking. The ticks were kept at room temperature and evaluated daily for their viability and mortality for 7 (seven) days. The tests were done in triplicate and the statistical analysis performed by ANOVA test. It was observed that at concentrations of 2 µg/ml quercetin average mortality was 5% and concentrations of 1µg/ml the average percentage mortality was 10%. Since the concentration of 0,1µg/ml averaged high percentage of death, approximately 42%. The control group (0,0 µg/ml) was assessed percentage of death by 35%. The results with respect to ethyl alcohol in had a mortality rate 30%, as 50% and equating to the control group was obtained 4% mortality. In

other concentrations no significant mortality rates within 7 days of analysis. The egg-laying was not influenced by the use of quercetin. The results show that the quercetin in concentrations of 2 µg/ml and 1µg/ml eventually preventing the death of ticks.

Keywords: Flavonoid. Ticks. Biological control. Livestock. Toxicity.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Imagem de uma teleógina de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.....16
- Figura 2** - Ciclo do carrapato.....17
- Figura 3** - Estrutura da molécula de quercetina.....20
- Figura 4** - Taxas de sobrevivência de carrapatos em porcentagem com o uso da Quercetina após o término das avaliações. Ao longo dos dias, as concentrações de 2µg/ml e 1µg/ml se mantiveram estabilizadas em relação com as concentrações de 0,1µg/ml e o controle.....25
- Figura 5** - Dados da mortalidade em porcentagens utilizando o teste de ANOVA. Pode-se observar que em concentrações menores grupo controle e 0,1µg/ml as taxas de mortalidade foram maiores ao final de sete dias de avaliação.....26
- Figura 6** - Taxa de sobrevivência de teleóginas submetidas a diferentes concentrações de Álcool Etílico ao longo de 7(sete) dias de avaliação. Em concentrações onde o álcool etílico se apresentava em concentração absoluto a viabilidade foi mais baixa em relação às demais concentrações.....28

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

**AAME** – Extrato Metanólico de *Araucaria Angustifolia*

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**M** – Molar

**mL** – Mililitro

**µl** – Microlitro

**µM** – Micromolar

**µg** – Micrograma

**µg/mL** – Micrograma por mililitro

**%** – Porcentagem

**°C** – Graus Celsius

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	22
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	23
	3.1    Objetivos Gerais.....	23
	3.2    Objetivos Específicos.....	23
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	24
	4.1    Coleta de amostras.....	24
	4.2    Preparação das soluções.....	24
	4.3    Cultivo.....	24
	4.4    Avaliação.....	24
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	25
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS</b> .....	30
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	31

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o segundo maior rebanho de bovinos do mundo, totalizando ao final de 2015 cerca de 212,3 milhões de cabeças permanecendo atrás apenas da Índia (PORTAL BRASIL, 2015). Algumas dezenas de segmentos industriais são sustentadas pelo agronegócio de carne bovina, gerando 10 milhões de toneladas de alimentos, 20 milhões de empregos e injetando U\$ 5,1 bilhões na economia por meio das exportações. Sendo que com a inclusão do comércio do couro, as exportações chegaram a U\$ 9,2 bilhões em 2009 (ROSA, 2009).

Certamente o Brasil é considerado um dos únicos países que possui condições para expandir na pecuária de corte visto que existem muitas áreas para serem exploradas, com tecnologias de produção que visam não agredir o meio ambiente e de forma ecologicamente correta. Alguns países considerados tradicionais produtores de carne bovina, como a Austrália e Argentina, estão encontrando problemas para a expansão de seus rebanhos, entre os problemas estão a seca e a falta de território. Além das favoráveis características, o estado do Rio Grande do Sul conta com produtores cada vez mais profissionais e capacitados, que buscam atingir grandes índices produtivos, sem agredir ao meio-ambiente.

O Brasil conta com uma vasta variedade de espécies forrageiras e raças bovinas de alta produtividade estando perfeitamente adaptadas ao território. Todos estes aspectos levam o Brasil a possuir uma pecuária de corte saudável, com animais alimentados, com produtos e rações de origem vegetal e criado dentro de conceitos ambientais modernos e correto (MEZZADRI, 2007).

Para a produtividade de um rebanho ser alta é necessário vários fatores que auxiliam, entre eles está em um lugar de destaque a saúde do animal, onde se o animal encontra-se debilitado e em grande estresse sua produção cai absurdamente. A ocorrência de doenças provoca alterações no organismo do animal, prejudicando seu desempenho produtivo (CONCEIÇÃO JUNIOR, 1996). O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Figura 1) é um artrópode da origem dos ácaros classificado nas famílias Ixodidae ou Argasidae tem sido responsável por perdas significativas na pecuária, afetando principalmente raças de origens europeias, que predominam no sul do Brasil. Esse ácaro se torna importante devido aos prejuízos acarretados na economia, prejudicando a produção de leite, carne, qualidade do couro, bem como acarretam doenças como a Tristeza Parasitária Bovina (CORDOVES, 1997). Este parasito além de todos prejuízos causados para o animal, como sugar o sangue e perfurar o couro, também mantém os animais sob estresse contínuo (WEGHER, 2010).

Figura 1 – Teleógina de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*



Fonte: Imagens Google

Cada bovino com cerca 10 a 12 carrapatos em um rebanho resulta em perdas consideráveis de até 22% de diminuição na apresentação do cio em fêmeas e 20 % de redução em índices de natalidade. Além do produtor perder na produção, seus custos são aumentados pela necessidade de aquisição de medicamentos, acaricidas, aplicação dos mesmos e atraso nos ganhos com comercialização do gado e seus produtos, perdendo condições de competitividade em função da qualidade e dos custos de produção (DANTAS et al., 2015). Estima-se que se gaste com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* mais de 1 Bilhão de dólares/ano, ou cerca de 8 dólares/cabeça/ano no Brasil, compreendendo desde gastos com controle químico, prejuízos no desempenho e até mortalidade em casos mais graves (JABU, 2009).

