
**ATIVIDADE INSETICIDA DO
EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE
Persea americana (LAURACEAE) SOBRE LARVAS E PUPAS
DE *Aedes aegypti* (DIPTERA, CULICIDAE)**

George Harrison Ferreira de Carvalho, ¹ Heloisa Helena Garcia da Silva, ¹ Luiz Carlos Cunha ² e Ionizete Garcia da Silva ¹

RESUMO

A busca de alternativas para o controle do *Aedes aegypti* ante sua resistência aos inseticidas sintéticos justifica a investigação de compostos vegetais uma vez que estes apresentam menor impacto ambiental em sua degradação e menor toxicidade aos vertebrados. Neste trabalho, avaliou-se o efeito inseticida do extrato bruto etanólico (ebe) da casca de *Persea americana* sobre larvas e pupas de *Ae. aegypti*. Após a obtenção do ebe, este foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo-se, assim, a solução usada como teste. Para cada bioensaio e repetição, tanto no laboratório quanto no campo, foram utilizadas 100 larvas de cada estágio e 100 pupas. A mesma quantidade foi usada para os controles positivo e negativo realizados com o temefôs (1ppm) e DMSO a 1,6%. Todos os bioensaios foram realizados nos principais criadouros artificiais urbanos – pneu, vidro e plástico. Os resultados obtidos demonstraram a atividade inseticida do ebe de *P. americana* em larvas e pupas de *Ae. aegypti*. Houve mortalidade de 100% das larvas de primeiro e segundo estádios; no laboratório, na dose de 5ppm e, no campo, na dose de 10 ppm. No laboratório, as CL₅₀ e CL₉₀ foram, respectivamente, de 7,2 ppm e 19,3 ppm para o terceiro estágio; de 6,6 ppm e 15,4 ppm para o quarto estágio e de 93,6 ppm e 158,7ppm para pupas. Seguindo a mesma ordem, no campo, as CL₅₀ e CL₉₀ foram de 27,8 ppm e 51,3 ppm para o terceiro estágio; de 23,8 ppm e 46,9 ppm para o quarto estágio e de 145,3 ppm e 261,9 ppm para as pupas. A constatação mais importante deste trabalho foi o efeito pupicida de *P. americana*, raramente encontrado em outros produtos tanto naturais quanto sintéticos. Foram realizados testes de toxicidade oral aguda em ratos com o ebe desta planta, o qual se mostrou atóxico de acordo com as normas do (Acute Toxic Class Method - OECD 423) para produtos de origem vegetal.

DESCRITORES: *Aedes aegypti*. *Persea americana*. Inseticidas naturais. Controle. Dengue.

1 Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (UFG).

2 Faculdade de Farmácia da UFG.

Endereço para correspondência: Dr. Ionizete Garcia da Silva, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Campus I, Caixa Postal 131 CEP:74001-970, Goiânia, GO, Brasil. E-mail: profionizete@yahoo.com.br

Recebido para publicação em: 18/8/2011. Revisto em: 9/12/2011. Aceito em: 13/12/2011.

ABSTRACT

Insecticidal activity of the crude ethanol extract of *Persea americana* (Lauraceae) on larvae and pupae of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae)

In the search for new alternatives for control of *Aedes aegypti*, in view of its resistance to chemical insecticides in use, research on plant substances has been increasing due to their degradable quality and reduced toxic effect in vertebrates. The aim of this study was to evaluate the insecticidal effect of crude ethanol extract (cee) of the *Persea americana* Mill bark, on larvae and pupae of *Ae. aegypti* in the laboratory and field. The test solution was obtained by dissolving the cee in dimethyl sulfoxide (DMSO). For each test and repetition, both in the laboratory and field, 100 larvae of the 1st, 2nd, 3rd, and 4th instars and 100 pupae were used. The same amount of larvae and pupae was used for the positive and negative control groups, performed respectively with temephos at 1 ppm and 1.6% of the DMSO treated extract. Both the laboratory bioassays and field assays were conducted using common urban breeding spots: tire, glass, and plastic. The results showed insecticidal activity of the *P. americana* cee on *Ae. aegypti* larvae and pupae, both in the laboratory and field. There was 100% mortality of the larvae of the 1st and 2nd instars at a dose of 5 ppm in the laboratory and at a dose of 10 ppm in the field. In the laboratory, the LC₅₀ and LC₉₀ were respectively, 7.2 and 19.3 ppm for 3rd instar, 6.6 and 15.4 ppm for 4th instar, and 93.6 and 158.7 ppm for pupae. Following the same order, in the field, the LC₅₀ and LC₉₀ were 27.8 and 51.3 ppm for the 3rd instar, 23.8 and 46.9 ppm for the 4th instar and 145.3 and 261.9 ppm for the pupae. The most important factor of this study was the pupicide effect of *P. americana* because it is very rare to find this effect from other products, either natural or synthetic. Acute oral toxicity were conducted in rats with the cee and this plant was proved to be nontoxic according to norms for products of plant origin (Acute Toxic Class Method - OECD 423).

KEY WORDS *Aedes aegypti*. *Persea americana*. Natural insecticides. Control. Dengue.

INTRODUÇÃO

O dengue é uma arbovirose causada por um dos quatro sorotipos conhecidos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) do gênero *Flavivirus*, constituindo-se, na atualidade, numa das mais importantes doenças re-emergentes no mundo. Essa doença pode ser classificada clinicamente como febre do dengue (FD) ou dengue clássico (DC), febre hemorrágica do dengue (FHD) ou síndrome do choque do dengue (SCD). A Secretaria de Vigilância em Saúde usa também a denominação caso de dengue com complicações (DCC). A infecção confere imunidade permanente para cada sorotipo (32, 49, 66).

