

ATIVIDADE DO EXTRATO DE NIM SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *Ctenocephalides felis felis* (BOUCHÉ, 1835) (SIPHONAPTERA: PULICIDAE)

FRANCISCO DE ASSIS RIBEIRO¹; THAÍS R. CORREIA²; JULIO ISRAEL FERNANDES³; RAQUEL M. P. DOS S. MELO⁴; VANESSA P. DA C. VIEIRA⁵; LUCIANA DE L. BEZERRA⁵; FABIO B. SCOTT⁶

ABSTRACT:- RIBEIRO, F. DE A.; CORREIA, T.R.; FERNANDES, J.I.; MELO, R.M.P. DOS S. VIEIRA, V.P. DA C.; BEZERRA, L. DE L.; SCOTT, F.B. [Activity of neem extract on the embryony development of *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) (Siphonaptera: Pulicidae)]. Atividade do extrato de nim sobre o desenvolvimento embrionário de *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) (Siphonaptera: Pulicidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, supl. 1, p. 87-91, 2008. Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: scott@ufrj.br

The present study had as objective to evaluate the activity of limonoid azadiractin, extracted of the seeds of the plant *Azadirachta indica*, neem, on the embryony development of *Ctenocephalides felis felis*. A dog was sprayed with the formulation 10%, another dog was kept as control, without treatment. Both had been infested weekly with 600 fleas, in the ratio of 1:1 between males and females. The deriving positions of the infestations had been incubate per seven days in assay pipes, and evaluated it percentage of emerging of flea eggs, comparing themselves the averages of the groups treat and have controlled. The extract of nim presented activity on the embryony development of *C. f. felis*, keeping superior levels of effectiveness 80% until day +14, beyond diminishing the position and inhibiting the development between urging larval of the percentage of larvae that had come out.

KEYWORDS: Azadiractin, cat flea, control, limonoid.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade do limonóide azadiractina, extraído das sementes da planta *Azadirachta indica*, nim, sobre o desenvolvimento embrionário de *Ctenocephalides felis felis*. Um cão foi tratado com a

formulação *spray* a 10%, outro cão foi mantido como controle, sem tratamento. Ambos foram infestados semanalmente com 600 pulgas, na proporção de 1:1 entre machos e fêmeas. As posturas oriundas das infestações foram incubadas por sete dias, em tubos de ensaio, e avaliou-se a porcentagem de eclosão dos ovos de pulga, comparando-se as médias dos grupos, tratado e controle. O extrato de nim apresentou atividade sobre o desenvolvimento embrionário de *C. f. felis*, mantendo níveis de eficácia superiores a 80% até o dia +14, além de diminuir a postura e inibir o desenvolvimento entre instares larvais do percentual de larvas que eclodiram.

PALAVRAS-CHAVE: Azadiractina, pulga do gato, controle, limonóide.

INTRODUÇÃO

A pulga *Ctenocephalides felis* é o mais abundante ectoparasito em cães e gatos do mundo e causa muitos problemas. Além do desconforto aos animais e aos proprietários, as pulgas estão associadas a severas doenças, incluindo

¹ Curso de Medicina Veterinária (MV), Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRRJ), Km 7 da BR 465, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: fran.ribeirovet@gmail.com - Bolsista IC-Pibic (CNPq/UFRRJ).

² Departamento de Parasitologia Animal (DPA), IV, UFRRJ, Km 7 da BR 465, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: thaisrca@gmail.com - Bolsista FAPUR.

³ Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (CPGCV), IV, UFRRJ, Km 7 da BR 465, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: vetjulio@yahoo.com.br e cruzvp@ufrj.br - Bolsista CNPq.

⁴ CPGCV, IV, UFRRJ, Km 7 da BR 465, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: raquel@ufrj.br - Bolsista Capes

⁵ Curso de Medicina Veterinária, IV/UFRRJ, Km 7 da BR 465, Seropédica, RJ 23890-000. - Bolsista do Programa Biext. E-mail: luluzootec@uol.com.br

⁶ DPA, IV, UFRRJ, Km 7 da BR 465, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: scott@ufrj.br

dermatites alérgicas (FOIL et al., 1998; MEHLHORN et al., 2001)

O ciclo evolutivo é constituído das fases de ovo, larva, pré-pupa, pupa e adulto. No ambiente, encontram-se 95% dos indivíduos da população de pulgas, enquanto apenas 5% estão sobre o hospedeiro (LINARDI; GUIMARÃES, 2000).

