

Avaliação inseticida contra *Pediculus humanus capitis* De Geer e de irritação cutânea aguda de soluções hidroglicólicas contendo *Ruta graveolans* L.

Insecticide activity against *Pediculus humanus capitis* De Geer and acute skin irritation from hydro-glycolic solution of *Ruta graveolans* L.

Rosilda Aparecida Kovaliczn¹; Francieli da Silva Rísdem¹; Andrei Nicoli Gebieluca Dabu²; Paulo Vitor Farago² & Josiane Padilha de Paula²

RESUMO – Diversas estratégias têm sido propostas pela indústria farmacêutica para o tratamento da pediculose no couro cabeludo. Entretanto, já existem relatos de espécimes de *Pediculus humanus capitis* De Geer resistentes a algumas preparações farmoquímicas, além do elevado custo de muitos desses medicamentos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade piolhícida do extrato hidroglicólico de *Ruta graveolans* L. (EHRG), bem como, investigar a irritabilidade cutânea dessa formulação na pele humana. O ensaio inseticida *in vitro* foi realizado em triplicata, a partir do contato direto de piolhos (n = 6) com o EHRG puro e também, diluído a 20% (V/V). O teste de irritação cutânea aguda *in vivo* do EHRG, sem diluição prévia, foi desenvolvido no antebraço de voluntários (n = 30). Ambas as investigações foram efetuadas frente aos respectivos controles, sendo que os voluntários previamente aceitaram e assinaram termos de consentimento livre e esclarecido. O EHRG, nas condições analisadas, revelou uma atividade piolhícida com morte de 50% dos espécimes no tempo médio inferior a 3min e a 25min, respectivamente, para as preparações na forma pura e diluída. Na irritação cutânea primária, após 4h da aplicação do EHRG, apenas em um dos voluntários ocorreu sensibilização mínima. Considerando os resultados obtidos para os controles, foi possível comprovar a eficácia dessa formulação como inseticida piolhícida e garantir a sua segurança, em função da baixa irritação na pele dos indivíduos submetidos ao teste. Dessa forma, sugere-se que o extrato hidroglicólico de *Ruta graveolans* L. é uma alternativa promissora e de baixo custo no tratamento tópico da pediculose no couro cabeludo.

PALAVRAS-CHAVE – Arruda; medicamento fitoterápico; pediculose; tratamento tópico.

SUMMARY – Several approaches have been proposed by the pharmaceutical industry to the head lice infection's treatment. However, some *Pediculus humanus capitis* De Geer specimens are reported as resistant to some chemical formulations. Moreover, the high cost of these medicines is also a problem. The aim of this paper was to investigate the *Ruta graveolans* L. (HERG) activity as a hydro-glycolic solution against head lice and to study the skin HERG irritation in human. The *in vitro* insecticidal test was performed in triplicate based on the direct head lice contact (n = 6) with pure HERG and diluted (20%V/V). The *in vivo* acute skin HERG irritation (not previously diluted) was achieved on the human forearms volunteers (n = 30). Both analyses were carried out against the respective controls. Human volunteers were previously approved and signed in free consenting terms. In the evaluated conditions, HERG showed an activity against head lice in specimens death (50%) minor than 3min and 25min, respectively for pure and diluted forms. After 4h, a primary irritation was verified only in one volunteer for HERG, as slight skin sensitivity. Concerning to the results obtained in controls, phytoformulation revealed efficacy and security with low human skin irritation. Therefore, the HERG can be regarded as a promising and low cost alternative to the topical head lice infection treatment.

KEYWORDS – Rue; phytotherapeutic medicine; head lice infection; topical treatment.

INTRODUÇÃO

A pediculose do couro cabeludo é uma enfermidade endêmica de distribuição mundial, causada pelo *Pediculus humanus capitis* De Geer, 1778 (Phthiraptera, Anoplu-

ra, Pediculidae), conhecido popularmente como piolho da cabeça (NEVES, 2006; REY, 2002; PESSÔA & MARTINS, 1988). Ocorre em qualquer idade, independente de sexo, raça, classe social ou credo (STORER, 1999; PESSÔA & MARTINS, 1988), ocasionando dermatites, infecções se-

Data do aceite: 09/7/2009

¹Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti, 4748, Laboratório de Parasitologia Humana (sala M-32), Uvaranas, 84030-900, Ponta Grossa, PR, Brasil

²Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti, 4748, Laboratório de Produtos Farmacêuticos (sala CIPP-13), Uvaranas, 84030-900, Ponta Grossa, PR, Brasil

cundárias e, em quadros mais graves, até anemia ferropriva (CARRERA, 1991; BARBOSA & PINTO, 2003). A transmissão decorre do contato direto ou por intermédio de fômites (pentas, escovas, bonés, roupas de cama, etc.), com a manutenção da vitalidade dos insetos fora do hospedeiro, em geral, superior a 24h (KOVALICZN *et al.*, 2007; BASTOS *et al.*, 2004; BURKHART, 2003).