No Brasil, atualmente, há transmissão de dengue nos 27 estados, prevalecendo a circulação dos sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3. Entretanto, o Ministério da Saúde (2011) (33) comprovou a transmissão do DENV-4 na Região Norte do Brasil (32, 59).

O *Ae. aegypti* é de origem africana e foi trazido para as Américas logo depois do descobrimento. Este mosquito apresenta hábitos sinantrópicos e antropofílicos, o que facilitou a sua dispersão pelo globo terrestre (65, 66).

As ações de controle de mosquitos transmissores de doenças incluem o saneamento do meio ambiente, informação e educação, controle químico

e biológico (39). As duas primeiras visam reduzir os potenciais criadouros; a terceira, a eliminação do vetor. Isoladamente essas medidas não surtem os efeitos desejados. É importante considerar que na maioria dos países em desenvolvimento tem ocorrido uma deterioração da infraestrutura de saúde pública com redução dos recursos humanos e financeiros. Esse controle, na maioria desses países, concentra-se na aplicação espacial de inseticidas em ultrabaixo volume (UBV) na vigência de uma epidemia; tal medida, porém, é pouco efetiva para a obtenção e manutenção de baixos índices de infestação predial (18, 19, 33, 61, 62, 63).

Até o momento não há uma vacina pronta para uso contra os quatro sorotipos do vírus do dengue, embora pesquisas estejam em andamento. A opção continua sendo o controle do *Ae. Aegypti*, mas o que dificulta muito esse processo é a resistência desenvolvida pelo vetor aos inseticidas, aliada à grande disponibilidade de criadouros artificiais e de sangue nas áreas urbanas (7, 27, 49, 64).

No Brasil, as principais estratégias usadas para o controle deste vetor são baseadas na utilização de produtos sintéticos como organofosforados (temefós) e piretroides (cipermetrina, deltametrina), os quais requerem monitoramento constante de seu manejo. No entanto, o uso de inseticidas e as ações educativas promovidas pelo governo não têm alcançado o êxito esperado no controle das populações deste mosquito (6).

O aparecimento de alteração da suscetibilidade e de populações resistentes tem ocasionado sérios problemas para o controle de mosquitos. Isso se deve, em muitos casos, à sua frequente exposição aos produtos químicos utilizados. Este quadro pode influenciar nos resultados dos programas, uma vez que a permanência do vetor favorece a transmissão do dengue e contribui para o surgimento de novos casos (6, 7, 8, 9, 10, 20, 31, 34).

A resistência de populações de *Ae. aegypti* ao temefós foi registrada em várias localidades de diversas unidades federadas do Brasil (6, 10, 27). Nos estados onde foi comprovada essa resistência, adotou-se o uso do diflubenzuron que é um regulador de crescimento.

Na busca por novas alternativas ao controle de vetores, produtos naturais e biológicos vêm sendo investigados. Destaca-se o controle biológico por meio de *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) e *B. sphaericus* (*Bs*) de forma integrada com os produtos sintéticos e naturais (3, 16, 43, 44).

Vários autores têm ressaltado a pesquisa e o desenvolvimento de substâncias derivadas de plantas para controle de mosquitos (2, 12, 13, 36, 41, 46, 47, 50, 56, 57, 60), especialmente do *Ae. aegypti* (1, 11, 28, 51, 55, 58). As plantas com comprovada aplicação na área farmacêutica têm sido as mais procuradas para o desenvolvimento de compostos com propriedades inseticidas (42). Esses compostos originários de plantas têm recebido especial atenção (5, 57) por serem alternativas ecologicamente corretas, visto que apresentam aspectos seletivos, biodegradáveis e de baixo impacto ambiental, o que garante maior segurança à população.

Neste trabalho, estudou-se o extrato bruto etanólico (ebe) extraído da casca do caule de *Persea americana*.

A *P. americana*, denominada popularmente como abacateiro, pertence à família Lauraceae e distribui-se nas Américas Central e do Sul. Apresenta porte arbóreo e é cultivada em quase todos os estados do Brasil, com grande prevalência na região sudeste onde as condições ecológicas favorecem seu desenvolvimento. O Brasil é um dos maiores produtores de abacate do mundo, com uma produção anual aproximada de 3,2 milhões de toneladas e área de 416 mil hectares (17).

A *P. americana* é uma planta amplamente estudada na fitoterapia, tanto por sua importante qualidade nutricional quanto por seus efeitos medicinais na saúde humana. As partes mais utilizadas como fontes de pesquisa são as folhas, a casca, o fruto e a semente, por apresentarem composições químicas bioativas variadas. As principais substâncias encontradas são carboidratos, proteínas, gordura, taninos, persito, metilegenol, dopamina, esparagina, ácidos málico e acético, gordura monoinsaturada e carotenoides. Essas substâncias são utilizadas no tratamento de diversas enfermidades, como anemia, helmintíases, doenças renais e reumatismo, além de ajudar na prevenção de câncer (4, 25).

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e identificação

Folhas e flores de *P. americana* foram coletadas no município de Aparecida de Goiânia, Goiás, Brasil (Latitude: 16°48'33.56"S e Longitude: 49°19'12.53"O) e encaminhadas ao herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Goiás (UFG), sendo a exsiccata registrada pelo Prof. Dr. Ângelo Rizzo com o nº 43.394.