No Brasil os gastos gerados com a tentativa do controle estão estimados em aproximadamente R\$ 800 milhões de reais investidos em produtos químicos. O quadro de controle do carrapato está caracterizado pelo aumento de cepas resistentes ao uso de acaricidas e, conseqüentemente, aumento significativo nas frequências das aplicações para tentativa de controle (FURLONG; MARTINS, 2007).

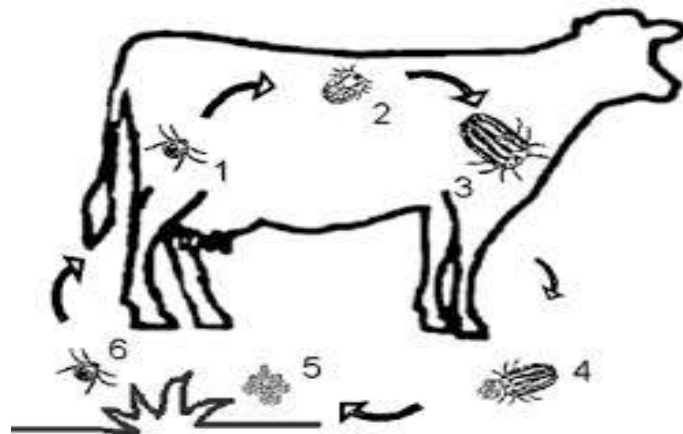
A importância do controle estratégico de parasitos está na forma de conseguir otimizar as ferramentas disponíveis para o controle dos mesmos. A partir do momento que for possível esta otimização, haverá uma melhora da relação custo/benefício desse trabalho de controle estratégico, aumentando a competitividade do setor pecuário com animais saudáveis e produtivos (MENDES, 2015).

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um ectoparasito hematófago originário da Ásia, cujo principal hospedeiro é o bovino (LEAL, 2003). O ciclo de vida do



carrapato bovino está dividido em duas fases: a fase parasitária e fase de vida livre. Na fase parasitária, a larva infestante fixa-se no bovino, evoluindo para ninfa, posteriormente, para adulto e, após o acasalamento, as fêmeas se alimentam e ingurgitam até caírem ao solo (LONDT; ARTHUR, 1975), iniciando a fase de vida livre, onde ocorre a postura de ovos, a incubação e eclosão dos mesmos, como mostra a figura 2 (GONZALES, 1975).

Figura 2 – Ciclo do carrapato



Fonte: Imagens Google

Segundo Nolan (1994), o controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é baseado praticamente na utilização de produtos químicos, através de antiparasitários que atuam por contato. A resistência do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas com diferentes princípios ativos e em condições variadas de manejo vem sendo estudada por vários pesquisadores como, por exemplo, a resistência em regiões da Austrália ao amitraz com fórmula química  $C_{19}H_{23}N_3$ , ao cyamizol e ao chlorometiuron.

Os produtos químicos utilizados para o controle caracterizam-se por apresentar alta toxicidade, aumento dos riscos para a saúde, contaminações de rios e diminuição da biodiversidade (LACEY et al. 2001).

Com isso, novos acaricidas tem sido desenvolvidos a partir de plantas, buscando um método eficaz, barato e alternativo para o controle destes ectoparasitos. Pesquisas realizadas com óleo de citronela (*Cymbopogon nardus*) demonstraram a atividade carrapaticida, agindo tanto em larvas como em fêmeas adultas. Extratos de *Copaifera reticulata*, planta endêmica na região Amazônica e Centro – Oeste, também se fez eficiente no combate das larvas, assim como de *Calea serrata*, que demonstrou ser um acaricida efetivo pela toxicidade às larvas e

diminuição da eclosão dos ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Estes e outros resultados tem incentivado pesquisadores brasileiros a estudarem a flora e a sua aplicação para controle na transmissão de doenças. Além dos métodos naturais, vacinas contendo proteínas (como BM86) que são capazes de induzir o sistema complemento e provocar a lise das células intestinais dos carrapatos, além de diminuir o sucesso reprodutivo e/ou impedir que completem o ciclo de vida. Algumas pesquisas com fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* também tem demonstrado a potenciabilidade destes no controle de carrapatos (AMORIM, 2012).

Segundo Silva (2008), o uso de extratos vegetais é um dos métodos alternativos para o controle do ácaro. O uso de plantas, sendo estas tóxicas ou medicinais, no controle de pragas é importante para a agricultura, pecuária e para o desenvolvimento sustentável. Sendo assim, existe uma grande variedade de plantas que possuem alto potencial para pesquisas de novos produtos que poderão substituir ou cessar o uso de acaricidas sintéticos.

Partindo do ponto de vista biológico, a evolução ocorrida entre as plantas e os insetos é reconhecida (RYAN; BYRNE, 1988), podendo servir como explicação para o amplo espectro de metabólitos secundários utilizados como defesa (BOWN et al., 2006). Na atualidade, a motivação maior em promover estudos deste espectro, utilizando a determinação da atividade inseticida de compostos botânicos como enfoque, é o baixo impacto gerado ao meio ambiente. Ligado ao baixo impacto no meio ambiente existe a demanda por produtos saudáveis e atóxicos para os humanos e mamíferos (RATTAN, 2010).

Vários exemplos de compostos vegetais que demonstram atividade inseticida, podem ser encontrados na literatura. Como exemplo, Adler et al. (1986) verificaram através de uma formulação a base de extratos de sementes de nim (*Azadirachta indica*), sua atividade repelente, inseticida e inibidora do crescimento contra *Blattella germanica* e *Periplaneta americana*, duas espécies de baratas comuns em ambientes urbanos. Guardiola et al. (1990) obtiveram resultados positivos para atividade repelente e inseticida de *Schinus mole*, sendo timol o composto com maior eficiência no controle.