As pulgas são muito prolíferas, produzindo cerca de 30 ovos por dia. As larvas podem ser encontradas em frestas cobertas, entrelaçados no tecido de carpetes e estofados, embaixo de mobílias e dentro de fendas e rachaduras. (CARLOTTI; JACOBS, 2000).

O fato de as formas imaturas desenvolverem-se no ambiente proporciona uma constante população, servindo como fonte de reinfestações para animais domésticos e, também, para outros mamíferos silvestres que atuam como reservatórios, garantindo a continuidade do ciclo, mesmo na ausência do hospedeiro principal. A eliminação destas formas do ambiente é difícil, principalmente devido a sua localização, porque muitas vezes, os produtos não exercem sua atuação no controle (SANTOS, 2000).

Os programas de controle integrado de pulgas devem ter como objetivo principal a redução das infestações a níveis toleráveis nos hospedeiros e no ambiente. Esses níveis são subjetivos e devem ser determinados com base nas características próprias de cada sistema de criação, em que se integram o hospedeiro, o parasito e o ambiente comum a ambos. Os programas de controle têm como base a combinação equilibrada de métodos mecânicos, culturais e de métodos de aplicação de compostos químicos (DRYDEN, 1995).

Atualmente, são vários os grupamentos químicos disponíveis para o controle de *C. felis felis*, por exemplo os piretróides, organofosforados, carbamatos, fenilpirazoles, nitroguanidinas, neonicotinóides e as lactonas macrocíclicas, além de substâncias que atuam como reguladoras de crescimento dos insetos conhecidas como IGR's (SCOTT et al., 2002).

Com o desenvolvimento da resistência contra drogas antiparasitárias, a indústria tem hesitado em investir na pesquisa de novos defensivos químicos. O tempo de comercialização de um novo produto é de difícil cálculo, mas certamente limitado em relação à rápida aquisição de resistência (UILENBERG, 1996).

Por tanto novas substâncias são necessárias, para o efetivo controle de pragas, oferecendo maior segurança, seletividade, biodegradabilidade, viabilidade econômica, aplicabilidade em programas integrados de controle de insetos e baixo impacto ambiental (VIEGAS-JÚNIOR, 2003)

Produtos naturais provenientes de plantas podem representar alternativas às medidas de controle, por apresentarem baixa toxicidade para mamíferos e pouco impacto ambiental (VIEGAS-JUNIOR, 2003; BARRETO et al., 2006; BUSS; PARK-BROWN, 2006).

Os limonóides são, provavelmente, os maiores representantes da classe dos terpenos com atividade inseticida. São conhecidos como meliacinas, por causa do seu sabor amargo. Cerca de 100 triterpenóides têm sido identificados em semen-

tes, madeira, cascas, folhas e frutos de *Azadirachta indica* (Meliaceae) (LNO et al., 1999).

A azadiractina é um composto extraído das sementes da árvore *Azadirachta indica*, nativa da Índia, vulgarmente conhecida como nim. Essas árvores possuem dois compostos com atividades inseticidas, a azadiractina e a salanina, e um outro composto com ação fungicida (VIEGAS-JÚNIOR, 2003; BUSS; PARK-BROWN, 2006).

Atualmente são comercializados compostos químicos ativos sobre mais de 200 espécies de insetos. Mesmo sendo ativa frente a um enorme espectro de insetos, a azadiractina não afeta os seus predadores naturais ou seus hospedeiros. (STONE, 1992; NDUMU et al.1999).

Tal molécula possui ação fagoinibidora, atuando na supressão do apetite, na interferência do funcionamento das glândulas endócrinas que controlam a metamorfose do inseto, impedindo assim o desenvolvimento na fase larval, comportando-se como análogo do hormônio juvenil (ISMAN, 1997; COOPING; MENN, 2000; VIEGAS-JÚNIOR, 2003).

A literatura também cita o efeito do nim sobre a oviposição e a fecundidade de insetos expostos ao composto, interferindo na sua reprodução (ISMAN, 1997; COOPING, MENN, 2000). Além de todas as ações sobre insetos anteriormente relatadas, o nim também age como repelente (BUSS; PARK-BROWN, 2006). Essa variedade de componentes reduz de modo significativo a ocorrência de fenômenos de tolerância e resistência ao fitoterápico (MULLA; TIANYUN, 1999).

Até o presente momento, não foram encontrados em literatura relatos da ação da azadiractina sobre o desenvolvimento embrionário de pulgas *C. f. felis*. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a ação da azadiractina sobre o desenvolvimento embrionário da pulga do gato.