Diferentes estudos epidemiológicos apontam que essa patologia tem crescido significativamente a partir dos últimos 50 anos, principalmente entre crianças (CATALÁ *et al.*, 2005; BARBOSA & PINTO, 2003; BORGES & MENDES, 2002; CHOSIDOW, 2000; PICOLLO, 1999; MUMCUOGLU *et al.*, 1990). Estudos de BARBOSA & PINTO (2003), revelam que, no Brasil, a pediculose chega a atingir cerca de 30% das crianças em fase escolar. Considerando esses dados, que revelam a prevalência dessa infestação no contexto da saúde coletiva, estudos apontam para a necessidade de aprimorar estratégias de tratamento piolhícida.

Atualmente, a indústria farmacêutica disponibiliza no mercado vários medicamentos de uso tópico para o controle da pediculose, a partir de inseticidas sintéticos com estruturas baseadas em benzoatos, organoclorados, sulfuros, piretróides, entre outros. Entretanto, algumas pesquisas demonstram que o uso contínuo desses medicamentos tem desenvolvido a resistência dos piolhos, eliminando seletivamente os indivíduos mais suscetíveis e concentrando na população, os indivíduos capazes de tolerar maiores doses dos compostos, ou seja, o aumento das doses significa somente a seleção de indivíduos mais resistentes, aumentando o risco toxicológico (CESTARI *et al.*, 2004; PICOLLO, 1999).

Algumas estratégias de baixo custo têm sido apresentadas para o controle da pediculose, como a catação manual, a escovação frequente dos cabelos, além do uso de medidas populares para facilitar a remoção desse agente etiológico. Nesse contexto, a medicina tradicional utiliza empiricamente diversas plantas medicinais na forma de infusos e loções tópicas, porém, sem respaldo integral da ciência (GOMES *et al.*, 1999).

Entre as plantas com potencial piolhícida, é possível verificar a utilização da *Ruta graveolens* L. (Rutaceae), comumente denominada arruda. É uma espécie de fácil cultivo, disseminada mundialmente. Suas folhas contêm glândulas translúcidas com óleo essencial (0,1 a 0,6%), responsável pelo odor característico do táxon. A composição química revela ainda alcalóides quinolínicos (com potencial tóxico), flavonóides, taninos, resinas e ácidos orgânicos, entre outros (FERREIRA *et al.*, 2004; ALONSO, 1998).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho é avaliar a atividade piolhícida do extrato hidroglucólico de *Ruta graveolens* L., bem como, investigar a irritação cutânea primária dessa formulação na pele humana.

MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi registrada e aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa (COEP) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), sob parecer nº. 26/2007, com os devidos termos de consentimento livre e esclarecido para a realização da coleta manual de *Pediculus humanus capitis* e para a aplicação do extrato hidroglucólico de *Ruta graveolens* L. (EHRG) em voluntários humanos.

O material botânico foi coletado na Casa do Menor Irmãos Cavanis, em Ponta Grossa (Paraná-Brasil), em abril de 2007. A colheita ocorreu próximo às 12h, com tempo ensolarado, temperatura de 30 °C e umidade relativa (UR) do ar em torno de 58%. Uma exsicata foi identificada pela taxonomista botânica Prof^a. Dr^a. Inês Janete Mattozo Takeda, sendo depositada no Herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa (HUPG), sob o número 6697. As folhas adultas e os fragmentos de caule foram submetidos à secagem em condições de laboratório (temperatura de 20 a 25 °C e UR de 65%), para a subsequente elaboração do EHRG.

O EHRG foi obtido por processo de turbo-extração durante 5min a 2500 rpm, empregando 20% de material vegetal seco e solução aquosa de glicerina a 50% (V/V) (SG50) q.s.p. 100mL, líquido extrator com elevada capacidade de remoção de princípios ativos vegetais e de baixa irritabilidade cutânea (SONAGLIO *et al.*, 2004; LIST & SCHMIDT, 2000; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982). Após a filtração, uma diluição a 20% (V/V) do EHRG foi elaborada com o mesmo líquido extrator, obtendo-se as formas extrativas denominadas de EHRG puro e EHRG diluído. As soluções foram acondicionadas em frasco âmbar, identificadas, e mantidas em temperatura ambiente.

