

EFICÁCIA DO NIM (*Azadirachta indica*) NO CONTROLE DE LARVAS E NINFAS DE *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787) (ACARI: IXODIDAE)*

*EFFICACY OF NEEM (*Azadirachta indica*) IN THE CONTROL OF *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787) (ACARI: IXODIDAE) LARVAE AND NYMPHS*

Julio Israel Fernandes¹, Thaís Ribeiro Correia², Francisco de Assis Ribeiro³, Yara Peluso Cid⁴ e Fabio Barbour Scott⁵

ABSTRACT. Fernandes J.I., Correia T.R., Ribeiro F.A., Cid Y.P. & Scott F.B. [Efficacy of neem (*Azadirachta indica*) in the control of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) larvae and nymphs.] Eficácia do nim (*Azadirachta indica*) no controle de larvas e ninfas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 32(Supl. 1):50-54, 2010. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará, Avenida Universitária, s/n, Pirapora, Campus de Castanhal, PA 68750-000, Brasil. E-mail: fernandesji@ufpa.br

Ixodid ticks are ectoparasites which infest both domestic and wild animals, causing impact to animal husbandry. *Amblyomma cajennense* is one of the ixodids with lower parasitic specificity, and can cause various diseases to man, including *Rickettsia rickettsii*, etiological agent of the spotted fever. Recently, the control of this parasite has been realized by using chemical compounds, which are, in general, toxic to the animals, the environment and human beings. The objective of the present study was to evaluate the efficacy of different concentrations of a 10% neem aqueous extract on the control of *A. cajennense* larvae and nymphs using an *in vivo* assay. The number of engorged larvae recovered from the control group was lower than the number from treated group, demonstrating inefficacy in repelling ticks. However, treated larvae suffered alterations on ecdysis. The efficacy level calculated from the number of infested larvae and number of recovered nymphs was 27.91%. No difference was observed between, nymphs from control and treated groups. Even leading to alterations on larval ecdysis, the 10% neem aqueous extract was inefficacious on the control of *A. cajennense* larvae and nymphs.

KEY WORDS: *Amblyomma cajennense*, ticks, control, neem, biopesticide.

RESUMO. Os ixodídeos são ectoparasitos que infestam os animais domésticos e silvestres, causando impacto no sistema de exploração animal. Ocasionalmente po-

dem parasitar o homem levando a desordens na saúde pública. Entre os ixodídeos, o carrapato *Amblyomma cajennense* é um dos que apresentam menor especifici-

*Recebido em 19 de outubro de 2009.

¹ Médico-veterinário, *Dr.CsVs*, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará, Avenida Universitária, s/n, Pirapora, Castanhal, PA, 68750-000, Brasil. E-mail: fernandesji@ufpa.br; vetjulio@yahoo.com.br

² Médica-veterinária, *Dr.CsVs*, Programa de Pós-Doutoramento, Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, km 7, Seropédica, RJ, 23890-000 e Professora da Faculdade de Medicina Veterinária de Valença, Fundação Educacional Dom André Arcoverde, Centro de Ensino Superior de Valença, Rua Sargento Vitor Hugo, 161 Bairro de Fátima, Valença, RJ, 27600-000, Brasil. E-mail: thaisrca@gmail.com

³ Médico-veterinário, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, IV, UFRRJ, Seropédica, RJ. Bolsista CAPES. E-mail: fran.ribeirovet@gmail.com;

⁴ Farmacêutica Industrial, Programa Binacional em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. Bolsista CAPES. E-mail: yaracid@yahoo.com.br;