Extração

Para a extração em evaporador rotativo, foram encaminhados 2 quilogramas de casca do caule desta planta ao Laboratório de Bioatividade de Plantas do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da UFG.

Secagem e moagem

A secagem foi realizada em estufa a 40°C, com ventilação forçada para evitar a saturação com a umidade desprendida do material. As cascas secas foram moídas em moinho de facas até obter-se fina granulometria.

Percolação e evaporação

O pó foi percolado em etanol após completa homogeneização com agitador mecânico. O recipiente foi coberto com papel alumínio para evitar a

evaporação do álcool e uma possível interferência da luz, permanecendo em repouso por 72 horas.

Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em funil de vidro com papel filtro e concentrado em evaporador rotativo a vácuo. O ebe obtido foi transferido para placas de Petri para secagem numa capela de exaustão, em temperatura ambiente, e, após a secagem, foi armazenado em congelador vertical a -4°C .

Bioensaios

Larvas e pupas foram obtidas de ovos de uma criação cíclica de *Ae. aegypti*, mantida no Laboratório de Biologia e Fisiologia de Insetos (IPTSP/UFG), em câmara climatizada a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$, $80\pm 5\%$ de umidade relativa (UR) e fotofase de 12 horas (52, 53). Os experimentos de campo foram realizados no mês de julho, com temperatura média de $30\pm 1,4^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $40,4\pm 2,6\%$.

Para realização dos bioensaios em laboratório, cartelas de ovos foram colocadas para eclosão em bacias contendo água da rede pública de abastecimento. Após a eclosão, as larvas foram alimentadas com ração para gatos colocada diretamente nas bacias. Utilizaram-se larvas de todos os estádios e pupas para os bioensaios realizados tanto no laboratório quanto no campo.

O ebe de *P. americana* foi pesado em balança analítica com a precisão de 0,0001g e solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO). A quantidade de solvente utilizada para o preparo da solução foi previamente determinada por ensaios de tolerância das larvas ao solvente. Observou-se tolerância até a proporção de 0,8 mL de DMSO para 25 mL de água.

a) no laboratório:

Os bioensaios foram realizados em três recipientes representando os criadouros mais comuns encontrados nos centros urbanos – vidro, plástico e pneu – tanto para as larvas quanto para as pupas. Nesses recipientes foram colocados 100 mL de cada uma das soluções, adicionando-se 100 larvas de primeiro, segundo, terceiro e quarto estádios e 100 pupas separadamente.

Os primeiros bioensaios foram iniciados com concentrações iniciais de 100ppm, diluindo-se até 10ppm, para as larvas de todos os estádios, pupas e tipos de criadouros. As CL_{50} e CL_{90} foram determinadas a partir de triplicata e a mortalidade foi avaliada após 24 horas de exposição das larvas ao ebe de *P. americana*. Todos os bioensaios foram realizados em sala climatizada similarmente à câmara de criação.

Todos os experimentos foram acompanhados de controle positivo (temefós a 1ppm) e negativo (DMSO), ambos com volume ajustado com água destilada. Os recipientes onde foram colocadas as pupas tiveram a superfície coberta com organza para evitar fuga no caso de emergência do mosquito.

b) no campo:

Utilizaram-se 100 larvas de cada um dos estádios e 100 pupas colocadas em 100 mL de cada concentração, para cada bioensaio, e os mesmos tipos de criadouros dos experimentos de laboratório. Os criadouros foram colocados em ambientes sombreados, em quintais e jardins de residências no setor Jardim América, Goiânia, Goiás, após prévia autorização dos moradores, que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

As leituras de mortalidade foram feitas 24 horas após o início dos experimentos. Os controles positivo e negativo foram feitos com temefós e DMSO, respectivamente. As larvas foram consideradas mortas quando inertes e com corpo e cápsula cefálicos escurecidos (55). A morte das pupas foi constatada pela inércia ao serem tocadas com agulhas. Os dados climatológicos de campo foram obtidos por meio de termômetro vertical e higrômetro.

Toxicidade aguda

Foram utilizados seis ratos machos e seis fêmeas da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*, pesando entre 200g e 300g, provenientes do Biotério Central da UFG, acondicionados no biotério setorial do Núcleo de Estudos e Pesquisas Toxicológicas (NEPET-UFG).

Os ratos (machos e fêmeas) foram mantidos em temperatura ambiente controlada para $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotofase aproximada de 12 horas até o início dos experimentos. Os animais foram tratados com água filtrada e ração, permaneceram em jejum por quatro horas antes da administração das amostras, sendo restituídas água e ração uma hora após a administração do ebe de *P. americana*. O mesmo protocolo foi utilizado no grupo controle (DMSO e água).

O ebe de *P. americana* foi solubilizado em água e DMSO e administrado por via oral (gavage). Por se tratar de extrato de origem vegetal com finalidade inseticida e em razão da inexistência de informações sobre casos de intoxicação pela casca desta planta, a triagem foi iniciada com a dose de 2.000 mg.Kg^{-1} de peso corporal para machos e fêmeas, considerada dose limite superior. Os controles foram feitos com água e DMSO.

A avaliação da toxicidade aguda seguiu as diretrizes da *Organization for Economic Cooperation and Development* (40) para o teste de classe de dose aguda tóxica. As avaliações ocorreram inicialmente em intervalos de 10 e 30 minutos, e depois de 1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas e, por fim, diariamente, até o 14º dia do experimento. As intensidades dos eventos foram tabuladas de zero a quatro, correspondendo, respectivamente, a ausente (0), raro (1), pouco (2), moderado (3), intenso (4). As observações seguiram o *screening* hipocrático – frênito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta aperto cauda, contorção, posição trem posterior, reflexo endireitamento, tônus do corpo, força para agarrar, ataxia, reflexo auricular, tremores, convulsões, hipnose, anestesia, lacrimação, ptose, micção, defecação, pilo ereção,

hipotermia, respiração, cianose, hiperemia e morte. As alterações encontradas foram registradas em protocolo impresso com a lista dos sinais investigados. Esta lista e a pesquisa de sinais basearam-se no modelo proposto (30).