Em um estudo etnofarmacológico realizado em 2001, a espécie arbórea *Araucaria angustifolia* foi indicada como um potente inseticida e acaricida (CASTRO, 2009). Porém, testes em laboratórios utilizando *A. angustifolia* envolvendo sua atividade inseticida são escassos e até o momento a bibliografia não apresenta nada relacionado ao mecanismo de ação do efeito inseticida desta planta. Com ocorrência na floresta ombrófila mista, *A. angustifolia* é uma gimnosperma de grande porte (ALMEIDA, 2003). É conhecida pelos seguintes nomes populares: pinheiro, pinheiro-brasileiro, pinheiro-do-paraná, pinho, pinho-

brasileiro, pinheiro-das-missões ou araucária. Ela também pode ser descrita em inglês como Parana-pine (CARVALHO,1994).

Com isso, a busca de novos agentes farmacologicamente ativos através de fontes naturais, como extratos de plantas, tem levado a diversas descobertas de muitas moléculas que podem desempenhar funções no tratamento de doenças, ou à descoberta de compostos com potencial biotecnológico, como a atividade inseticida e acaricida. Neste contexto, a literatura relata a presença de metabólitos secundários como a quercetina, flavonoides e ácidos fenólicos extraídos do extrato metanológico das folhas de *A. angustifolia* (YAMAGUSHI, 2005, 2009), sendo que tais compostos podem estar associados a efeitos inseticidas (VIEGAS, 2003).

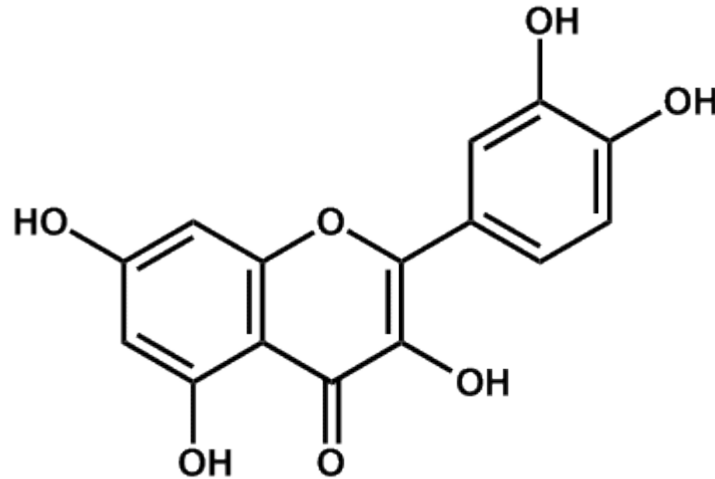
Os flavonoides são compostos de baixa massa molecular com uma estrutura base constituída por dois anéis aromáticos ligados através de um anel pirano. Eles representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural, sendo amplamente distribuídos no reino vegetal. Nos últimos anos essas moléculas têm atraído a atenção de muitos pesquisadores, pois exibem notável variedade de atividades biológicas, físicas e farmacológicas. Elas podem atuar como sequestradores de radicais livres, neutralizando espécies reativas de oxigênio, e como ligantes quelatos para íons metálicos, sendo que se atribui a essas características a responsabilidade por suas propriedades benéficas (SIMÕES et al., 2013).

A quercetina com fórmula química  $C_{15}H_{10}O_7$  cuja estrutura pode ser vista na figura 3 é considerado um dos flavonoides mais presentes na dieta humana, pois é encontrada em grande quantidade nas frutas, verduras e chás e com propriedades de grande interesse, entre elas estão seus efeitos anticarcinogênicos, protetores do sistema renal, cardiovascular e hepático. A interação dos flavonoides com íons metálicos pode mudar as propriedades antioxidantes e alguns outros efeitos biológicos, sendo a maioria de suas propriedades muitas vezes superiores as dos compostos originais. Pesquisas tem mostrado que alguns complexos metálicos como a quercetina possuem resistência à atividade neoplásica e apresentam atividades antisséptica, anti-inflamatória e/ou antioxidante (SIMÕES et. al., 2013).

Behling (2004) e seus colaboradores consideram o flavonoide quercetina como um antioxidante que pode ser encontrado em alimentos na forma glicosilada, sendo um importante componente da dieta humana, embora, não sejam considerados nutritivos. Os flavonoides são antioxidantes devido a suas propriedades sequestrantes de radicais livres e quelante de íons metálicos, protegendo os tecidos contra radicais livres e da peroxidação

lipídica. Embora os flavonoides apresentem propriedades antioxidantes importantes, alguns estudos tem demonstrado uma atividade pró-oxidante *in vitro*.

Figura 3 – Estrutura química da molécula quercetina



Fonte: Imagens Google

De acordo com Freitas (2012), estudos realizados demonstram a presença da substância quercetina no extrato metanólico de *A. angustifolia*, sendo determinada através de Cromatografia de Camada Delgada. Estudos utilizando como modelo baratas da espécie *Phoetalia pallida* demonstram que o extrato de *Araucária angustifolia* é um inseticida natural contra *Phoetalia pallida*.