⁵ Médico-veterinário, *Dr.CsVs*, Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: scott@ufrj.br

dade parasitária, podendo causar diversas doenças ao homem, incluindo *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa. O controle do parasito tem sido realizado nos últimos anos empregando compostos químicos que são, em sua maioria, tóxicos para o animal, meio ambientes e seres humanos. O presente trabalho foi realizado com objetivo de avaliar a eficácia do extrato aquoso de nim, em diferentes concentrações, através de testes *in vivo* no controle de larvas e ninfas de *A. cajennense*. Foi utilizada apenas a concentração de 10% em larvas e ninfas não alimentadas. O número de larvas ingurgitadas recuperadas do grupo controle foi menor que o número de larvas do grupo tratado, demonstrando a incapacidade do nim em repelir os carrapatos. Entretanto, as larvas do grupo tratado sofreram alteração na ecdise. O nível de eficácia calculada a partir do número de larvas infestadas e o número de ninfas recuperadas foram de 27,91%. Não foram observadas quaisquer diferenças entre as ninfas do grupo controle e as do grupo tratado. Mesmo com alteração na ecdise das larvas, o extrato aquoso de nim, na concentração de 10% foi ineficaz no controle de larvas e ninfas de *A. cajennense*.

PALAVRAS-CHAVE. *Amblyomma cajennense*, carrapatos, controle, nim, biopesticida.

INTRODUÇÃO

No Brasil, há relatos de trinta e duas espécies de carrapatos pertencentes ao gênero *Amblyomma*, sendo a espécie *A. cajennense* a de maior prevalência. É popularmente conhecido por vários nomes, dependendo da fase evolutiva, como carrapato estrela, vermelhinho e micuim nas fases adultas, ninfas e larvas, respectivamente (Guimarães et al. 2001). De modo geral, os estágios de larva e ninfa são os que merecem destaque por apresentarem menor especificidade parasitária, podendo parasitar diferentes espécies. São responsáveis por causar intenso prurido e dor no momento da alimentação (Lemos et al. 1997).

Os animais de companhia vêm a cada dia conquistando um maior espaço nos lares e nas vidas da população mundial. O estreitamento desse convívio, no entanto, faz com que seja necessária uma especial atenção à saúde animal, pois são inúmeras as doenças compartilhadas entre estes e os humanos. Nesse contexto, os carrapatos fixados nos animais domésticos podem eventualmente parasitar os seres humanos e ocasionar a transmissão de patógenos.

O carrapato *A. cajennense* é um carrapato encontrado principalmente em animais de produção, sendo o seu controle realizado através do emprego de substâncias químicas, técnicas de rotação de pastagens e o controle

estratégico, realizado de acordo com a biologia do parasito. Entretanto, com a exploração de novas áreas para a agricultura e o desenvolvimento de novas opções de lazer como o ecoturismo, proporcionam não só os humanos, mas os cães, contato com carrapatos infectados.

O controle do parasito é realizado com rotação de pastagens, porém os diferentes estágios do carrapato podem sobreviver por longos períodos de jejum. As queimadas eram utilizadas com frequência. Entretanto, devido aos prejuízos ao meio ambiente, é uma modalidade de controle que vem deixando de ser empregada, além da possibilidade de alguns exemplares do carrapato sobreviverem, pois os mesmos podem penetrar em rachaduras presentes no solo (Leite et al. 1997).

Nos dias de hoje este controle é efetuado, na maior parte dos casos, com o recurso a pesticidas, compostos por substâncias químicas que apresentam elevada toxicidade para o ambiente e para os seres humanos, sobretudo quando o parasito a ser controlado é *A. cajennense*, pois necessita de concentrações mais elevadas de formulações carrapaticidas do que as utilizadas para *R. (B) microplus*.

Fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma americanum* quando tratadas com extratos de nim tiveram um aumento no período de pré-postura (Lindsay & Kaufman 1988).

Extratos de nim a 5% foram testados em bovinos naturalmente infestados por diferentes espécies de carrapatos, demonstrando resultados significativos (Webb & David 2002).

Os extratos de nim também foram eficazes no controle do carrapato *H. anatolicum excavatum* onde através de testes *in vitro* o tempo de eclosão das larvas foi mais rápida no grupo tratado com óleo de nim, levando a larvas a alterações em sua morfologia e posterior morte. Ao utilizarem um produto comercial com 5% de azadiractina obtiveram 100% de mortalidade das larvas e na concentração de 12,8%, a mesma eficácia em ninfas e adultos não ingurgitados. Na mesma concentração não foi observado eclodibilidade das larvas (Abdel-Shafy & Zayed 2002).