A quantidade de excretas e o consumo de água e ração foram avaliados a cada 48 horas durante os 15 dias de experimento. No fim dos experimentos, todos os animais foram anestesiados com solução de xilazina-cetamina 0,2 mL/100g, conforme protocolo da Cornell University/Cornell Center for Animal Resources and Education, e eutanasiados por deslocamento cervical, tendo seus órgãos vitais (coração, pulmão, fígado, rim, estômago, baço, intestino grosso e intestino delgado) retirados para a avaliação histopatológica.

O projeto foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG e identificado pelo nº 297/2010.

Análise estatística

Os valores das concentrações letais, CL_{50} e CL_{90} , foram determinados pela análise de Probit. A diferença de mortalidade entre os grupos tratados e criadouros foi verificada pela Análise de variância e o teste de Tukey, pelo programa GraphPad Prism5, ao nível de 5%.

RESULTADOS

Nos bioensaios em laboratório, a mortalidade das larvas de primeiro e segundo estádios foi de 100% a 5ppm em todas as repetições e criadouros. As concentrações letais, CL_{50} e CL_{90} , encontradas para larvas de terceiro estádio de *Ae. aegypti* (Tabela 1) foram, respectivamente, de 9,3 ppm e 20,2 ppm no pneu, de 7,2 ppm e 19,3ppm no plástico e de 8,2 ppm e 21,8 ppm no vidro. Não houve diferença significativa das concentrações letais entre pneu, plástico e vidro ao nível de 5%.

Para larvas de quarto estádio, as CL_{50} e CL_{90} foram, respectivamente, de 7,6 ppm e 19,2 ppm no pneu; de 6,6 ppm e 15,4 ppm no plástico e de 6,9 ppm e 16,2 ppm no vidro. Não houve diferença significativa entre os criadouros testados. A maior parte das larvas de quarto estádio morreu na tentativa de sair do contato com o produto, empupando-se. Esse processo ocorreu em todas as concentrações.

Os valores das CL_{50} e CL_{90} encontrados para as pupas foram de 110,1 ppm e 175,1ppm, de 93,6 ppm e 158,7 ppm e de 98,8 ppm e 163,7 ppm, respectivamente, para pneu, plástico e vidro (Tabela 1). Não houve diferença significativa da mortalidade de pupas entre os criadouros e nem morte nas larvas e pupas no controle negativo. Houve mortalidade total das larvas no controle positivo (temefós 1 ppm) e sobrevivência total de pupas.

Nos bioensaios no campo, as concentrações letais, CL_{50} e CL_{90} , encontradas para larvas de terceiro estádio de *Ae. aegypti*, foram, respectivamente, de 45,0 ppm e 65,4 ppm, de 27,8 ppm e 51,3 ppm e de 29,4 ppm e 52,9 ppm para experimentos

realizados em pneu, plástico e vidro. Não houve diferença significativa da mortalidade entre os recipientes ao nível de 5%.

Tabela 1. Suscetibilidade de larvas terceiro e quarto estádios e pupas de *Aedes aegypti* ao extrato bruto etanólico de *Persea americana* em laboratório após 24 horas de exposição em diferentes criadouros

Criadouros	Estádio	CL ₅₀ /ppm (IC 95%)	CL ₉₀ /ppm(IC 95%)
Pneu	L3	9,3 (4,8-13,5)	20,9 (15,4-26,6)
	L4	7,6 (4,0-11,5)	19,2 (16,0-25,2)
	Pupa	110,1 (85,8-137,0)	175,1 (148,7-210,2)
Plástico	L3	7,2 (3,4-10,8)	19,3 (13,7-28,2)
	L4	6,6 (3,2-10,0)	15,4 (10,8-20,3)
	Pupa	93,6 (51,1-121,1)	158,7 (123,3-213,8)
Vidro	L3	8,2 (3,8-10,8)	21,8 (14,4-32,6)
	L4	6,9 (2,6-11,3)	16,2 (10,7-23,0)
	Pupa	98,8 (48,2-110,5)	163,70 (147,8-187,2)

CL₅₀ – concentração letal necessária para matar 50% das larvas e pupas; ppm - partícula por milhão; IC - intervalo de confiança com 95% de probabilidade; CL₉₀ – concentração letal necessária para matar 90% de larvas e pupas; L₃ – larva de terceiro estádio; L₄ – larva de quarto estádio.

Para larvas de quarto estádio, as CL₅₀ e CL₉₀ foram, respectivamente, de 30,3 e 53,6 ppm para pneu, de 23,8 ppm e 46,9 ppm para plástico e de 26,0 ppm e 49,4 ppm para vidro. Não houve diferença significativa da mortalidade entre os criadouros.

As CL₅₀ e CL₉₀ encontradas para as pupas foram de 253,5 ppm e 350,5ppm; 145,3 ppm e 261,9ppm e de 167,9 ppm e 286,1ppm, respectivamente, para pneu, plástico e vidro (Tabela 2). A mortalidade das pupas em pneu, plástico e vidro não apresentou diferença significativa ao nível de 5%.

