
**EFEITO LARVICIDA E TOXICOLÓGICO DO
EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DA CASCA DO
CAULE DE *Magonia pubescens* SOBRE *Aedes
aegypti* (DIPTERA, CULICIDAE), EM CRIADOUROS
ARTIFICIAIS**

Ionizete Garcia da Silva,^{1/2} Viviany Pires Guimarães,¹ Cleyverton Garcia Lima,³ Heloisa Helena Garcia da Silva,^{1/2} Carmeci Natalina Elias,¹ Caroline Martins Mady,³ Vivian Vanini da Mota e Silva,³ Alexandre de Paiva Nery,³ Keila Rodrigues da Rocha,³ Cleonice Rocha⁴ e Eliana Isac²

RESUMO

Ensaio biológico foram realizados, em condições de campo, para verificar a atividade larvicida do extrato bruto etanólico (e.b.e.) da casca do caule da *Magonia pubescens* sobre o *Aedes aegypti*, na busca de novas alternativas de controle para esse mosquito. O material botânico foi coletado e, em seguida, dessecado em estufa de ar forçado a 40°C, moído, percolado a frio em etanol por 72 horas, filtrado, concentrado em evaporador rotativo e dessecado em uma capela à temperatura ambiente. O e.b.e. obtido foi dissolvido em água destilada e testado para todos os estádios larvais de *A. aegypti*. No laboratório, os experimentos foram realizados em copos descartáveis de 50 mL, colocando-se 25 mL de solução e 1 larva em cada um. Foram feitas 20 réplicas para cada estádio e testemunha. A mortalidade foi avaliada após 48 horas do início do teste. A CL₅₀ encontrada para larvas de primeiro, segundo, terceiro e quarto estádios foi de: 35; 36; 75 e 70 mg de e.b.e./100 mL de água destilada, respectivamente. Na seqüência dos estádios, a CL₁₀₀ foi de 45; 85; 125 e 115 mg de e.b.e./100 mL de água destilada. No campo os bioensaios foram realizados com larvas de terceiro estádio, por um período de 12 semanas, num fundo de quintal, na cidade de Anápolis, Goiás. Para esses experimentos utilizou-se água do sistema público, e a CL₁₀₀ foi ajustada para 140 mg/100 mL de água. A solução do e.b.e., na dose ajustada, foi colocada nos criadouros artificiais mais comuns do *A. aegypti*, para avaliar a atividade residual e a interferência do tipo de recipiente na mortalidade. O e.b.e. da *M. pubescens* demonstrou

1 Laboratório de Bioatividade de Plantas e Entomologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

2 Prof. do Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia do IPTSP-UFG.

3 Bolsista de Iniciação Científica do CNPq.

4 Departamento de Matemática e Física da Universidade Católica de Goiás.

Endereço para correspondência: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública IPTSP/UFG. Rua Delenda Rezende de Melo, esq. com a 1ª Avenida, Setor Universitário, Caixa Postal 131, CEP 74605-050, Goiânia, GO. E-mail: ionizete@iptsp.ufg.br

Recebido para publicação em 21/2/2002. Revisto em 28/10/2002. Aceito em 21/2/2003.

atividade larvicida para todos os estádios de *A. aegypti*, no laboratório. No campo, a mortalidade diminuiu à medida que a solução envelhecia. O tipo de criadouro interferiu na mortalidade. Testes toxicológicos foram realizados com o e.b.e. da *M. pubescens*, que se mostrou atóxico de acordo com as normas para produtos de origem vegetal.

DESCRITORES: *Magonia pubescens*. *Aedes aegypti*. Inseticida botânico. Controle.

INTRODUÇÃO

Aceita-se que o *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) tenha se originado no continente africano, pelas evidências de comportamento primitivo e silvestre que ele ainda mantém naquele continente. Nos outros, o mosquito só tem sido encontrado em áreas urbana e periurbana. Sua dispersão acompanhou a movimentação humana e sua proliferação foi beneficiada pelas modificações antrópicas do meio ambiente, onde se cria em água limpa; porém, em certas regiões, adaptou-se a águas poluídas (Forattini, 1965; Consoli & Oliveira, 1994; Silva et al., 1999).

O ovo de *A. aegypti* é a fase mais resistente do ciclo biológico, pois suporta condições desfavoráveis, continuando viável até 492 dias após a oviposição, o que contribui para a dispersão passiva desse mosquito (Rodhain, 1996; Silva et al., 1998).

