

## Ação de extrato de Neem sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* com azadirachtina-A quantificada por HPLC

### Action of extract of Neem against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with azadirachtin-A quantified by HPLC

Oliveira, M.C.S.<sup>1\*</sup>; Chagas, A.C.S.<sup>1</sup>; Forim, M.<sup>2</sup>; Silva, M.F.<sup>2</sup>; Freitas, A.R.<sup>1</sup>; Giglioti, R.<sup>3</sup>; Carvalho, C.<sup>3</sup>

<sup>1\*</sup> Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, Brasil. <sup>2</sup> UFSCar, <sup>3</sup> UNICEP

**Resumo:** O efeito do extrato de sementes de Neem (*Azadirachta indica*) sobre larvas e fêmeas adultas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foi estudado nas concentrações de 5, 10, 30, 50 e 100 ppm. Para as fêmeas adultas os valores de CL<sub>50</sub>, CL<sub>75</sub> and CL<sub>90</sub> foram de 3,1%, 8,8% e 24,6%, respectivamente. Experimentos com larvas não mostraram eficiência em todas as concentrações estudadas. Estes resultados mostraram que somente a utilização de soluções com concentrações acima de 25% do extrato estudado, poderão ser eficientes. Novos métodos para extração da azadirachtina serão testados posteriormente.

**Palavras-chave:** *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, Neem, *Azadirachta indica*, azadirachtina

**Abstract:** Effects of the plant extract of Neem seed (*Azadirachta indica*) on larvae and adult stages of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* was studied at concentrations of 5, 10, 30, 50 and 100 ppm. For adult females ticks values for CL<sub>50</sub>, CL<sub>75</sub> and CL<sub>90</sub> were 3,1%, 8,8% and 24,6%, respectively. Experiments with larvae did not respond to Neem seed extract solutions studied. These results indicate that only solutions with concentrations above 25% of the studied extract, will be efficient. New methods for the azadirachtin extraction will be tested.

**Key-words:** *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, Neem, *Azadirachta indica*, azadirachtin

#### Introdução

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provoca um prejuízo anual estimado em dois bilhões de dólares no Brasil (Grisi et al., 2002). Além de reduzir a produtividade do rebanho, é o vetor responsável pela transmissão de patógenos causadores da “Tristeza parasitária” e compromete o orçamento dos criadores com medicamentos e mão-de-obra. Segundo Mendes (2005), o quadro atual do controle com carrapaticidas sintéticos se caracteriza por um quadro crescente de resistência parasitária e pelo aumento das aplicações de carrapaticidas, com a presença de resíduos no leite e na carne dos bovinos. Produtos químicos que associam diferentes princípios ativos sintéticos têm surgido no mercado, já que os elevados custos de pesquisas para desenvolvimento de novos princípios ativos restringem as opções futuras de controle de *R. microplus*. Diante desta situação, várias pesquisas têm sido realizadas buscando-se conhecer as possibilidades carrapaticidas de vários extratos vegetais (Chagas et al., 2002; Alvarenga et al., 2004; Borges et al., 2005; Martins, 2006; Heimerdinger et al., 2006; Fernandes & Freitas, 2007; Ribeiro et al., 2007). Com relação à *Azadirachta indica* (Meliaceae), existe a necessidade de conhecer a real aplicabilidade de seus extratos sobre *R. microplus*, especialmente da azadirachtina-A (AZ-A), considerada o principal princípio ativo com ação inseticida (Sundaram, 1996). O presente trabalho teve por objetivo avaliar a ação de extratos oleosos da semente de Neem sobre larvas e fêmeas ingurgitadas em laboratório, tendo a azadirachtina-A quantificada por HPLC.

#### Materiais e Métodos

Óleo comercial de Neem foi enriquecido em teor de AZ-A por meio da maceração de sementes trituradas em hexano e metanol no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos. A AZ-A foi quantificada em 1.000 ppm (mg/kg) via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Modo Reverso de Eluição. Fêmeas ingurgitadas provenientes de bovinos criados na Embrapa Pecuária Sudeste foram submetidas ao teste de imersão (Drummond et al., 1971). O extrato oleoso foi diluído em 5 concentrações, utilizando-se álcool etílico a 30%: 0,5, 1, 3, 5 e 10%, ou seja, 5, 10, 30, 50 e 100 ppm. Foram feitas três repetições (10 fêmeas) para cada concentração, assim como para o controle com água destilada e para o

