

## PUBLIC HEALTH

## Uso de Extrato de Nim no Controle de Acariase por *Myobia musculi* Schranck (Acari: Miobidae) e *Myocoptes musculinus* Koch (Acari: Listrophoridae) em Camundongos (*Mus musculus* var. *albina* L.)

ANA C.G. DOS SANTOS<sup>1</sup>, ONALDO G. RODRIGUES<sup>2</sup>, LÚCIO V.C. DE ARAÚJO<sup>3</sup>, SANDRA B. DOS SANTOS<sup>4</sup>, RITA DE M.S.N. DE C. GUERRA<sup>1</sup>, MATHEUS L. T. FEITOSA<sup>1</sup>, WHAUBTYFRAN C. TEIXEIRA<sup>1</sup> E ÁRINA SANTOS-RIBEIRO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Depto. Patologia, FAPEMA - Univ. Estadual do Maranhão/UEMA, Curso de Medicina Veterinária, Cidade Universitária Paulo VI, Tirirical, C. postal 9, 65.055-970, São Luís, MA, santos.clara@ig.com.br

<sup>2</sup> Depto. Medicina Veterinária; <sup>3</sup> Depto. Engenharia Florestal. Univ. Federal de Campina Grande, C. postal 64 58700-000, Patos, PB

<sup>4</sup> Depto. Parasitologia Animal, Univ. Federal Rural do Rio de Janeiro, 23.890-000, Seropédica, RJ

*Neotropical Entomology* 35(2):269-272 (2006)

Use of Neem Extract in the Control of Acariasis by *Myobia musculi* Schranck (Acari: Miobidae) and *Myocoptes musculinus* Koch (Acari: Listrophoridae) in mice (*Mus musculus* var. *albina* L.)

**ABSTRACT** - The objective of this work was to evaluate the acaricide action of neem extract formulated as a pomatum in the treatment of acariasis in mice (*Mus musculus* var. *albina* L.) naturally infected by *Myobia musculi* Schranck and *Myocoptes musculinus* Koch. Twenty parasitized animals were chosen and distributed in four groups: control (vaseline), 5%, 10% and 20% of neem. The animals were treated at 48h intervals and maintained in cages with food and water *ad libitum* and accompanied daily for 24 days. There was a decrease in the mean number of mites recovered after 96h with 5% of neem when compared to the others concentrations ( $P < 0.05$ ). From 120h on, the concentrations of 10% and 20% were also efficient and differed statistically from the control group ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ ; respectively). From 168h on, the animals treated with neem concentrations of 10% and 20% showed significant results ( $P < 0.01$ ). The animals exhibit signs of hair recuperation and the mites were not observed anymore. After 216h, the hair was completely recovered and the animals remained free of the infestation in the concentrations of 10% and 20%. The neem pomatum showed acaricide action in the concentrations of 10% and 20% for mice and when used as a topical remedy, had good phlogistic and cicatrizing activity and showed no side effects.

**KEY WORDS:** Acaricide, *Azadirachta indica*

**RESUMO** - O objetivo do trabalho foi avaliar a ação acaricida do extrato de nim sobre a forma de pomada, no tratamento da acariase em camundongos (*Mus musculus* var. *albina* L.) naturalmente infestados por *Myobia musculi* Schrank e *Myocoptes musculinus* Koch. Foram selecionados 20 animais parasitados e distribuídos em quatro grupos: controle (vaselina), nim a 5%, 10% e 20%. Os animais foram submetidos ao tratamento a cada 48h e mantidos confinados em gaiolas, com alimento e água *ad libitum* e acompanhados diariamente ao longo de 24 dias. Houve redução significativa do número médio de ácaros recuperados a partir de 96h na concentração de nim a 20%, em comparação com as demais concentrações ( $P < 0,05$ ). A partir das 120h da aplicação, as concentrações de 10% e 20% também apresentaram resultados significativos quando comparados com o grupo controle ( $P < 0,05$  e  $P < 0,01$ ; respectivamente). A partir de 168h, os animais tratados com as concentrações de 10% e 20% mostraram resultados significativos ( $P < 0,01$ ) em comparação com o controle e os ácaros não foram mais observados. Após 216h da aplicação, a pelagem estava totalmente recuperada e os animais permaneceram livres da infestação, nas concentrações de 10% e 20% ( $P < 0,01$ ). A pomada de nim apresentou atividade acaricida nas concentrações de 10% e 20% em camundongo quando aplicada topicamente, além de mostrar boa atividade flogística, cicatrizante e não desenvolver efeitos colaterais.

