

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DE EXTRATOS DE SEMENTES DE NIM
(*Azadirachta indica*) SOBRE FÊMEAS INGURGITADAS E
LARVAS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*
(CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE).**

Rodrigo Giglioti

Biólogo

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
FEVEREIRO DE 2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DE EXTRATOS DE SEMENTES DE NIM
(*Azadirachta indica*) SOBRE FÊMEAS INGURGITADAS E
LARVAS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*
(CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE).**

Rodrigo Giglioti

Orientadora: Prof. Dra. Lúcia Galvão de Albuquerque

Co-orientadora: Dra. Márcia Cristina de Sena Oliveira

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia (Produção Animal)

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
FEVEREIRO DE 2010**

Giglioti, Rodrigo
G459e Efeito de extratos de sementes de Nim (*Azadirachta indica*) sobre fêmeas ingurgitadas e larvas de *Rhipicephalus (boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE) / Rodrigo Giglioti. – – Jaboticabal, 2010
xiii, 55 f. : il.; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010
Orientador: Lucia Galvão de Albuquerque
Banca examinadora: Moacir Rossi Forim, Gilson Pereira de Oliveira

Bibliografia

1. Controle. 2. Carrapato. 3. Fitoterápicos. 4. Nim. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 595.42:615.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EFEITO DE EXTRATOS DE SEMENTES DE NIM (*Azadirachta indica*)
SOBRE FÊMEAS INGURGITADAS E LARVAS DE *Rhipicephalus* (*Boophilus*)
microplus (CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE).

AUTOR: RODRIGO GIGLIOTI

ORIENTADORA: Profa. Dra. LUCIA GALVAO DE ALBUQUERQUE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em ZOOTECNIA, pela
Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LUCIA GALVAO DE ALBUQUERQUE

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. GILSON PEREIRA DE OLIVEIRA

Departamento CPPAR / Faculdade Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. MOACIR ROSSI FORIM

Departamento de Química / Universidade Federal de São Carlos / São Carlos/SP

Data da realização: 23 de fevereiro de 2010.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RODRIGO GIGLIOTI – Filho de Roberto Pedro Giglioti e Amália Neris Giglioti, nascido em 18 de janeiro de 1982, no município de São Carlos – SP. Biólogo, graduado pelo Centro Universitário Central Paulista – Unicep, em dezembro de 2007, com a monografia intitulada: “Estudo do perfil protéico e atividade proteolítica dos produtos de excreção/secreção de larvas de terceiro estágio de *Cochliomyia hominivorax*”. Atua como estagiário de pesquisa na Embrapa Pecuária sudeste de São Carlos desde 2006 no laboratório de Sanidade Animal. Atualmente é aluno do programa de Pós-graduação em Zootecnia da FCAV/UNESP, área de concentração Produção Animal, em nível de mestrado, iniciado em 2008.

*“Sempre chega a hora em que
descobrimos que sabíamos muito
mais do que antes julgávamos”.*

José Saramago

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Roberto e Amália, as minhas irmãs Roberta e Rachel, à minha namorada Aline e *in memória* de sua mãe Isabel, pelo amor que fizeram transparecer por mim e pelo amparo em diversos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho vem concluir uma das etapas de um grande sonho, que só seria possível ser realizado com a participação de pessoas que foram essenciais para o meu crescimento e desenvolvimento como ser humano e profissional. Manifesto a minha gratidão a todas elas e de forma particular:

À minha co-orientadora pesquisadora Dr.^a Márcia Cristina de Sena Oliveira, que foi a primeira pessoa a confiar em meu trabalho e estudo, propiciando oportunidades de desenvolvimento contínuo. Tenho como exemplo de pesquisador a ser seguido e com ideais dignos de respeito diante de toda a sua sabedoria. Agradeço-lhe por ajudar no desenvolvimento de minhas idéias e por sempre me fazer lembrar as pretensões da verdadeira finalidade educativa no campo da pesquisa. Obrigado por suas sugestões, ensinamentos e a participação indispensável para a realização desse trabalho.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Lúcia Galvão de Albuquerque, agradeço por me acolher no momento em que mais precisei, pela sua inestimável contribuição por seu incentivo e disponibilidade em trocar informações, sugestões e críticas fundamentais à elaboração desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Moacir Rossi Forim, por participar como membro da banca examinadora, mas principalmente em participar intensamente nesse trabalho, fornecendo toda sua atenção e sabedoria.

Ao Prof. Dr. Gilson Pereira de Oliveira, por participar como membro da banca examinadora, que veio acompanhando desde a defesa do projeto e qualificação.

Ao Prof. Dr. Henrique Nunes de Oliveira, por toda atenção fornecida e contribuição das análises estatísticas.

À pesquisadora Dr^a. Ana Carolina Chagas, agradeço por suas sugestões, conselhos, colaboração, e acima de tudo pelo respeito e amizade contribuindo valorosamente para a realização desta pesquisa.

A todos os pesquisadores da Embrapa Pecuária Sudeste e professores do programa de pós-graduação em Zootecnia da Unesp/Fcav, pelo carinho e atenção dispensada.

Aos amigos estagiários e funcionários dos laboratórios de Sanidade Animal e Biotecnologia, pela amizade, respeito, agradável convivência, atenção e paciência oferecidos a mim cotidianamente. Agradeço toda ajuda por eles oferecida.

Aos funcionários de campo da Embrapa Pecuária Sudeste pela colaboração no trabalho de coleta dos carrapatos.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro concedido.

Obrigado a todos mais uma vez por me proporcionarem partilhar parte de minha vida com pessoas tão especiais.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. O Carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	4
2.1.1. Distribuição, Taxonomia e Ciclo Biológico	4
2.1.2. Importância econômica do carrapato <i>R. (B.) microplus</i>	6
2.1.3 Métodos de controle	7
2.2. Utilização de extratos vegetais no controle de parasitas	10
2.3. O Nim (<i>Azadirachta indica</i>)	12
2.3.1. Distribuição, Taxonomia e Morfologia	12
2.3.2. Compostos presentes nos extratos de Nim	13
2.3.3. Estudos da utilização do Nim contra parasitas	15
2.3.4. Estudos da utilização do Nim contra carrapatos	17
3. OBJETIVOS	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Preparação de extratos de Nim	20
4.2. Obtenção e processamento das sementes de Nim	20

4.3. Enriquecimento de óleo de Nim	22
4.4. Preparação das diluições de extrato de Nim	23
4.5. Colheita de fêmeas ingurgitadas de <i>R. (B.) microplus</i> e preparo dos ensaios	23
4.5.1. Colheita dos carrapatos	23
4.5.2. Ensaio com fêmeas ingurgitadas de <i>R. (B.) microplus</i>	24
4.6. Preparo do ensaio com larvas	26
4.6.1. Obtenção das larvas de <i>R. (B.) microplus</i> em laboratório	26
4.7. Análise Estatística	27
5. RESULTADOS	28
5.1. Ensaio com as fêmeas ingurgitadas de <i>R. (B.) microplus</i>	28
5.2. Ensaio com as larvas de <i>R. (B.) microplus</i>	36
6. DISCUSSÃO	37
7. CONCLUSÕES	45
8. REFERÊNCIAS	46

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1: Fluxograma de preparação de extratos de Nim com alto teor de AZA.	21
FIGURA 2: Resultados dos cálculos de Redução de postura (RP) dos extratos testados com fêmeas ingurgitadas de <i>R. (B.) microplus</i> . N2: extrato Nim 2.000ppm; N5: Extrato Nim 5.000ppm; N9; extrato Nim 9.000ppm e N10: extrato Nim 10.000ppm de AZA.	30
FIGURA 3: Resultados dos cálculos de Redução da eclodibilidade (RE) dos extratos testados sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R. (B.) microplus</i> . N2: extrato Nim 2.000ppm; N5: Extrato Nim 5.000ppm; N9; extrato Nim 9.000ppm e N10: extrato Nim 10.000ppm de AZA.	31
FIGURA 4: Resultado dos cálculos de Eficácia do produto (EF) dos extratos testados sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R. (B.) microplus</i> . N2: extrato Nim 2.000ppm; N5: Extrato Nim 5.000ppm; N9; extrato Nim 9.000ppm e N10: extrato Nim 10.000ppm de AZA.	31
FIGURA 5: Efeitos da concentração proporcional da AZA na solução sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R.(B.) microplus</i> .	34
FIGURA 6: Efeitos das diluições dos extratos de Nim sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R.(B.) microplus</i> .	35
FIGURA 7: Concentrações Letais (CL) de 50 e 90% de cada extrato testado sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R.(B.) microplus</i> . Os valores de CL foram divididos em relação aos valores da concentração de AZA de cada extrato.	35

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1: Médias e desvios padrão dos índices de Redução de postura (RP), Redução de eclodibilidade (RE), Eficiência reprodutiva (ER) e Eficácia do produto (EP) para os extratos de Nim (<i>Azadirachta indica</i>) nas diluições de 1,25; 2,5; 5,0; 10,0 e 12,8% testados em fêmeas ingurgitadas de <i>R. (B.) microplus</i> .	29
TABELA 2: Concentrações Letais de cada extrato estimadas pelo modelo de Probit a partir dos parâmetros de Eficácia do produto (EP), de acordo com o extrato de Nim utilizado nos ensaios com fêmeas ingurgitadas de <i>R. (B.) microplus</i> .	33

LISTA DE ABREVIATURAS

AZA: azadiractina

BOD: Biochemical Oxygen Demand

CL: concentração letal

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

DL: dose letal

EP: Eficácia do produto

ER: Eficiência reprodutiva

N10: extrato de Nim 10.000ppm de AZA.

N2: extrato de Nim 2.000ppm de AZA.

N5: extrato de Nim 5.000ppm de AZA.

N9: extrato de Nim 9.000ppm de AZA.

RE: Redução da eclodibilidade

RP: Redução de postura

TIA: Teste de Imersão de Adultas

TPB: Tristeza Parasitária Bovina

TPL: Teste do Pacote com Larvas

EFEITO DE EXTRATOS DE SEMENTES DE NIM (*Azadirachta indica*) SOBRE FÊMEAS INGURGITADAS E LARVAS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE).

RESUMO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é considerado o mais importante parasito de bovinos no Brasil. Atualmente seu controle é dificultado pela exigüidade de moléculas acaricidas geradas, e pelo rápido desenvolvimento de resistência dos carrapatos. O presente trabalho teve por objetivo estudar o efeito de quatro extratos oleosos de sementes de Nim (*Azadirachta indica*) contendo 2.000, 5.000, 9.000 e 10.000 ppm de azadiractina (AZA) quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fêmeas ingurgitadas e larvas de *R. (B.) microplus*, *in vitro*. Para os ensaios com fêmeas ingurgitadas foi usado o Teste de Imersão de Adultas e para os ensaios com as larvas o Teste do Pacote com Larvas. Os resultados obtidos nos ensaios com fêmeas ingurgitadas mostraram que o principal efeito tóxico produzido pelos extratos, está relacionado à inibição da reprodução deste parasito. Foram verificadas reduções nas taxas de ovipostura e eclodibilidade das larvas oriundas das fêmeas tratadas com várias diluições dos extratos, em relação aos controles. Nos cálculos de Eficácia do produto (EP) para todas as soluções testadas, observou-se que a solução de 10.000ppm de AZA (N10) apresentou a maior eficácia. Os resultados das análises dos ensaios mostraram significância ($p < 0,01$) dos dois efeitos incluídos no modelo, indicando variações significativas tanto devidas à concentração de AZA, quanto do ensaio realizado. Nas concentrações letais para as fêmeas ingurgitadas verificou-se que as CL_{50} não apresentaram variações, enquanto que as CL_{90} apresentaram grandes variações entre os extratos estudados. Nos ensaios com as larvas, não foram observadas mortalidade das larvas, indicando eficácia zero de todos os extratos testados. Os resultados dos ensaios com fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* mostraram que os extratos oleosos de Nim apresentaram atividade carrapaticida. Desta forma, sugere-se que estudos complementares possam ser realizados, tais como desenvolvimento de novos métodos de isolamento e/ou identificação de outros limonóides, além da AZA, presentes nesta planta, possibilitando sua utilização como carrapaticida e viabilizando o uso do mesmo.

Palavras chaves: controle, fitoterápicos, azadiractina, Nim, carrapatos, bovinos

THE EFFECT OF NIM (*Azadirachta indica*) SEEDS EXTRACTS UNDER ENGORGED FEMALES AND *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* LARVAE (CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE).

ABSTRACT *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is considered the most important cattle parasite in Brazil. Nowadays, his control is complicated by the slowness that acaricides molecules are generated, synthesized through and by the fast development of the resistance of these ticks to the market available products. This work aims to study the effect of four extracts of Neem seed oil (*Azadirachta indica*) containing 2.000, 5.000, 9.000 and 10.000 ppm of azadirachtin (AZA) quantified by high performance liquid chromatography (HPLC) on engorged females and larvae of *R. (B.) microplus*, *in vitro*. For the tests with engorged females, the Adult Immersion Test was used and for the larvae was used the Larvae Package Test. The test results with the engorged females showed that the main toxic effect produced by the extracts is related to the inhibition of the parasite reproduction. Were observed reductions in oviposition and hatchability rates of the larvae derived from the female treated with several dilutions of extracts, compared to controls. In the Product Effectiveness (PE) for all the test solutions, the 10.000ppm (N10) solution showed the highest efficiency. The analysis results from the tests showed significance ($p < 0,01$) of the two effects included in the model, indicating variations both due to AZA and to the test performed. In the lethal concentration to the engorged females was verified that the CL50 did not show great variation, while the CL90 showed great variation between the studied extracts. In the tests with larvae was not observed mortality of them, indicating zero effectiveness of all tested extracts. The results of the tests with *R. (B.) microplus* engorged females demonstrated that the extract of Neem seeds oils showed acaricide activity. Thus, it is suggested that further studies can be conducted, such as development of the methods and of excretion, and characterization of other secondary methods, in addition to AZA, present in this plant, allowing its use as acaricide and enable the use of it.

Key-words: control, fitoterapics, azadirachtin, Neem, ticks, cattles

1) INTRODUÇÃO

Rhipicephalus (Boophilus) microplus é considerado o mais importante parasito dos bovinos no Brasil apresentando danos diretos e indiretos na ordem de 2 bilhões de dólares anuais GRISI et al., (2002).

Os prejuízos econômicos decorrentes de infestações por este carrapato são relacionados à redução do ganho de peso, queda na produção de leite, depreciação do couro, etc. Outra fonte de prejuízos é a transmissão das babesioses e anaplasmoses que representam uma importante causa de morbidade e mortalidade, especialmente em animais taurinos (OLIVEIRA-SEQUEIRA & AMARANTE, 2002).

O controle da população de carrapatos dos bovinos no Brasil vem sendo realizado principalmente através do uso de acaricidas. Contudo, o indiscriminado uso de princípios químicos sintéticos tem levado ao aparecimento de resistência genética contra estes compostos, resultando na diminuição gradativa da eficácia de diversos produtos. Além dos problemas de resistência, existem problemas de saúde pública como a presença de resíduos desses produtos na carne, leite e meio ambiente levando à reflexão da necessidade de pesquisa de produtos alternativos menos tóxicos e mais seguros para o controle deste parasito.

O Nim (*Azadirachta indica*) é uma planta tropical que apresenta ampla utilização no campo da saúde e que quando empregada com critério, não produz resíduos potencialmente tóxicos para os seres humanos e o meio ambiente (BOEKE et al., 2004). Extratos preparados produzidos a partir de diversos órgãos da planta vêm sendo utilizados de maneira empírica, com resultados inconstantes. A grande maioria dos trabalhos descritos na literatura não descrevem a caracterização qualitativa e quantitativa nas diferentes partes da planta usada, onde geralmente, os princípios podem estar presentes em menores quantidades.