As baratas são insetos-praga primitivos nos quais a maioria dos sistemas fisiológicos é carente de especialização. Se por um lado, a falta de especialização pode ser um entrave para a comparação com alguns sistemas biológicos animais, do ponto de vista da neurotoxicologia torna-se um importante instrumento na investigação do mecanismo de ação de compostos químicos com atividade tóxica sobre o sistema nervoso (STANKIEWICZ et al., 2012). Por exemplo, já foram identificados mais de 200 neurotransmissores e seus respectivos receptores no sistema nervoso de baratas, que são idênticos aos de outros insetos superiores e apresentam grande homologia em sua estrutura molecular aos de animais vertebrados, dentre eles os seres humanos. Nesse aspecto, a junção neuromuscular da barata se vale do neurotransmissor glutamato, muito comum no sistema nervoso de mamíferos, para produzir contração muscular pela ativação dos receptores de N-Metil-D-Aspartato (NMDA). Por essa razão, as baratas são reconhecidas como modelos extremamente úteis em ensaios de neurobiologia (HUBER et al.,

1990). Uma grande vantagem do uso desses animais em experimentos, no campo da toxicologia, é a possibilidade de se investigar várias funções do sistema nervoso por meio de ensaios bioquímicos, como inibição da enzima acetilcolinesterase; ensaios comportamentais como, atividade de *grooming* (ato de limpeza dos órgãos sensoriais) e ensaios eletrofisiológicos, como preparação nervo-muscular, podendo estes serem realizados em modelos naturais *in vivo*, *in situ* ou mesmo *in vitro*. Além disso, no caso dos bioinseticidas, muitos deles têm como alvo principal o sistema nervoso, o que facilita, de certa forma, a descrição do seu mecanismo de ação, bem como a evidenciação do grau de seletividade (STANKIEWICZ et al., 2012).

A eficiência do extrato de *A. angustifolia* é constatado através do bloqueio neuromuscular irreversível no animal, podendo estar relacionado com a inibição da enzima acetilcolinesterase, capaz de induzir alterações comportamentais no inseto, ligada diretamente à modulação dos neurotransmissores no sistema nervoso central. Tal eficiência, possivelmente, esteja envolvida no efeito letal deste flavonoide sobre o inseto (FREITAS, 2012).

Outros agentes, como por exemplo, algumas toxinas de venenos animais, atuam através da ligação ao sistema nervoso central do inseto, levando a um aumento na liberação do neurotransmissor dopamina, induzindo efeitos como diminuição da locomoção (WEISEL-EICHLER et al., 1999; LIBERSAT, 2003). Também tem sido descritos aspectos bioquímicos na intoxicação induzida por agentes inseticidas naturais (BULLANGPOTI et al., 2006), por exemplo, a inibição da produção de ATP nas mitocôndrias (YAMAMOTO ; KUROKAWA, 1970; STOREY, 1981) ou ainda, inibição da enzima acetilcolinesterase, causando acumulação de acetilcolina na fenda sináptica e, com isso, mantendo a membrana pós-sináptica em constante estado de estimulação, culminando na morte do inseto (KOSTYUKOVSKY et al., 2002; MILLS et al., 2004; SHAAYA ; RAFAELI, 2007).

## **2 JUSTIFICATIVA**

Devido aos problemas gerados na pecuária ocasionados pelo carrapato tem-se procurado métodos alternativos de controle desse ectoparasito.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 Objetivo Geral:

- Avaliar a toxicidade da quercetina em teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

#### 3.2 Objetivos Específicos:

- Determinar a concentração mais efetiva sobre as taxas de sobrevivência/mortalidade;
- Avaliar a taxa de ovo postura.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Coleta de amostras**

Os carrapatos foram coletados de animais parasitados em uma propriedade no município de Lavras do Sul, o total de 440 ácaros foram retirados manualmente dos animais, transportados e armazenados sob refrigeração em temperatura média de 7°C por cerca de 15 horas até o momento do manuseio.

### **4.2 Preparação das soluções**

As soluções de quercetina foram preparadas nas concentrações de 0,1µg/ml, 1µg/ml, 2µg/ml de quercetina (SIGMA – ALDRICH) e o grupo controle, todos em DMSO 20%. As soluções preparadas para o experimento utilizando álcool etílico foram de 10%, 50%, absoluto e o grupo controle, todos em água destilada.

### **4.3 Manutenção**

Cada grupo contendo 20 carrapatos para cada concentração utilizando quercetina foram embebidos por 10 minutos nas soluções e cultivados em placas de petri forradas com papel filtro. Para os testes utilizando álcool etílico foi utilizado 50 carrapatos para cada uma das concentrações, posteriormente foram embebidos por 10 minutos nas respectivas concentrações. Os carrapatos, tanto para os tratamentos com quercetina quanto para álcool etílico foram cultivados em temperatura ambiente e avaliados diariamente durante 7 dias. Os testes foram realizados em triplicata.

### **4.4 Avaliação**

Os carrapatos foram avaliados quanto sua viabilidade e/ou mortalidade por 7 dias diariamente. Em cada dia de observação as teleóginas foram analisadas quanto ao movimento das patas, sendo que um simples movimento foi considerado como indivíduos viáveis. Somente aqueles que não apresentavam movimento algum foram considerados mortos. Para os testes estatísticos foi utilizado o teste de ANOVA com confiabilidade de 95.