A. aegypti é o mosquito mais associado ao homem, criando-se nos mais diversos recipientes artificiais resultantes do lixo urbano sem destino adequado (Silva et al., 1999). No Brasil, esse mosquito foi considerado erradicado em 1955 e 1973. Reintroduziu-se em 1967, 1978 e, dessa época para cá, dispersou-se para quase todo o território brasileiro (Nobre et al., 1994; Mondet et al., 1996; Teixeira et al., 1999; Brasil, 1999). Isso contribuiu para o aparecimento e as repetições de epidemias de dengue, com a possibilidade de reurbanização da febre amarela. As epidemias de febre amarela urbana desapareceram no Brasil desde os anos 50, mas o ciclo silvestre existe, fazendo que a cada ano sejam registrados alguns casos, principalmente entre turistas que adentram em matas sem antes se terem vacinado (Mondet et al., 1996).

Atualmente, a dengue é considerada a arbovirose humana mais importante, acometendo cerca de cem milhões de pessoas por ano no mundo (Mcbride et al., 2000), sendo que aproximadamente 40% da população mundial vive em áreas de risco (Gratz, 1991; Chastel, 1997; Pinheiro et al., 1997; Guzman et al., 1999; Murthy et al., 2000). A dengue é endêmica em todos os continentes, com exceção da Europa, e a febre hemorrágica dessa arbovirose ocorre na Ásia, nas Américas e em algumas ilhas do Pacífico (Pinheiro et al., 1997; Rosen, 1999). Nas Américas, a dengue tem sido relatada há mais de duzentos anos, sendo que a primeira epidemia, documentada laboratorialmente, ocorreu na região do Caribe e na Venezuela,

em 1963 e 1964, associada ao sorotipo Den-3 (Brasil, 1996a). No Brasil, a epidemia ocorreu pela primeira vez em 1981 e 1982, na cidade de Boa Vista (RO), tendo sido causada pelos sorotipos Den-1 e Den-4 (Vasconcelos et al., 1993).

Atualmente, há transmissão de dengue em 24 estados brasileiros, com circulação dos sorotipos Den-1, 2 e 3, em decorrência do aumento demográfico, da urbanização incontável e das condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento dos vetores (Rodhain, 1996; Brasil, 2000, Funasa, 2002).

Como ainda não há vacina pronta para a dengue, o controle dessa doença está restrito às ações antivetoriais. Estas têm mostrado vários problemas, dentre eles, o aparecimento de resistência do *A. aegypti* aos inseticidas (Mekuria et al., 1991; Thavaselvam et al., 1993; Mourya et al., 1997; Failloux et al., 1994; Macoris et al., 1995; Silva et al., 1997; Rawlins, 1998; Carvalho & Silva, 1999), motivando estudos de novas alternativas, como as substâncias de plantas ativas para insetos. Desde o século XIX, extratos vegetais foram usados para combater insetos antes do aparecimento dos inseticidas sintéticos. A partir de 1939 o piretro passou a ser utilizado e comercializado em muitos países. Na década de 1950, uma molécula análoga à da piretrina foi sintetizada, originando os inseticidas denominados piretróides. Em função do custo e volume de produção e comercialização, eles substituíram por algumas décadas os produtos naturais, os organoclorados e organofosforados. Com o aparecimento da resistência dos insetos aos inseticidas químicos sintéticos em uso, associada à necessidade de preservação do meio ambiente, pesquisas com produtos naturais retornam em várias partes do mundo (Dharmshaktu et al., 1987; Monzon et al., 1994; Slimstad et al., 1995; Silva et al., 1996; Choochote et al., 1999; Pizarro et al., 1999; Siddiqui et al., 2000; Guimarães et al., 2001).

Este trabalho teve a finalidade de buscar alternativas naturais, basicamente sem impacto ambiental, para o combate ao *A. aegypti*, com bioensaios no laboratório e no campo.

MATERIAL E MÉTODOS

Coletaram-se várias partes da planta *M. pubescens* (casca do caule, semente, cápsula do fruto e raiz), na região de Formosa, Goiás, as quais foram encaminhadas ao Laboratório de Bioatividade de Plantas do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG. Essas partes foram colocadas em estufa de fluxo de ar forçado a 40°C, para secagem. Posteriormente, foram moídas até atingirem baixa granulometria. O pó foi percolado a frio. Em um béquer de dois litros, colocaram-se 800 g desse pó, adicionado a um litro de álcool etílico absoluto, homogeneizando-o em agitador mecânico. O béquer foi coberto com papel-alumínio, e a solução permaneceu em repouso

por 72 horas. Após esse período, filtrou-se o sobrenadante em papel-filtro do tipo coador descartável. O mesmo foi submetido a mais quatro percolações.

O filtrado foi colocado em evaporador rotativo, e o extrato obtido foi transferido para um vidro âmbar com capacidade para 30 mL, para secagem à temperatura ambiente numa capela de exaustão. Depois de completamente seco, o produto cristalizado foi acondicionado em dessecador.