**PALAVRAS-CHAVE:** Acaricida, *Azadirachta indica*

O Nordeste brasileiro possui uma flora nativa e exótica vasta. Estudos etnobotânicos recentes têm mostrado muitas plantas com propriedades terapêuticas de uso rotineiro (Albuquerque 2001). Esse fato tem contribuído para o conhecimento e preservação de flora regional. No entanto, a aplicação de métodos cientificamente controlados é necessária na investigação do potencial fitoterápico dessas plantas visando o aproveitamento racional.

Inseticidas botânicos são relativamente seguros e degradáveis. Os mais proeminentes inseticidas botânicos nos últimos anos são derivados das árvores de nim (*Azadirachta indica* A. Juss), os quais têm sido estudados nas áreas de entomologia e fitoquímica e têm utilidade em propósitos médicos e cosméticos. As árvores de *A. indica* produzem pelo menos 35 princípios biologicamente ativos. A azadiractina é o princípio inseticida ativo, predominante nas sementes e outras partes da árvore de nim, com efeitos sobre o crescimento e o desenvolvimento de insetos. Alguns destes parâmetros de bioatividade dos produtos do nim têm sido investigados em algumas espécies de artrópodes de importância médica e veterinária (Mulla-Mir & Su-Tianyun 1999).

Extratos de plantas podem ser utilizados para o controle de determinadas espécies de carrapatos como *Hyalomma anatolicum excavatum* Koch (Acarina: Ixodidae) (Abdel-Shafy & Zayed 2002), *Amblyomma americanum* L. (Acarina: Ixodidae) e *Dermacentor variabilis* Say (Acarina: Ixodidae) (Carroll et al. 1989). Ndumu et al. (1999) demonstraram a toxicidade *in vitro* do óleo da semente de nim para larvas de *Amblyomma variegatum* Uilenburg (Acarina: Ixodidae) observando que no produto puro houve 100% de mortalidade das larvas após 48h e que a toxidez estava relacionada com a concentração e tempo de exposição. Maske et al. (2000) testaram *in vitro* a eficácia de um composto de nim, Nimbitor, contra ectoparasitos de bovinos. A 4%, o composto apresentou ação ectoparasiticida, com 100% de eficácia sobre piolhos (*Linognathus vituli* L. (Anoplura: Linognathidae), moscas (*Hippobosca maculata* Leach (Diptera: Hippoboscidae) e estágios larvais de carrapato (*Rhipicephalus haemaphysaloides* Supino (Acarina: Ixodidae).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação acaricida de extrato de nim sob forma de pomada em diferentes concentrações, no tratamento da acariase em camundongos naturalmente infestados, pois infestações por ácaros em animais de laboratório podem comprometer a saúde desses animais, inviabilizando-os para experimentos de pesquisa.

### Material e Métodos

A fazenda do Centro de Pesquisa para os Trópicos do Semi-Árido - (NUPEARIDO) - Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) mantém cultivo de árvores de nim, de onde foram coletadas as folhas para a extração do óleo e confecção da pomada para uso tópico. A extração foi realizada no laboratório de Plantas Medicinais - CSTR - Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)-Campus de Patos, PB. Após a coleta, as folhas foram submetidas à secagem em estufa de ventilação forçada, por 48h a 55°C.

Em seguida, a amostra foi triturada manualmente e determinada a matéria seca segundo método descrito por Silva & Queiroz (2002). Uma fração de 70 g do material seco e macerado foi colocada em um cartucho de papel de filtro, previamente tarado e submetida a extração com álcool metílico puro num sistema Soxhert por aproximadamente 13h. O extrato obtido foi concentrado por evaporação a 60 ± 5°C, através de um Evaporador Rotativo MA 120. O extrato bruto concentrado foi levado a uma estufa de ventilação forçada a 55°C, por 24h, filtrado em cadinho de vidro sintetizado, de porosidade média e acondicionado em recipientes previamente esterilizados em capela de fluxo laminar. O extrato bruto filtrado foi colocado em ambiente à temperatura aproximada de 4°C até seu uso. As pomadas foram elaboradas em banho-maria a 70°C, colocando-se 100 g de vaselina. Após 1h, tendo a vaselina atingido o estado semi-sólido, procedeu-se à formulação das alíquotas da pomada, nas concentrações de 5%, 10% e 20%, que foram acondicionadas em recipientes plásticos mantidos à temperatura ambiente até seu uso.

Foram utilizados no experimento camundongos (*Mus musculus* var. *albina* L.), de ambos os sexos, criados no biotério do Departamento de Antibióticos (R. COBEA 183), e confinados no Biotério Setorial-CSTR. Os animais apresentavam áreas de alopecia com prurido em toda extensão do corpo, sendo constatada a presença de ácaros fixados aos pêlos e migrando entre eles.