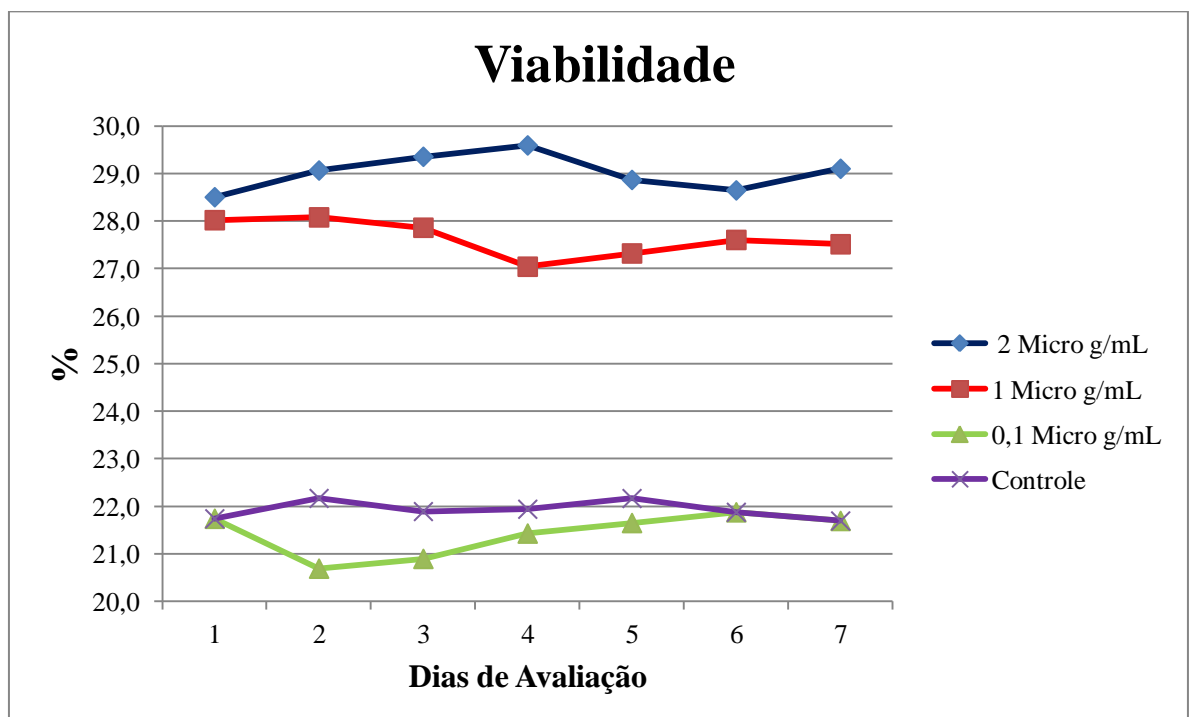


## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo Freitas (2012), em estudos realizados com baratas *Phoetalia pallida* e outros estudos realizados com moscas, foi possível observar que o extrato metanólico de *Araucaria angustifolia* com presença da quercetina foram eficazes na indução da letalidade usando doses de 6, 6  $\mu\text{g/ml}$ , sendo que neste trabalho usamos. Em contrapartida, os resultados obtidos com este trabalho demonstraram que o uso da quercetina como possível acaricida pode não ser tão eficiente como em *Phoetalia pallida*.

Na Figura 4, baseado nos resultados obtidos no trabalho de Freitas (2012), a quercetina nas concentrações mais elevadas, de 2 $\mu\text{g/ml}$  e 1 $\mu\text{g/ml}$ , preveniu a morte de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Com relação ao grupo controle e 0,1 $\mu\text{g/ml}$ , houve uma queda na viabilidade nas avaliações iniciais e posteriormente se manteve estável.

Figura 4. Taxas de sobrevivência em percentagem com o uso da quercetina após o término das avaliações. Ao longo dos dias, as concentrações de 2 $\mu\text{g/ml}$  e 1 $\mu\text{g/ml}$  se mantiveram estabilizadas em relação com as concentrações de 0,1 $\mu\text{g/ml}$  e o controle.



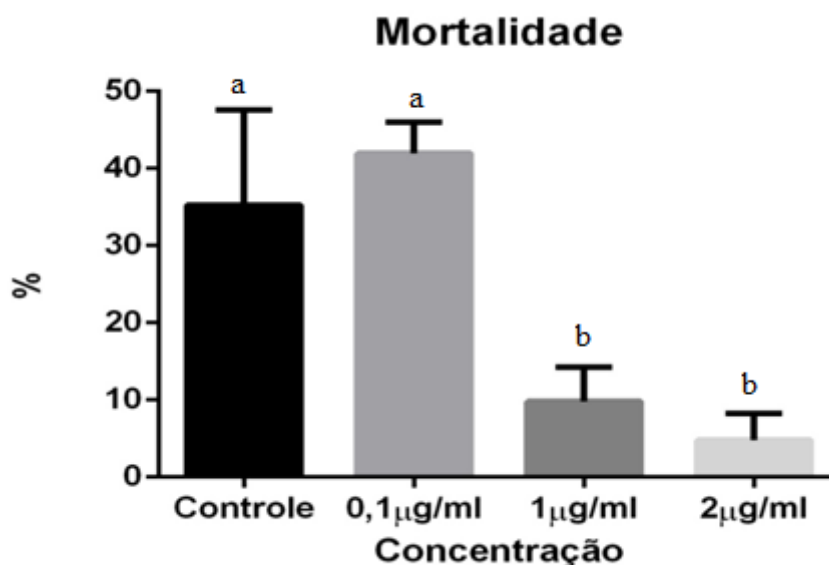
A letalidade, segundo Osborne (1996) é atribuída à atividade anti-colinesterásica da quercetina. Uma vez que a atividade da enzima acetilcolinesterase é essencial para a

sobrevivência do inseto. Freitas (2012) comprova a atividade letal da atividade anticolinesterásica da quercetina sobre o Sistema Nervoso Central em *P. pallida*. Com isso, nossos resultados contrapõem os estudos realizados pelos autores. Freitas (2012) ainda sugere que o bloqueio ocorrido é induzido via inibição de receptores NMDA ou ativação de receptores GABA.

Freitas (2012) acredita que a quercetina possa estar envolvida no bloqueio de receptores NMDA, como ocorre em mamíferos. Mas até o momento não é possível concluir se o bloqueio é induzido pela via de inibição de receptores NMDA ou pela ativação de receptores de GABA.