As larvas de *A. aegypti* foram retiradas de uma criação em alta escala do laboratório, onde foram produzidas de acordo com a metodologia de Silva et al. (1998). Essa colônia originou-se de mosquitos capturados em Goiânia em 1993 e vem sendo mantida por gerações sucessivas até o momento.

No laboratório, os bioensaios foram realizados em câmara climatizada a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $80 \pm 5\%$ e fotofase de doze horas. No preparo das soluções utilizadas pesou-se o e.b.e. em balança analítica, com a precisão de 0,0001 g. O material pesado foi dissolvido em água destilada, com o auxílio de um agitador magnético, por cerca de quinze minutos. As soluções foram preparadas 48 horas antes da realização dos testes. Empregaram-se vinte larvas para cada estágio, sendo oitenta larvas para cada experimento. Foram feitas cinco réplicas para cada bioensaio. A mesma quantidade de larvas foi usada para o grupo-controle em água destilada.

As leituras de mortalidade foram feitas 48 horas após o início dos testes. As larvas eram consideradas mortas quando havia ausência total de movimentos, com escurecimento do corpo e da cápsula cefálica. Os ensaios de campo foram realizados num fundo de quintal, arborizado, na cidade de Anápolis, Goiás. Utilizaram-se larvas de terceiro estágio de *A. aegypti*, em sete diferentes criadouros artificiais, para verificar a atividade residual do e.b.e. da *M. pubescens* e a interferência do tipo de recipiente na mortalidade das larvas. Foram preparados quinze litros de solução, no laboratório, na concentração de 140 mg de e.b.e./100 mL de água da rede pública de abastecimento. A CL_{100} encontrada no laboratório foi ajustada para o ensaio de campo. Usaram-se criadouros de cimento-amianto, pneu, plástico, cerâmica, cimento, vidro e lata. Em cada um se colocava 1,0 litro da solução do e.b.e. e cem larvas de terceiro estágio do *A. aegypti*, com cinco réplicas e seus respectivos controles. Os experimentos foram feitos durante doze semanas, com a mesma solução. Na realização dos experimentos no campo a temperatura média foi de $27 \pm 4,45^\circ\text{C}$, a umidade relativa, de $73 \pm 14,4\%$ e o fotoperíodo aproximado, de doze horas.

A toxicologia oral aguda foi realizada com solução do e.b.e. da casca do caule em diferentes concentrações até atingir a concentração de 4 g/kg de peso. Os testes foram feitos com quatro ratos albinos por concentração (sendo dois de cada sexo), os quais pesavam entre 180 e 200 g. Antes dos testes, eles ficavam doze horas em jejum absoluto, em caixa de polipropileno coberta com grade de arame inox, permanecendo dentro dessas

até o final dos experimentos. Essas caixas eram acondicionadas em salas apropriadas no biotério, com fotofase natural de aproximadamente doze horas, temperatura média de cerca de $28 \pm 3^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $70 \pm 15\%$.

As doses foram administradas através de uma sonda que as colocava diretamente no esôfago do rato. Os animais permaneciam sem alimentação por duas horas, depois recebiam água e ração. Eram observados diariamente por duas semanas para avaliação de sintomas de intoxicação aguda. As observações prosseguiram por vários meses. Trabalhou-se com quatro gerações sucessivas para análise de intoxicação crônica e reprodutiva. Em seguida, os grupos-teste e os grupos-controle foram acasalados para análise de efeitos tóxicos sobre reprodução e teratogenicidade.

O teste de irritação primária da pele foi realizado com quatro coelhos, que pesavam entre 700 e 900 g. Seus pêlos foram raspados em quatro sítios de cerca de 2 cm^2 , sendo dois para tratamento e dois para controle. Após 48 horas, dois sítios foram escarificados e os outros dois mantidos com a pele íntegra. Em seguida, aplicou-se 0,5mL da solução do e.b.e. a 10% nesses sítios. Colocou-se 0,5 ml de solução salina (0,1 mg/mL) nos sítios dos coelhos-controle. Todos os sítios foram tampados com uma gaze e uma bandagem impermeável. Após 24 horas da aplicação do produto, a bandagem era removida para avaliação, de acordo com a tabela de Draize (Brito, 1994), com leituras após 24 horas, 72 horas e uma semana.

O teste de irritação ocular foi realizado com quatro coelhos, que pesavam entre 800 e 1.000 g. A técnica consistiu na instilação de 0,1 mL da solução do e.b.e. 10% no olho direito de cada animal, permanecendo o olho esquerdo, não tratado, como controle. As pálpebras foram mantidas juntas por 30 segundos. As observações foram feitas em 24, 48, 72 e 96 horas e no sétimo dia após a aplicação, seguindo-se a graduação de intensidade das reações do método de Draize e de Kay (Brito, 1994).