MATERIAL E MÉTODOS

Localização da experimentação

O experimento foi realizado no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária, Projeto Sanidade Animal (Embrapa/UFRRJ). Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Avaliação da atividade da azadiractina no desenvolvimento embrionário de *Ctenocephalides felis felis*

Para avaliar a atividade da formulação aquosa *spray* do extrato de nim a 10%, foram utilizados dois cães da raça Beagle. No dia 0, um animal foi tratado com a formulação aquosa *spray* de azadiractina, recebendo três borrifadas do produto por quilograma de peso vivo, já o outro animal não recebeu nenhum tipo de tratamento, sendo mantido como controle.

Os cães foram alocados separadamente em gaiolas de ferro galvanizado, medindo 120 x 60 x 60 cm. Essas gaiolas eram mantidas em instalações de alvenaria dentro do canil. Cada animal foi infestado nos dias +4, +7, +14, +21, com 300 pulgas machos e 300 fêmeas, em um total de 600 pulgas. Se-

tenta e duas horas após a infestação, esses animais foram mantidos individualmente em transportes próprios para cães, de tamanho médio, um para cada animal, devidamente identificado, por um período de quatro horas. Posteriormente, os animais foram escovados com o intuito de se retirar ovos de pulgas que poderiam estar aderidos ao pelame do animal, e o material presente no piso do transporte foram coletados com o auxílio de um pincel de cerdas macias, varrendo-se toda a área interna. O mesmo processo foi realizado com os dois cães, o tratado e o controle.

Os ovos de pulga que foram obtidos no material coletado foram devidamente identificados, aspirados, quantificados e separados em seis repetições contendo 10 ovos cada, acondicionados em tubos de ensaio com o auxílio de um aspirador de baixa potência ao qual foi adaptado um tubo de borracha e uma pipeta Pasteur. Esse procedimento foi realizado com auxílio de um microscópio estereoscópico. Junto aos ovos, foi adicionado meio grama de uma dieta necessária para manutenção das larvas, preparada com uma parte de farelo de trigo e uma parte de sangue bovino desidratado em estufa, na temperatura de 100 °C durante 24 horas, misturada com areia na proporção de 1:5 (CORREIA et al., 2003). Posteriormente, esses ovos foram incubados em uma câmara climatizada mantida na temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR de $75 \pm 10\%$. Ao final de sete dias, os tubos foram vertidos em álcool 70° e examinados sob microscópio estereoscópico para avaliar o percentual de emergência das larvas.

A atividade da azadiractina foi avaliada com base no cálculo da eficácia empregando-se a seguinte fórmula:

$$\left[\frac{\text{percentual de emergência de larvas dos ovos provenientes do grupo controle} - \text{percentual de emergência de larvas dos ovos provenientes do grupo tratado}}{\text{percentual de emergência de larvas dos ovos provenientes do grupo controle}} \right] \times 100 \text{ (ABBOTT, 1925).}$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação do primeiro dia de observação, dia +4, o grupo controle apresentou uma média de 7,83 larvas eclodidas, enquanto o grupo tratado apresentou média de 0,33, demonstrando 95,78% de inibição do desenvolvimento embrionário das pulgas. Essa média de inibição se manteve na avaliação seguinte, dia +7, em que as médias dos grupos controle e tratado foram, respectivamente, 8 e 0,66, com percentual de 91,75% de inibição. Na avaliação do dia +14, o percentual de inibição caiu para 82,20%, ainda sendo considerado um bom percentual de inibição, visto que níveis de eficácia inferiores a 70% são considerados insatisfatórios. No dia +21, o experimento deu-se por encerrado, uma vez que os níveis de inibição foram menores que 70%, como podem ser observados na Tabela 1.

Nas observações realizadas durante o período experimental, também se observou que as larvas que eclodiram no grupo tratado com a formulação contendo azadiractina, além de estarem em menor número, apresentavam-se menos desenvolvidas que as larvas eclodidas no grupo que não recebeu

Tabela 1. Número de larvas de pulga eclodidas após tratamento de cães da raça Beagle com uma formulação *spray* de extrato de nim a 10%.

Grupos	Número de larvas emergidas após 7 dias do desafio			
	Dia +40	Dia +70	Dia +14	Dia +21
Controle				
1	5	6	9	6
2	7	10	10	7
3	10	9	9	8
4	9	8	8	6
5	8	8	10	6
6	8	7	10	5
Total	47	48	56	38
Média	7,83	8	9,33	6,33
Tratado				
1	0	1	1	8
2	0	0	4	8
3	1	0	2	7
4	1	0	0	4
5	0	1	0	0
6	0	2	3	0
Total	2	4	10	27
Média	0,33	0,66	1,66	4,5
Eficácia (%)	95,78	91,75	82,20	28,91

tratamento, isso associado a uma significativa diminuição no número de ovos encontrados no fundo dos transportes.