Muitos fatores podem influenciar a composição de extratos, entre elas cita-se: estágio de desenvolvimento da planta, estação do ano, índice pluviométrico, temperatura, altitude, condições de coleta, estabilização e condições de estocagem (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

A investigação de novas alternativas para a produção de alimentos procura diminuir o impacto e a poluição ambiental, a dependência externa das matérias-primas e estimular a produção de alimentos de alta qualidade biológica. Existe um mercado promissor para os bioinseticidas e inseticidas naturais. Esses produtos podem ser utilizados no manejo integrado de pragas em cultivos comerciais e também na agricultura orgânica, sem causar prejuízo ambiental (CORRÊA & VIEIRA, 2007).

2) REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O Carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

2.1.1. Distribuição, Taxonomia e Ciclo Biológico

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é uma espécie originária da Ásia que atualmente se distribui entre os paralelos 32 Norte e 32 Sul, abrangendo importantes zonas da América Central, América do Sul, África e Oceania (GONZALES, 1993). Praticamente todo o território brasileiro encontra-se no espaço de ocorrência desse parasito (FONSECA et al., 1997).

Estudos de filogenia molecular por análise e comparação de seqüências de DNA permitiram caracterizar e determinar grande similaridade entre os gêneros *Rhipicephalus* (Kock, 1844) e *Boophilus* (Curtice, 1891). Estes estudos levaram a alteração da nomenclatura e o gênero *Boophilus* passou a designar um subgênero de *Rhipicephalus* (MURREL & BARKER, 2003).

Taxonomicamente, o carrapato *R. (B.) microplus* é classificado segundo GUIMARÃES (2001), modificado por MURREL & BARKER (2003):

- Reino: Animalia;
- Filo: Arthropoda;
- Classe: Arachnida;
- Subclasse: Acari;
- Corte: Parasitiformes;
- Ordem: Ixodida;
- Família: Ixodidae;
- Subfamília: Rhipicephalinae;
- Gênero: *Rhipicephalus*;
- Sub-gênero: *Boophilus*
- Espécie: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

R. (B.) microplus é um carrapato monoxeno, ou seja, desenvolve todo o seu ciclo biológico num único hospedeiro, e compreende uma fase de vida livre e outra fase de

vida parasitária. A de vida livre ocorre em um menor espaço de tempo quando os meses são mais quentes (primavera-verão) e em períodos mais longos nos meses mais frios (outono-inverno), podendo variar entre 41 dias ou estender-se por até 300 dias, dependendo das condições ambientais, enquanto a fase parasitária dura 21 dias em média. A fase de vida livre inicia-se quando a fêmea ingurgitada de sangue se desprende do hospedeiro e cai ao solo. Elas procuram áreas protegidas dos raios solares diretos, com temperatura e umidade favoráveis, para iniciar a postura. No solo, inicia-se o período de pré-postura, que dura em média 3 dias, em condições ótimas de temperatura e umidade. O período de postura, dura cerca de 15 dias, sendo que o 5º dia ocorre a maior produção de ovos. A eclosão das larvas inicia-se ao redor do 7º dia após o final do período de postura e se completa em mais sete dias quando se tornam larvas infestantes. Em condições desfavoráveis de temperatura e umidade, pode transcorrer mais de 100 dias entre o final da postura e a eclosão das larvas (PEREIRA et al., 2008).

A fase parasitária tem início com a fixação das larvas infestantes no hospedeiro bovino. Inicialmente as larvas alimentam-se de linfa e em torno do oitavo dia após a fixação, sofrem a primeira muda e liberam as ninfas. As ninfas se alimentam de sangue e sofrem nova muda, liberando as metaninfas. A partir desta fase ocorre a diferenciação sexual. Os machos jovens são denominados neandros e gonandros, ao se tornarem adultos (15º dia após a fixação). Os machos são menores que as fêmeas e percorrem o corpo do animal, alimentando-se de sangue e fecundando várias fêmeas. A fêmea jovem é denominada neógina e ao redor do 18º dia, quando apresenta maturidade sexual denomina-se partenógina. Após a fecundação a fêmea continua seu repasto sanguíneo ingurgitando-se totalmente ao fim do período parasitário, quando passa a ser denominada teleógina (ao redor do 21º dia, quando se desprende do animal). A teleógina cai no solo para iniciar a postura. As teleóginas chegam a ingerir de 2 a 3 mL de sangue durante sua vida parasitária e transformam cerca de 60% de sua massa corporal em ovos, que em média, chegam a 3.000 unidades. Um grama de ovos de *R. (B.) microplus* contém cerca de 20.000 ovos (GONZALES, 1993; PEREIRA et al., 2008).

As características morfológicas de *R. (B.) microplus* são: corpo pequeno sem ornamentação no escudo, capítulo hexagonal, coxas I com dois espinhos curtos em

ambos os sexos, aparelho bucal curto, hipostômio mais longo que os palpos com placas circulares, sulco anal e festões ausentes. Os machos apresentam quatro placas adanais longas e distintas e seu corpo termina em uma ponta aguda, enquanto que nas fêmeas o corpo termina normalmente em forma arredondada. Os machos apresentam coloração castanho-avermelhada e as fêmeas ingurgitadas coloração cinza chumbo (GUIMARÃES, 2001; MARCONDES, 2001).

2.1.2. Importância econômica do carrapato *R. (B.) microplus*

Atualmente, o *R.(B.) microplus* é considerado o principal ectoparasita das regiões tropicais e subtropicais do mundo, os prejuízos causados geram grandes perdas à produção bovina mundial (WILLADSEN & RIDING, 1980; O`KELLY & KENNEDY, 1981). Segundo a FAO (1999), uma população superior a 300 milhões de bovinos estão expostos ao carrapato, originando cerca de três bilhões de dólares anuais em prejuízos à pecuária mundial.

Em território brasileiro, o *R.(B.) microplus* encontra condições favoráveis para o seu desenvolvimento comumente apresentando altas infestações e perdas consideráveis (GONZALES, 1993).

HORN (1983) estimou que os danos causados pelo carrapato *R. (B.) microplus* aos bovinos, considerando mortalidade, perda do ganho de peso, efeitos sobre o couro, gastos com carrapaticidas, diminuição na produção de leite, chegavam a US\$ 968 milhões por ano no Brasil. Em função do aumento do rebanho bovino de 76 milhões de cabeças em 1983, para 169 milhões em 2000, essas perdas podem ultrapassar os US\$ 2 bilhões conforme estimativa feita por GRISI et al., (2002).

As lesões produzidas pelo carrapato na pele do animal acarretam severas conseqüências para a indústria do couro. Tais lesões diminuem a resistência do material, conferindo aparência ruim e impossibilitando a sua utilização na indústria de calçados (GONZALES, 1974; 1975). A inoculação de várias substâncias farmacologicamente ativas presentes na saliva do carrapato provoca reações alérgicas e perda de apetite (MARQUES et al., 1995).

O principal problema sanitário gerado pelo parasitismo do carrapato *R. (B.) microplus* no Brasil, é a ocorrência de infecção pelos agentes da tristeza parasitária bovina (TPB). A TPB causa grandes prejuízos devido à mortalidade dos animais, abortos, redução de fertilidade e queda da produção de carne e leite (FARIAS, 1995).

Independente dos efeitos da TPB, os carrapatos afetam os animais principalmente por provocar anemia, imunossupressão e redução da ingestão de alimentos. Cada carrapato ingurgitado é responsável pela perda de aproximadamente 1g de peso vivo nos animais parasitados (JONSSON, 2006). Outra importante fonte de prejuízos para os produtores rurais ocasionada por esse ácaro são os gastos originados pelas diversas ações necessárias ao seu controle, tais como a construção de banheiros de aspersão, gastos com serviços veterinários, com pessoal, carrapaticidas, etc.

2.1.3. Métodos de controle

O controle da população de carrapatos nos rebanhos brasileiros por mais de um século, tem sido baseado principalmente no uso de acaricidas. O uso indiscriminado de diversos princípios químicos determinou um grave quadro de resistência genética nestes parasitas, reduzindo a vida útil dos princípios utilizados. Problemas gerados pela presença de resíduos desses acaricidas na carne, leite e meio ambiente tem levado à reflexão da necessidade de melhor monitoramento em suas aplicações. A resistência a pesticidas ocorre de maneira generalizada em muitas áreas onde populações de *R.(B.) microplus* encontram-se estabelecidas. Em alguns casos a ocorrência da resistência impede a utilização de todas as classes de pesticidas disponíveis, tornando o controle praticamente inviável. Em termos gerais, a aplicação de acaricidas no Brasil, é feita principalmente por meio de pulverização (LEITE, 1988; FURLONG, 1999), com critérios bastante variáveis de eficiência (FURLONG et al., 2007).

Para agravar a situação da resistência aos carrapaticidas, a maioria dos países não dispõe de um programa oficial de controle de carrapatos (NARI & HANSEN, 1999). O uso de carrapaticidas é orientado principalmente pela pressão do mercado, havendo um grande vazio em relação às informações técnicas a respeito da melhor utilização

desses produtos, bem como com relação a informações sobre a biologia do parasita e estratégias de controle.

De acordo com ROUSH & McKENZIE (1987), no início da evolução da resistência, estima-se que a frequência dos genes que conferem essa característica a uma população, é bastante baixa. Entretanto, em virtude do uso contínuo de um mesmo princípio acaricida, a resistência tende a aumentar fazendo com que a eficácia do produto seja rapidamente reduzida.

A escassez de princípios químicos disponíveis no mercado, unido ao seu mau uso, acelerou o surgimento da resistência generalizada das populações de *R. (B.) microplus*, fazendo com que uma grande parte dos produtos comercializados no Brasil não apresentasse eficácia superior a 75% (FURLONG, 1999).

A diluição inadequada dos produtos, erros de medida na mistura, a pulverização de volumes insuficientes nos animais, erro na dosagem de medicamentos injetáveis e não respeitar os intervalos corretos entre tratamentos contribuem para elevar o grau de resistência de uma população de carrapatos, e conseqüentemente diminui a efetividade do princípio químico no seu controle (GEORGE, 2000). A evolução da resistência dos carrapatos à maioria dos produtos químicos sintéticos presentes no mercado, e a demora no desenvolvimento de novas moléculas tem deixado a impressão de que em um futuro não muito distante os carrapaticidas disponíveis não serão mais efetivos (GEORGE et al., 2004). A resistência de *R. (B.) microplus* aos carrapaticidas está presente na maior parte das regiões do mundo onde é realizado seu controle químico e é, fatalmente, uma conseqüência do uso de carrapaticidas.

Diversos estudos têm relatado a ocorrência de resistência aos carrapaticidas de diferentes grupos químicos (WHARTON & ROULSTON, 1970; BRUN et al., 1983; ARANTES et al., 1996; MARTINS & FURLONG, 2001; FURLONG et al., 2002; VARGAS et al., 2003; RODRÍGUEZ-VIVAZ et al., 2006; KLAFKE et al., 2006; DAVEY et al., 2008). PEREIRA et al., (2008) revisaram relatos de resistência aos carrapaticidas entre 1996 e 2006 e encontraram como principais grupos químicos descritos os piretróides, organofosforados, imidinas e as lactonas macrocíclicas. Além desses, existem suspeitas de resistência ao fipronil. Entre as drogas disponíveis no mercado

apenas fluazuron e spinosad ainda não foram relatados como drogas que já provocaram resistência.

O controle das formas de vida livre dos carrapatos que se desenvolvem nas pastagens pode ser realizado por meio de rotação de pastagens e introdução de pastagens com poder de repelência (ANDRADE, 2001).

Outro método de controle do carrapato seria a utilização de vacinas que poderiam conferir resistência ao hospedeiro, sem que ele tivesse contato prévio com o parasito (LABARTHE, 1994). Atualmente duas vacinas contra o carrapato bovino são comercializadas: a Tick-Gard, produzida na Austrália desde 1994 e a Gavac desenvolvida em Cuba. Ambas empregam como imunógeno uma proteína da membrana intestinal de *R. (B.) microplus*, que nas infestações naturais não é apresentada ao sistema imune do hospedeiro (WILLADSEN et al., 1995; WILLADSEN, 2004). Trabalhos realizados no Brasil com a vacina Tick-Gard em áreas com altas infestações naturais revelaram que somente seu uso isolado não foi capaz de controlar as populações de carrapato (PEREIRA et al., 2008).

Além das vacinas, a utilização de raças mais resistentes tem sido pesquisada como uma alternativa para a redução das populações de carrapatos. A introdução de bovinos *Bos indicus*, mais resistentes a estes parasitos quando comparados aos *Bos taurus* e seus cruzamentos, têm sido usadas com a finalidade de reduzir efetivamente a população de carrapatos (RIEK, 1962; WAGLAND, 1978; ARANTES et al., 1996; PIPER et al., 2009).

Em relação ao controle biológico, várias bactérias e fungos têm sido estudados para serem usadas no controle deste ácaro. Entretanto, as pesquisas ainda são incipientes, necessitando de mais investigações para determinar seu modo de ação e valor potencial (SAMISH et al., 2004).

No histórico do combate ao *R. (B.) microplus* desde o início do século XX até os dias atuais, observa-se o desenvolvimento de carrapaticidas com eficácias cada vez maiores. Todavia, tal eficácia, por si só, tem se mostrado incapaz de impedir o prejuízo causado por esses ixodídeos. (PEREIRA et al., 2008).

2.2. Utilização de extratos vegetais no controle de parasitas

Durante séculos, as plantas foram à única fonte de substâncias terapêuticas para o homem. Com o desenvolvimento da química farmacêutica, a partir do século XIX as plantas representavam o recurso mais importante para o desenvolvimento de medicamentos. Nos dias atuais, embora o desenvolvimento da fitoterapia tenha se expandido rapidamente, apenas 25% dos medicamentos prescritos são derivados de plantas e 120 substâncias de origem natural obtidos de cerca de 90 espécies de plantas, são empregados nos tratamentos modernos. Cerca de 40% das novas drogas que estão sendo desenvolvidas, são baseadas em produtos naturais (HOSTETTMANN et al., 2003).

Segundo WOOD (1983) as plantas produzem uma inconstante variedade de alomônios para protegê-las dos insetos fitófagos e outros herbívoros. Este autor afirma que é provável que a maioria desses metabólitos secundários seja biosintetizado para deter a predação. Muitas destas substâncias têm sido utilizados pelo homem, tais como alcalóides tóxicos, glicosídeos cianogênicos, glicosídeos cardíacos, dentre outros. Esses compostos não são estritamente necessários para o desenvolvimento ou reprodução da planta, contudo favorecem a melhor qualidade de vida (STARMANS & NIJHUIS, 1996).

Geralmente, os metabólitos secundários são armazenados pelas plantas em menores quantidades que os metabólitos primários, tornando-se compostos especiais, sendo, portanto mais valorizados no mercado. Na medicina popular, uma enorme variedade de plantas está sendo utilizada no controle parasitário. Contudo, na maioria das vezes o conhecimento científico de suas particularidades antiparasitárias é nulo ou está apenas no início das pesquisas (SAUERESSIG, 2002). Atualmente diversas plantas tem sido investigadas como candidatas a novos fármacos naturais, porém, existem ainda aproximadamente 350.000 plantas no mundo inteiro que ainda não foram submetidas a nenhum estudo fotoquímico e farmacológico (HOSTETTMANN et al., 2003).