Os resultados estatísticos obtidos com os testes realizados em quercetina utilizando o teste de two way ANOVA, os resultados demonstraram que as concentrações maiores, de 1µg/ml e 2µg/ml respectivamente, obtiveram mortalidade baixa em relação as concentrações de 0,1µg/ml e o grupo controle (Figura 5). Em percentagens, os dados nos mostram que utilizando uma solução com 2 µg/ml de quercetina obteve-se apenas 5% de morte e em solução contendo 1 µg/ml a taxa de mortalidade em percentagem foi de 10%. O grupo controle (0,0µg/ml) teve mortalidade expressa em percentagem estimada em 35% e utilizando a concentração 0,1µg/ml a mortalidade foi de 42% dos carrapatos.

Figura 5. Dados da mortalidade em percentagens utilizando o programa ANOVA. Pode-se observar que em concentrações menores grupo controle e 0,1µg/ml as taxas de mortalidade foram maiores ao final de 7 dias de avaliação.



Como Freitas (2012) sugere em sua dissertação, que ensaios utilizando tanto o Extrato Metanólico de *A. angustifolia* (AAME) quanto a quercetina induziram bloqueio neuromuscular irreversível em 120 min de registros, é possível compreender que o extrato de *Araucaria angustifolia* tem ação importante e direta sobre o Sistema Nervoso Periférico da barata, validando a atividade inseticida do AAME em *Phoetalia pallida* gerando a hipótese que compostos fenólicos presentes no extrato possam estar envolvidos na atividade inseticida como demonstrado pela quercetina. Os dados apresentados pelo teste estatístico, novamente, nos mostram que a quercetina em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* auxilia na prevenção da morte do carrapato como pode ser observado na Figura 4 onde nas concentrações de 1µg/ml e 2µg/ml a taxa de sobrevivência foi maior em relação às outras concentrações.

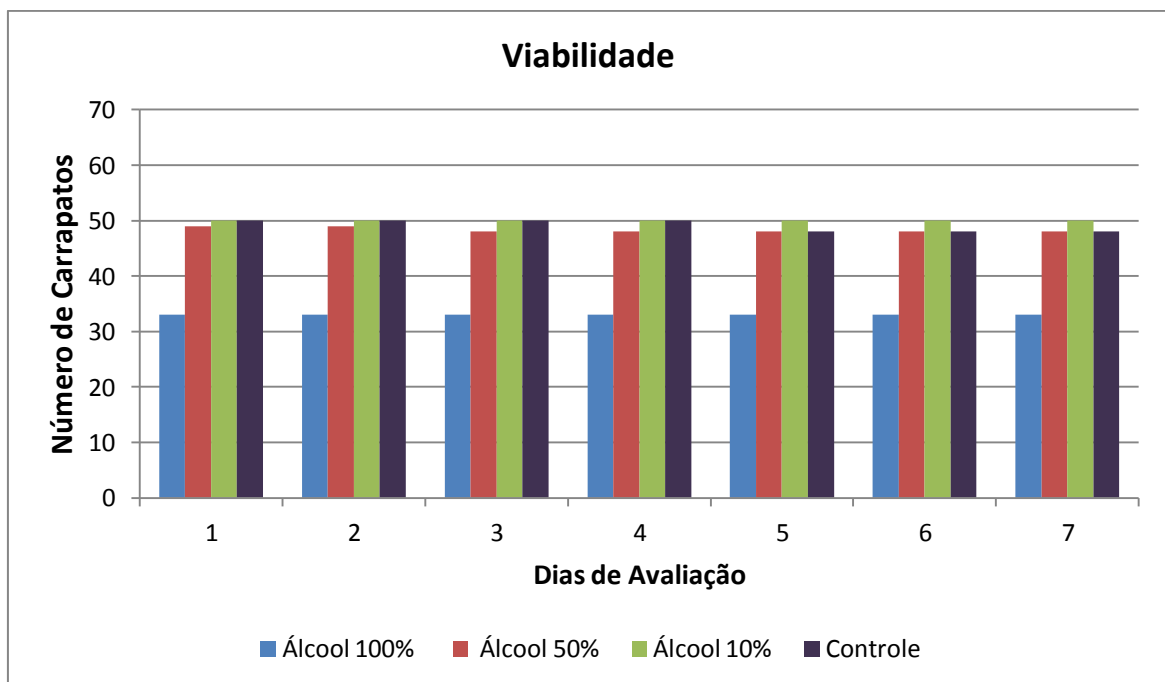
O mecanismo de ação inseticida é complexo, e envolve tanto a neurotoxicidade sobre o Sistema Nervoso Central e também pode envolver o Periférico. A ativação de uma cascata de eventos que se inicia com a ativação de autoreceptores muscarínicos, induziria um aumento da concentração do IP3 citosólico bem como do Ca<sup>2+</sup> favorecendo a liberação da dopamina no sistema nervoso central do inseto, levando o animal à morte (FREITAS, 2012).

Segundo Dal Bello (2014) (comunicação pessoal) o uso de *Araucaria angustifolia* em preparações com Álcool Etílico é capaz de fazer o controle de carrapatos. O uso do extrato de *Araucaria angustifolia* (dados não apresentados) não se mostrou eficaz na letalidade de teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus in vitro*. Para responder a pergunta se o álcool etílico usado nas preparações por Dal Belo (2014) foi o responsável por fazer o controle do acaro, foi realizado o experimento com diferentes concentrações de álcool etílico.

De acordo com a Figura 6, nosso experimento visou analisar a viabilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* na exposição a concentrações diferentes de etanol, sendo elas álcool absoluto, 50% e 10%. Os ectoparasitos foram expostos ao composto por embebição durante 10 (dez) minutos, e posteriormente deixados durante 7 dias para análise diária. O que pudemos ver como resultados foi uma taxa de mortalidade de 34% para a exposição de etanol absoluto desde o dia inicial de análise e uma taxa de mortalidade de 4% para etanol 50%, que se equipara ao grupo controle, tratado apenas com água destilada. Nas demais concentrações não houveram taxas de mortandade significativas no período de 7 dias de análise. Esses resultados nos sugerem que o etanol apresenta possível efeito inseticida apenas em concentração absoluta e que seu efeito é possivelmente imediato, tendo em vista que o número de insetos mortos manteve-se fixo nos 7 dias de análise, nos indicando que o efeitos são imediatos e não cumulativos.