Foram selecionados aleatoriamente 20 animais com lesões de pele positivas para ácaros; realizada a contenção manual dos animais para coleta das amostras, através de raspado cutâneo nas regiões lesionadas. No laboratório de Parasitologia Veterinária - CSTR - UFCG, as amostras de cada animal foram examinadas com auxílio de estereomicroscópio (400x) e os espécimes foram processados segundo o método de Hoffmann (1987) e identificados segundo Flechtmann (1977).

Os animais foram distribuídos em quatro grupos com cinco animais cada, sendo o controle (GI), grupo 2 (GII), grupo 3 (GIII) e grupo 4 (GIV), que foram submetidos ao tratamento a cada 48h, uma vez ao dia, no total de cinco aplicações com a pomada à base de extrato de nim nas concentrações de 5% (GII), 10%(GIII) e 20% (GIV). O grupo controle (GI) foi tratado com placebo (vaselina). As regiões do corpo elegidas para o tratamento foram a cabeça, dorso e base da cauda, por serem áreas de melhor acesso. A aplicação da pomada foi realizada com auxílio de um pincel de cerdas finas, individualizado, utilizando-se uma quantidade suficiente para cobrir cada lesão, das regiões anteriormente citadas, protegendo sempre os olhos dos animais. Para avaliar o grau de infestação dos animais e eficácia do produto foram feitos raspados cutâneos em área de 0,5 mm das lesões antes da aplicação do extrato de nim para a quantificação dos espécimes de ácaros.

A limpeza das gaiolas foi realizada com detergente neutro e a grade de metal era flambada a cada 48h. A cama de serragem era substituída antes de cada aplicação de pomada.

Os animais foram mantidos confinados em gaiolas com alimento e água *ad libitum* e acompanhados diariamente

por nove dias. A evolução do quadro clínico foi acompanhada, dando-se especial atenção às características macroscópicas das lesões e à intensidade das áreas afetadas e do prurido. Ao final do tratamento os animais foram observados por um período adicional de 15 dias. A avaliação dos dados foi realizada com o teste não paramétrico Kruskal-Wallis com nível de significância de 5% (Gomes 1990).

### Resultados e Discussão

O diagnóstico parasitológico constatou a presença de machos, fêmeas e ninfas de ácaros Prostigmatas e Astigmatas, das famílias Myobidae e Lirophoridae, das espécies *M. musculi* e *M. musculus*, respectivamente. O número médio de ácaros contados antes da aplicação do tratamento com a pomada de extrato de nim, por espécie identificada e grupo experimental encontra-se discriminado na Tabela 1. A infestação manteve-se positiva no grupo controle até o final do experimento.

Houve uma redução do número médio de ácaros recuperados, a partir de 96h na concentração de nim a 20%, quando comparado às demais concentrações, o que foi comprovado pelo teste estatístico utilizado ( $P < 0,05$ ). A partir de 120h da aplicação, as concentrações de 10% e 20% também apresentaram resultados significativos nos camundongos tratados quando comparadas com o grupo controle ( $P < 0,05$  e  $P < 0,01$ ; respectivamente). A partir de 168h, os animais tratados com as concentrações de 10% e 20% comparadas ao controle mostraram resultados significativos ( $P < 0,01$ ), exibindo sinais de recuperação da pelagem sem lesões de pele aparente e apresentando pêlos brilhosos e com vitalidade; os ácaros não foram mais observados. Após 216h da aplicação, a pelagem estava recuperada e os animais estavam livres da infestação nas concentrações de 10% e 20% ( $P < 0,01$ ) (Tabela 2), o que foi constatado pelos resultados negativos dos raspados cutâneos após o tratamento.

Os animais tratados com pomada de extrato de nim a 5% não apresentaram a mesma resposta, como visto nas concentrações de 10% e 20%. Nesses animais houve apenas uma redução nos sinais inflamatórios, principalmente na redução do prurido, devido à ação flogística do produto e diminuição dos ácaros migratórios. Apesar de as lesões de alopecia persistirem também neste grupo não houve eliminação completa dos ácaros.

A infestação por ácaros em camundongos de laboratório é comum e determina alterações imunológicas o que

impossibilita o uso dos animais infestados em experimentos. Desta forma, o conhecimento de medidas terapêuticas é necessário e medicações atóxicas, eficazes e de baixo custo devem ser investigadas.