As concentrações letais foram interpoladas pela Análise de Probit através do programa Statistical Product and Service Solution (SPSS). Aplicou-se o teste *t* para verificar as diferenças de mortalidade das larvas entre os criadouros.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apresentam-se os efeitos larvicida e toxicológico do e.b.e. da casca do caule da *M. pubescens* sobre todos os estádios de *A. aegypti* em laboratório, e sobre o terceiro estádio no campo. Optou-se por esse estádio em razão de sua maior tolerância ou “resistência” em relação aos demais. No campo, a solução do e.b.e. da casca do caule de *M. pubescens* foi preparada com água do sistema público, com a finalidade de facilitar, na prática, as ações de controle no ambiente urbano. Como existiam também as variáveis

climáticas e os diferentes tipos de criadouros, esses fatores interferiram na mortalidade, sendo a CL_{100} ajustada para o campo: 140 mg/100 mL de água.

A ação larvicida do e.b.e. da semente mostrou-se mais eficaz que a do e.b.e. da casca do caule, reduzindo o gasto desse produto pela metade, como mostra a Figura 1. Contudo, optou-se por testar o e.b.e. da casca do caule e não o da semente, pelo fato de que esta última só se encontra disponível nos meses de agosto e setembro, além de ser insolúvel em água, enquanto o e.b.e. da casca é hidrossolúvel – o que simplifica o preparo da solução para uso popular – e está disponível em qualquer época do ano. Essa condição viabilizou uma produção contínua e o uso programado. Outro fato de importância é a regeneração da casca do caule, em período que varia de seis a oito meses, sendo que a planta tem mantido o aspecto normal, durante o acompanhamento de quatro anos.

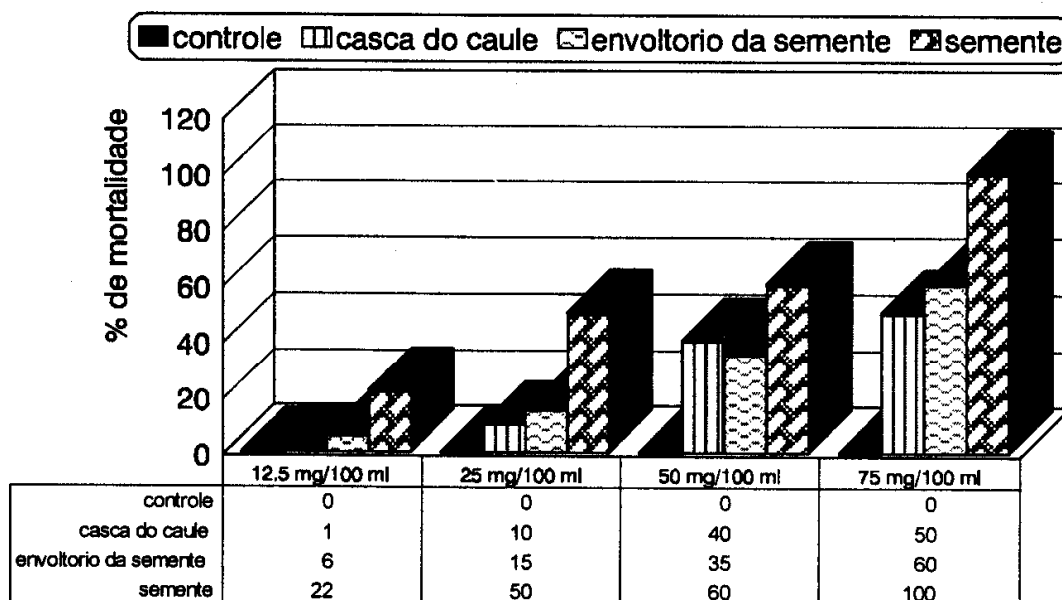


Figura 1. Mortalidade de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* pela ação do extrato bruto etanólico de várias partes da *Magonia pubescens*, após 48 horas

O e.b.e. foi diluído em água, apresentando coloração vermelho-tijolo, odor balsâmico forte, espuma e forte tensão superficial. Para evitar a morte das larvas pela interferência da espuma, os bioensaios foram realizados após 24 horas da preparação. Os resultados obtidos em laboratório e campo são apresentados nas Figuras 1, 2 e 3.

O e.b.e. da casca do caule da *M. pubescens* mostrou eficiência para todos os estádios larvais de *A. aegypti*, em laboratório. No campo, o estudo longitudinal demonstrou que há 100% de mortalidade até 48 horas após a aplicação do extrato. Este não apresentou efeito residual, e sua atividade diminuiu com o envelhecimento da solução nos diversos criadouros testados.