Acredita-se que a diferença de composição da cutícula entre larvas e fêmeas ingurgitadas é que possa justificar os resultados. De acordo com BALASHOV (1972), a cutícula dos carrapatos é formada pela camada externa, epicutícula (composta externamente por ceras e internamente por proteínas) e também pela camada interna, procutícula (quitina e proteínas). Segundo ODHIAMBO (1982), a camada de ceras ou de lipídeos é vista em *B. microplus* somente a partir da ecdise na ninfa e, em maior quantidade, no adulto. Portanto, nas fêmeas ingurgitadas, os solventes precisam dissolver primeiro a camada de ceras da epicutícula, para só então passar para as camadas mais polares da cutícula, constituídas de proteínas hidrossolúveis.

Figura 6. Taxa de sobrevivência de teleóginas submetidas a diferentes concentrações de álcool etílico ao longo de 7(sete) dias de avaliação. Em concentrações onde o álcool etílico se apresentava em concentração absoluto a viabilidade foi mais baixa em relação às demais concentrações.



Quanto à postura de ovos, o que pode-se observar em relação ao tratamento com quercetina foi a presença de ovos a partir do quarto dia de avaliação para concentrações de 1µg/ml, 2µg/ml, 0,1µg/ml. Após o quinto dia de avaliação, o grupo controle apresentou postura de ovos o que pode-se concluir que a quercetina não interfere na postura de ovos.

Para o tratamento realizado com álcool etílico, a postura de ovos ocorreu no quarto dia após o início das avaliações e somente as concentrações de 50%, 10% e o grupo controle

obtiveram postura de ovos. Sendo assim, o álcool etílico na sua forma absoluta interfere diretamente na postura de ovos. Após o quinto dia a postura de ovos ocorreu normal mente em todas concentrações.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos no trabalho em questão conclui-se que o uso da quercetina em carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* age prevenindo a morte dos carrapatos em concentrações superiores, provavelmente devido a algum mecanismo presente que atua como proteção dos carrapatos. Com mais estudos, será possível descobrir quais receptores estão associados com a letalidade. Acredita-se, que o presente estudo possa abrir caminhos para mais pesquisas relacionadas ao tema e com isso, encontrar formas de controle otimizadas para o carrapato.

## REFERÊNCIAS

**ALMEIDA, M. T. R.** Isolamento e identificação de substâncias ativas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze com potencial atividade antiviral. Florianópolis, 2003.

**AMORIN, T. de C.**, Métodos alternativos para o controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: uma revisão. Espírito Santo, 2012.

**BALASHOV, Y.S.** A translation of bloodsucking ticks (Ixodoidea)  $\frac{3}{4}$  Vectors of diseases of man and animals. *Misc Publ Entomol*, v.8, n.5, p.159-376, 1972.

**BEHLING, E.B., SENDÃO, M.C., FRANCESCATO, H.D.C., ANTUNES, L.M.G., BIANCHI, M.L.P.**, flavonoide quercetina: aspectos gerias e ações biológicas. *Alim. Nutr.*, Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

**BOWN, A.W., MAC GREGOR, K.B., SHELP, J.** Gamma-aminobutrate: defense against invertebrate pests. *Trends in Plant Science* 11, 424-427. 2006.

**BULLANGPOTI V., VISETSON S., MILNE M., MILME J., PORNBANLUALAP S., SUDTHONGKONGS C., YAYAPAT S.** The novel botanical insecticide for the control brown plant hopper (*Nilaparvata lugens* Stal.) *Commun Agric Appl Biol Sci*. 71, 475–481. 2006.

**CAMILLO, G; VOGEL F. F; SANGIONI L.A;** et al.; Eficiência in vitro de acaricidas sobre carrapatos de bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.39, n.2, p.490-495. 2009.

**CORDOVÉS, C.O.**, Carrapato: controle ou erradicação. Porto Alegre: Guaíba Agropecuária, 1997. 197p.

**CARVALHO, P. E. R.** Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. *Embrapa*. Colombo – PR 70-78. 1994.

**CASTRO, K.N.C.**, Evaluation in vitro of brazilian pine tree extract for cattle tick control. *Revista Brasileira de Agroecologia* 4, 2575-2578. 2009.

**CONCEIÇÃO JUNIOR, V.** Características de adaptação nos cruzamentos de raças européias x zebu; Cadernos Técnicos Escola de Veterinária da UFMG, n. 18, 29-35, 1996; Disponível em <[http://www.fernandomadalena.com/site\\_arquivos/804.pdf](http://www.fernandomadalena.com/site_arquivos/804.pdf)> Acesso em 12 novembro de 2015.

**DANTAS, M. de O. et al.**. Estudo do complexo tristeza parasitária bovina e seu quadro eritrocitário. Disponível em:<[http://WWW.agroline.com.br/agrociencia/pdf/plubic\\_40.pdf](http://WWW.agroline.com.br/agrociencia/pdf/plubic_40.pdf)> Acesso em 22 de Novembro de 2015.

**FURLONG, J.; MARTINS, J. R.; PRATA, M. C. A.** O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? *A Hora Veterinária – Ano 27, nº 159, setembro/outubro/2007*

**FREITAS, T. C.** caracterização da atividade entomotóxica induzida pelo extrato metanólico de araucária angustifolia em baratas da espécie *Phoetalia pallida*. Dissertação de mestrado. 2012.

**GONZALES, J.C.** 1975. O controle do carrapato dos bovinos. 2.ed. Porto Alegre : Sulina, 103pp.

**HUBER, I., MASLER, E.P., RAO, B.R., EDS.**, Cockroaches as Models for Neurobiology: Applications in Biomedical Research, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 1990.