Pesquisas sobre o uso de fármacos acaricidas têm sido relatadas na literatura. Embora princípios ativos convencionais como os piretróides (permetrina), organofosforados (clorpirifós) e as avermectinas (ivermectina e moxidectina) venham sendo usados como medida profilática e curativa na acariase em camundongos de laboratório (Bean-Knudsen *et al.* 1990, Papini & Marconcini 1991, Pence *et al.* 1991, Pullium *et al.* 2005), Davis *et al.* (1999) afirmam que a ivermectina determina efeito significativo no comportamento sensorial (sistema nervoso) de camundongos e Toth *et al.* (2000) sugerem que há risco potencial de intoxicação após o uso destes fármacos.

Nas últimas décadas, extratos de plantas foram amplamente utilizados contra pragas fitófagas e mosquitos (Arnason *et al.* 1987, Chavan & Nikam 1988, Baladrin *et al.* 1995). Contudo, o extrato de nim também demonstrou ser tóxico para alguns carrapatos de bovinos como *Amblyomma cajennense* Fabricius (Acarina: Ixodidae) e *Boophilus microplus* Canestrini (Acarina: Ixodidae) (Williams *et al.* 1996).

Estes resultados assemelham-se aos trabalhos desenvolvidos com extratos de diferentes plantas no controle de populações de carrapatos. Extratos de *Artocarpus altilis* Park e *A. indica* induziram a 65% e 80% de falha na eclosão de larvas de *B. microplus*, respectivamente (Williams 1993). Resultados similares são descritos quando extratos de *Acanthus ebracteatus* Vahl, *Acarus calamus* L., *Annona squamosa* L., *Luffa acutangula* (L.) Roxb e *Stemona collisae* Craib (Chungsamarnyart *et al.* 1988). Carroll *et al.* (1989) comprovaram o efeito larvicida sobre larvas de *A. americanum* e *D. variabilis*.

Mais recentemente, Abdel-Shafy & Zayed (2002) estudaram, *in vitro*, o efeito acaricida do extrato da semente de nim sobre ovos, estágios imaturos e adultos de *Hyalomma anatolicum* Koch (Acarina: Ixodidae) e concluíram que o NeemAzal F teve efeito significativo no controle dessa espécie de carrapato quando usado nas concentrações de 1,6% e 3,2%.

A pomada nas concentrações de 10% e 20% de nim foi eficiente para o tratamento da sarna em camundongos de laboratório. O efeito é observável a partir do quarto dia do tratamento, quando aplicado topicamente, em quantidade

Tabela 1. Número médio ( $\pm$  DP) de ácaros por espécie, identificados nos grupos experimentais de camundongos, antes do tratamento tópico com a pomada à base de extrato de nim em diferentes concentrações. Temp.:  $29 \pm 3^\circ\text{C}$ ; UR:  $70 \pm 10\%$ .

Espécie	Ácaros/grupos			
	0%	5%	10%	20%
<i>M. musculi</i>	3,0 $\pm$ 0,70	2,4 $\pm$ 1,14	2,0 $\pm$ 0,70	3,0 $\pm$ 2,34
<i>M. musculus</i>	4,0 $\pm$ 2,0	3,6 $\pm$ 1,81	5,0 $\pm$ 1,22	3,0 $\pm$ 2,34

Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ).

Tabela 2. Número médio ( $\pm$  DP) de ácaros vivos na cabeça, dorso e base da cauda, após tratamento tópico em camundongos com pomada à base de extrato de nim. Temp.:  $29 \pm 3^\circ\text{C}$ ; UR:  $70 \pm 10\%$ .

Grupos	Ácaros vivos (h após tratamento)				
	0	96	120	168	216
Controle	$7,0 \pm 1,58$ a	$7,0 \pm 1,58$ a	$7,0 \pm 1,58$ a	$7,0 \pm 2,12$ a	$7,0 \pm 1,58$ a
Nim 5%	$6,0 \pm 1,58$ a	$5,6 \pm 1,94$ a	$5,0 \pm 1,58$ a	$4,0 \pm 1,58$ a	$4,0 \pm 1,58$ a
Nim 10%	$7,0 \pm 2,0$ a	$4,0 \pm 1,58$ a	$1,6 \pm 1,81$ b	0 b	0 b
Nim 20%	$6,0 \pm 2,0$ a	$2,6 \pm 1,51$ b	$0,2 \pm 0,44$ b	0 b	0 b

Médias na mesma coluna seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Dunn's a 5% de probabilidade.

suficiente para cobrir as áreas lesionadas, além de mostrar boa atividade flogística, cicatrizante e não desenvolver efeitos colaterais em camundongos.