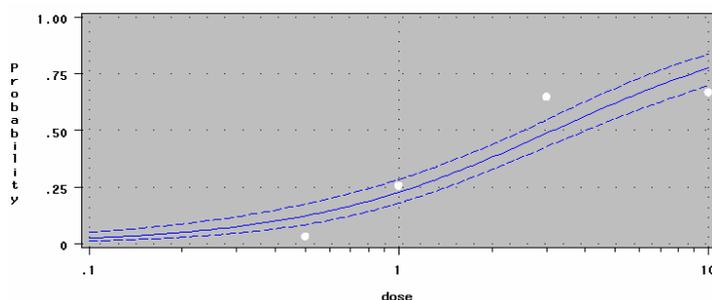
---

<sup>1</sup> E-mail: marcia@cnpse.embrapa.br

controle contendo o solvente álcool etílico a 30%. Após a imersão, as fêmeas foram acondicionadas em B.O.D. ( $\pm 27^{\circ}\text{C}$  e UR > 80%) para avaliação da mortalidade, oviposição e eclodibilidade das larvas. Para a realização do teste com as larvas, foram utilizadas somente larvas com 14 a 21 dias de idade provenientes de fêmeas ingurgitadas da Embrapa. Utilizou-se a metodologia de contato por papel de filtro impregnado (FAO Plant Protection Bulletin, 1971). Foram feitas três repetições para as mesmas concentrações, assim como para os controles. Após 48 h em B.O.D, os envelopes foram abertos e iniciou-se a contagem de larvas vivas e mortas utilizando-se bomba à vácuo. O cálculo das concentrações letais foi realizado por meio do procedimento Probit do programa SAS (SAS Institute, 2002-2003).

### Resultados e Discussão

As estimativas dos valores de  $CL_{50}$ ,  $CL_{75}$  e  $CL_{90}$  para fêmeas ingurgitadas, com os intervalos de confiança com 95% de probabilidade, estão apresentados na Figura 1. Os valores obtidos com os respectivos limites inferior e superior foram: 3,1% (2,5 a 4,0%), 8,8% (6,5 a 13,5%) e 24,6% (15,6 a 47,9%).



Observa-se que para a obtenção de uma eficácia próxima a 100%, seria necessário o uso do extrato a 1.000 ppm de forma bastante concentrada (acima de 25%). A leitura da mortalidade larvar indicou eficácia zero dos extratos, ou seja, não ocorreu mortalidade das larvas, mesmo com o extrato a 10% e as larvas expostas aos tratamentos tinham morfologia e comportamento normais. Habluetzel et al. (2007) encontraram eficácia *in vivo* de 60 a 92% do produto Neem Azal, contendo azadirachtina-A a 125 ppm, sobre o piolho de ovinos *Damalinea limbata*. Para o carrapato *Hyalomma anatolicum excavatum*, comum na Ásia, África e Europa, Neem Azal contendo 5% de azadirachtina possibilitou o controle nas concentrações entre 1,6 e 3,2% (Abdel-Shafy & Zayed, 2002). Entretanto, para *R. microplus*, os resultados negativos se repetem e indicam que somente extratos muito concentrados permitiriam controle eficaz do carrapato, demonstrando a inviabilidade econômica do tratamento (Furlong et al., 2002). Benavides et al. (2001) observaram após teste de imersão de fêmeas ingurgitadas em extratos etéreos da semente do neem, que a  $DL_{99}$  para inibição da oviposição, calculada por meio do Probit, seria de 28,1%. Borges et al. (2005) testaram extrato hexânico a 0,25% do fruto de outra Meliaceae, *Melia azedarach* (cinamomo ou Santa Bárbara), sobre bovinos infestados de *R. microplus*. A redução do número de fêmeas ingurgitadas foi de 27,3% em relação ao controle, mas a conversão e a eclodibilidade das larvas não foi afetada. Portanto, não ocorreu interferência do tratamento na reprodução do carrapato. Acredita-se que a maior sensibilidade das fêmeas ingurgitadas ao extrato oleoso do neem, em relação às larvas, se deve à natureza de sua cutícula. Somente a partir da ecdise na ninfa é que surge uma camada externa de ceras, ou seja, as fêmeas ingurgitadas possuem uma camada lipídica que facilitou a entrada do extrato lipofílico e, conseqüentemente, sua ação (Chagas et al., 2003).

### Conclusão

O extrato de Neem contendo AZ-A a 1.000 ppm não possui ação antiparasitária eficaz sobre *R. microplus* a 10% (100ppm).