Considerando o período estudado, de 77 dias, a mortalidade das larvas foi significativamente maior nos criadouros de cerâmica, seguindo, em ordem decrescente, os de plástico, pneu, vidro, cimento, lata e cimento-amianto, pelo teste *t*, ao nível de 5% (Tabela 1 e Figura 3). A mortalidade nos recipientes de barro e plástico não apresentou diferença significativa entre si. Esses resultados da mortalidade sugerem uma interação entre o tipo de recipiente e o e.b.e. da casca do caule de *M. pubescens*. Eles mostram o potencial dessa planta, abrindo perspectivas de seu uso nas ações de combate ao *A. aegypti*, considerado como o vetor mais importante da dengue e da febre amarela urbana. Estudos e a partição química do extrato, sua purificação e separação cromatográfica e com a determinação de seus princípios ativos, tendo em vista diminuir as concentrações letais, estão sendo feitos para novas formulações. A CL₁₀₀ encontrada para o quarto estágio de *A. aegypti* foi igual a 115 mg do e.b.e./100 mL de água, portanto, menor em relação à CL₅₀ encontrada por Silva et al. (1996), de 150 mg/ 100 mL de água. Isso está relacionado ao tempo de contato da larva com o produto, que foi de 48 horas, reduzindo a concentração letal.

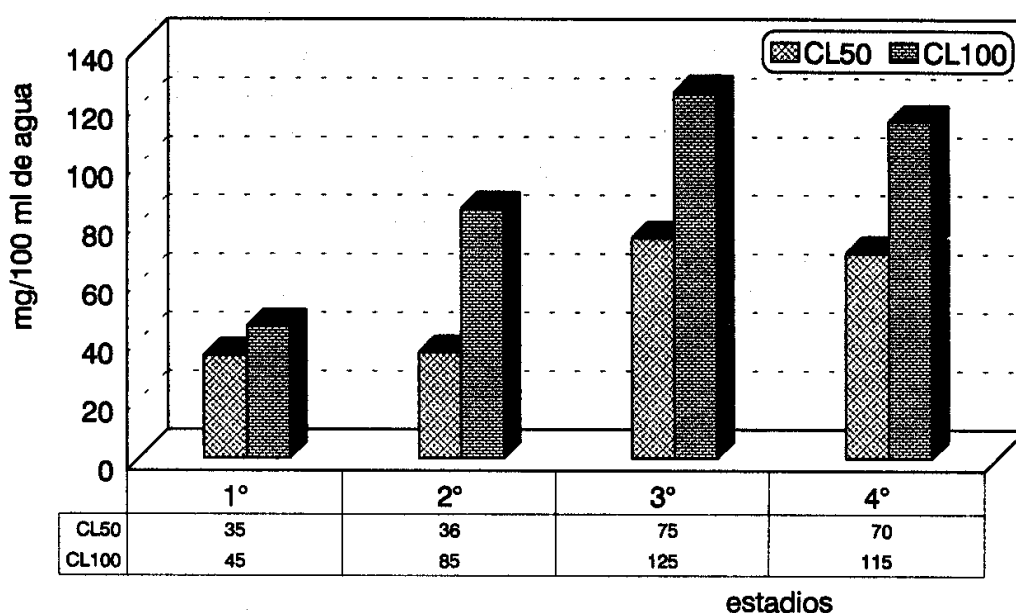


Figura 2. Suscetibilidade dos estágios larvais de *Aedes aegypti* ao extrato bruto etanólico da casca do caule de *Magonia pubescens*, após exposição de 48 horas

Alguns estudos já evidenciam a potencialidade do uso de extratos de plantas para o *A. aegypti*. Não há uma padronização nesses estudos quanto à unidade utilizada, o estágio e a concentração letal. Por isso, os resultados são extremamente discrepantes, variando de 4 a 5.000 ppm, e, em relação aos deste trabalho, são concordantes, similares ou discordantes.

Tabela 1. Avaliação da atividade larvicida residual do extrato bruto etanólico da *Magonia pubescens* sobre larvas de 3º estágio do *Aedes aegypti*, em diferentes criadouros artificiais, em condições de campo, durante 12 semanas.