Uma das formas de se detectar a carga parasitária e a ixodofauna de determinada localidade é a técnica do arrasto utilizando um pano, preferencialmente branco, sobre a vegetação. Essa técnica foi empregada na Suécia por Garbouli et al. (2006) que associaram ainda óleo de nim, surfactantes e citronela no pano em uma área contaminada por *Ixodes ricinus*. Os resultados demonstraram que os produtos em conjunto apresentaram efeito de repelência para as ninfas do carrapato.

Diferentes concentrações de óleo de nim já foram empregadas no controle de *A. variegatum* em testes *in vitro* e *in vivo* em ovelhas, para avaliar o seu efeito acaricida e repelente (Makeri et al. 2007).

O óleo de nim a 25% foi empregado com sucesso no controle de *A. variegatum* em caprinos e em coelhos, como também para o controle de *A. variegatum*, *R. apendiculatus* e *B. decoloratus* em bovinos, e que a eficácia está diretamente relacionada a concentração do óleo, controlando assim todas as fases imaturas do carrapato (Kaaya et al. 2007).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficácia de uma formulação contendo 10% de nim no controle de larvas e ninfas do carrapato *A. cajennense* através de testes *in vivo*.

MATERIAL E MÉTODOS

Todas as etapas do ensaio *in vivo* foram realizadas nas dependências do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV). Foram utilizados 12 coelhos com média de três meses idade, alimentados exclusivamente com ração e água *ad libitum*, para cada ensaio. Os coelhos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos com seis animais cada. No dia zero, os animais do grupo 1 foram mantidos sem tratamento, grupo controle. Os animais pertencentes ao grupo 2 foram tratados com nim na concentração de 10%.

Foi utilizada a emulsão de nim, a partir do óleo de nim puro, adquirido do laboratório Natural Rural®. Para o preparo da emulsão foi acrescentado a uma parte do óleo um emulsificante (Tween 80) na concentração de 30%. Posteriormente, a solução foi levada a um agitador magnético com aquecimento, onde permanecia por 10 minutos a uma temperatura de 40°C, completando até a quantidade desejada com água. A dose empregada em cada coelho foi de 3 ml/kg de peso vivo, aplicada com auxílio de um borrifador.

No dia +1, seguindo a metodologia de Neitz et al. (1971) utilizada para manutenção de colônia, foi colocado um saco de pano aderido à base das orelhas do coelho. No dia +2, foram realizadas as infestações com os carrapatos não alimentados de cada estágio, oriundos de uma colônia localizada nas dependências do mesmo laboratório, sendo o local de escolha para as infestações a região entre as orelhas. Todas as infestações referentes a cada estágio do parasito foi realizada em etapas distintas. No ensaio utilizando larvas, cada coelho foi infestado com 200 larvas não alimentadas. No ensaio utilizando ninfas, cada coelho foi infestado com 50 carrapatos não alimentados da espécie *A. cajennense*.

Foram realizadas observações diárias nos animais para avaliar a fixação dos carrapatos, reações adversas do produto, mortalidade dos carrapatos e coleta dos carrapatos ingurgitados. Após a queda de todos os car-

rapatos, os mesmos foram separados em seringas de maneira que os carrapatos de cada animal não tivessem contato com os animais do mesmo grupo. As seringas após a devida identificação foram então acondicionadas em câmaras climatizadas com demanda bioquímica de oxigênio a uma temperatura média de 27°C e umidade relativa de 80%.

Ao final de 30 dias de observação, a avaliação da eficácia foi calculada com a seguinte fórmula: [(total das ninfas / adultos recuperados do grupo controle – Total das ninfas / adultos recuperados do grupo tratado) ÷ total das ninfas / adultos recuperados do grupo controle] x 100.