Tabela 2. Suscetibilidade de larvas e pupas de *Aedes aegypti* ao extrato bruto etanólico de *Persea americana* após 24 horas de exposição em diferentes criadouros no campo

Criadouros	Estádio	CL ₅₀ /ppm (IC 95%)	CL ₉₀ /ppm(IC 95%)
Pneu	L3	45,0 (33,3–53,7)	65,4 (54,9–80,5)
	L4	30,3 (22,8–37,1)	53,6 (44,3–67,2)
	Pupa	253,5 (172,2–304,8)	350,5 (288,2–429,8)
Plástico	L3	27,8 (19,9–34,8)	51,3 (36,6–57,6)
	L4	23,8 (13,7–32,9)	46,9 (34,1–68,8)
	Pupa	145,3 (102,9–181,6)	261,9 (212,4–334,1)
Vidro	L3	29,4 (20,7–37,1)	52,9 (42,3–69,0)
	L4	26,0 (18,5–33,8)	49,4 (39,7–64,0)
	Pupa	167,9 (104,2-218,6)	286,1 (220,0–380,9)

CL₅₀ – concentração letal necessária para matar 50% das larvas e pupas; ppm - partícula por milhão; IC - intervalo de confiança com 95% de probabilidade; CL₉₀ – concentração letal necessária para matar de 90% de larvas e pupas; L₃ – larva de terceiro estádio e L₄ – larva de quarto estádio.

A dose de 10 ppm causou 100% de mortalidade em larvas de primeiro e segundo estádios em todas as repetições e criadouros em campo.

A avaliação da toxicidade aguda do ebe de *P. americana* não apresentou diferença significativa entre os grupos tratados e controles ao nível de 5%. A produção de excretas foi constante durante o tratamento.

Quanto ao *screening* hipocrático, nenhuma alteração sensorial e motora foi observada no decorrer do experimento. Os animais apresentaram-se responsivos a todos os estímulos, demonstraram atividade motora adequada, pelos brilhantes, sem secreções nasais, auriculares ou oculares e não apresentaram ptose em nenhum momento do tratamento. Mostraram-se dóceis à manipulação para as pesagens e troca de caixas. Não foram observados óbitos dos animais experimentais nem do grupo controle.

DISCUSSÃO

As CL_{50} e CL_{90} do ebe de *P. americana* para o *Ae. aegypti* foram bem menores em laboratório do que as encontradas no campo. Isso se deve, provavelmente, às interferências das variáveis climáticas como temperatura, umidade e fotoperíodo, conforme já evidenciado (45) com relação à temperatura, o que causou diferença significativa da mortalidade de larvas de *Ae. aegypti*.

A CL_{50} do ebe da casca do caule de *P. americana* para as larvas de terceiro estádio, em recipiente plástico no laboratório, foi de 7,2 ppm, semelhante ao relatado na literatura (24): CL_{50} de 8,87mg/L (ou ppm), utilizando-se o extrato da semente desta planta.

Diversos estudos com plantas têm demonstrado que elas podem ser candidatas ao uso no controle de *Ae. aegypti*. Como demonstrou Costa et al. (2005) (15) que observaram efeitos tóxicos de alguns constituintes voláteis presentes nos óleos de *Syzigium aromaticum*, *Lippia sidoides*, e *Hyptis martiusii* sobre larvas de terceiro estádio de *Ae. aegypti* em laboratório. Essas plantas apresentaram as CL_{50} de 21,4 ppm, 19,5 ppm e 18,5 ppm. Essas concentrações letais foram maiores do que as de *P. americana* deste trabalho.

O ebe de *P. americana* apresentou maior atividade larvicida para o *Ae. aegypti*, em condições de campo, com CL_{90} de 65,4 ppm, 51,3 ppm e 52,9 ppm, respectivamente, para os criadouros pneu, vidro e plástico, do que as concentrações obtidas em outro trabalho (38) que utilizou frações hexânicas e metanólicas do óleo-resina de *Copaifera langsdorffii*.

O efeito larvicida do extrato bruto hexânico de folhas de *Leucas aspera* contra larvas de primeiro, segundo, terceiro e quarto estádios de *Ae. aegypti*, encontrado em laboratório (29), foi de CL_{50} de 77,4 ppm, 144,0 ppm, 199,7 ppm e 257,1 ppm, respectivamente. Comparando essas concentrações letais com as de *P. americana*, que apresentou CL_{100} de 5ppm para primeiro e segundo estádios e CL_{50}

de 7,2ppm e 6,6ppm, respectivamente, para terceiro e quarto estádios, verifica-se um potencial larvicida cerca de dez vezes maior desta planta em relação à *L. aspera*.

O ebe de *P. americana* apresentou as CL₅₀ e CL₉₀ de 6,6 ppm e 15,4ppm para terceiro e quarto estádios de *Ae. aegypti*, respectivamente. Essas concentrações foram inferiores às encontradas na literatura (14, 21, 22, 23, 35) para as plantas *Apium graveolens*, *Croton nepetaefolius*, *C. argyrophyloides*, *C. sonderianus*, *C. zenhtneri*, *Vanillosmopsis arborea*, *Millingtonia hortensis*, *Annona squamosa*, *Bauhinia variegata*, *Plumeria alba*, *Psidium guajava*, *Syzygium cumini*, *Alstonia scholaris*, *Michelea champaca*, *Holoptelia integrifolia*, *Quisqualis indica* e *Nerium indicum*.