A contaminação do meio ambiente que vem sendo causada pelo uso abusivo de carrapaticidas químicos é um sério problema, pois conduz à contaminação do solo, dos

recursos hídricos e provoca perturbação à saúde coletiva (PEREIRA & FAMADAS, 2004). O controle do carrapato por meio do uso de produtos menos tóxicos está se tornando cada vez mais atrativo devido às preocupações crescentes de segurança ambiental e saúde humana, principalmente pelo aumento gradual do uso de inseticidas químicos, dos custos gerados pelos mesmos e pelo aparecimento de resistência dos ácaros pelos acaricidas (SAMISH et al., 2004).

Realizando um levantamento quantitativo de plantas medicinais da vegetação da Caatinga do Brasil, ALBUQUERQUE et al., (2007) confirmaram que muitas plantas nativas desta região apresentavam alvos potenciais para futuros estudos farmacológicos e fitoquímicos. Os extratos de várias plantas originárias de regiões tropicais e subtropicais têm sido testados e algumas demonstraram atividade acaricida contra algumas espécies de carrapatos (BARROS & EVANS, 1989; CHUNGSAMARNYART et al., 1991; PRATES et al., 1993; CHUNGSAMARNYART & JANSWAN, 1996; WILLIAMS & MANSHING, 1996; OLIVO et al., 2008).

CHAGAS et al., (2002), avaliaram a ação biocida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp. contra larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, e comprovaram efeito acaricida contra os mesmos. Da mesma forma, FERNANDES & FREITAS (2007) avaliaram a atividade acaricida do extrato de Copaíba (*Copaifera reticulata*) contra as larvas do mesmo ácaro e confirmaram grande eficácia.

BORGES et al., (2003) encontraram significativo efeito acaricida dos extratos de Cinamomo (*Melia azedarach*), contra larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*. Estes autores verificaram elevada taxa de mortalidade de larvas e inibição parcial ou total da produção de ovos e da embriogênese. SOUSA et al., (2008), estudaram o efeito de extratos hexânicos da mesma planta e observaram altas eficácias e DL50 (doses letais para 50% de mortalidade) com cerca de 1,5 vezes menor para os extratos originários de frutos verdes, quando comparado aos de frutos maduros, embora ambos extratos nas maiores concentrações, tenham apresentado eficácia significativa.

COSTA JÚNIOR et al., (2002) avaliaram a efeito dos rotenóides extraídos do Timbó (*Derris urucu*) contra fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* e verificaram que em concentrações de 7,5 e 10,0 mg/mL mostraram-se eficazes. Resultados similares

foram encontrados por PEREIRA & FAMADAS (2004) que avaliaram a eficácia dos mesmos extratos sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*.

Avaliando o potencial larvicida do extrato bruto etanólico da casca do caule de “Sabão-de-Soldado” (*Sapindus saponaria*) sobre *R. (B.) microplus*, FERNANDES et al., (2005) verificaram resultados significativos nas concentrações letais de 50 e 90% contra esse ácaro.

ALVARENGA et al., (2004) estudaram o efeito do uso do alho (*Allium sativum*) no controle de *R.(B.) microplus* e verificaram redução da carga deste carrapato. Esses autores trabalharam com bovinos que ingeriram diferentes níveis do resíduo do beneficiamento da planta. Resultados semelhantes foram observados por FURLONG & COSTA-JÚNIOR (2008) que testaram o efeito do enxofre extraído do alho, no controle do mesmo carrapato.

2.3. O Nim (*Azadirachta indica*)

2.3.1. Distribuição, Taxonomia e Morfologia

O Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) é uma planta originária da Ásia e hoje está presente em áreas subtropicais e tropicais da África, América e Austrália (SCHUMUTTERER, 1990). No Brasil, as primeiras introduções realizadas para pesquisa desta planta como inseticida foram realizadas pelo IAPAR (Instituto Agrônomo do Paraná), em Londrina PR, em 1986 com sementes originárias das Filipinas (MARTINEZ, 2008).

Segundo a classificação taxonômica de De Jussieu (1830) citada por BISWAS et al., (2002) o Nim é classificado como:

- Ordem: Rutales;
- Subordem: Rutinae;
- Família: Meliaceae;
- Sub-família: Melioideae;
- Tribo: Melieae;
- Gênero: *Azadirachta*;
- Espécie: *Azadirachta indica*.

O Nim é uma planta perene ou decídua, bastante resistente e de crescimento rápido, em condições climáticas favoráveis podem atingir até 25 metros de altura. Os frutos possuem forma oval com comprimento entre 1,5 a 2,0cm e quando maduros apresentam uma polpa doce amarelada e tegumento branco contendo um óleo verde amarelado no interior da semente (SCHUMUTTERER, 1990). As folhas do Nim são verde-escuras, compostas, imparipenadas, simples e sem estípulas. Suas flores são hermafroditas, de cor branca, aromáticas com inflorescência densa, com estames formando tubo. Dependendo do local, do plantio, as árvores produzem frutos até duas vezes por ano, com produção de entre 30 a 50 kg por árvore (NEVES, 2004).

2.3.2. Compostos presentes nos extratos de Nim

Atualmente, diversas pesquisas conduzidas em várias partes do mundo tentam estabelecer os mecanismos de ação de compostos obtidos a partir de meliáceas sobre os insetos, principalmente com a espécie *Azadirachta indica*. Os compostos presentes nos extratos do Nim exercem atividade nos processos reprodutivos, comportamentais, alimentares e de crescimento dos artrópodes (SCHUMUTTERER, 1990; MORDUE & NISBET, 2000; MARTINEZ, 2008).

Mais de 135 compostos já foram isolados a partir de diferentes partes do Nim (BISWAS et al., 2002). Esses compostos foram divididos em dois grupos: isoprenóides e não-isoprenóides. Os isoprenóides incluem diterpenos e triterpenos, os quais contêm protolimonóides e limonóides. Os não-isoprenóides abrangem as proteínas e carboidratos, compostos sulfurosos, poli-fenólicos como os flavonóides e seus glicosídeos, taninos e compostos alifáticos (BISWAS et al., 2002).

O Nim fornece uma intensa quantidade de metabólitos secundários de atividades biológicas comprovadas sendo que seu principal produto um óleo retirado de suas sementes, qual contém inúmeros elementos ativos, sendo o limonóide azadiractina (AZA), o mais importante (NEVES, 2004). Entretanto, a concentração de AZA presente na semente do Nim pode variar consideravelmente, devido a fatores ambientais e possivelmente também por razões genéticas (SCHUMUTTERER, 1990).

A AZA extraída da semente do Nim é um poderoso regulador do crescimento de insetos, inibe a alimentação e apresenta alta toxicidade, porém esse composto se

degrada rapidamente, sendo muito sensível a ação da luz, umidade e variações do pH (GUERRINI & KRITICOS, 1998).

Os limonóides presentes no Nim (tetranortriterpenóides) são conhecidas por apresentar atividade contra insetos, principalmente na intervenção de seu crescimento por inibição de sua alimentação, conhecida como atividade fagoinibidora. A AZA é sem dúvida o limonóide com maior potencial de uso contra insetos, interferindo nas glândulas endócrinas que controlam a metamorfose e impedindo o desenvolvimento da ecdíase (CORRÊA & VIEIRA, 2007). Essa substância pode também inibir a vitelogenina durante a ovogênese de artrópodes (JONSSON & PIPER, 2007).

A avaliação de seu efeito tóxico foi revisada recentemente por BOEKE et al., (2004), que concluíram que quando utilizada de forma adequada, os seus resíduos não apresentam risco para a saúde humana e para o meio ambiente. Desse modo, a sua utilização na pecuária é uma alternativa aos princípios químicos geralmente tóxicos, rotineiramente utilizados no controle dos parasitas dos animais. A AZA surgiu como um pesticida natural que apresenta grande eficácia e biodegradabilidade, e por isso a sua produção em laboratório tem sido pesquisada (PRAKASH & SRIVASTAVA, 2006).

A falta de padronização pode ser um dos principais problemas encontrados na utilização dos extratos do Nim, como por exemplo, a parte da planta utilizada para a produção do extrato, pois os frutos concentram maior teor de AZA e a estabilização da solução já que a mesma pode ser facilmente degradada. Embora este princípio concentra-se principalmente nos frutos, existe uma grande variação nos teores encontrados em sementes de diferentes procedências (ERMEL, 1987). A grande maioria dos trabalhos científicos publicados utilizou soluções produzidas com a planta, sem a quantificação de seu princípio ativo que pode variar bastante com a parte da planta, relacionado ao seu desenvolvimento e sazonalidade, índice pluviométrico e sazonalidade, temperatura, altitude, condições e épocas para o cultivo e/ou coleta (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

HOSTETTMANN et al., (2003) determinaram que para a seleção de plantas medicinais, um dos critérios mais importantes é a observação do terreno, pois uma espécie que cresce em um ambiente hostil, tais como florestas tropicais em que a presença das mais diversas pragas é abundante, sintetiza maiores quantidades de

compostos com atividade inseticida. Esses compostos representam uma alternativa de controle de pragas.

2.3.3. Estudos da utilização do Nim contra parasitas

A atividade dos extratos de Nim contra diversos parasitas de animais domésticos vêm sendo estudada. HEATH et al., (1995) observaram que extratos desta planta foram eficazes contra *Bovicula ovis*, um piolho parasito de ovinos. HABLUETZEL et al., (2007) avaliaram o efeito de um extrato comercial de sementes de Nim contendo 125 e 650 ppm de AZA sobre a sobrevivência e reprodução de piolhos de cabras (*Damalinia limbata*), e verificaram que esse extrato produziu redução na sobrevivência dos estágios de ninfas e adultos e também interferiu na oviposição e oogênese destes piolhos.

COSTA et al., (2006) e CHAGAS & VIEIRA (2007), estudaram a atividade anti-helmíntica de folhas secas de Nim administradas por via oral e não observaram efeito contra estes parasitos.

GUERRINI & KRITICOS, (1998) avaliaram o efeito do uso tópico do extrato de sementes de Nim contra pulgas de cães e gatos (*Ctenocephalides felis felis*) e verificaram redução significativa da população desses parasitos nas doses utilizadas.

SCHMUTTERER (1990) afirmou que larvas de diversos mosquitos dos gêneros *Aedes* spp. e *Anopheles* spp. são sensíveis a AZA e mostram como sintomas da intoxicação, a redução da alimentação e do crescimento. WANDSCHEER et al., (2004) estudando o efeito de soluções de Nim contra o mosquito transmissor da dengue *Aedes aegypti* encontraram resultados satisfatórios, principalmente relacionados à atividade larvicida. Esses autores concluíram, no entanto, que a atividade do extrato pode ser ampliada pela introdução de processos de fracionamento e extração de limonóides mais eficazes.

Entre os trabalhos desenvolvidos com carrapatos resultados positivos foram observados por ABDEL-SHAIFY & ZAYED (2002), que estudaram o efeito de extratos oleosos de Nim sobre estágios imaturos e adultos do carrapato *Hyalomma anatolicum excavatum*. Eles encontraram efeitos significativos sobre as taxas de mortalidade das

larvas recém eclodidas e fêmeas ingurgitadas não alimentadas, sendo que as taxas de mortalidade aumentaram proporcionalmente à concentração da solução.

Em ensaios conduzidos usando o óleo do Nim contra o carrapato de camelos *Hyalomma dromedarii*, AL-RAJHY et al., (2003) observaram redução significativa na atividade de alimentação da larva, fato que provocou atraso na muda para o estágio de ninfa.

LUNDH et al., (2005) avaliaram o efeito do óleo do Nim contra ácaros de galinhas (*Dermanyssus gallinae*) e verificaram eficácia de 92% na redução desses ácaros. Resultados semelhantes foram observados por DU et al., (2008) que testaram a atividade acaricida dos extratos do Nim contra larvas de *Sarcoptes scabiei*, ácaro que provoca a escabiose ou sarna. DU et al., (2009) avaliaram outros extratos de Nim contra os mesmos parasitos confirmando sua eficácia.

LANDAU et al., (2009) estudaram o efeito do Nim contra o carrapato *Dermacentor variabilis*, parasito de ovinos. O extrato comercial Neem-Azal® foi administrado aos animais junto com a ração e os autores puderam observar a que a presença de AZA no sangue do animal era baixa, e provocou a redução na ingestão de sangue do animal pelo carrapato.

SANTOS et al., (2006) estudaram o efeito de pomadas contendo 5, 10 e 20% do extrato obtido a partir de folhas de Nim, sobre ácaros de camundongos (*Myobia musculi* e *Myocoptes musculinus*). Houve efeito acaricida nas concentrações de 10% e 20%, e foi ainda observada boa atividade cicatrizante dos extratos.

Em estudos com pragas de plantas VENZON et al., (2008) encontraram redução significativa na população de *Polyphagotarsonemus latus*, um ácaro que ataca as plantações de pimenta, quando usaram o produto comercial Neem Azal T/S.

Estudando extratos aquosos nativos de folhas, sementes e cascas de sementes do Nim, HELMY et al., (2007) observaram que todos os extratos apresentaram atividade inibitória contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*), Gra-negativas (*Escherichia coli*), leveduras (*Candida albicans*) e os fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium citrinum*.

2.3.4. Estudos da utilização do Nim contra carrapatos

CHUNGSAMARNYART et al., (1991) avaliaram o efeito do extrato etanólico das folhas de Nim sobre o estágio larval de *R. (B.) microplus*, e não observaram resultados significativos após 24 e 48 horas de contato das larvas com o extrato. WILLIAMS (1993) testou o efeito de soluções de Nim contra fêmeas ingurgitadas e observou efeitos adversos sobre a ovipostura e eclodibilidade de larvas do ácaro. Este autor trabalhou com extratos de sementes da planta extraídos em 95% de etanol por 120 horas a 25°C e que foram posteriormente filtrados e concentrados. SILVA et al., (2002) avaliaram duas formulações comerciais de Nim sobre fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. (B.) microplus*. Estes autores utilizaram diversas diluições (1,5; 10; 35 e 50%) do extrato oleoso em água destilada, e obtiveram eficácias muito baixas.

BENAVIDES et al., (2001), estudaram o efeito da pulverização de bovinos criados a campo, com soluções de Nim, sobre o *R.(B.) microplus*, e não encontraram diferenças em relação ao grupo controle tratado com acaricida a base de amitraz. Os autores salientaram, no entanto, que o experimento teria que ser repetido com maior número de animais nos grupos experimentais, já que foram utilizados apenas cinco por grupo.

FURLONG et al., (2002) estudaram a concentração letal de soluções de Nim para 50%(CL₅₀) e 90% (CL₉₀) de uma população de larvas de *R.(B.) microplus*. Eles encontraram que tanto os extratos aquosos como os alcoólicos necessitariam de concentrações muito altas para a obtenção de resultados satisfatórios, o que tornaria inviável a sua utilização no controle do parasito. SAUERESSIG (2002) também não encontrou resultados efetivos da utilização de soluções de folhas de Nim sobre as atividades ovarioestática, anti-embriogênica e sobre a eclodibilidade das larvas de *R.(B.) microplus*.

SILVA et al., (2007) testaram os efeitos do extrato etanólico do Nim contra *R.(B.) microplus* e verificaram a redução do período de pré-postura e de postura e redução da produção total de ovos. SRIVASTAVA et al., (2008) avaliaram a eficácia de extratos de sementes, folhas e galhos do Nim *in vitro* e *in vivo* contra *R.(B.) microplus*. Estes autores verificaram que os extratos derivados de sementes da planta, na concentração

de 8% apresentaram 80% de eficácia contra fêmeas ingurgitadas, que mostraram redução significativa da ovipostura. No experimento a campo, os mesmos autores também verificaram efeito acaricida do mesmo extrato, na mesma concentração, com 70,5% de mortalidade no quinto dia após o tratamento. MAGADUM et al., (2009) encontraram 71,8% de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, ao avaliar o extrato etanólico de sementes do Nim, na concentração de 8% *in vitro*.

3) OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram: preparar soluções de Nim com concentrações conhecidas de AZA e verificar seus efeitos sobre fêmeas ingurgitadas e sobre larvas do carrapato *R. (B.) microplus*.

4) MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Preparação de extratos de Nim

Os extratos de sementes de Nim foram produzidos nos laboratórios do Departamento de Química de Produtos Naturais da UFSCar. A metodologia empregada compreendeu uma série de procedimentos desenvolvidos pelos pesquisadores daquele departamento e que não serão totalmente descritos, porque ainda estão em processo de patenteamento.

O objetivo das extrações preparadas para neste experimento, foi à obtenção de óleos de Nim com alto teor de AZA e que pudessem ser reproduzidos com certa facilidade.

4.2. Obtenção e processamento das sementes de Nim

As sementes utilizadas neste experimento são provenientes das colheitas dos frutos de árvores plantadas em Paranavaí/PR e Juazeiro/BA. As sementes recebidas de Juazeiro foram utilizadas para a obtenção do óleo de Nim. O óleo foi extraído por meio de uma prensa mecânica. Após sua extração o óleo bruto foi filtrado e quantificado para a determinação do teor de AZA.

As sementes provenientes do estado do Paraná, depois de colhidas, foram colocadas em caixas de isopor e enviadas ao laboratório para processamento. As polpas que envolviam as amêndoas foram removidas para obtenção das mesmas. As amêndoas foram congeladas com nitrogênio líquido e trituradas. O preparo dos extratos seguiu o seguinte protocolo resumidamente: para cada Kg de amêndoas maceradas foram adicionados 10 L de *n*-hexano. Esta mistura foi colocada para macerar em ciclos de agitação mecânica por 10 minutos e repouso de 90 minutos. Estes ciclos foram repetidos oito vezes. A torta resultante deste processo foi submetida à extração com etanol. Para isto a torta foi misturada com etanol nas mesmas proporções descritas para a extração hexânica, e posteriormente macerada. Durante a maceração o material foi submetido a ciclos de agitação mecânica por 10 minutos e repouso de 12 horas, repetidos 12 vezes. O extrato etanólico assim obtido continha alto teor de AZA.

O fluxograma de produção pode ser visualizado na FIGURA 1.

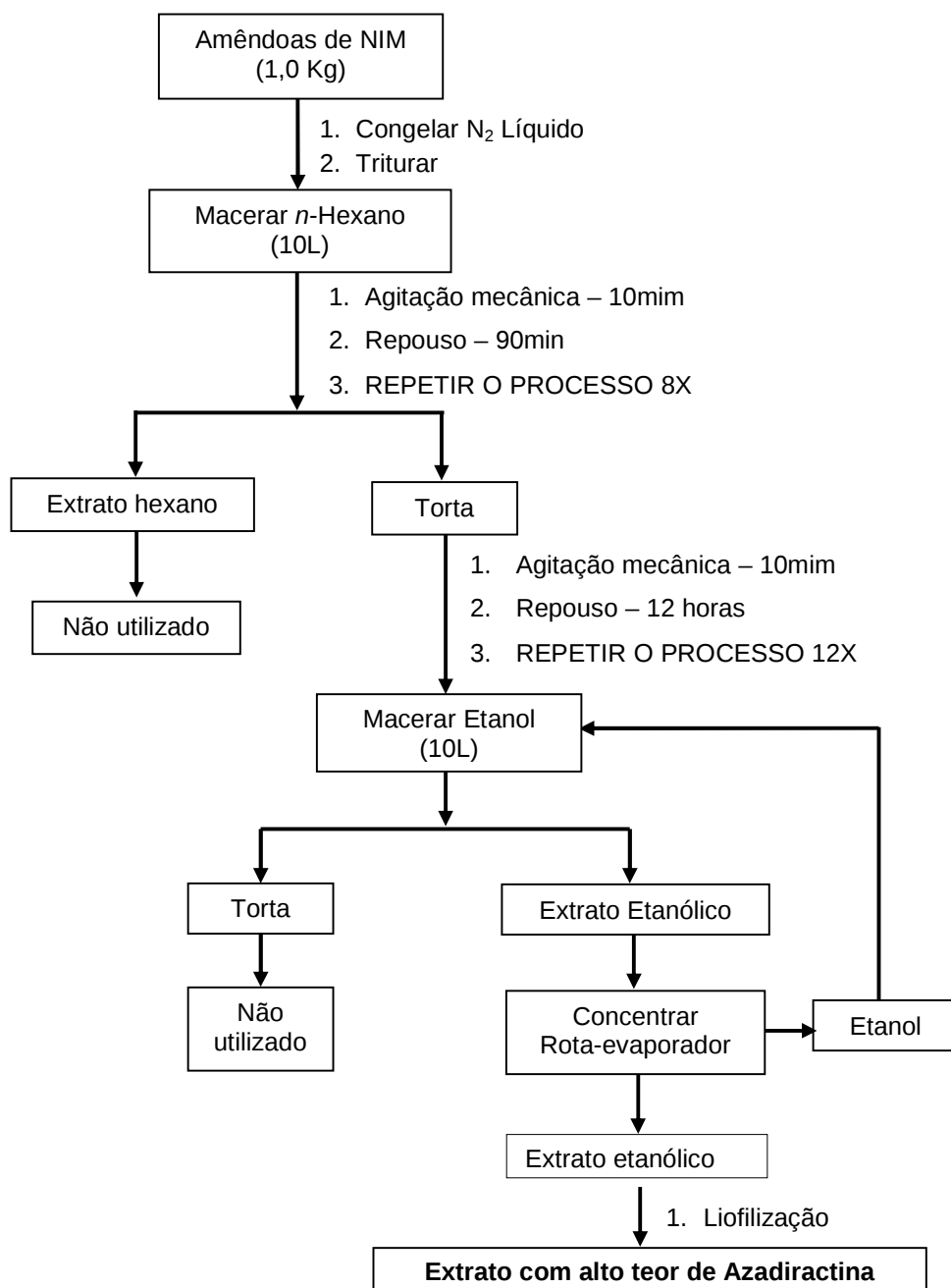


FIGURA 1. Fluxograma de preparação de extratos de Nim com alto teor de AZA.

O processo descrito permitiu obter o extrato de Nim com alto teor de AZA, que foi utilizado no processo de enriquecimento do óleo bruto de Nim.

Optou-se pela utilização do solvente *n*-hexano para o processo de extração por apresentar-se como um solvente de baixa polaridade. Esse solvente permitiu extrair compostos que apresentam baixa polaridade. A AZA possui polaridade média, se mantendo na torta. Neste caso, esse solvente foi utilizado como um procedimento de "limpeza", extraíndo primeiramente os compostos poucos polares considerados interferentes à AZA. Somente pós a extração química do óleo, a AZA foi extraída com etanol, obtendo um extrato etanólico mais concentrado.

4.3. Enriquecimento de óleo de Nim

Devido à diferença na polaridade entre o extrato etanólico liofilizado produzido em laboratório, e o óleo a ser enriquecido (polar → apolar) foi necessário o uso de um veículo para auxiliar a mistura. Para o enriquecimento de volumes conhecidos e óleo de Nim, massas conhecidas de extratos etanólicos com alto teor de AZA foram solubilizados em etanol e incorporados ao óleo. A quantidade de extrato utilizado foi estabelecida pelo teor de AZA no extrato e o teor final de AZA desejado no óleo. O processo de enriquecimento e a eficácia foram avaliados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Todos os extratos foram mantidos em freezer a -20 °C em frascos revestidos com papel alumínio até o momento dos ensaios.

Foram preparados extratos oleosos nas concentrações de 2.000ppm (N2), 5.000ppm (N5), 9.000ppm N (9) e 10.000 ppm (N10) de AZA a partir de extratos e óleos de Nim descritos acima.

O óleo bruto de Nim extraído por meio de uma prensa mecânica contém todos os compostos presentes de sua semente. Quanto maior foi concentração pretendida de AZA no óleo a ser enriquecido, menor foi a quantidade final deste óleo bruto utilizado para o enriquecimento deste composto. Portanto, os extratos com alto teor de AZA apresentaram uma menor quantidade de compostos de baixa polaridade considerados interferentes relativos à utilização do solvente hexânico que apresenta baixa polaridade. Deste modo, os óleos enriquecidos não apresentaram o mesmo perfil quantitativo de ácidos graxos, di e triterpenos e outros limonóides considerados compostos de baixa polaridade. Assim, os extratos com 2.000 ppm (N2) de AZA apresentou uma maior

quantidade de compostos de baixa polaridade, o de 5.000 ppm (N5) uma quantidade mediana, e os extratos com 9.000 ppm (N9) e 10.000 ppm (N10) as menores quantidades destes compostos.

4.4. Preparação das diluições de extrato de Nim

Extratos oleosos de Nim contendo 2.000 (N2), 5.000 (N5), 9.000 (N9) e 10.000 ppm (N10) de AZA foram testados contra fêmeas ingurgitadas e larvas de *R. (B.) microplus in vitro*. Para cada extrato foram feitas diluições utilizando uma solução de água destilada estéril, tween 80 a 0,66% como emulsificante e etanol a 30% para obtenção das seguintes diluições: 1,25%; 2,5%; 5,0%; 10,0% e 12,8%. Foram preparados também dois controles, um contendo somente água e outro contendo água adicionada de etanol a 30% e tween 80 a 0,66%. Todas as diluições dos extratos e os dois controles descritos acima foram utilizados tanto para o ensaio contra as fêmeas ingurgitadas, quanto para as larvas.

4.5. Colheita de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* e preparo dos ensaios

4.5.1. Colheita dos carrapatos

Foram colhidas fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, provenientes de bovinos de corte de diferentes grupos genéticos (puros *Bos indicus* e mestiços *Bos taurus* X *Bos indicus*) criados na Embrapa Pecuária Sudeste, que permaneceram sem tratamento acaricida por no mínimo 40 dias antes do dia da colheita. Este período permitiu a colheita de fêmeas que não apresentasse resíduo de qualquer tipo de acaricida utilizado no controle destes carrapatos. Todas as amostras foram acondicionadas em caixas de isopor e rapidamente transportadas para o laboratório de Sanidade Animal, onde foram lavadas, cuidadosamente secas com papel absorvente e pesadas em balança analítica. A identificação das fêmeas foi feita de acordo com as chaves de ARAGÃO & FONSECA (1961).

4.5.2. Ensaios com fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus*

Para o ensaio com fêmeas ingurgitadas foi usado o Teste de Imersão de Adultas (TIA) seguindo a metodologia proposta por DRUMMOND et al., (1973). Esse teste permite a comparação da mortalidade das fêmeas ingurgitadas e das taxas de oviposição/eclodibilidade de larvas entre as fêmeas dos grupos tratados e controles. As fêmeas de carrapato foram separadas em grupos de 10 ácaros, com pesos homogêneos (parcela experimental), usando-se três repetições para cada diluição do extrato a ser testado. As fêmeas foram imersas por cinco minutos nas soluções de Nim, e após este período elas foram secas com papel absorvente, acondicionadas em placas de Petri estéreis e incubadas em incubadora BOD (Biochemical Oxygen Demand), com temperatura controlada de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade superior a 80%. Durante a incubação foram feitas verificações diárias da mortalidade das fêmeas. Ao final da postura (18º dia), os ovos foram pesados e colocados em seringas de plástico, para verificação da taxa de eclosão das larvas.

A leitura de eclodibilidade das larvas foi realizada com a contagem do número de larvas e de ovos remanescentes não eclodidos, em uma amostra representativa do conteúdo das seringas, usando técnica descrita por AMARAL, (1993) com modificações. Esta metodologia foi realizada da seguinte maneira: as seringas contendo as larvas e/ou ovos remanescentes foram colocadas em estufa à temperatura de 40°C durante 24 horas, com o propósito de matar as larvas eclodidas e assim facilitar as contagens. As amostras de cada seringa foram homogeneizadas e porções colhidas ao acaso foram colocadas em placas de Petri e contadas com o auxílio de lupa. Para cada amostra foram feitas três contagens de 100 larvas ou ovos sendo calculada a média final por tratamento.

Os dados obtidos nos ensaios dos extratos nas diversas diluições com as fêmeas ingurgitadas foram utilizados para determinação dos seguintes parâmetros: Redução de postura (RP), Redução da eclodibilidade (RE), Eficiência reprodutiva (ER) e Eficácia do produto (EP), utilizando as seguintes fórmulas (DRUMMOND et al., 1973):

$$\text{RP (\%)} = \frac{\text{MOC} - \text{MOT}}{\text{MOC}} \times 100$$

Em que :

RP: Redução de postura

MOC: Peso da massa de ovos no grupo controle

MOT: Peso da massa de ovos no grupo tratado

$$RE (\%) = \frac{EC - ET}{EC} \times 100$$

Em que:

RE: Redução da eclodibilidade

EC: eclodibilidade média no grupo controle

ET: eclodibilidade média no grupo tratado

$$ER = \frac{MO \times E \times 20.000}{PF}$$

Em que:

ER: Eficiência reprodutiva

MO: Peso da massa de ovos do grupo tratado

PF: Peso de fêmeas ingurgitadas do grupo tratado

E: Eclodibilidade das larvas do grupo tratado

O número 20.000 se refere ao número aproximado de ovos de *R. (B.) microplus* contidos em um grama.

A Eficiência reprodutiva (ER) foi usada para determinação da Eficácia do produto (EP) por meio da fórmula:

$$EP (\%) = \frac{ER \text{ controle} - ER \text{ tratado}}{ER \text{ controle}} \times 100$$

Em que:

EP= Eficácia do produto

ER controle= Eficiência reprodutiva do grupo controle

ER tratado= Eficiência reprodutiva do grupo tratado

4.6. Preparo do ensaio com larvas

4.6.1. Obtenção das larvas de *R.(B.) microplus* em laboratório

Para os ensaios com as larvas foi utilizado o “Teste do Pacote com Larvas” (TPL) (STONE & HAYDOC, 1962), adotado como padrão pela FAO (1971). Foram escolhidas para obtenção de larvas, somente as fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* que apresentaram peso compreendido entre 160 a 300 mg, por ser considerado ótimo para obtenção de posturas (BENNETT, 1974). As fêmeas foram lavadas e acondicionadas em placas de Petri estéreis e incubadas em BOD a 27±1°C e umidade relativa superior a 80% para ovipostura (18 dias). Após esse período os ovos foram colocados em seringas descartáveis estéreis, identificados, tampados com rolha de algodão e novamente colocados em BOD nas mesmas condições de temperatura e umidade para a obtenção das larvas. Para o TPL, utilizou-se cerca de 100 larvas com idades entre 14 e 21 dias, que foram colocadas entre dois pedaços de papel de filtro (2 x 2 cm) previamente umedecidos com as soluções preparadas nas mesmas diluições descritas para os ensaios com as fêmeas ingurgitadas, e fechados como sanduíches (LEITE, 1988). Esses sanduíches contendo as larvas tratadas com os extratos e controles foram colocados dentro de um envelope de papel-filtro (6 x 6 cm) e foram fechados com pregadores. Foram realizadas três repetições para cada diluição, e incubados em estufa BOD nas mesmas condições descritas acima.