RESULTADOS

Larvas

O número de larvas ingurgitadas recuperadas por dia experimental em cada coelho nos diferentes grupos encontra-se listado na Tabela 1. O número médio de larvas ingurgitadas coletadas foi similar nos dois grupos experimentais, recuperando 564 larvas no grupo controle e 637 no grupo tratado com a formulação contendo 10% de nim. Os carrapatos foram recuperados entre os dias + 4 e + 7, com maiores taxas de recuperação nos dias + 5 e + 6 em ambos os grupos. A partir dos resultados observados é possível afirmar que o produto não foi eficaz no controle direto das larvas, pois não impediu a fixação dos carrapatos no grupo tratado,

Tabela 1. Número de larvas ingurgitadas recuperadas de *Amblyomma cajennense* por dia experimental em coelhos infestados artificialmente nos diferentes grupos experimentais.

Grupo/ Animais	Número de larvas recuperadas				
	Dia + 4	Dia + 5	Dia + 6	Dia + 7	Total
Controle					
01	21	61	22	2	106
02	45	58	12	1	116
03	34	50	12	1	97
04	7	51	15	6	79
05	2	50	14	3	69
06	53	37	6	1	97
Total	162	307	81	14	564 ^a
Média	27	51,17	13,5	2,33	94
DP ¹	20,5	8,32	5,2	1,97	17,3
Nim 10%					
07	10	37	12	7	66
08	24	62	25	3	114
09	45	58	15	3	121
10	18	55	9	2	84
11	81	53	17	1	152
12	17	75	5	3	100
Total	195	340	83	19	637 ^a
Média	32,5	56,67	13,83	3,17	106,2
DP	26,6	12,4	6,94	2,04	30,1

¹Desvio padrão; Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente (P>0,05).

tão pouco retardou sua fixação, uma vez que a data da coleta dos parasitos foi similar.

O percentual médio de recuperação foi similar nos grupos experimentais. O grupo controle apresentou percentual médio de recuperação no valor de 47, representando uma média de 94 larvas ingurgitadas por coelho. O grupo tratado apresentou melhores níveis de recuperação com percentual médio de 53,1 com número médio de larvas ingurgitadas de 106,2 por animal infestado (Tabela 2).

Tabela 2. Número de larvas ingurgitadas recuperadas de *Amblyomma cajennense* em coelhos infestados artificialmente, percentual de eclosão e número de ninfas recuperadas nos diferentes grupos experimentais.

Grupos/ Animais	Nº de larvas recuperadas	Percentual de recuperação(%)	Nº de ninfas recuperadas
Controle			
01	106	53	65
02	116	58	84
03	97	48,5	77
04	79	39,5	49
05	69	34,5	42
06	97	48,5	77
Total	564	-	394
Média	94	47	65,7
DP ¹	15,8		15,4
Nim 10%			
07	66	33	31
08	114	57	65
09	121	60,5	48
10	84	42	35
11	152	76	77
12	100	50	28
Total	637	-	284
Média	106,2	53,1	47,3
DP	27,5		18,2

¹Desvio padrão; Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente (P>0,05).

Ninfas

O número de ninfas ingurgitadas recuperadas por dia experimental em cada coelho nos diferentes grupos encontra-se listado na Tabela 3.

O número total de ninfas ingurgitadas do grupo controle foi similar ao do grupo tratado. Entretanto, as médias apresentaram pequena diferença, uma vez que o grupo controle apresentou uma média de 7,6 ninfas recuperadas e o grupo tratado, média de 5,8 carrapatos. O percentual de recuperação de ninfas ingurgitadas e o número de adultos observados ao final do período experimental encontram-se listados na Tabela 4.

Independente do grupo experimental, todas as ninfas ingurgitadas realizaram ecdise para adultos. Os resultados no presente estudo relatam a ineficácia do produto contendo 10% de extrato de nim no controle de ninfas de *A. cajennense*, uma vez que o percentual de recuperação foi similar nos grupos tratado e controle e o efeito do nim de alterar o processo de muda dos parasitos não foi observado, pois todos os carrapatos coletados realizaram ecdise.