Outra importante característica do ebe de *P. americana*, observada neste estudo, foi o efeito pupicida sobre *Ae. aegypti*, em contraste com o controle positivo, o temefós (a 1ppm), que é o produto químico-sintético de maior eficácia contra as larvas deste mosquito e que foi inócua para pupas, nas quais se verificou 100% de sobrevivência.

A atividade pupicida de *P. americana* sobre *Ae. aegypti* foi o resultado mais relevante diante da escassez de produtos de origem químico-sintética ou botânica que apresentem efeitos similares. As concentrações letais encontradas para larvas foram bem menores do que para pupas. Isso se deve, provavelmente, às vias de intoxicação do produto que é ingerido pelas larvas no plancton e outras partículas e, por contato, no caso das pupas. No caso do ebe de *P. americana*, este atravessou o exoesqueleto, intoxicando as pupas e levando-as à morte.

As CL₉₀ de laboratório e de campo realizadas com pneu foram de 175,1 ppm e 350,5 ppm, respectivamente. Este resultado é comparável ao obtido por Macchioni et al. (2004) (26) em pesquisa com a planta *Callitris glaucophylla* e saponinas extraídas de frutos de *Balanites aegyptiaca*; estas interferiram na emergência de adultos, com concentração letal de 500 ppm para alcance de 100% de mortalidade. Na literatura pertinente ao assunto, estudos com extratos de *Albizzia amara* e *Ocimum basilicum* mostraram ação pupicida em concentrações maiores até cem vezes do que as deste trabalho (37).

As probabilidades de diminuição das concentrações letais se ampliam quando substâncias ativas são isoladas e purificadas (51, 54). As subfrações do óleo-resina de *C. reticulata*, CRM₁₋₄ (sesquiterpenos) e CRM₅₋₇ (diterpeno labdano), apresentaram CL₅₀ de 0,2 ppm e 0,8 ppm, respectivamente. Com o isolamento e purificação do ebe de *P. americana* espera-se que o mesmo resultado venha a acontecer, pois o ebe desta planta apresentou a CL₅₀ de 7,3 ppm.

Os resultados relativos ao exame de toxicidade oral aguda demonstraram que não houve sinais de intoxicação e nem complicações de ordem fisiológica, motora e comportamental nos grupos experimental e controle.

Neste trabalho foi demonstrada atividade larvicida e pupicida do ebe da planta *P. americana* sobre *Ae. aegypti* tanto no laboratório como no campo. Vale ressaltar as inúmeras vantagens das substâncias de origem botânica quando

comparadas ao emprego de inseticidas sintéticos por serem obtidas de recursos renováveis e rapidamente degradáveis. Outro benefício dos produtos de origem botânica, em detrimento dos sintéticos, é o fato de ser lento o desenvolvimento de resistência dos insetos a essas substâncias compostas da associação de vários princípios ativos, além de não deixarem resíduos. Portanto, uma alternativa para evitar o desenvolvimento rápido de resistência a produtos químicos sintéticos é a utilização de produtos inseticidas de plantas em razão da complexidade de seus compostos (48).

REFERÊNCIAS

1. Aguilera L, Navarro A, Tacoronte JE, Leyva M, Marquetti MC. Efecto letal de myrtaceas cubanas sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Rev Cubana Med Trop* 55: 100-104, 2003.
2. Amer A, Mehlhorn H. Persistency of larvicidal effects of plant oil extracts under different storage conditions. *Parasitol Res* 99: 473-477, 2006.
3. Andrade CFS, Modolo M. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* in integrated control. *Rev Saúde Pública* 25: 184-187, 1991.
4. Barbosa SJJ, Siqueira JBJ, Coelho GE, Vilarinhos PT, Pimenta FGJ. Dengue in Brazil: current situation and prevention and control activities. *Epidemiol Bull* 23: 3-6, 2002.
5. Barreto CF, Cavasin GM, Silva HHG, Silva IG. Estudo das alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindus saponaria* Lin (Sapindaceae). *Rev Patol Trop* 35: 37-57, 2006.
6. Braga IM, Valle D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde* 16: 113-118, 2007.
7. Braga IM, Valle D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol Serv Saúde* 16: 279-293, 2007.
8. Brogdon WG, McAllister JC. Simplification of adult mosquito bioassays through use time-mortality determinations in glass bottles. *J Am Mosq Control Assoc* 14: 59-164, 1998.
9. Campos J, Andrade CFS. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Rev Saúde Pública* 35: 232-236, 2001.
10. Carvalho M do SL de, Caldas ED, Degallier N, Vilarinhos P de TR, Souza LCK de, Yoshizawa MAC, Knox MB, Oliveira C. Susceptibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. *Rev Saúde Pública* 38: 623-629, 2004.
11. Cavalcanti ESB, Morais SM, Lima MAA, Santana EWP. Larvicidal Activity of Essential Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 541-544, 2004.
12. Champakaew D, Choochote W, Pongpaibul Y, Chaithong U, Jitpakdi A, Tuetun B, Pitasawat B. Larvicidal efficacy and biological stability of a botanical natural product, zedoary oil-impregnated sand granules, against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Parasitol Res* 100: 729-737, 2007.
13. Cheng SS, Huang CG, Chen YJ, Yu JJ, Chen WJ, Chang ST. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. *Bioresource Technol* 1: 452-456, 2009.
14. Choochote W, Tuetun B, Kanjanapothi D, Rattanachanpichai E, Chaithong U, Chaiwong P, Jitpakdi A, Tippawangkosol P, Riyong D, Pitasawat B. Potential of crude extract of celery, *Apium graveolens* L., against the insect *Aedes aegypti* (L) (Diptera: Culicidae). *J Vector Ecol* 29: 340-346, 2004.
15. Costa JGM, Rodrigues FFG, Angélico EC, Silva MR, Mota ML, Santos NKA, Cardoso ALH, Lemos TLG. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. *Rev Bras Farmacogn* 15: 304-309, 2005.
16. Espindola BR, Guedes RN, Souza RCP. Avaliação da eficácia do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* no controle de formas imaturas do *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 762) em ambiente de laboratório. *EntomoBrasilis* 1: 10-13, 2008.