As leituras foram feitas com auxílio de lupa e bomba a vácuo, após 48 horas de incubação, separando-se as larvas vivas e mortas. Foram consideradas mortas todas as larvas que se apresentaram totalmente imóveis. A porcentagem da mortalidade foi determinada seguindo os seguintes cálculos (FAO, 1971):

$$M (\%) = \frac{MC - MT}{MC} \times 100$$

Em que:

M: Mortalidade

MC = Mortalidade no grupo controle

MT = Mortalidade no grupo tratado

$$MM = \frac{MR1 + MR2 + MR3}{3}$$

Em que:

MM = Mortalidade média

MR1 = Mortalidade de repetição 1

MR2 = Mortalidade de repetição 2

MR3 = Mortalidade de repetição 3

4.7. Análise Estatística

Para a realização das análises estatísticas da Eficácia do produto (EP) os ensaios dos extratos N2, N5, N9 e N10 foram considerados conjuntamente, sendo que o efeito de cada ensaio foi incluído no modelo de análise. Após análises preliminares buscando-se verificar o modelo mais adequado, optou-se por utilizar um modelo probit, incluindo os efeitos da concentração proporcional de AZA na solução (diluição da solução vezes a concentração de AZA do extrato) e o efeito principal (classificatório) de ensaio (extrato). Os dados foram analisados utilizando-se o procedimento PROBIT do pacote estatístico SAS, tendo sido calculadas as concentrações letais CL₅₀ e CL₉₀ para EP. O efeito da concentração foi transformado em logaritmo com base 10, para ser incluído no modelo.

5) RESULTADOS

5.1. Ensaio com as fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*

Os resultados dos ensaios com as fêmeas ingurgitadas relativos a Redução de postura (RP), Redução de eclodibilidade (RE) e Eficácia do produto (EP), para os extratos testados são apresentados na TABELA 1.

TABELA 1: Médias e desvios padrão das porcentagens de Redução de postura (RP), Redução de eclodibilidade (RE), Eficiência reprodutiva (ER) e Eficácia do produto (EP) para os extratos de Nim (*Azadirachta indica*) nas diluições de 1,25; 2,5; 5,0; 10,0 e 12,8% testados em fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*.

Extrato*	Controle	1,25%	2,5%	5%	10%	12,8%
N2	RP	-	0,43±6,52	14,49±13,02	37,11±12,11	53,36±18,67
	RE	-	0±0	6,66±11,55	23,33±32,14	20,00±26,46
	ER**	10,07±0,71	10,02±0,64	7,96±1,08	4,62±1,53	4,01±2,63
	EP	-	0,47±6,39	20,88±10,73	54,06±15,16	60,16±26,13
N5	RP	-	13,92±15,59	51,61±10,52	35,37±33,92	69,67±21,60
	RE	-	3,33±5,77	20,0±26,46	20,0±17,32	38,33±50,08
	ER**	9,76±0,74	8,10±1,50	3,90±1,78	5,12±2,84	2,06±2,12
	EP	-	17,04±15,35	60,04±18,22	47,55±29,05	78,91±21,75
N9	RP	-	-0,77±3,64	47,40±2,04	82,46±17,11	61,25±17,87
	RE	-	0±0	26,66±5,77	15,0±21,21	16,66±5,77
	ER**	9,76±0,74	9,85±0,36	3,77±0,41	2,07±0,38	3,21±1,68
	EP	-	-0,82±3,65	61,38±4,22	78,78±3,87	67,12±17,23
N10	RP	-	6,69±4,24	9,11±5,54	16,26±11,77	52,99±13,41
	RE	-	1,26±1,08	12,48±12,94	18,99±13,57	88,06±4,34
	ER**	9,86±0,74	9,06±0,38	7,86±1,56	6,77±2,04	0,52±0,13
	EP	-	8,05±3,85	20,27±15,88	31,25±20,70	94,72±1,30

*N2= Nim 2.000ppm; N5= Nim 5.000ppm; N9= 9.000ppm e N10= Nim 10.000ppm.

** 10⁺⁵

Os resultados da porcentagem de Redução de postura (RP), calculados para os quatro extratos testados, estão representados na FIGURA 2. O melhor efeito sobre a redução de postura foi observado para o extrato contendo 9.000 ppm de AZA (N9) diluído a 5%.

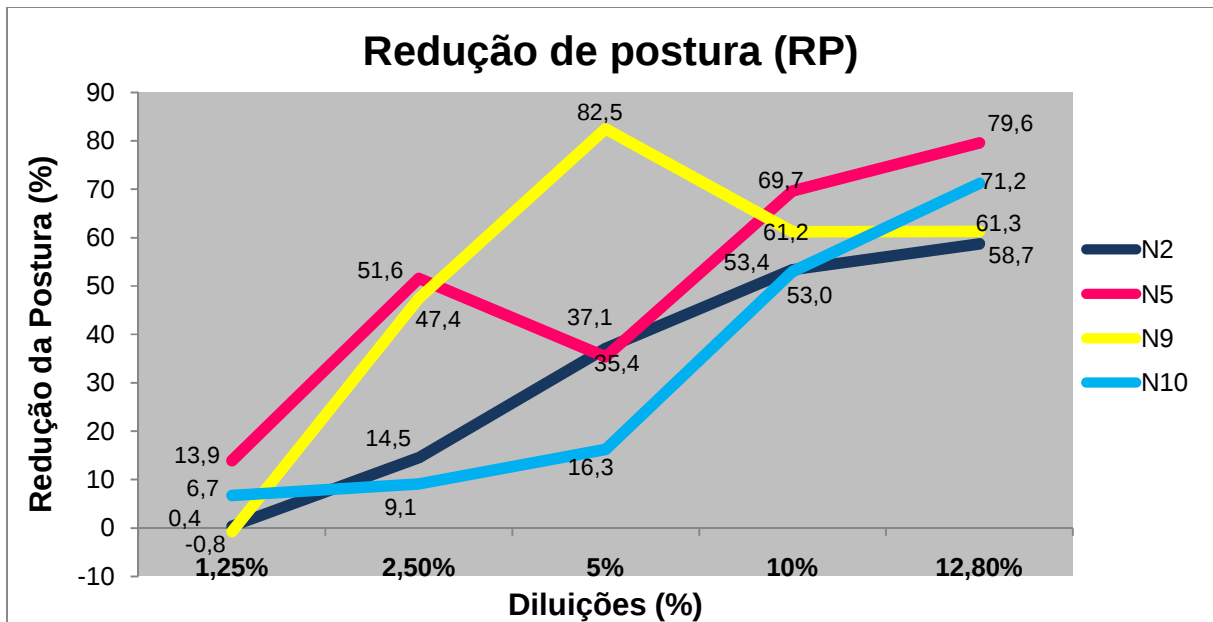


FIGURA 2: Resultados dos cálculos de Redução de postura (RP) dos extratos testados sobre fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*. N2: extrato Nim 2.000ppm; N5: Extrato Nim 5.000ppm; N9; extrato Nim 9.000ppm e N10: extrato Nim 10.000ppm de AZA.

Os dados de porcentagem de Redução da eclodibilidade (RE) calculados para os quatro extratos testados estão representados na FIGURA 3. A solução N10 diluída a 10% foi a que apresentou o melhor efeito de RE das larvas da progênie das fêmeas testadas.

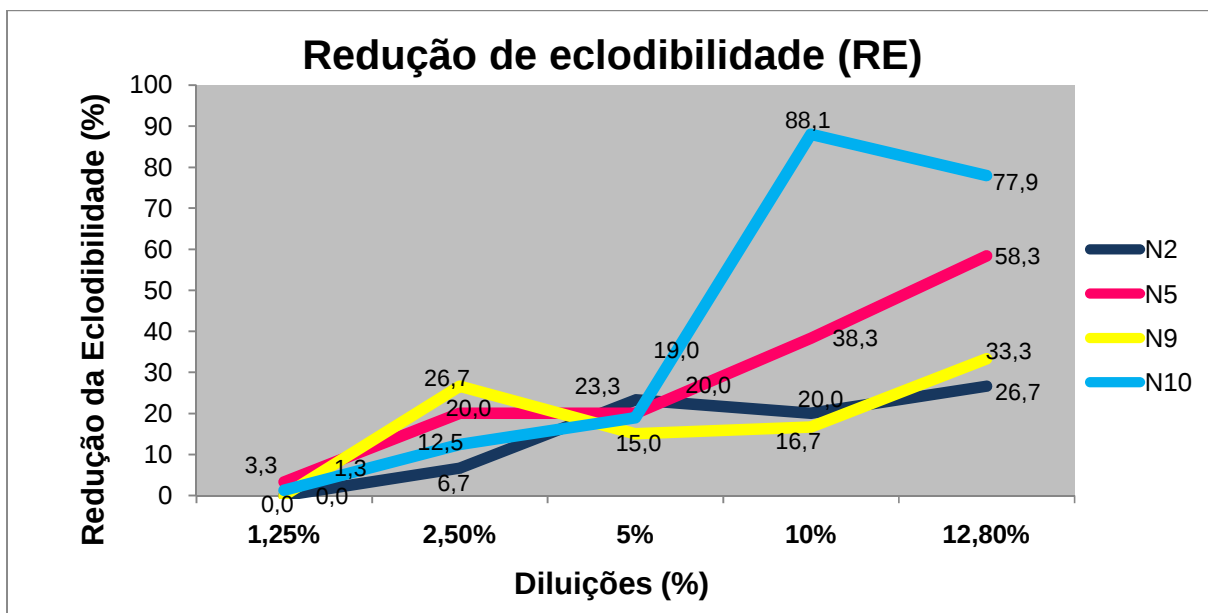


FIGURA 3: Resultados dos cálculos de Redução da eclodibilidade (RE) dos extratos testados sobre fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*. N2: extrato Nim 2.000 ppm; N5: Extrato Nim 5.000 ppm; N9; extrato Nim 9.000 ppm e N10: extrato Nim 10.000 ppm de AZA.

Os resultados da Eficácia do produto (EP) determinado para os quatro extratos testados estão representados na FIGURA 4.

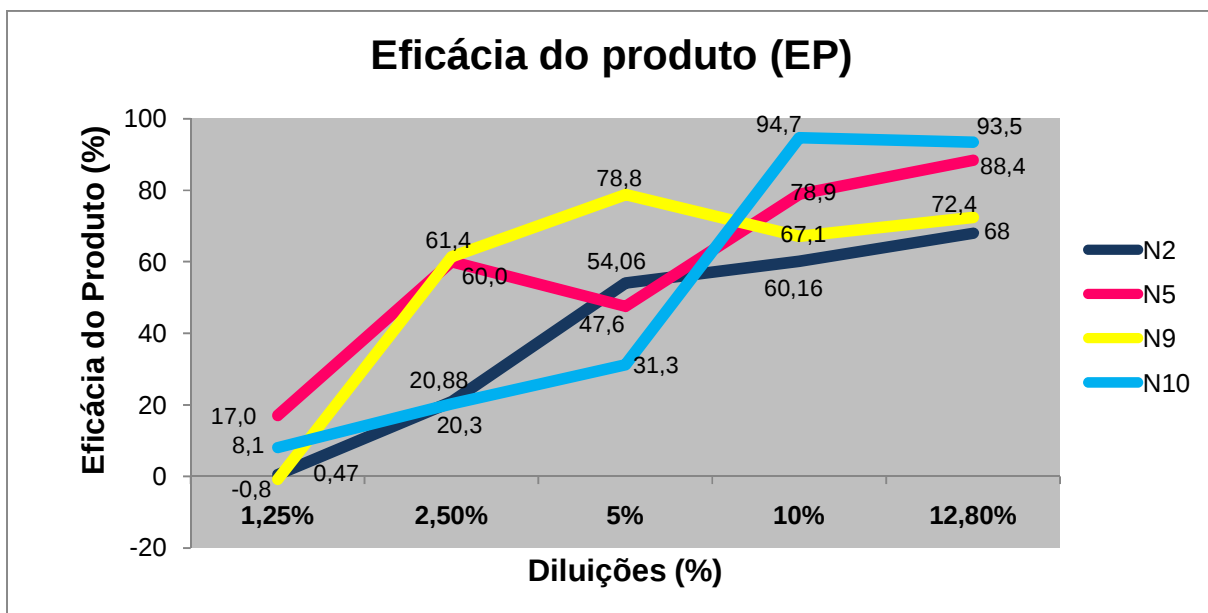


FIGURA 4: Resultado dos cálculos de Eficácia do produto (EP) dos extratos testados sobre fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*. N2: extrato Nim 2.000ppm; N5: Extrato Nim 5.000ppm; N9; extrato Nim 9.000ppm e N10: extrato Nim 10.000ppm de AZA.

O maior índice de EP foi observado para as soluções com os maiores teores de AZA (N10), diluída a 10%.

Os resultados dos cálculos das Concentrações Letais (CL) para 50% e 90% nos ensaios com as fêmeas ingurgitadas, estão apresentados na TABELA 2.

TABELA 2: Concentrações Letais de cada extrato estimadas pelo modelo de Probit a partir dos parâmetros de Eficácia do produto (EP), de acordo com o extrato de Nim utilizado nos ensaios com fêmeas ingurgitadas de *R. (B) microplus*.

Concentração Letal	Extratos			
	N2	N5	N9	N10
	Valores de CL(%)	Valores de CL(%)	Valores de CL(%)	Valores de CL(%)
	(Máx. - Mín.)	(Máx. - Mín.)	(Máx. - Mín.)	(Máx. - Mín.)
CL ₀₁	0,85	1,106	2,25	3,05
CL ₀₅	1,87	2,431	4,94	6,70
CL ₁₀	2,85	3,700	7,51	10,19
CL ₁₅	3,78	4,911	9,98	13,53
CL ₂₀	4,74	6,152	12,50	16,95
CL ₂₅	5,75	7,463	15,16	20,56
CL ₃₀	6,84	8,877	18,03	24,46
CL ₃₅	8,03	10,425	21,17	28,73
CL ₄₀	9,35	12,143	24,66	33,46
CL ₄₅	10,84	14,074	28,59	38,78
CL ₅₀	12,53	16,275	33,06	44,85
CL ₅₅	14,49	18,819	38,22	51,86
CL ₆₀	16,80	21,812	44,30	60,10
CL ₆₅	19,57	25,406	51,60	70,01
CL ₀₇	22,98	29,837	60,61	82,22
CL ₇₅	27,33	35,490	72,09	97,80
CL ₈₀	33,16	43,053	87,45	118,64
CL ₈₅	41,53	53,927	109,54	148,60
CL ₉₀	55,14	71,59	145,41	197,28

Limite de confiança= 95% (Máximo – Mínimo)

N2= Nim 2.000ppm; N5= Nim 5.000ppm; N9= Nim 9.000ppm e N10= Nim 10.000ppm.

Os resultados mostraram significância ($p < 0,01$) dos dois efeitos incluídos no modelo, indicando variações significativas tanto devidas à concentração de AZA, quanto do ensaio realizado. Como esperado, o aumento na concentração de AZA aumenta a eficácia como é possível de se verificar a partir das eficácias preditas mostradas na FIGURA 5, para cada um dos ensaios.