| Semana | Amianto | Lata | Cimento | Vidro | Pneu | Plástico | Cerâmica |
|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 100±0,00 | 100±0,00 | 100±0,00 | 100±0,00 | 100±0,00 | 100±0,0 | 100±0,00 |
| 2 | 89,2±5,42 | 74,6±6,22 | 84,9±7,73 | 89,8±4,1 | 85,1±3,21 | 95,1±5,23 | 99,2±7,98 |
| 3 | 49,7±4,31 | 70,4±5,99 | 69,7±8,61 | 75,2±2,24 | 65,4±3,99 | 85,3±4,97 | 60,4±9,16 |
| 4 | 21,1±3,24 | 89,6±4,92 | 84,7±7,22 | 65,3±2,78 | 95,3±3,89 | 95,1±6,47 | 95,1±3,99 |
| 5 | 20,4±4,33 | 40,1±6,97 | 65,2±3,11 | 55,3±2,39 | 85,1±8,41 | 94,6±3,28 | 85,4±3,84 |
| 6 | 34,9±9,26 | 69,6±9,01 | 25,1±9,23 | 64,6±7,45 | 24,9±7,28 | 75,1±5,29 | 79,9±5,71 |
| 7 | 05±2,43 | 14,9±6,13 | 24,8±2,98 | 24,7±9,13 | 25,3±6,53 | 50,3±3,25 | 89,6±6,37 |
| 8 | 0,0 | 15,3±6,62 | 14,9±8,76 | 20,3±7,92 | 40,4±7,98 | 39,7±5,43 | 64,6±9,31 |
| 9 | 0,0 | 0,0 | 14,6±6,61 | 14,9±3,22 | 10,2±5,47 | 25,2±7,22 | 56,1±8,54 |
| 10 | 0,0 | 0,0 | 10±5,32 | 9,99±9,25 | 9,6±5,22 | 9,9±2,44 | 49,6±9,91 |
| 11 | 0,0 | 0,0 | 6±6,39 | 4,6±8,23 | 10,3±7,65 | 9,6±6,39 | 45,1±7,97 |
| 12 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 4,8±4,21 | 0,0 | 50,1±9,02 |

Nota: ± erro-padrão da média.

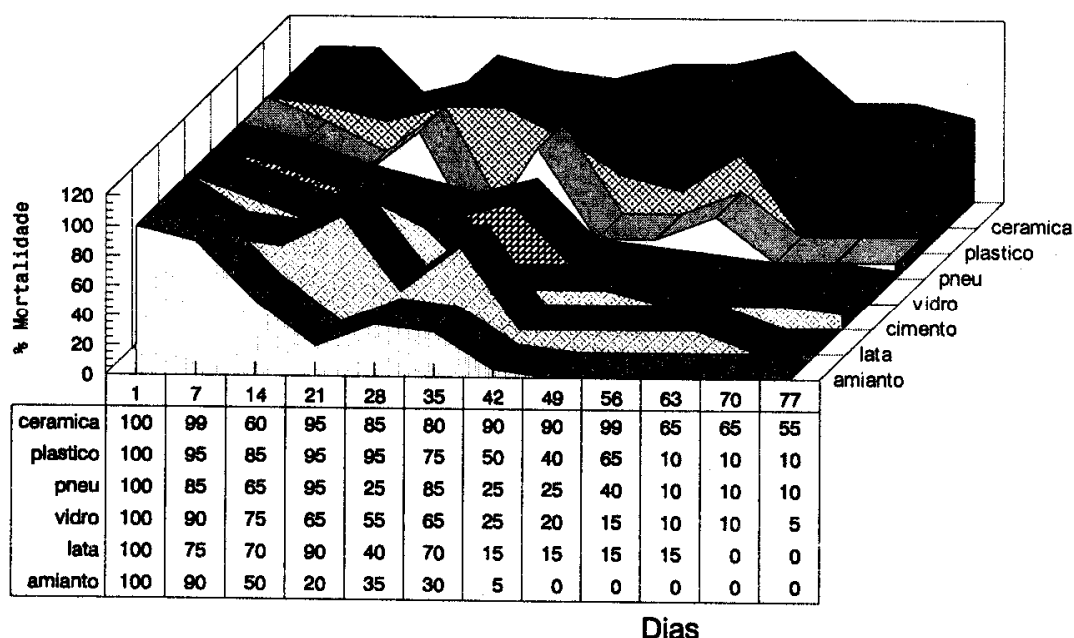


Figura 3. Suscetibilidade do *Aedes aegypti* ao extrato bruto etanólico da *Magonia pubescens*, em diferentes criadouros artificiais, em condições de campo durante doze semanas

Dharmshaktu et al. (1987), trabalhando com extratos de folhas de *Agave americana*, encontraram CL_{100} de 0,0032% para larvas de primeiro estágio e de 0,08% para o quarto estágio de *A. aegypti*, respectivamente. Com o e.b.e. de karanja (*Pongamia glabra*), Sagar et al. (1999) encontraram CL_{100} em 8 ppm para larvas de primeiro estágio de *A. aegypti*. Choochote et al. (1999) demonstraram ação repelente da fração de *Kaempferia galanga* para adultos de *A. aegypti*, por três horas, com $ED = 30,73 \text{ g/cm}^2$. Siddiqui et al. (2000) isolaram dois "Tetranortriterpenoids", da *Azadirachta indica*, com propriedades larvicidas para terceiro estágio de *A. aegypti*, com CL_{50} de 21 e 83 ppm, respectivamente.