17. Ferreira BP. Propagação do abacateiro (*Persea sp.*) por estaquia e mergulha. Porto Alegre: Monografia acadêmica. 2008. Disponível em: www.lume.ufrgs.br/ Acesso em: 28/01/2011.
18. Gubler DJ, Clark GG. Community based integrate control of *Aedes aegypti*: a brief overview of current programs. *Am J Trop Med Hyg* 50: 50-60, 1994.
19. Guzman MGT, Kouri GF, Bravo JRG. Emergence of dengue hemorrhagic fever in the Americas. Reemergence of dengue. *Rev Cubana Med Trop* 51: 5-13, 1999.
20. Harris AF, Shavanthi R, Ranson H. Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am J Trop Med Hyg* 83: 277-284, 2010.
21. Kanis LA, Antonio RD, Antunes ÉP, Prophiro JS, Silva OS. Larvicidal effect of dried leaf extracts from *Pinus caribaea* against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) *Rev Soc Bras Med Trop* 42: 373-376, 2009.
22. Kaushik R, Saini P. Screening of some semi-arid region plants for larvicidal activity against *Aedes aegypti* mosquitoes. *J Vector Borne Dis* 46: 244-246, 2009.
23. Kim MK, Jang YS, Ahn YJ, Lee DK, Lee HS. Larvicidal activity of Australian and Mexican plant extracts against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae). *J Asia Pac Entomol* 5: 227-231, 2002.
24. Leite JJ, Brito EH, Cordeiro RA, Brilhante RS, Sidrim JJ, Bertini LM, Morais SM, Rocha MF. Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts. *Rev Soc Bras Med Trop* 42: 110-113, 2009.
25. Lu QY, Arteaga JR, Zhang Q, Huerta S, Go VLW, Heber D. Inhibition of prostate cancer cell growth by an avocado extract: role of lipid-soluble bioactive substances. *J Nutr Biochem* 16: 23-30, 2005.
26. Macchioni F, Carugini S, Cecchi F, Siciliano T, Braca A, Cioni P, Morelli I. Aqueous extract of *Codonopsis javanica* against larval and pupal stages of *Aedes albopictus*. *Annali Faci Med Vet* 57: 215-220, 2004.
27. Macoris M de LG, Andrighetti MTM, Takaku L, Glasser CL, Garbeloto VC, Bracco JE. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 703-708, 2003.
28. Magadula JJ, Innocent E, Otieno JN. Mosquito larvicidal and cytotoxic activities of 3 *Annona* species and isolation of active principles. *J Med Plants Res* 3: 674-680, 2009.
29. Maheswaran R, Sathish S, Ignacimuthu S. Larvicidal activity of *Leucas aspera* (Willd.) against the larvae of *Culex quinquefasciatus* Say and *Aedes aegypti* L. *Int J Integr Biol* 2: 214-217, 2008.
30. Malone MH. Pharmacological Approaches to Natural Products Screening and Evaluation Wagner, H.; Wolff, P. (Ed.). In: *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity*. Berlin, Spriger-Verlag, 1977. p. 23-53.
31. Marcombe S, Carron A, Darriet F, Etienne M, Agnew P, Tolosa M, Yp-Tcha MM, Lagneau C, Yébakima A, Corbel V. Reduced efficacy of pyrethroid space sprays for dengue control in an area of Martinique with pyrethroid resistance. *Am J Trop Med Hyg* 80: 745-751, 2009.
32. Ministério da Saúde. Brasília. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Informe Epidemiológico da dengue*. Semanas de 1 a 7 de 2011: [27 páginas]. Disponível em: portal.saude.gov.br/.../informe_epidemiologico_semana_1_a_7_09_revisado, 2011. Acesso em: 28/01/2011.
33. Ministério da Saúde. Brasília: *Secretaria de Vigilância em Saúde Atualização em 17/01/2011* [10 páginas]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/area.cfm?id_area=1498, 2011. Acesso em: 05/06/2011.
34. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. *Dengue - Manual de Normas Técnicas, Instrução para pessoal de combate ao vetor*. Brasília, 2001. p. 83.
35. Morais SM, Cavalcanti ES, Bertini LM, Oliveira CL, Rodrigues JR, Cardoso JH. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian Croton species against *Aedes aegypti* L. *J Am Mosq Control Assoc* 4: 22-161, 2006.
36. Mullai K, Jebanesan A, Pushpanathan T. Effect of bioactive fractions of *Citrullus vulgaris* Schrad. leaf extract against *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. *Parasitol Res* 102: 951-955, 2008.