Os espécimes de *Pediculus humanus capitis* foram retirados do couro cabeludo de crianças e adolescentes, de ambos os sexos, na faixa etária de 6 a 14 anos, assistidos pela Casa do Menor Irmãos Cavanis. Após o procedimento de catação manual, os insetos vivos foram acomodados junto a alguns fios de cabelos dos próprios voluntários e imediatamente transferidos para recipientes de poli(tereftalato de etileno) cristal com capacidade de 100mL, tamponados com gaze de algodão e fixada por elástico. Os frascos foram depositados em caixa de isopor, fechada, mantendo-se a temperatura interna entre 25 e 28 °C e a UR entre 70 e 73% monitoradas por meio de termohigrômetro. Nessas condições, o transporte dos exemplares ao Laboratório de Parasitologia Humana da UEPG foi efetivado em um prazo máximo de 2h a partir da coleta.

Após a constatação da mobilidade dos espécimes de *Pediculus humanus capitis* (n = 72), esses insetos em diferentes fases evolutivas (ninfas e adultos) foram separados em grupos de 6 e transferidos, com auxílio de pinça entomológica, para placas de Petri de vidro com 5cm de diâmetro. Cada ensaio inseticida *in vitro* foi realizado em triplicata, a partir do contato direto dos ectoparasitos com 5mL do EHRG puro, tomando-se o cuidado para que os piolhos ficassem totalmente submersos na formulação. Os exemplares foram observados por estereomicroscopia de forma contínua nos primeiros 15min e, periodicamente, a cada 15min durante a primeira hora e, com observação a cada 30min, a partir da segunda hora, por um tempo total de 4h para a verificação da letalidade. A ausência de atividade motora e de movimentação do conteúdo intestinal de cada espécime foram os critérios estabelecidos para a avaliação da letalidade. O mesmo procedimento foi adotado para os grupos EHRG diluído, controle negativo e controle positivo.

O SG50, líquido extrator utilizado para a obtenção do EHRG, foi avaliado como controle negativo. Como controle positivo, foi empregado o Piolin[®] (lote nº. 40436), shampoo fitoterápico contendo *Ruta graveolens* L. (arruda), *Juglans regia* L. (noqueira) e *Artemisia vulgaris* L. (artemísia) (PIOLIN, 2005). Os dados foram tratados por aná-

lise de variância, utilizando o teste “t” de Student, no intervalo de confiança estabelecido de 95% ou $p \leq 0,05$.

O teste de irritação cutânea aguda *in vivo* do EHRG, sem diluição prévia, foi desenvolvido em voluntários humanos ($n = 30$), de ambos os sexos, na faixa etária de 18 a 30 anos. Para isso, um papel celulósico foi embebido com $50\mu\text{L cm}^{-2}$ do EHRG e aplicado na porção anterior do antebraço de cada voluntário e coberto com um bioadesivo cirúrgico. Como controle negativo, foi empregado o líquido extrator SG50. Uma solução de lauril sulfato de sódio a 20% (m/V) (SLSNa20) foi estabelecida como controle positivo, de acordo com a recomendação da literatura (PADILHA DE PAULA *et al.*, 2003; DRAIZE *et al.*, 1944), em função do seu elevado potencial de sensibilização cutânea.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da atividade inseticida das amostras contra os espécimes de *Pediculus humanus capitis* estão sumarizados na Tabela I. O EHRG puro revelou um tempo médio de 1min e 46s, com desvio padrão (SD) de 21s e coeficiente de variação percentual (%CV) de 20% para a letalidade dos ectoparasitas, analisados em triplicata. Nas mesmas condições, o EHRG diluído apresentou um tempo médio de 59min (SD = 40min e %CV = 68 %), sendo que para o controle positivo (Piolin®) foi obtido um tempo médio de 1min e 23s (SD = 21s e %CV = 25%). Entretanto, após o término do tempo de 4h de observação, o controle negativo (SG50) não demonstrou efeito inseticida para todos os espécimes ensaiados em triplicata, sendo que, em média, dois ectoparasitos permaneceram vivos, mesmo ao final do experimento.