Monzon et al. (1994) mostraram atividade larvicida de *Anona squamosa*, *Eucalyptus globulus*, *Lansium domesticum*, *Azadirachta indica* e *Codiaeum variegatum* para terceiro estágio de *A. aegypti*, com as CL₉₀ extremamente elevadas: 201,5 g/100 mL; 810,6 g/100 mL; 24,8 g/100 mL; 60,4 g/100 mL e 100 g/100 mL, respectivamente, após 24 horas de exposição. Ciccia et al. (2000) também apresentaram resultados elevados da *Abuta grandifolia* e *Minthostachys setosa* sobre larvas de terceiro estágio de *A. aegypti*, cuja CL₁₀₀ foi de 8,1 mg/mL e 25,2 mg/mL, respectivamente.

A planta mais promissora, *Tagetes minuta*, tem sido estudada por vários pesquisadores, e a sua atividade inseticida foi demonstrada para diversos insetos. Macedo et al. (1997), utilizando o e.b.e. dessa planta, mostraram sua atividade sobre larvas de quarto estágio de *A. fluviatilis* com CL₉₀ = 1,50 mg/L e CL₅₀ = 1,0 mg/L. Para *A. aegypti*, Green et al. (1991) demonstraram a atividade larvicida do óleo dessa planta, com CL₅₀ = 10 ppm para o terceiro estágio. Com a mesma planta e o mesmo estágio desse mosquito, Perich et al. (1994) encontraram uma CL₉₀ de 4 ppm.

Slimestad et al. (1995) apresentaram a atividade larvicida de *Melantheria albinervia* para o *A. aegypti*, nas concentrações de 500 ppm (extrato diclorometano) e 250 ppm (ácido 2 diterpene), após 24 horas de exposição. Essas doses foram compatíveis com aquelas encontradas neste trabalho com a *M. pubescens*. Schwartz et al. (1998), utilizando folhas do *Cyperus iria*, planta amplamente distribuída na Ásia e África, isolaram uma substância juvenilizante (JHIII) que impedia que as larvas de *A. aegypti* passassem aos estádios subseqüentes, usando CL₅₀ entre 267 e 427 mg/100 ml de água. Alguns estudos já evidenciam a potencialidade do uso para insetos vetores de doenças no Brasil, como o de Pizarro et al. (1999), que estudaram a atividade do extrato bruto desidratado e de frações de saponina da *Agave sisalana*, conhecida popularmente como sisal, planta com vasta distribuição no Nordeste e usada como fonte de fibra para a tecelagem. Esses autores encontraram atividade larvicida dessa planta sobre o *A. aegypti*, determinando a CL₅₀ em 322 e 204 ppm, respectivamente, para o extrato e a saponina, o que vislumbra a possibilidade de seu uso nas ações de controle através do aproveitamento do resíduo da indústria da fibra. Outra espécie do mesmo gênero, a *A. americana*, apresentou atividade larvicida para o *A. fluviatilis*, na concentração de 100 ppm (Consoli et al., 1988). Mesmo que essa espécie não seja incriminada como vetor, isso abre perspectivas para o controle de outras que compartilham os mesmos criadouros. O extrato de *Eclipta paniculata* também mostrou atividade nas doses de CL₅₀ = 3,3 mg/l e CL₉₀ = 17,2 mg/l, para a mesma espécie de mosquito. Infelizmente esses autores não estudaram a atividade dessas plantas para o *A. aegypti*, o que possibilitaria uma comparação.

Quanto à toxicologia oral aguda, não houve registro de morte, nem sinais de intoxicação aguda, como ataxia, paralisia muscular, sialorréia

contínua ou perda de controle dos esfínteres. O animais demonstraram comportamento normal: não se mostravam agitados, tensos ou latentes. Partiu-se de uma concentração correspondente à décima parte da CL₅₀ encontrada para o terceiro estágio, que é a fase larval mais resistente do *A. aegypti*. Concentrações sucessivamente maiores foram utilizadas, até a concentração de 4 g/kg de peso. Para atingir esta última, houve dificuldade em virtude da formação de precipitado da substância (Tabela 2).

As normas da toxicologia preconizam que produtos botânicos administrados em animais experimentais sem provocar sinais de intoxicação em uma concentração maior ou igual a 2,0 g/kg de peso podem ser considerados atóxicos (Brasil, 1996b).

Houve percepção de alteração apenas das fezes, que adquiriram uma coloração mais escura, mas mostraram consistência preservada, permanecendo assim por três dias após a administração das doses.