Tabela 3. Número de ninfas ingurgitadas recuperadas de *Amblyomma cajennense* em coelhos infestados artificialmente, por dia, nos diferentes grupos experimentais.

Grupos/ Animais	Número de ninfas recuperadas				Total
	Dia + 4	Dia + 5	Dia + 6	Dia + 7	
Controle					
01	0	9	0	0	9
02	0	4	3	0	7
03	0	2	3	1	6
04	0	6	0	0	6
05	0	-	-	-	-
06	0	8	2	0	10
Total	0	29	8	1	38
Média	0	5,8	1,6	0,2	7,6 ^a
DP ¹	0	2,6	1,3	0,4	1,6
Nim 10%					
07	0	3	0	0	3
08	0	0	0	0	0
09	0	8	1	0	9
10	0	1	1	0	2
11	0	1	2	1	4
12	0	11	4	2	17
Total	0	24	8	3	35
Média	0	4	1,3	0,5	5,8 ^a
DP	0	4,1	1,4	0,8	5,7

¹Desvio padrão; Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente (P>0,05).

Tabela 4. Número de ninfas ingurgitadas recuperadas de *Amblyomma cajennense* em coelhos infestados artificialmente, percentual de eclosão e número de adultos recuperados nos diferentes grupos experimentais.

Grupos/ Animais	Nº de ninfas recuperadas	Percentual de recuperação (%)	Nº de adultos recuperados
Controle			
01	9	18	9
02	7	14	7
03	6	12	6
04	6	12	6
05	-	-	-
06	10	20	10
Total	38	-	38
Média	7,6	15,2	7,6 ^a
DP ¹	1,62		1,62
Nim 10%			
07	3	6	3
08	-	-	-
09	9	18	9
10	2	4	2
11	4	8	4
12	17	34	17
Total	35	-	35
Média	5,8	14	7 ^a
DP	5,54		5,54

¹Desvio padrão; Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente (P>0,05).

DISCUSSÃO

Larvas

Embora tenha sido recuperado um maior número de larvas ingurgitadas no grupo tratado em relação ao grupo controle, o percentual de ecdise foi maior no grupo controle, recuperando um total de 394 ninfas ao final do

período experimental e no grupo tratado, das 637 larvas ingurgitadas recuperadas, apenas 284 ninfas foram observadas ao final do período experimental. O nível de eficácia calculada a partir do número final de ninfas recuperadas foi de 27,91%. Os valores descritos no trabalho demonstram que o produto alterou a ecdise das larvas para as ninfas.

Ninfas

Até o presente momento, não foi identificado na literatura consultada, trabalhos envolvendo o controle de *A. cajennense* com produtos fitoterápicos através da realização de testes *in vivo*, como no presente estudo. Os trabalhos relatados foram feitos através de testes *in vitro* utilizando diferentes plantas e estágios dos parasitos, impossibilitando comparações fidedignas com o presente estudo.

O uso do nim já foi descrito em testes *in vitro* para outras espécies de carrapatos. Abdel-Shafy & Zayed (2002) testaram um produto comercial contendo 5% de azadiractina em diferentes concentrações em ovos, larvas, ninfas e adultos da espécie *H. anatolicum*. Dependendo da concentração, foi observada a morte de 100% das larvas, ninfas e adultos com inibição da eclosão das larvas oriundos dos ovos tratados, resultados superiores aos estudo, utilizando metodologias distintas. Em ambos os trabalhos foi observado que o extrato de nim não provocou nenhuma alteração na ecdise das ninfas tratadas, independente da espécie de carrapato. Em 2006, Clemente et al. empregaram o óleo da planta *C. citratus* no controle de larvas de *A. nitens* e *A. cajennense* com resultados semelhantes ao presente estudo, uma vez que o óleo da planta não apresentou eficácia para as larvas das espécies testadas.