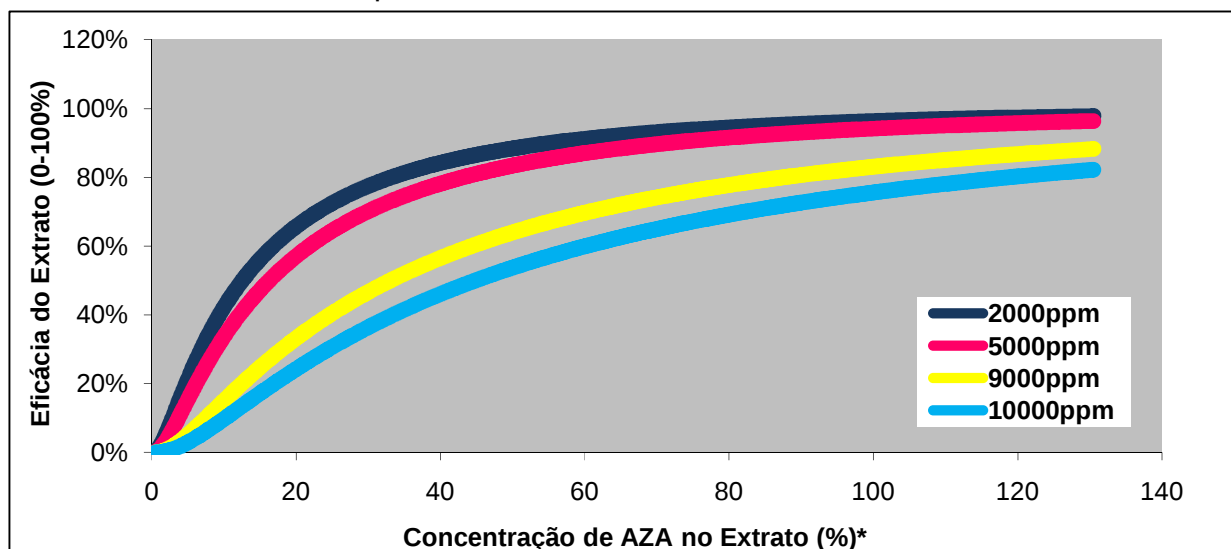


FIGURA 5: Efeitos da concentração proporcional da AZA na solução sobre fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus*.

*Diluição do extrato vezes a quantidade do extrato em ppm.

O efeito do ensaio está parcialmente confundido com o efeito da concentração, uma vez que cada ensaio foi realizado com um extrato diferente e as mesmas diluições foram aplicadas a cada um dos extratos nas soluções utilizadas. Desta forma, não seria esperado efeito significativo deste efeito, exceto se causado por fatores não identificados por ocasião da realização do ensaio. Apesar disto, o efeito de ensaio foi significativo, indicando que ocorreu um comportamento diferente a cada ensaio. Observando-se na FIGURA 5, pode-se inferir que quanto maior a concentração de AZA no extrato utilizado no ensaio, menor seria a sua eficiência relativa. Ou ainda, como se pode verificar na FIGURA 6, que o aumento na eficiência depende mais da diluição aplicada sobre o extrato, do que da concentração de AZA, indicando que outros compostos eventualmente presentes no extrato poderiam ser responsáveis pelo aumento da eficiência. De uma maneira geral, à medida que a quantidade do extrato na solução aumenta, ocorre um aumento de sua eficiência.

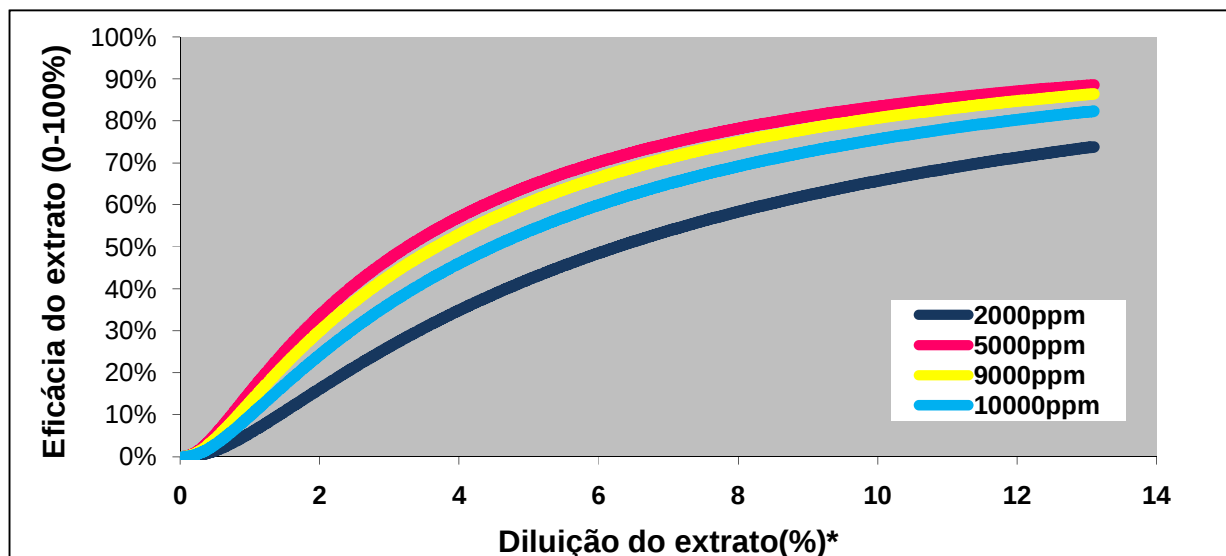


FIGURA 6: Efeitos das diluições dos extratos do Nim sobre fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus*.

*A diluição do extrato refere-se ao aumento da quantidade do extrato na solução.

As CL_{50} para todos os extratos testados foram de 12,52% (N2), 16,23 (N5), 33,06% (N9) e 44,85% (N10), e as CL_{90} foram de 55,14% (N2), 71,59% (N5), 145,41% (N9) e 197,28% (N10). A menor concentração exigida para 50% e 90% de mortalidade das fêmeas foi para o extrato N5.

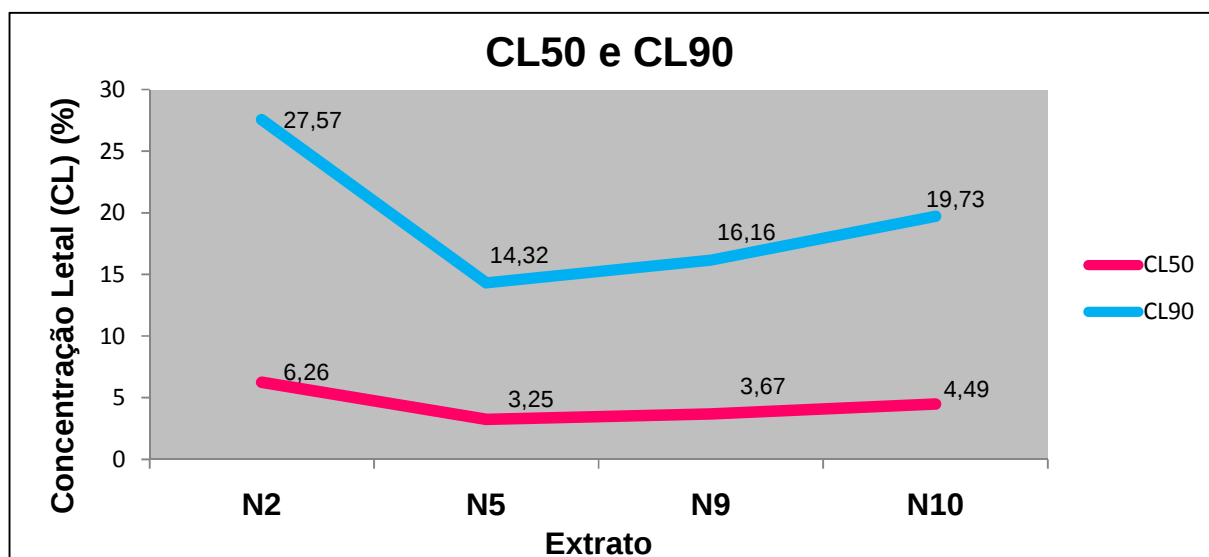


FIGURA 7: Concentrações Letais (CL) de 50 e 90% de cada extrato testado sobre fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus*. Os valores de CL foram divididos em relação aos valores da concentração de AZA de cada extrato.

5.2. Ensaaios com as larvas de *R. (B.) microplus*

As leituras da mortalidade larvar indicaram eficácia zero dos extratos, ou seja, não ocorreu mortalidade das larvas, em todos os extratos avaliados. As larvas expostas aos tratamentos apresentaram morfologia e comportamento normais.

6) DISCUSSÃO

Os experimentos conduzidos no Laboratório de Química de Produtos Naturais da UFSCar mostraram que é possível a obtenção de soluções de Nim com altos teores de AZA, quantificada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A AZA presente nos extratos e óleos do Nim é o composto mais estudado no controle de pragas e insetos (COHEN et al., 1996) e é considerado o princípio ativo mais importante presente nas sementes desta planta, embora vários autores tenham relatado a presença de outros limonóides com ação inseticida (SCHUMUTTERER, 1990; NEVES, 1994; MORDUE & NISBET, 2000; BRAHMACHARI, 2004; MARTINEZ, 2008).

Os resultados obtidos nos ensaios com fêmeas ingurgitadas mostraram que o principal efeito tóxico produzido pelos extratos, está relacionado com a inibição da reprodução deste parasito. Foram verificadas reduções nas taxas de ovipostura e eclodibilidade das larvas oriundas das fêmeas tratadas com várias diluições dos extratos em relação aos controles. Efeitos semelhantes do uso dos extratos de Nim foram observados por ABDEL-SHAIFY & ZAYED (2002) que avaliaram o efeito do Nim comercial Neem Azal F sobre os ovos do carrapato *Hyalomma anatolicum excavatum*. Estes autores observaram reduções de eclodibilidade de 35%, 34%, 52% e 60% no décimo quinto dia após o tratamento, com aquele produto diluído a 1,6; 3,2; 6,4 e 12,8%, respectivamente. Esses autores sugeriram que a razão da redução na produção de ovos das fêmeas do *H. anatolicum excavatum* naquele experimento foi devido à presença da AZA no extrato comercial usado nos testes, que atuaria como um estimulante para a eclodibilidade das larvas, tornando incompleto seu desenvolvimento e provocando a sua morte em poucas horas após a eclosão.

De uma maneira geral, no presente experimento, os extratos avaliados nos ensaios com fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus*, provocaram importante redução nos índices de eclodibilidade (RE) das larvas originadas das fêmeas tratadas. Nos testes com o extrato N10 diluído a 10% e 12,8% foram observadas reduções de 88% e 77,9%, respectivamente (FIGURA 3).

Não se sabe com certeza a causa dos problemas reprodutivos causados pelos extratos de Nim aos carrapatos, porém, especula-se que podem ser consequência de alterações no processo reprodutivo das fêmeas, causado pela toxicidade dos princípios presentes nestes extratos. Efeitos deletérios sobre a progênie de fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* tais como o aumento do período de pré-postura e do período de postura e a redução da produção total de ovos também foram observados por SILVA et al., (2007) em ensaios com extrato etanólico do Nim.

Reduções nos índices de postura e eclodibilidade das larvas dos carrapatos também foram verificadas em testes com plantas pertencentes à mesma família do Nim (Meliaceae). FARIAS et al., (2007), avaliaram a eficácia do extrato hexânico da planta vulgarmente conhecida como Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.), contra *R. (B.) microplus* e observaram ausência de eclodibilidade (0%) em todos os tratamentos estudados. Estes autores trabalharam com concentrações bastante elevadas dos extratos (10 a 100%). SOUSA, et al., (2008) avaliaram a eficácia dos extratos oleosos de outra meliácea, o Cinamomo (*Melia azedarach*). Para produção dos extratos foram usados frutos verdes e maduros que foram armazenados em temperatura ambiente e em geladeira. Nos estudos contra fêmeas adultas de *R.(B.) microplus* foram verificadas reduções de postura e eclodibilidade significativas para todos os extratos avaliados.

A redução da massa de ovos produzida por fêmeas de carrapato tem sido verificada em diversos ensaios *in vitro*, no qual foram usados os extratos de Nim contra as fêmeas. SRIVASTAVA et al., (2008) verificaram que o extrato das sementes do Nim a 8% provocaram redução de cerca de 34,0 mg da massa de ovos produzida por fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* tratadas, quando comparados com o grupo controle não tratado que produziu 50,1 mg de ovos. Resultados semelhantes para redução de postura foram encontrados no presente trabalho para os extratos N5 que apresentaram RP de 69,7% e N10 71,2%.

Avaliando a ação do extrato hexânico de frutos maduros de Cinamomo (*Melia azedarach*) BORGES et al., (2003) verificaram total inibição da postura com os extratos diluídos a 0,25%. Os autores avaliaram que este resultado foi consequência do efeito nocaute causado por este extrato, com a morte imediata das fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus*. Nos ensaios realizados contra fêmeas ingurgitadas deste carrapato

com os extratos do Nim no presente experimento, embora não tenha sido observado tal efeito, puderam-se observar altos índices de RP, principalmente para os testes em que foram usados os extratos nas maiores concentrações de AZA, como o N10 diluídos a 10% e 12,8% que provocaram 88% e 77,9% na RP, respectivamente.

Os resultados obtidos nos testes com fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, relativos à RE das larvas, mostraram que embora o extrato N9 tenha apresentado a maior taxa de RE, 82,4%, ela foi bastante próxima daquela obtida para o extrato N10 (79,6%).

Quanto aos cálculos de eficácia para todas as soluções testadas pode-se observar que a solução N10 apresentou a maior eficácia, devido principalmente ao seu efeito sobre a eclodibilidade das larvas. Resultados semelhantes foram verificados por SOUSA et al., (2008), quando testaram os extratos dos frutos maduros de outra Meliaceae, *Melia azedarach* a uma concentração de 0,25% e observaram um percentual de eclosão de 0,7%, e percentual de eficácia de 99,7%.

Aparentemente a maior eficácia obtida no presente trabalho ocorreu com a solução que apresentou a maior quantidade do extrato. Esse resultado pode estar associado ao aumento da quantidade do extrato como um todo e não somente na concentração de AZA. Através dos resultados das análises estatísticas, pode-se observar um aumento na eficácia dos extratos com o aumento da quantidade do extrato na solução, independentemente de cada extrato avaliado. ABDEL-SHAIFY & ZAYED (2002) estudando o efeito do extrato comercial de sementes do Neem Azal F sobre fêmeas ingurgitadas do carrapato *Hyalomma anatolicum excavatum*, verificaram eficácias entre 90 a 100% no produto testado. Esses autores trabalharam com concentrações de 1,6%, 3,2%, 6,4% e 12,8% e observaram que a mortalidade aumentava de acordo com o aumento relativo da concentração do produto.

Na maioria dos extratos avaliados neste estudo, à medida que se aumentava a quantidade do extrato na solução, aumentavam-se as porcentagens dos índices de RP, RE e EP. NUDMU et al., (1999) observaram que dois fatores principais influenciaram a eficácia de extratos de Nim testados por eles: o tempo de exposição ao óleo e a quantidade do óleo no extrato. Eles puderam observar que quanto maior o tempo de exposição ao óleo e quanto maior a quantidade do óleo no extrato, maiores eram as

eficácias dos produtos testados. No presente trabalho o tempo de exposição das fêmeas aos diferentes extratos foram iguais e por isto só puderam-se observar os efeitos das diversas quantidades dos extratos oleosos presentes nas soluções preparadas.

SRIVASTAVA et al., (2008) verificaram dentre os extratos de Nim testados contra fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus*, que o extrato da semente a uma concentração de 8% foi o mais eficaz (80%). Esses autores trabalharam com concentrações de 1 a 8%, verificando que a maior concentração foi a mais eficaz. Além dos extratos de sementes, esses autores trabalharam com extratos de galhos e folhas, apresentando eficácias inferiores comparados com as das sementes, o que indicou que a origem dos extratos de Nim pode ser muito importante para a obtenção de soluções mais ricas nos princípios ativos desejados. MAGADUM et al., (2009) também encontraram resultados significativos avaliando o extrato etanólico de sementes do Nim nas mesmas concentrações contra fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, observando 71,8% de mortalidade das mesmas. Esses estudos corroboram os resultados encontrados no presente trabalho que indicam que a eficácia do produto está associada à presença de substâncias específicas nos extratos testados.