**JABU, M.** Seleção de bovinos de corte resistentes ao carrapato. 2009. Disponível em: <<http://www.jabu-marcos.blogspot.com/.../seleção-de-bovinos-de-corte-resistentes.html>> Acesso em 15 de Novembro de 2015.

**KOSTYUKOVSKY, M., RAFAELI, A., GILEADI, C., DEMCHENKO, N., SHAYYA, E.** Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated



from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. *Pest Manag. Sci.* 58, 1101-1106. 2002.

**LACEY, L. A.; FRUTOS, F.; KAYA, H. K.; VAIL, V.** Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future?. *Biological Control*, v. 21, p. 230-248, 2001.

**LEAL A.T.; FREITAS D.R.J.; VAZ Jr. I.S.** Perspectivas para o controle do carrapato bovino. *Acta Scientiae Veterinariae.* 31:1-11. 2003.

**LONDT, J.G.H.; ARTHUR, D.R.** 1975. The structure and parasitic life cycle of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1888) in South Africa (Acarina: Ixodidae). *Journal of the Entomological Society of South Africa.* 38: 321–340.

**MENDES, R.** Parasitas – Os Hóspedes Indesejáveis da Pecuária. Disponível em < <http://www.revistarural.com.br/edicoes/item/6254-parasitas-os-h%C3%B3spedes-indesej%C3%A1veis-da-pecu%C3%A1ria>> Acesso em 27 Novembro de 2015.

**MEZZADRI, F. P.** Cenário Atual da Pecuária de Corte - Aspectos do Brasil com Foco no Estado do Paraná - Ano 2007 – Fábio Peixoto Mezzadri. – Curitiba: SEAB/DERAL/DCA, 2007.

**MILLS, C., CLEARY, B.J., GILMER, J.F., WALSH, J.J.,** Inhibition of acetylcholinesterase by tea tree oil. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 56, 375–379. 2004.

**NOLAN, J.** Current developments in resistance to amidine and pyrethroid tickicides in Australia. In: **WHITEHEAD, G.B.; GIBSON, J.D.** Tick biology and control. Grahamstown: Rhodes University, 1981. p.109-114.

**ODHIAMBO, T.R.** Current themes in tropical science: physiology of ticks. Oxford : Pergamon, 1982. V.1, 508p.

**PORTAL BRASIL,** Rebanho bovino brasileiro cresce e chega a 212,3 milhões de cabeças de gado. Disponível em: < <http://www.brasil.gov.br/economia-e>

emprego/2015/10/rebanho-bovino-brasileiro-cresce-e-chega-a-212-3-milhoes-de-cabecas-de-gado > Acesso em 04 de Dezembro de 2015.

**RATTAN, R.S.** Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plantorigin. *Crop Protection* 29, 913-920. 2010.

**ROSA, F.T.C.** 2009. Carne bovina: cuidado com meias verdades. (<http://www.pecuaria.com.br/info.php?ar=1&&ver=5188>). Acesso em 10/06/2015.

**RYAN, M.F, BURNE O.** Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *J Chem Ecol*, 14(10), 1965-75. 1988.

**SHAAYA, E., RAFAELI, A.,** Essential oils as biorational insecticides. Potency and mode of action. Chapter 11. In Ishaaya, Nauen and Rami Horowitz —insecticides design using advanced technologies, 249-261. 2007.

**SILVA, W.C.** 2008. Potencialidade acaricida sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e estudo fitoquímico de *Piper aduncum* L. (Piperaceae), *Palicourea marcgravii* St. Hil (Rubiaceae) e *Derris negrensis* Benth (Fabaceae). Tese de Doutorado – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul. 128pp.

**SIMÕES, V. N., FAVARIN, L. R. V., CABEZA, N. A., OLIVEIRA, T. D., FIORUCCI, A. R., STROPA, J. M., RODRIGUES, D. C. M., CAVALHEIRO, A. A., ANJOS, A. dos.,** Síntese, caracterização e estudo das propriedades de um novo complexo mononuclear contendo quercetina e íon Ga(III). *Química Nova*. São Paulo, 2013.

**STANKIEWICZ, M., DABROWSKI, M., LIMA, M. E.** Nervous System of *Periplaneta americana* Cockroach as a Model in Toxinological Studies: A Short Historical and Actual View. *Journal of Toxicology*, 11, 2012.

**STOREY K.B., STOREY J.M.** Biochemical strategies of overwintering in the gall fly larva, *Eurosta solidaginis*: effect of low temperature acclimation on the activities of enzymes of intermediary metabolism. *J. Comp. Physiol.* 144: 191–199. 1981.

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

**WEGHER, E. A.;** Nova tecnologia garante aumento na produtividade dos bovinos baseada no controle de verminoses e outros parasitas; 2010; Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php>> Acesso em 22 de Novembro de 2015.

**WEISEL-EICHLER, A., HASPEL G., LIBERSAT, F.,** Venom of a parasitoid wasp induces prolonged grooming in the cockroach. *The Journal of Experimental Biology* 202, 957- 964. 1999

**YAMAGUCHI, L. F., KATO, M. J., DI MASCIO, P.** Biflavonoids from *Araucaria angustifolia* protect against DNA UV-induced damage. *Phytochemistry*, 70, 615-620. 2009.

**YAMAGUCHI, L. F., VASSÃO, D. G., KATO, M. J., DI MASCIO, P.** Biflavonoids from Brazilian pine *Araucaria angustifolia* as potentials protective agents against DNA damage and lipoperoxidation. *Phytochemistry*, 66, 2238-2247. 2005.

**YAMAMOTO C., KUROKAWA M.** Synaptic potentials re-corded in brain slices and their modification by changes in tissue ATP. *Exp. Brain Res.* 10: 159-170. 1970.