Garboui et al. (2006) ao empregarem uma flanela impregnada com óleo de Nim em um campo contaminado com o carrapato *I. ricinus*, relatam a eficácia do produto ao repelir ninfas do carrapato. No presente estudo, não foi observado esse fenômeno, uma vez que todos os carrapatos fixaram no hospedeiro após vinte e quatro horas em ambos os grupos.

O extrato de nim já foi empregado em outras espécies de carrapatos em testes *in vivo*. Kaaya et al. (2007) administraram óleo de nim através da alimentação em ovinos naturalmente infestados com carrapatos da espécie *A. variegatum* com o intuito de avaliar sua eficácia. Os resultados foram superiores ao presente estudo, uma vez que os carrapatos não conseguiam se fixar no hospedeiro. Os autores também relatam o fenômeno em coelhos, uma vez que os carrapatos não fixaram nos hospedeiro

por um período de 10 dias. No presente trabalho, não foi observado esse efeito, pois as larvas e ninfas ingurgitadas de cada grupo seguiram o mesmo ritmo de coleta. Os autores ainda relatam que o emprego do nim alterou de forma significativa o período de muda. Esse fenômeno foi observado no presente estudo apenas na fase de larva.

CONCLUSÃO

Apesar de ter se observado alteração na ecdise das larvas, o extrato aquoso de nim a 10% foi ineficaz no controle de larvas e ninfas de *A. cajennense* em coelhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Shafy S. & Zayed A.A. *In vitro* acaricidal effect of plant extract of neem seed oil (*Azadirachta indica*) on egg, immature, and adult stages of *Hyalomma anatolicum excavatum* (Ixodoidea: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 106(1):89-96, 2002.
- Clemente M.A., Gomes F.T., Furlong J. & Prata M.C.A. Eficácia de *Eucalyptus citriodora* no controle de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 13(supl. 1):304, 2004.
- Garboui S.S., Jaenson T.G.T. & Palsson K. Repellency of MyggA@_ Natural spray (para-menthane- 3,8-diol) and RB86 (neem oil) against the tick *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in the field in east-central Sweden. *Experimental and Applied Acarology*, 40(3-4):271-277, 2006.
- Guimarães J.H., Tucci E.C. & Barros-Battesti D.M. *Ectoparasitos de Importância Veterinária*. 1 ed. Plêiade/FAPESP, São Paulo, 2001. 218p.
- Kaaya G.P., Saxena R.C. & Gebre S. The potential of neem products for control of economically-important African ticks. *Biotechnology Research Asia*, 4(1):95-104, 2007.
- Labruna M.B. & Pereira M.C. Carrapatos em cães no Brasil. *Revista Clínica Veterinária*, 6(30):24-32, 2001.
- Leite R.C., Oliveira P.R., Lopes C.M.L. & Freitas C.M.V. Alguns aspectos epidemiológicos das infestações por *Amblyomma cajennense*: uma proposta de controle estratégico. Anais do 2º Simpósio sobre Controle de Parasitos. CGE, Campinas, 1997. p.9-14.
- Lindsay P.S. & Kaufman R.W. The efficacy of azadirachtin on putative ecdysteroid-sensitive system in Ixodid ticks, *Amblyomma americanum* L. *Journal of Insect Physiology*, 34:439-442, 1988.
- Makeri H.K., Maikai V.A. & Nok J.A. Effect of topical application of neem seed (*Azadirachta indica*) extract on sheep infested with *Amblyomma variegatum*. *African Journal of Biotechnology*, 6(20):2324-2327, 2007.
- Neitz W.O.D., Boughton F. & Walters H.S. Laboratory in investigations on the life cycle of Karoo Paralysis tick (*Ixodes rubicundus*) (Neumann, 1904). *Journal of Veterinary Research*, 3(38):215- 224, 1971.
- Webb E.C. & David M. The efficacy of neem seed extract (*Azadirachta indica*) to control tick infestation in Tswana, Simmentaler and Brahman cattle. *South African Journal of Animal Science*, 32(1):1-6, 2002.