O que se notam nos trabalhos da literatura é que, em sua maioria, associam a AZA como o principal composto de ação anti-parasitária. Entretanto, pesquisas que abordam a avaliação dos compostos do Nim contra os carrapatos, especialmente à espécie *R.(B.) microplus* ainda são incipientes. Foi observado no presente estudo, que a quantidade do extrato na solução é o principal fator que influencia os efeitos deletérios contra a progênie de fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. (B.) microplus* (FIGURA 4). As análises estatísticas mostraram que à medida que o extrato de Nim está presente em uma maior quantidade, torna-se mais eficaz, independentemente da concentração de AZA. Outros limonóides oriundos das sementes podem estar influenciando os resultados, como por exemplo, à medida que o teor de AZA foi enriquecido nos extratos pode ter ocorrido uma redução gradual da quantidade dos outros princípios presentes no extrato bruto de Nim. Geralmente, a precisão dos efeitos de vários tipos de extratos de árvores de Nim em relação ao controle de pragas é difícil

de ser apontada, uma vez que a complexidade dos compostos e seus diversos modos de ação representam obstáculos na elucidação dos mecanismos envolvidos.

Além da AZA, outros constituintes eventualmente presentes nos extratos do Nim podem apresentar efeitos de controle sobre as fêmeas ingurgitadas influenciando o aumento da eficácia, como pode ser verificado pelas análises estatísticas neste estudo a partir da análise do modelo Probit. Outros limonóides presentes em extratos de Nim vêm mostrando efeitos tóxicos destas substâncias sobre parasitos, como foi verificado por COHEN et al., (1996) que observaram a existência de dois outros limonóides nos extratos do Nim denominados nimbolida e epoxiazadiradiona e que apresentam potencial citotóxico. O presente trabalho demonstrou que a presença de outros constituintes no extrato de Nim, além da AZA demonstraram ação acaricida sobre fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*. Contudo, mais estudos são necessários para determinação exata destas substâncias, sua constituição química e seu exato papel no efeito acaricida dos extratos de Nim.

Os resultados dos cálculos das CL₅₀ e CL₉₀ para todos os extratos testados contra as fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* demonstraram que o extrato N5 foi o que exigiu as menores concentrações para a mortalidade destas fêmeas, embora significativo, não fossem verificadas grandes variações nas concentrações requeridas para mortalidade entre os extratos, principalmente para as CL₅₀. Resultados semelhantes foram observados por OLIVEIRA et al., (2007) quando avaliaram a ação do óleo de Nim enriquecido com AZA sobre *R. (B.) microplus*, e observaram valores de CL₅₀ e CL₉₀ de 3,1% e 24,6%, respectivamente. SRIVASTAVA et al., (2008) também observaram valores semelhantes de CL₅₀ quando testaram os extratos de sementes de Nim contra o mesmo carrapato. Esses autores verificaram que o valor determinado para essa concentração letal era de 5,12%, com 24 horas após o tratamento com o extrato. Da mesma forma, BENAVIDES et al. (2001) observaram, após teste de imersão de fêmeas ingurgitadas em extratos etéreos da semente do Nim, que a DL99 para inibição da oviposição, calculada por meio do Probit, seria de 28,1%. Já FURLONG et al., (2002) estudaram a concentração letal de soluções de Nim para CL₅₀ e CL₉₀ de uma população de larvas de *R.(B.) microplus*, e encontraram que os extratos aquosos e alcoólicos necessitariam de concentrações muito altas para a obtenção de resultados

satisfatórios. Na verdade tem sido relatada uma maior sensibilidade das fêmeas ingurgitadas ao extrato do Nim, em relação às larvas, que pode ser atribuída a diferente natureza de suas cutículas.

A utilização do solvente hexânico para o processo de extração permitiu produzir um extrato com alto teor de AZA. Por apresentar afinidade com compostos de baixa polaridade, esse solvente permitiu a extração das amêndoas do composto AZA, este por sua vez, apresenta média polaridade, produzindo um extrato com alto teor desse composto. Embora este extrato fornecesse uma maior concentração de AZA, outros limonóides constituintes de média e alta polaridade estariam presentes neste extrato e devem ser considerados no efeito dos achados do presente trabalho. Portanto, devemos considerar que além da AZA, os extratos produzidos e utilizados no presente trabalho apresentavam outros limonóides de baixa, média e alta polaridade, que variaram sua quantidade em função da quantidade do extrato com alto teor de AZA exigido para o enriquecimento do óleo a ser produzido, que podem ter influenciado nos resultados obtidos no presente estudo.

A partir dos resultados obtidos com os diferentes extratos testados no presente estudo, podemos inferir algumas possibilidades. Se observarmos a metodologia utilizada para a produção dos extratos, podemos verificar que quando foi preparado um extrato oleoso com menor concentração de AZA, muitos limonóides característicos do Nim de baixa polaridade permaneceram no óleo, em função de uma menor quantidade do extrato com alto teor de AZA exigida para o enriquecimento desse óleo, que contém todos os constituintes extraídos das amêndoas. De uma maneira geral, o extrato que continha a menor concentração de AZA apresentou uma maior quantidade desses outros limonóides de baixa, média e alta polaridade favorecendo o efeito acaricida. Ao contrário, à medida que se aumentou a concentração de AZA nos extratos, a quantidade dos outros limonóides de baixa polaridade foi diminuída, provocando um efeito relativamente menor do que o esperado.

Desta maneira, como foi observado nas análises estatísticas que o extrato N5 apresentou as melhores concentrações para mortalidade das fêmeas ingurgitadas, dentre os extratos avaliados, este extrato pode ser considerado o mais adequado para a utilização como carrapaticida. Ao compararmos esse extrato com os outros extratos

avaliados, este apresenta quantidades medianas do óleo bruto e AZA, quando observados em N9 e N10, que apresentavam altos teores de AZA, e no extrato N2, que ao contrário, apresentava uma maior quantidade de outros limonóides de baixa polaridade e uma menor concentração de AZA e outros limonóides de média e alta polaridade.

Com base nestes resultados, pode-se observar que, além da AZA e outros limonóides de média e alta polaridade presentes nos extratos, os limonóides de baixa polaridade, como por exemplo, os ácidos graxos, também podem ser atribuídos para uma melhor eficiência dos extratos de Nim contra fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus*.

Outra razão para se questionar em relação ao baixo efeito individual esperado da AZA sobre as fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, é que este pode estar relacionado ao fato da AZA apresentar alta afinidade por soluções aquosas. Lembrando que para a diluição dos extratos oleosos utilizados no presente estudo, foi utilizada uma solução aquosa (água) para permitir a solubilização destes extratos nas diferentes diluições já citadas. Uma vez que este composto apresenta alta afinidade com a água, durante o tempo de imersão das fêmeas, o mesmo possa não ter sido absorvido pela cutícula da fêmea ingurgitada, sendo esta constituída primeiramente por uma camada externa de ceras, a epicutícula, que é lipossolúvel (BALASHOV, 1972).

Com relação aos resultados obtidos a partir do teste de impregnação das larvas com os extratos do Nim não foram verificadas eficácias dos extratos, ou seja, não ocorreu mortalidade das larvas com nenhum dos extratos testados. CHAGAS et al., (2003) avaliando a sensibilidade do carrapato *R.(B.) microplus* a diversos solventes, verificaram que, de uma maneira geral, as fêmeas se mostraram mais sensíveis aos solventes do que as larvas. Esses autores salientaram que a diferença na constituição da cutícula entre larvas e fêmeas ingurgitadas pode ser a causa dos seus resultados. A cutícula dos carrapatos é composta externamente por uma camada de ceras denominada de epicutícula e internamente por uma camada composta por quitina e proteína, chamada de procutícula (BALASHOV, 1972). Segundo ODHIAMBO (1982), a camada de ceras ou de lipídeos é observada em *R.(B.) microplus* somente a partir da ecdise da ninfa e, em maior quantidade, no adulto. Portanto, nas fêmeas ingurgitadas

expostas ao extrato é necessário que primeiro ocorra a dissolução da camada de ceras da epicutícula para que o extrato penetre nas camadas mais polares da cutícula, constituídas de proteínas hidrossolúveis. Este autor comenta que quanto mais lipossolúvel ser o produto químico, maior será a facilidade inicial que encontrará para penetrar a cutícula. O extrato oleoso de Nim utilizado neste estudo, como sendo lipossolúvel, pode auxiliar no rompimento da epicutícula, facilitando posteriormente penetrar nas camadas hidrossolúveis.

Como relatado, o estágio larval não apresenta tal composição lipossolúvel envolvendo sua carapaça, assim não facilitando a absorção dos compostos de baixa polaridade presentes nos extratos pelas larvas. Outra evidência que pode ter colaborado para os resultados obtidos nos testes com larvas no presente estudo, pode estar relacionado ao teste do papel impregnado utilizado. PASSOS (1994) observou que a celulose do papel diminui a toxicidade de alguns defensivos químicos, capturando o princípio ativo e retendo-o. O mesmo foi evidenciado por CHAGAS et al., (2003) quando estudaram a sensibilidade do carrapato *R.(B.) microplus* a solventes e relataram que o teste de imersão de larvas demonstrou possibilitar um contato maior com o solvente do que o teste com papel impregnado.

Como citado no presente experimento, é possível a obtenção de extratos de Nim quantificados para os teores de AZA e que os extratos concentrados de Nim apresentam grande potencial para serem usados no controle do carrapato *R. (B.) microplus*. Estudos posteriores serão necessários para a determinação de todos os constituintes dos extratos e seu real papel na ação tóxica dos extratos desta planta sobre a progênie do carrapato, assim como sobre o seu efeito em experimentos *in vivo*.

7) CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente estudo, conclui-se que:

- É possível preparar extratos de Nim com teores de AZA conhecidos e reprodutíveis;
- Os extratos oleosos de sementes de Nim apresentaram atividade inibidora da reprodução em fêmeas adultas de *R.(B.) microplus*;
- Os extratos oleosos das sementes de Nim não apresentaram atividade contra larvas de *R.(B.) microplus*;
- Os resultados dos ensaios biológicos com fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* demonstraram que as eficácias dos extratos testados dependem da presença de várias substâncias nos extratos e não somente da concentração de AZA.

8) REFERÊNCIAS

- 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). *Vet Parasitol*, Amsterdam, v. 106, p. 89-96, 2002.
- ALBUQUERQUE, U.P. et al. Medicinal plants of the caatinga (Semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *J Ethnopharmacol*, Berkeley, n.114, p.325-354, 2007.
- AL-RAJHY, D.H. et al. Acaricidal effects of cardiac glycosides, azadirachtin and neem oil against the camel tick, *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae). *Pest Manag Sci*, Chichester, n.59, p.1250–1254, 2003.
- ALVARENGA, L.C. et al. Alteração da carga de carrapatos de bovinos sob a ingestão de diferentes níveis do resíduo do beneficiamento do alho. *Ciênc Agrotec*, Lavras, v.28, n.4, p.906-912, 2004.
- AMARAL, N.K. Guidelines for the evaluation of ixodicides against the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Rev Bras Parasitol Vet*, Rio de Janeiro, v. 2, n. 2, p.144-151, 1993.
- ANDRADE, A.B.F. et al. Análise genética da infestação de fêmeas da raça Caracu por carrapato (*Boophilus microplus*) e mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*). Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2001.
- ARAGÃO, H., FONSECA, F. Notas de Ixodologia. VII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica Brasileira. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 59, p. 115-129, 1961.
- ARANTES, G.J. et al. O carrapato do bovino, *Boophilus microplus*, no município de Uberlândia, MG: análise da sua resistência contra carrapaticidas comerciais. *Rev Bras Parasitol Vet*, Rio de Janeiro, v.4, n.2, p.89–93, 1996.
- BALASHOV, Y.S. A translation of bloodsucking ticks (Ixodoidea) – Vectors of diseases of man and animals. *Misc Publ Entomol*, v.8, n.5, p.159-376, 1972.

- BARROS, A.T.M., EVANS, D.E. Ação de gramíneas forrageiras em larvas infestantes do carrapato dos bovinos, *Boophilus microplus*. *Pesq Vet Bras*, Brasília, v. 9, n. ½, p. 17-21, 1989.
- BENAVIDES, O.E.; et al. Evaluación preliminar de extractos del Neem (*Azadirachta indica*), como alternativa para el control de la garrapata del ganado *Boophilus microplus* (Acari: Ixodida). *Rev Colom Entomol*, Bogotá, v. 27, n.1-2, p.1-8, 2001.
- BENNET, G.F. Oviposition of *Boophilus microplus* (CANESTRINI) (ACARI: IXODIDAE): I. Influence of ticks size on egg production. *Acarologia*, Paris, v. 16, p. 52-61, 1974.
- BISWAS, K. et al. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Curr Sci*, Baganlore, v. 82, n.11, p.1336-1345, 2002.
- BOEKE, S.J.; et al. Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. *J Ethnopharmacol*, v.94, p.25-41, 2004.
- BORGES, L. M. F.; et al. In vitro efficacy of extracts of *Melia azedarach* against the tick *Boophilus microplus*. *Med Vet Entomol*, Oxford, v.17, p.228-231, 2003.
- BRAHMACHARI, G. Neem—An Omnipotent Plant: A Retrospection. *ChemBioChem*, New York, n.5, p.408-421, 2004.
- BRUN, L.O. et al. Ethion Resistance in the Cattle Tick (*Boophíks microplus*) in New Caledonia. *Trop Pest Manag*, London, v.29, n.1, p.16-22, 1983.
- CHAGAS, A.C.S.; VIEIRA, L. S. Ação de *Azadirachta indica* (Neem) em nematódios gastrintestinais de caprinos. *Braz Vet Res Anim Sci*, São Paulo, v.144, n.1, p.49-55, 2007.
- CHAGAS, A.C.S. et al. Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. *Ciênc Rural*, Santa Maria, v.33, n.1, p.109-114, 2003.
- CHAGAS, A.C.S. et al. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. *Braz J Res Anim Sci*, São Paulo, v.39, n.5, p.247-253, 2002.
- CHUNGSAMARAYART, N.; JANSWAN, W. Acaricidal Activity of Peel of Citrus spp. *Boophilus microplus*. *Kasetsart J, Nat. Sci.*, v.30, p.112-117, 1996.
- CHUNGSAMARAYART, N. et al. Practical Extraction of Sugar Apple Seeds against Tropical Cattle Ticks. *Kasetsart J. Nat. Sci. Suppl.*, v.25, p.101-105, 1991.