### Referências

- Abdel-Shafy, S. & 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.
- Albuquerque, U.P. 2001. The use of medicinal plants by the cultural descendants of african people in Brazil. Acta Farm. Bonaerense 20: 139-144.
- Arnason, J.T., B.J.R. Philogene, N. Donsko & I. Kubo. 1987. Limonoides from the Meliaceae and rutaceae reduce feeding growth and *Ostrinia nubilalis*. Entomol. Exp. Appl. 43: 221-226.
- Baladrin, M.F., J.A., Klocke, S. Wurtele & W.H. Bollinger. 1995. Natural plant chemicals: Source of industrial and medicinal materials. Science 228: 1154-1160.
- Bean-Knudsen, D.E., J.E. Wagner & R.D. Hall. 1990. Evaluation of the of *Myobia musculi* infestations on laboratory mice with permethrin. Lab. Anim. Sci. 40: 463.
- Carroll, J.F., A. Maradufu & J.D.J. Warthen. 1989. An extract of *Commiphora erythraea*: a repellent and toxicant against tick. Entomol. Exp. Appl. 53: 111-116.
- Chavan, S.R. & S. Nikam. 1988. Investigation of alkaloids from the neem leaves and neem larvicidal activity. J. Pest. Sci. 13: 1-32.
- Chungsamarnyart, N., S. Jiwajinda, W. Jansawan, U. Kaewsuwan & P. Burnasilpin. 1988. Effective plant crude-extracts on the tick (*Boophilus microplus*) larvicidal. Kasetsart J. Nat. Sci. 23: 37-41.
- Davis, J.A., R. Paylor, M.P. McDonald, M. Libbey, A. Ligler, K. Bryant & J.N. Crawley 1999. Behavioral effects of ivermectin in mice. Lab. Anim. Sci. 49: 288-296
- Flechtmann, C.W. 1977. (eds.) Ácaros de importância médico-veterinária, São Paulo, Nobel, 192p.
- Gomes, F.P. 1990. (eds.) Curso de estatística experimental. Piracicaba, Nobel, 430p.
- Hoffmann, R.P. 1987. (eds.) Diagnóstico do Parasitismo Veterinário, Porto Alegre, Sulina, 156p.
- Maske, D.K., S.W. Kolte & C.R. Jangle. 2000. Efficacy of neem based compound "Nimbitor" against ectoparasites of cattle. Indian Vet. J. 77: 103-106.
- Mulla-Mir, S. & S. Tianyun. 1999. Activity and biological effects of neem products against arthropods of medical na veterinary importance. J. Am. Mosq. Control Assoc. 15: 133-152.
- Ndumu, P.A., J.B. George & M.K. Choudhury. 1999. Toxicity of neem seed oil (*Azadirachta indica*) against the larvae of *Amblyomma variegatum* a three-host tick in cattle. Phytother. Res. 13: 532-534.
- Papini, R. & A. Marconcini. 1991. Treatment with Ivermectin in drinking water against *Myobia musculi* and *Myocoptes musculinus* mange in naturally infected laboratory mice. Angew. Parasitol. Feb. 32: 11-13.
- Pence, B.C., D.S. Demick, B.C. Richard & F. Buddingh. 1991. The efficacy and safety of chlorpyrifos (Dursban) for control of *Myobia musculi* infestation in mice. Lab. Anim. Sci. 41: 139-142.
- Pullium, J., W. Brooks, A. Langley & M.A. Huerkamp. 2005. A single dose of topical moxidectin as an effective treatment for murine acariasis due to *Myocoptes musculinus*. Contemp. Top. Lab. Anim. Sci. 44: 26-28.
- Silva, D.J. & A.C. Queiroz. 2002 (eds.), Análise de alimentos: Métodos químicos e biológicos. Viçosa, UFV, 235 p.
- Toth, L.A., C. Oberbeck, C.M. Straign, S. Fraizer & J.E. Rehg. 2000. Toxicity evaluation of prophylactic treatments for mites and pinworms in mice. Comp. Top. Lab. Anim. Sci. 39: 18-21.
- Williams, L.A. 1993. Adverse effects of extracts of *Artocarpus atilis* Park and *Azadirachta indica* (A. Juss) on the reproductive physiology of the adult female tick *Boophilus* (Conest.). Invert. Reprod. Develop. 23: 159-164.
- Williams, L.A.D. & Ajai Mansingh. 1996. The insecticidal and acaricidal action of compounds from *Azadirachta indica* (A. Juss) and their use in tropical pest management. Integr. Pest Manage. Rev. 1: 133-145.

Received 01/III/05. Accepted 27/IX/05.