TABELA I
Atividade inseticida *in vitro* do extrato hidroglicólico de *Ruta graveolens* L. (EHRG) contra o *Pediculus humanus capitis* De Geer

Amostras avaliadas	Tempo médio de letalidade*	Desvio padrão (SD)	Coefficiente de variação percentual (%CV)
EHRG puro	1min e 46s	21s	20%
EHRG diluído	59min	40min	68%
Controle positivo (Piolin®)	1min e 23s	21s	25%
Controle negativo (SG50)**	> 4h	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>

*6 espécimes de ectoparasitas por análise, em triplicata

**não demonstrou efeito inseticida para todos os espécimes ensaiados no término do tempo de 4h

Considerando os resultados obtidos para o tempo médio de letalidade dos ectoparasitos estudados, foi possível verificar que o EHRG puro teve um desempenho similar ao do controle positivo (Piolin®). Avaliando que esses produtos, na forma de solução hidroglicólica e de shampoo, respectivamente, devem ser mantidos por 15min em contato com a região capilar do hospedeiro infestado, ambas as formulações demonstraram ser eficazes no tratamento da pediculose do couro cabeludo.

Entretanto, pela aplicação da análise de variância (ANOVA), foi constatado que o valor da variância dentro dos grupos (MQG = 346,6) é menor que o valor da variância das médias (MQR = 793,5), indicando que existe uma diferença estatística entre os grupos investigados. Além disso, o valor do *f* calculado (9,26) é maior do que o *f* tabela-

do (7,71), com $p = 0,038996$, comprovando que há diferença significativa no tempo médio de letalidade entre o EHRG puro e o Piolin®, ao nível de significância de 5%. Esse fato pode ser justificado pela presença de outros táxons vegetais com indicação piolhícida no produto comercial, capazes de potencializar o efeito da *Ruta graveolens* L., além da composição detergente da formulação, capaz de reduzir a tensão superficial e favorecer o contato íntimo com os espécimes.

Para o EHRG diluído a 20% foi observada a morte de todos os exemplares de *Pediculus humanus capitis* em um tempo médio de 59min (Tabela I), valor superior ao tempo de aplicação recomendado para o shampoo Piolin® (15min). Dessa forma, nas condições de utilização propostas, o extrato de arruda diluído não se revelou eficaz para o tratamento da pediculose, apresentando um comportamento intermediário entre o controle positivo (tempo médio de letalidade de 1min e 23s) e o controle negativo (tempo de letalidade superior a 4h). Entretanto, cabe destacar que o EHRG, mesmo diluído, teve um desempenho mais satisfatório que o controle negativo SG50, revelando que os compostos químicos da espécie *Ruta graveolens* L., na forma farmacêutica avaliada, possuem efeito pediculicida.

Para o controle negativo, considerando o estudo em triplicata, foi observado que 33,3% dos exemplares em contato com a solução aquosa de glicerina a 50% (V/V) permaneceram vivos ao final do tempo de 4h. A morte parcial dos espécimes pode ser explicada pelo efeito osmótico que o SG50 possui, em função do elevado teor de glicerina que a compõe, ocasionando a redução da sobrevivência do inseto nesse meio líquido.

No teste de irritação cutânea aguda *in vivo*, o EHRG puro revelou irritação mínima (+) em um dos 30 voluntários em avaliação, no tempo de 4h, após a administração da solução-teste. O mesmo resultado foi verificado para o SG50, controle negativo empregado no ensaio. Nos tempos de 24h, 48h e 72h após o início desses tratamentos, não foi observada nenhuma irritação nos indivíduos submetidos à avaliação.

Nesse ensaio, a SLSNa20 (controle positivo), entretanto, indicou irritação cutânea mínima (+) em 7 voluntários e irritação moderada (++) em um voluntário no tempo de 4h. No tempo de 24h, foi encontrada uma irritação mínima (+) em 8 voluntários e uma irritação moderada (++) em um voluntário. Transcorridas 48h e 72h da aplicação do controle positivo, foi observada uma irritação mínima (+), respectivamente, em 5 e 4 voluntários.

Para nenhuma das três amostras, inclusive a SLSNa20, foi constatada uma irritação significativa (+++). Esses resultados demonstram que o EHRG puro tem baixa capacidade de desencadear uma irritação cutânea aguda *in vivo*, o que garante a sua segurança para o uso em humanos.

Considerando o desempenho do EHRG puro nos estudos *in vitro* e *in vivo*, é possível estabelecer que o mesmo atende ao recomendado por PICOLLO (1999), que aconselha o desenvolvimento de formulações pediculicidas com baixa toxicidade e máxima efetividade.