37. Murugan K, Murugan P, Noortheen A. Larvicidal and repellent potential of *Albizia amara* Boivin and *Ocimum basilicum* Linn against dengue vector, *Aedes aegypti* (Insecta:Diptera:Culicidae). *Bioresource Technol* 98: 198-201, 2007.
38. Oliveira JÁ. Atividade larvicida de *Copaifera reticulata* E *C. langsdorffii* Sobre larvas de *Aedes aegypti*, em ensaios de campo. Goiânia [Tese de doutorado em Medicina Tropical – IPTSP/UFG], 2008.
39. OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde. *Dengue y dengue hemorrágico em las Américas: guías para su prevención y control*. Washington DC: OPS. Publicacion Cientifica No. 548, 1995.
40. Organisation For Economic Cooperation And Developmente (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development, 2001.
41. Pavela R. Larvicidal effects of various Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 102: 555-559, 2008.
42. Penido C, Costa KA, Pennaforte RJ, Costa MFS, Pereira JFG, Siani AC, Henriques MGMO. Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergeninduced vascular permeability and hyperalgesia. *Inflamm Res* 54: 295-303, 2005.
43. Polanczyk RA, Garcia MO, Alves SB. Potencial de *Bacillus thuringiensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. *Rev Saúde Pública* 37: 813-816, 2003.
44. Praça LB, Batista AC, Martins ES, Siqueira CB, Dias DGS, Gomes ACMM, Falcão R, Monnerat RG. Estirpes de *Bacillus thurnigiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. *Pesq Agropec Bras* 39: 11-16, 2004.
45. Prophiro JS, Rossi JCN, Kanis LA, Santos TE, Silva OSS. Estudo Comparativo do Efeito Larvicida de Extratos de Frutos Verdes e Maduros de *Melia azedarach* L. (Sapindales: Meliaceae) em *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *BioAssay* 3: 1-5, 2008.
46. Pushpanathan T, Jebanesan A, Govindarajan M. The essential oil of *Zingiber officinalis* Linn (Zingiberaceae) as a mosquito larvicidal and repellent agent against the filarial vector *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 102: 1289-1291, 2008.
47. Rahuman AA, Gopalakrishnan G, Venkatesan P, Geetha K. Larvicidal activity of some Euphorbiaceae plant extracts against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 102: 867-873, 2008.
48. Roel AR. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. Universidade Católica Dom Bosco. *Interações (Campo Grande) I*: 43-50, 2001.
49. Rothman AL. Dengue: defnig protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest* 113: 946-951, 2004.
50. Schmutterer H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annu Rev Entomol* 35: 271-297, 1990.
51. Silva HHG, Geris R, Silva IG, Rodrigues Filho E. Larvicidal activity of oil-resin fractions from the brazilian medicinal plant *Copaifera reticulata*. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 264-267, 2007.
52. Silva HHG, Silva IG. Estudos do ciclo evolutivo do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) a partir de ovos com quatro meses de estocagem em laboratório. *Rev Patol Trop* 29: 95-100, 2000.
53. Silva HHG, Silva IG, Lira KS. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. *Rev Patol Trop* 27: 53-63, 1998.
54. Silva HHG, Silva IG, Santos RMG, Filho ER, Elias CN. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindácea) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev Soc Bras Med Trop* 37: 396-399, 2004.
55. Silva IG, Guimarães VP, Lima CG, Silva HHG, Elias CN, Mady CM, Silva VVM, Nery AP, Rocha KR, Rocha C, Isac E. Efeito larvicida e toxicológico do extrato bruto etanólico da casca do caule de *Magonia pubescens* sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae), em criadouros artificiais. *Rev Patol Trop* 32: 73-86, 2003.

56. Silva JS, Mariano FZ, Scopel I. Ano dengue no Brasil e as políticas de combate ao *Aedes aegypti*: Da tentativa de erradicação as políticas de controle. *Hygeia* 3: 163-175, 2008.
57. Silva OS, Prophiro JS, Rossi JCN, Kanis LA, Romão PRT, Blazius RD. Larvicidal effect of andiroba oil *Carapa guianensis* (Meliaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Am Mosq Control Assoc* 22: 699-701, 2006.
58. Simas NK, Lima EC, Conceição SR, Kuster RM, Filho AMO. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvívica de *Myrozylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Quim Nova* 27: 46-49, 2004.
59. Souza SS, Silva IG, Silva HHG. Associação entre incidência de dengue, pluviosidade e densidade larvária de *Aedes aegypti*, no Estado de Goiás. *Rev Soc Bras Med Trop* 43: 152-155, 2010.
60. Sukamar K, Perich MJ, Boobar LR. Botanical derivatives in mosquito control: a review. *J Am Mosq Control Assoc* 7: 210-237, 1991.
61. Tauil PL. Urbanization and dengue ecology. *Cad Saúde Pública* 17: 99-102, 2001.
62. Teixeira MG, Barreto ML, Guerra Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. *Inf Epidemiol SUS* 8: 5-33, 1999.
63. Vasconcelos PFC, Lima JWO, Rosa APAT, Timbó MJ, Rosa EST, Lima HR, Rodrigues SG, Rosa JFST. Epidemia de dengue em Fortaleza, Ceará: inquérito soro-epidemiológico aleatório. *Rev Saúde Pública* 32: 447-454, 1998.
64. Whitehead SS, Falgout B, Hanley KA, Blaney JE, Markoff L, Murphy BR. A life, Attenuated Dengue Virus Type 1 Vaccine Candidate with a 30-Nucleotide Deletion in the 3' Untranslated Region Is Highly Attenuated and Immunogenic in Monkeys. *J Virol* 77: 1653-1657, 2003.
65. WHO – World Health Organization. *Vector Control: methods for use by individuals and communities*. Geneva WHO. 2nd ed. 1997. p.84.
66. WHO - World Health Organization. Dengue/dengue haemorrhagic fever. 1999 [acessado 2011 dez 06]. páginas: 27. Disponível em: <http://www.searo.who.int/LinkFiles/DengueGuideline-dengue.pdf>