A atividade do nim sobre larvas de *C. felis* e *X. brasiliensis* foi verificada por Kilonzo, em 1991, quando foram expostas quatro instares larvais das duas espécies por 24 horas ao extrato de nim a 50%. Houve letalidade dessas larvas a partir de um período de duas horas. No entanto, neste estudo, a ação do extrato de nim foi avaliada quando aplicado sobre um indivíduo infestado com as formas adultas, agindo sobre a postura e sobre a eclodibilidade das larvas oriundas de pulgas adultas expostas ao produto.

Em 1998, resultados equivalentes foram observados por Guerrini e Kriticos, sobre ovos *C. felis*, utilizando metodologia parecida, com o uso de uma formulação *spray*, aplicada sobre gatos artificialmente infestados com pulga, também impedindo que houvesse eclosão de larvas por um período de 14 dias.

No ano seguinte, Salles e Rech ao utilizar uma torta de nim, observaram que houve diminuição na postura da mosca-das-frutas, *Anastrepha fraterculus*, concordando com os resultados deste trabalho, enquanto na utilização da formulação líquida, a redução não foi significativa, chegando a ser aumentada na maior concentração. Situação semelhante se deu quanto à eclosão de larvas em ambos os casos.

Ginarte (2003) realizou testes com diferentes extratos, dentre eles o óleo de *A. indica* (Nim), visando avaliar sua ação inseticida sobre *Musca domestica*, não encontrando toxicidade em suas larvas, discordando dos resultados deste trabalho, visto que houve uma ação sobre a eclosão de larvas.

Em 2006, Brito et al. avaliaram a toxicidade de algumas formulações comerciais de nim sobre os ácaros, *Tetranychus urticae*, *Euseius alatus* e *Phytoseiulus macropilis*, obtendo

100% de eficácia no que diz respeito à sua embriogênese em todas as formulações testadas para *T. urticae* e na maior concentração para as demais espécies, com viabilidade de 96,3% para o primeiro e 100% na maior concentração para as demais, apresentando resultados superiores aos do presente estudo.