CONCLUSÃO

O extrato hidroglicólico de *Ruta graveolens* L. sem diluição prévia, avaliado por meio da atividade inseticida contra o *Pediculus humanus capitis* e da irritação cutânea agu-

da, demonstrou ser uma alternativa eficaz, segura e de baixo custo ao tratamento tópico da pediculose no couro cabeludo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALONSO, V. *Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas*. Buenos Aires: Indugraf, 1998.
2. BARBOSA, J.V. & PINTO, Z.T. Pediculose no Brasil. *Entomologia y Vectores*, v 10, n 4, p 579-86, 2003.
3. BASTOS, S.R.P.; SERRA-FREIRE, N.M.; CARVALHO, A.S.; ALMEIDA, N.M. & SILVA, D.A. Período de sobrevivência de exemplares de *Pediculus capitis* (De Geer, 1778) (Phthiraptera: Pediculidae) fora do hospedeiro. *Entomologia y Vectores*, v 11, n 2, p 341-47, 2004.
4. BORGES, R. & MENDES, J. Epidemiological aspects of head lice in children attending day care centers, urban and rural schools in Uberlândia, central Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v 97, n 2, p 189-92, 2002.
5. BURKHART, C.N. Fomite transmission with head lice: a continuing controversy. *The Lancet*, v 361, p 99-100, 2003.
6. CARRERA, M. *Insetos de interesse médico e veterinário*. Curitiba: UFPR, 1991.
7. CATALÁ, S.; JUNCO, L. & VAPORAKY, R. Infestação por *Pediculus capitis* segundo sexo e fatores sociais na Argentina. *Revista de Saúde Pública*, v 39, n 3, p 438-43, 2005.
8. CESTARI, I.M.; SARTI, S.J.; WAIB, C.M. & BRANCO JR., A.C. Avaliação da atividade potencial inseticida de óleo essencial de *Tagetes minuta* (Asteraceae) contra *Pediculus humanus capitis* De Geer (Phthiraptera: Pediculidae). *Neotropical Entomology*, v 33, n 6, p 805-7, 2004.
9. CHOSIDOW, O. Scabies and pediculosis. *The Lancet*, v 355, p 819-26, 2000.
10. DRAIZE, J.H.; WOODARD, G. & CALVERY, H.O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v 82, p 377-90, 1944.
11. FERREIRA, M.P.; FERREIRA, R.; WINCKLER, V.G. & FREITAS, F. Tônico capilar para tratamento da pediculose. *Cosmetics and Toiletries*, v 16, n 3, p 126-32, 2004.
12. GOMES, V.L.O.; RODRIGUES, M.G.S. & VAZ, M.R.C. Ação da *Ruta graveolens* (arruda) no tratamento da pediculose. *Vitalle Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v 11, p 11-6, 1999.
13. KOVALICZN, R.A.; RISDEN, F.S.; FARAGO, P.V. & PAULA, J.P. Sobrevida do *Pediculus capitis* sob condições adversas. *Revista de Patologia Tropical*, v 36 (anais do XX Congresso Brasileiro de Parasitologia), p 419, 2007.
14. LIST, P.H. & SCHMIDT, P.C. *Phytopharmaceutical technology*. Boston: CRC Press, 2000.
15. MUMCUOGLU, K.Y.; MILLER, J. & GOFIN, R. Epidemiological studies on head lice infestation in Israel. I. Parasitological examination of children. *International Journal of Dermatology*, v 29, p 502-6, 1990.
16. NEVES, D.P. *Parasitologia dinâmica*. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2006.
17. PAULA, J.P.; GOMES-CARNEIRO, M.R. & PAUMGARTTEN, F.J.R. Chemical composition, toxicity, and mosquito repellency of *Ocimum selloi* oil. *Journal of Ethnopharmacology*, v 88, n 2-3, p 253-60, 2003.
18. PESSÔA, S.B. & MARTINS, A.V. *Parasitologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1988.
19. PICOLLO, M.I. Riesgos y beneficios en el uso de pediculicidas. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, v 58, n 1-2, p 238-42, 1999.
20. PIOLIN: shampoo. Responsável técnico Silvana M. Montagna. Porto Alegre: Laboratório Saúde Ltda., 2005. *Bula de medicamento*.
21. REY, L. *Bases da parasitologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002.
22. SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R. & BASSANI, V.L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A. & PETROVICK, P.R. (org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/UFRGS, 2004.
23. STORER, T. *Zoologia geral*. São Paulo: IBEP, 1999.
24. VOIGT, R. & BORNSCHEIN, M. *Tratado de tecnologia farmacéutica*. Zaragoza: Editorial Acribia, 1982.

Endereço eletrônico
Rosilda Aparecida Kovaliczn
e-mail: rosildak@uol.com.br