- COHEN, E. et al. Nimbolide is the Principal Cytotoxic Component of Neem-Seed Insecticide Preparations. *Pestic Sci*, Chichester, n.48, p.135-140, 1996.
- CORRÊA, A.G.; VIEIRA, P.C. Produtos naturais no controle de insetos. 2.ed. São Carlos: Edufscar, 2007. 150p.
- COSTA JUNIOR, L. M.; et al. Eficiência in vitro de rotenóides extraídos do Timbó (*Derris urucu*) em teleóginas do carrapato *Boophilus microplus*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12º, 2002, Rio de Janeiro. Anais...CDROM. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. p.
- COSTA, C.T.C.; et al. Anthelmintic Activity of *Azadirachta indica* A. Juss against sheep gastrointestinal nematodes. *Vet Parasitol*, v.137, p.306-310, 2006.
- DAVEY, R.B. et al. Efficacy of amitraz applied as a dip against an amitraz-resistant strain of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) infested on cattle. *Vet Parasitol*, Amsterdam, v.152, p.127–135, 2008.
- DRUMMOND, R.O. et al. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory tests for insecticides. *J Econ Entomol*, London, v.66, p.130-133, 1973.
- DU, Y. et al. Acaricidal activity of four fractions and octadecanonic acid-tetrahydrofuran-3-4-diyl ester isolated from chloroform extracts of neem (*Azadirachta indica*) oil against *Sarcoptes scabiei* var. *cuniculi* larvae in vitro. *Vet Parasitol*, Amsterdam, v.163, n.1-2, p.175-180, 2009.
- DU, Y.; JIA, R. et al. Acaricidal activity of extracts of neem (*Azadirachta indica*) oil against the larvae of the rabbit mite *Sarcoptes scabiei* var. *cuniculi* in vitro. *Vet Parasitol*, Amsterdam, v.157, n.1-2, p.144-148, 2008.
- ERMEL, K. et al. Azadirachtin content of neem kernels from different geographical locations, and its dependence on temperature, relative humidity, and light. In: SCHUMETTERER, H.; ASCHER, K. R. S. Natural pesticides from the neem tree and other tropical plants. Nairobi: GTZ, 1987.
- FAO. Report of the WGRP and FAO/Industry Contact Group on Parasite Resistance. Embrapa Gado de Leite, Juíz de Fora, 1999. 49p.
- FAO PLANT PROTECTION BULLETIN. 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* n.7, v.19, p.15-18, 1971.

- FARIAS, M.P.O. et al. Eficácia in vitro do óleo da *Carapa guianensis* Aubl. (andiroba) no controle de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Re. Bras Plantas Med*, Botucatu, v.9, n.4, p.68-71, 2007.
- FARIAS, N.A.R. Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina. Guaíba: Agropecuária, 1995. 80p.
- FERNANDES, F.F.; FREITAS, E.P.S. Acaricidal activity of na oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol*, Amsterdam, n.147, p.150-154, 2007.
- FERNANDES, F.F. et al. Larvicidal potential of *Sapindus saponaria* to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Pesq Agropec Bras*, Brasília, v.40, p.1243-1245, 2005.
- FONSECA, A. H., PEREIRA, M. J. S., MAFRA, C.L. Dinâmica Populacional do Carrapato *Boophilus microplus* em São Miguel do Anta - MG, Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet*, Rio de Janeiro, v.6, n. 2, supl.1, p.121, 1997.
- FURLONG, J.; COSTA-JÚNIOR, L.M. Avaliação da Eficiência da homeopatia e do enxofre extraído do alho (*Allium sativum*) no controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, II SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 15º, 2008, Curitiba. Anais...CD-ROM.
- FURLONG, J.; PRATA, M. C. A.; MARTINS, J. R. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? *Hora Vet*, Porto Alegre, v. 27, n. 159, p. 26-32, set out, 2007.
- FURLONG, J. et al. CL₅₀ E CL₉₀ dos extratos alcoólico e aquoso de Nim indiano (*Azadirachta indica*) em larvas de *Boophilus microplus*. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12., 2002, Rio de Janeiro. Anais...CR-ROM.
- FURLONG, J. Diagnostico de La susceptibilidad de la garrapata Del ganado *Boophilus microplus* a los acaricidas em el estado de Minas Gerais, Brazil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL: Control de la resistencia em garrapatas y moscas de importancia veterinaria y enfermedades que transmiten, 4., 1999, Puerto Vallarta.

- GEORGE, J.E. et al. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology*, Cambridge, v.129, p.353-366, 2004.
- GEORGE, J.E. Present and Future Technologies for Tick Control. *Ann N Y Acad Sci*, v.916, p.583-588, 2000.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim Nova*, São Paulo, v.30, n.2, p.374-381, 2007.
- GONZALES, J. C. *O controle do carrapato do boi*. Porto Alegre: J.C. Gonzales, 1993. 80 p.
- GONZALES, J.C. *O controle dos carrapatos dos bovinos*. Porto Alegre: Editora Sulina, 1975. 104p.
- GONZALES, J.C. *O carrapato do boi: vida, resistência e controle*. São Paulo: Editora Mestre Jou, 1974.
- GRISI, L. et al. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora Vet*, Porto Alegre, v.21, n.125, p.8-10, 2002.
- GUERRINI, V.H.; KRITICOS, C.M. Effects of azadirachtin on *Ctenocephalites felis* in the dog and the cat. *Vet Parasitol*, Amsterdam, v.74, p.289-297, 1998.
- GUIMARÃES, J.H.; TUCCI, E.C.; BARROS-BAHESTI. *Ectoparasitos de interesse veterinário*. São Paulo: Plêiade/Fapesp, 2001. 218p.
- HABLUETZEL, A.; et al. Impact of the botanical insecticide Neem Azal[®] on survival and reproduction of the biting louse *Damalinia limbata* on angora goats. *Vet Parasitol*, Amsterdam, n.144, p.328-337, 2007.
- HEATH A. C. et al. Evaluation of non-conventional treatments for control of the biting louse (*Bovicola ovis*) on sheep. *Med Vet Entomol*, v.9, n.4, p.407-412, 1995.
- HELMY, W.A. et al. Biological and anti-microbial activities of aqueous extracts from Neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae). *J Appl Scien Res*, v.3, n.10, p.1050-1055, 2007.
- HORN, S.C., DUBIN, L.C., SEVERO, J.E. Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos no Brasil. Brasília: Ministério da Agricultura, Secretaria de Defesa Sanitária, 1983. 79p. Boletim Especial.
- HOSTETTMANN, K. et al. *Princípios Ativos de Plantas Superiores*. São Carlos: EdUFSCar, 2003. 152p.

- JONSSON, N.N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* and their crosses. *Vet Parasitol*, Amsterdam, v.137, p.1-10, 2006.
- JONSSON, N.N., PIPER, E.K. *Integrated control programs for ticks on cattle*. Australia, p.135-136, 2007.
- KLAFKE, G.M.; et al. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. *Vet Parasitol*, Amsterdam, v.142, p.386–390, 2006.
- LABARTHE, N.V. Biological Control of Tick Populations: Review and Reflections. *Cad Saúde Públ*, Rio de Janeiro, v.10, n.1, p.47-52, jan/mar 1994.
- LANDAU, S.Y.; et al. Neem-tree (*Azadirachta indica* Juss.) extract as a feed additive against the American dog tick (*Dermacentor variabilis*) in sheep (*Ovis aries*). *Vet Parasitol*, Amsterdam, v.165, p.311–317, 2009.
- LEITE, R.C. *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): susceptibilidade, uso atual e retrospectivo de carrapaticidas em propriedades das regiões fisiogeográficas da baixada do Grande-Rio e Rio de Janeiro. Uma abordagem epidemiológica. Tese doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1988. 151p.
- LUNDH, J. et al. Azadirachtin-impregnated traps for the control of *Dermanyssus gallinae*. *Vet Parasitol*, Amsterdam, v.130, p.337-342, 2005.
- MAGADUM, S.; et al. Comparative efficacy of *Annona squamosa* and *Azadirachta indica* extracts against *Boophilus microplus* Izatnagar isolate. *Parasitol Res*, v.105, p.1085-1091, 2009.
- MARCONDES, C B. *Entomologia médica e veterinária*. São Paulo: Ed. Ateneu, 2001. p.263.
- MARQUES, A.O. Avaliação da eficácia da ivermectina a 1% (solução injetável), no tratamento de bovinos naturalmente infestados pelo carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) e mantidos em pastagem. *Rev Bras Parasitol Vet*, Rio de Janeiro, v. 4, n.2, p.117-119, 1995.
- MARTINEZ, S.S. et al. Nim, um inseticida natural. *A Lavoura*, Rio de Janeiro, p. 40 - 43, 30 abr, 2008.

- MARTINS, J.R.; FURLONG, J. Avermectin resistance of *Boophilus microplus* in Brazil. *Vet Rec*, London, v.149, n.2, p. 64, 2001.
- MORDUE, A.J.; NISBET, A.J. Azadirachtin from the Neem Tree *Azadirachta indica*: its Action Against Insects. *An Soc Entomol. Brasil*, Piracicaba, v.29, n.4, 2000.
- MURRELL, A.; BARKER, S.C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Syst Parasitol*, Dordrecht, v.56, p.169–172, 2003.
- NARI, A.; HANSEN, J.W. Resistance of ecto-endoparasites: current and future solutions. Paris: OIE, 1999. (Session, 67.)
- NDUMU, P. A.; et al. Short communication: Toxicity of Neem Seed Oil (*Azadirachta indica*) against the Larvae of *Amblyomma variegatum* a Three-Host Tick in Cattle. *Phytother Res*, London, v.13, p.532–534, 1999.
- NEVES, E.J.M. Importância dos fatores edafo-climáticos para o uso do nim (*Azadirachta indica* A. Juss) em programas florestais e agroflorestais nas diferentes regiões do Brasil. *Boletim de Pesquisa Florestal*, Piracicaba, n.49, p.99-107, 2004.
- ODHIAMBO, T.R. Current themes in tropical science: physiology of ticks. *Oxford: Pergamon*, 1982. v.1, 508p.
- O'KELLY, J.C.; KENNEDY, P.M. Metabolic changes in cattle due to the specific effect of the tick, *Boophilus microplus*. *Br J Nutr*, v.45, p.557-566, 1981.
- OLIVEIRA, M. C. S. et al. Ação do extrato de Neem sobre *Rhipicephalus (boophilus) microplus* com azadiractina-A quantificada por HPLC. In: ALPA, 20., 2007 Cusco. Reunião.
- OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.; AMARANTE, A.F.T. *Parasitologia animal - animais de produção*. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Biomédicas, 2002.
- OLIVO, C.J. et al. Óleo de citronela no controle do carrapato de bovinos. *Ciência Rural*, v.38, n.2, p.406-410, 2008.
- PASSOS, W.M. *Contribuição para a melhoria no controle de algumas espécies de Malófagos (Insecta: Pitiiaptera), parasitos de galinhas de postura*. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1994.
- PEREIRA, J.R.; FAMADAS, K.M. Avaliação “*in vitro*” da eficiência do extrato da raiz do Timbó (*Dahlstedtia pentaphyla*) (Leguminosae, Papilionidae, Millettiedae) sobre

- Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) na região do vale do Paraíba, São Paulo, Brasil. *Arq Inst Biol*, São Paulo, v.71, n.4, p.443-450, 2004.
- PEREIRA, M.C et al. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, controle e resistência*. São Paulo: Ed. MedVet, 2008.
- PIPER, E.K. et al. Immunological profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Clin Vaccine Immunol*, v.6, n. 7, p.1074-1086, 2009.
- PRAKASH, G., SRIVASTAVA, A.K. Modeling of azadirachtin production by *Azadirachta indica* and its use for feed forward optimization studies. *Bio Eng J*, v. 29, p.62-68, 2006.
- PRATES, H.T. et al. Atividade carrapaticida e composição química do óleo essencial do capim-gordura. *Pesq agropec Bras*, Brasília, v.28, n.5, p.621-625, 1993.
- RIEK R.F. Studies end the reaction of animals to infestation with tick. VI. Resistance of cattle to infestation with the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). *Aust J Agricu Res*, Collingwood, v.13, p.532-549, 1962.
- RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I. et al. Prevalence and potential risk factors for amitraz resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle farms in the State of Yucatan, Mexico. *Vet Parasitol*, Amsterdam, v.136, n.75, p.280-286, 2006.
- ROUSH, R.T.; MCKENZIE, J.A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Ann Rev Entomol*, v.32, p.361-380, 1987.
- SAMISH, M. et al. Biological control of ticks. *Parasitology*, v.129, P.389–403, 2004.
- SANTOS, A.C.G., et al. Uso de Extrato de Nim no Controle de Acariase por *Myobia musculli* Schranck (Acari: Miobidae) e *Myocoptes musculus* Koch (Acari: Listerophoridae) em camundongos (*Mus musculus* var. albina L.). *Neotrop Entomol*, v.35, n.2, p.269-272, 2006.
- SAS Institute. SAS/INSIGHT User's Guide, versão 9.1.3, versão para Windows. Cary, NC, USA, 2002/2003.
- SAUERESSIG, T. M. Testes in vitro com extratos de plantas para controle alternativo do carrapato do boi. Resultados preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, RIO DE JANEIRO, 12., 2002, Rio de Janeiro: Anais...CD-ROM.

- SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annl Rev Entomol*, Palo Alto, v.35, p.271-297, Palo Alto, 1990.
- SILVA, W.J. et al. Avaliação de duas fórmulas comerciais de *Azadirachta indica* (MELIACEA) sobre fêmeas de *Boophilus microplus* (ACARI: IXODIDAE). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12., 2002, Rio de Janeiro.
- SILVA, W.W.; et al. Efeitos do neem (*Azadirachta indica* A. Juss) e do capim santo [*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf] sobre os parâmetros reprodutivos de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) no seminário paraibano. *Rev Bras Pl Med*, Botucatu, v.9, n.3, p.1-5, 2007.
- SOUSA, L.A.D.DE, et al. Avaliação da eficácia de extratos oleosos de frutos verdes e maduros de cinamomo (*Melia azedarach*) sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Rev Bras Parasitol Vet*, Rio de Janeiro, v.17, n.1, p.36-40, 2008.
- SRIVASTAVA, R. et al. Efficacy of *Azadirachta indica* extracts against *Boophilus microplus*. *Parasitol Res*, v.104, p.149–153, 2008.
- STARMANS, D.A.J.; NIJHUIS, H.H. Extraction of secondary metabolites from plant material: A review. *Trends in Food Science & Technology*, v.7, June, 1997.
- STONE, B.F.; HAYDOCK, K.P. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). *Bull Entomol Res*, v.53, p.563-578, 1962.
- VARGAS, M.S. et al. Avaliação *in vitro* de uma cepa de campo de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) resistente à Amitraz. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 33, n.4, p.737-742, 2003.
- VENZON, M. et al. Acaricidal efficacy of neem against *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) (Acari: Tarsonemidae). *Crop Protection*, v.27, p.869-872, 2008.
- WAGLAND, B.M. Host Resistance to Cattle Tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) Cattle. III*Growth on Previously Unexposed Animals. *Aust J Agric Res*, v.29, p.401-409, 1978.
- WANDSCHEER, C.B. et al. Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. *Toxicon*, v.44, p.829-835, 2004.

- WHARTON, R.H.; ROULSTON, W.J. Resistance of ticks to chemicals. *Annu Rev Entomol*, v.15, p.381-404, 1970.
- WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. *Parasitology*, v.129, 367–387, 2004.
- WILLADSEN, P. et al. Commercialization of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology*, v.110, p.43-50, 1995.
- WILLADSEN, P.; RIDING, G.A. On the biological role of a proteolytic-enzyme inhibitor from the ectoparasitic tick *Boophilus microplus*. *Biochem J.* v.189, p.295-303, 1980.
- WILLIAMS, L.A.D. Adverse effects of extracts of *Artocarpus altilis* Park and *Azadirachta indica* (A. Juss) on the reproductive physiology of the adult female tick, *Boophilus microplus* (Canest.). *Invert Rep and Develop*, v.23 n.2-3, p.159-164, 1993.
- WILLIAMS, L.A.D.; MANSHING, A. The insecticidal and acaricidal actions of compounds from *Azadirachta indica* (A. Juss.) and their use in tropical pest management. *Integ Pest Manag Rev*, 1, p. 133-145, 1996.
- WOOD, W.F. Chemical Ecology: Chemical Communication in Nature. *J Chem Educ*, v.60, n.7, p.531, 1983.