### Literatura Citada

Abdel-Shafy, S. and A.A. Zayed. 2002. 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). Vet. Parasitol. 106: 89-96.

- Alvarenga, L.C., P.C.A. Paiva, V.L. Banys, E.A. Collao-Saenz, A.M.G. Rabelo and C.A.P. Rezende. 2004. Alteração da carga de carrapatos de bovinos sob a ingestão de diferentes níveis do resíduo do beneficiamento do alho. *Ciênc. Agrotéc.* 28: 906-912.
- Benavides, O.E., M.G. Hernández, N.A. Romero, A.H. Castro and B.J.L. Rodríguez. 2001. Evaluación preliminar de extractos del Neem (*Azadirachta indica*), como alternativa para el control de la garrapata del ganado *Boophilus microplus* (Acari: Ixodida). *Rev. Colomb. Entomol.* 27: 1-8.
- Borges, L.M.F., P.H. Ferri, W.C. Silva, W.J. Silva, L.S. Melo, L.A.D. Souza, S.F. Soares, K.A. Faria, N.A. Gomes, A. Mori and N.F. Silva. 2005. Ação do extrato hexânico de frutos maduros de *Melia azedarach* (Meliaceae) sobre *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) em bezerros infestados artificialmente. *Rev. Patol. Trop.* 34: 53-59.
- Chagas, A.C.S., R.C. Leite, J. Furlong, H.T. Prates and W.M. Passos. 2003. Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. *Ciência Rural* 33: 109-114.
- Chagas, A.C.S., W.M. Passos, H.T. Prates, R.C. Leite, J. Furlong and I.C.P. Fortes. 2002. Efeito acaricida de *Eucalyptus* em *Boophilus microplus*: óleos essenciais e concentrados emulsionáveis. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 39: 247-253.
- Drummond, R.O., S.E. Ernest, J.L. Trevino, W.J. Gladney and O.H. Graham. 1971. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. *J. Econ. Entomol.* 66: 130-133.
- FAO Protection Bulletin. 1971. Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. Tentative methods for larvae of cattle tick *Boophilus* spp. *FAO Method* 7. 19: 15-18.
- Fernandes, F.F. and E.P.S. Freitas. 2007. Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet. Par.* 147: 150-154.
- Furlong, J., L.M. Costa Junior, A.C.S. Chagas and E.S. Reis. 2002. CL50 e CL90 dos extratos alcoólico e aquoso de nim indiano (*Azadirachta indica*) em larvas de *Boophilus microplus*. In: XII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 2002, Rio de Janeiro. Anais... Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, v. 12.
- Grisi, L., C.L. Massard, M.G.E. Borja and J.B. Pereira. 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Vet.* 125:8-10.
- Habluetzel, A., F. Carnevali, L. Lucantoni, L. Grana, A.R. Attili, F. Archilei, M. Antonini, A. Valbonesi, V. Abbadessa, F. Esposito and S.A. van der Esch. Impact of the botanical insecticide Neem Azal on survival and reproduction of the biting louse *Damalinia limbata* on angora goats. *Vet. Par.* 144: 328-337.
- Heimerdinger, A., C.J. Olivo, M.B. Molento, C.A. Agnoli, M.F. Ziech, L.F.B. Scaravelli, F.R. Skonieski, J.F. Both and P.S. Charão. 2006. Extrato alcoólico de capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*) no controle de *Boophilus microplus* em bovinos. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 15: 37-39.
- Martins, R.M. 2006. Estudio in vitro de la acción acaricida del aceite esencial de la gramínea Citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) en la garrapata *Boophilus microplus*. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu* 8: 71-78.
- Mendes, M.C. 2005. Resistência do carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) aos piretróides e organofosforados e o tratamento carrapaticida em pequenas fazendas. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (Tese de Doutorado em Parasitologia). 139 p.
- Ribeiro, V.L.S., E. Toigo, S.A.L. Bordignon, K. Gonçalves and G. vonPoser. 2007. Acaricidal properties of extracts from aerial parts of *Hypericum polyanthemum* on the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.* 147: 199-203.
- SAS Institute. 2002–2003. User's Guide. versão 9.1.3, versão para Windows. Cary, NC, USA.
- Sundaram, K.M.S. 1996. Azarirachtin biopesticide: a review of studies conducted on its analytical chemistry, environment behaviour and biological effects. *J. Environ. Sci. Health B13*: 913-948.