Os trabalhos envolvendo a ação da azadiractina sobre o desenvolvimento de pulgas não são comumente encontrados em literatura, existindo somente discussões sobre uma possível ação sobre elas. Em literatura, os trabalhos encontrados referentes à ação dos extratos de nim sobre pulgas, envolvem, em sua grande maioria, a ação do produto diretamente sobre as formas evolutivas das pulgas, enquanto o presente trabalho envolve a ação sobre os adultos quanto à diminuição da postura e evolução do ciclo biológico. Até o presente momento, não existem relatos sobre a ação desse limonóide sobre o desenvolvimento embrionário de *C. f. felis*. Pode-se afirmar, a partir do presente trabalho, que a azadiractina obteve uma boa eficácia sobre a inibição do desenvolvimento embrionário de *C. f. felis*, mantendo níveis superiores a 80% durante 14 dias. Pode-se ainda relatar que a azadiractina também possui ação sobre as formas larvais da pulga do gato. Estudos relacionados à atividade dessa molécula, como também de outros produtos naturais como o nim sobre pulgas se fazem necessários, em virtude do pouco conhecimento que se tem sobre tais produtos e pelo fato de possuírem um menor impacto ambiental, em comparação aos produtos químicos convencionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W.S. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, v. 18, n.1, p. 265-267, 1925.
- BARRETO, C.F.; CAVASIN, G.M.; SILVA, H.H.G.; SILVA, I.G. Estudo das alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindus saponaria* Lin (Sapindaceae) *Revista de Patologia Tropical*, v. 35, n. 1, p. 37-57, 2006.
- BRITO, M.H.; GODIM JR, M.G.C.; OLIVEIRA, J.V.; CÂMARA, C.A.G.; Toxicidade de Formulações de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) ao Ácaro-Rajado e a *Euseius alatus* De Leon e *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae). *Neotropical Entomology*, v. 35, n. 4, p. 500-505, 2006.
- BUSS, E.A.; PARK-BROWN, S.G. Natural products for insect pest management. *University of Florida IFAS Extension*, p. 1-5, 2006.
- CARLOTTI, D. N.; JACOBS, D. E. Therapy, control and prevention of flea allergy dermatitis in dogs and cats. *Veterinary Dermatology*, v.11, n 1, p. 83-98, 2000.
- COOPING, L. G; MENN, J. J. Biopesticides: a review of their action, applications an efficacy. *Pest Management Science* v. 56, n.1, p. 651-676, 2000.
- CORREIA, T.R.; SOUZA, C.P.; FERNANDES, J.I.; MARTINS, I.V.F.; SANTOS, H.D.; SCOTT, F. B. Ciclo biológico de *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) (Siphonaptera, Pulicidae) a partir de diferentes dietas artificiais. *Revista Brasileira de Zoociências*, v. 5, n. 2, p. 153-160, 2003.
- DRYDEN, M.W. Management of flea infestations. In: CONGRESS OF THE WORLD VETERINARY ASSOCIATION. 25. Yokohama, 1995. *Proceedings ...* Yokohama: WVA, 1995. p. 308-313.
- FOIL, L.; ANDRESS, E.; FREELAND, R.L.; ROY, A.F.; RUTLEDGE, R.; TRICHE, P.C.; O'REILLY, K.L. Experimental infection of domestic cats with *Bartonella henselae* by inoculation of *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae) feces. *Journal Medical Entomology*, v. 35, n.1, p. 625-628, 1998.
- GINARTE, C. M. A. *Efeito de extratos de plantas e inseticidas de segunda e terceira gerações em populações de Musca domestica (Diptera: Muscidae)*, 2003. 136f, Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
- GUERRINI, V.H.; KRITICOS, C.M. Effects of azadirachtin on *Ctenocephalides felis* in the dog and the cat *Veterinary Parasitology*, v.74, n. , p.289-297, 1998.
- ISMAN, M.B. Neem insecticides, Bioinsecticides Faculty of Agricultural Science, University of British Columbia, Vancouver, Canada, n.5; v. 8, p. 32-38, 1997.
- KILONZO, B.S. Larvicidal effects of neem, *Azadirachta indica* on fleas in Tanzania. *Insect Science Applicative*, v.12, n. 5-6, p. 699-702, 1991.
- LINARDI, P.M.; GUIMARÃES, L.R.; *Sifonápteros do Brasil*. São Paulo: Editora MZUSP/FAPESP, 2000. p. 291.
- LNO, X.; MA, Y.; WU, S.; WU, D.; *Journal of Natural Products*. N. 62, p. 1022, 1999. In: VIEGAS-JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.
- MEHLHORN, H.; HANSEN, O.; MENCKE, N., Comparative study on effects of three insecticides (fipronil, imidacloprid, selamectin) on development stages of the cat flea (*Ctenocephalides felis* Bouché, 1835): a light and electron microscopic analysis of in vivo and in vitro experiments. *Parasitology Research*, v.87, n.1, p.198-207, 2001.
- MULLA, S.; TIANYUN, S. Activity and biology effects of neem products against arthropods of medical and veterinary importance. *Journal of American Mosquito Control Association*, v.15, n.1, p.133-152, 1999.
- NDUMU, P.A.; GEORGE, J.B.D.; CHOUDHURY, M.K.; Toxicity of neem seed oil (*Azadirachta indica*) against the larvae of *Amblyomma variegatum* a three-host tick in cattle. *Phytoterapy Research* v. 13, n.1, p. 532, 1999.
- SALLES, L.A.; RECH, N.L.; Efeito de extratos de nim (*Azadirachta indica*) e cinamono (*Melia azedarach*) sobre *Anastrepha fraterculus* (WIED.) (DIPTERA:TEPHRITIDAE). *Revista Brasileira de Agrociência* v.5 n.3 p.225-227, 1999.
- SANTOS, H.D. *Período de desenvolvimento dos estágios imaturos de Ctenocephalides felis felis (Bouché, 1835)*

- (*Siphonaptera: Pulicidae*) mantidos em condições controladas e no ambiente. Dissertação (Mestrado) 2000, 93 f. - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2000.
- SCOTT, F. B.; MARTINS, I. V. F.; SOUZA, C. P.; CORREIA, T. R. Aspectos gerais do controle da pulga *Ctenocephalides felis felis* em cães. *Hora Veterinária*, v 21, n. 125, p.13-18, 2002.
- STONE, R. A biopesticidal tree begins to blossom. *Science*, v.255, n. 5048, p.1070-1071, 1992.
- UILENBERG, G. Integrated control of tropical animal parasitoses. *Animal Health and Production*, v. 28, n.1, p 257-265, 1996.
- VIEGAS-JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

Recebido em 30 de abril de 2008.

Aceito para publicação em 14 de setembro de 2008.