Tabela 2. Toxicologia oral aguda com o e.b.e. da *Magonia pubescens* em ratos albinos

| Grupo | Concentração (mg/kg) | Nº de animais tratados | Nº de animais mortos |
|----------|----------------------|------------------------|----------------------|
| 1 | 150 | 4 | 0 |
| 2 | 1.000 | 4 | 0 |
| 3 | 3.000 | 4 | 0 |
| 4 | 4.000 | 4 | 0 |
| Controle | - | 4 | 0 |

Irritação primária de pele. A leitura de 24 horas revelou que as regiões escarificadas desenvolveram o aspecto de crosta de cicatrização com impregnação pela solução do e.b.e. O sítio-controle apresentou essa mesma crosta sem a coloração marrom da solução. As demais leituras mostraram apenas o processo evolutivo de secamento da crosta.

Irritação de mucosa ocular. Os testes de irritação de mucosa ocular em coelhos também não apresentaram quaisquer sinais de irritação. Foram avaliados os seguintes parâmetros: para a conjuntiva, a ocorrência de hiperemia, secreção ou quimose; para a córnea, a área ou opacidade; e para a íris a inflamação. Não houve irritação de mucosa para o e.b.e. da casca do caule de *M. pubescens*. A íris mostrou-se normal, com pupilas isofotorreagentes, e a córnea, sem ulceração, com coloração normal e sem opacidade.

De acordo com o somatório dos resultados e com os métodos de análise toxicológica, a média máxima obtida foi zero, considerando-se o produto como não irritante para a mucosa ocular.

Toxicidade sobre a primeira geração. A avaliação de efeitos teratogênicos foi realizada a partir da observação dos ratos usados na toxicologia oral e de suas gerações sucessivas. Não houve sinais de

toxicidade. As gestações eram normais, e os filhotes não apresentavam malformações nem alterações de peso, de comportamento ou das medidas corporais. Portanto, podemos presumir que não houve registro de efeitos teratogênicos, já que muitas fêmeas estavam prenhas quando houve a ingestão por sonda.

Os ratos testados para toxicologia oral aguda simples e cumulativa foram acasalados após o período decorrido de observações. Foram acompanhadas três gerações até à fase adulta. Não houve alterações de médias de peso e tamanho nem sinais de malformação ou alterações congênitas. Houve registro de uma morte, um filhote de uma geração de casal-controle. Porém, o exame cadavérico revelou como causa da morte a asfixia mecânica, provavelmente pelas condições de nascimento de múltiplos filhotes (Tabela 3).

Tabela 3. Avaliação de efeitos teratogênicos sobre a primeira geração de ratos albinos, descendentes de casais que ingeriram o e.b.e. da *Magonia pubescens*

| 1ª geração | Nº filhotes | Mortos | Aspectos físicos | Comportamento |
|------------------|-------------|--------|------------------|---------------|
| Casal-teste 1 | 8 | 0 | Normais | Normal |
| Casal-teste 2 | 8 | 0 | Normais | Normal |
| Casal-controle 1 | 7 | 0 | Normais | Normal |
| Casal-controle 2 | 7 | 1 | Normais | Normal |

De acordo com as normas toxicológicas vigentes, os resultados obtidos até o momento indicam que o e.b.e. da *M. pubescens* é atóxico. Segundo a Portaria nº 106, do Ministério da Saúde (Brasil, 1996b), sobre as normas para estudo da toxicidade de produtos fitoterápicos, o produto pode ser considerado inócuo caso sua CL₅₀ seja maior que 2,0 g/kg. Neste trabalho, realizaram-se testes com concentração duas vezes maior que esta, e ainda assim não houve registro de morte ou de algum efeito tóxico. Esses resultados indicam que é possível ampliar o potencial e as possibilidades de uso do e.b.e. dessa planta como larvicida.

O manuseio e o contato com mucosas, em relação a esse produto, não trariam transtornos, dados os resultados desses testes com mucosa ocular, em que se registrou média máxima de zero. Esse fato, de acordo com as tabelas e os critérios toxicológicos (Brito, 1996; Larini, 1997), classifica o produto como não-irritante. A mesma interpretação pode ser registrada com a toxicidade dermal, de acordo com os métodos de Draize e Kay (Brito, 1994, Larini, 1997).

Não houve também registro de efeitos teratogênicos para a primeira geração, em função da normalidade dos resultados. O uso dos extratos da *M. pubescens* como larvicidas pode tornar-se viável em curto prazo e com boa relação custo-benefício, dada a facilidade de produção de mudas e de seu plantio em solos desde os pobres e degradados até aos férteis. Vale ressaltar

também a regeneração da casca nos locais da extração, em árvores já formadas, num período aproximado de oito meses. Outro fator importante é a grande disponibilidade dessa planta na região Centro-Oeste, principalmente no nordeste goiano.

ABSTRACT

Larvicide and toxic effect of the ethanol crude extract of the stem coat of *Magonia pubescens* towards *Aedes aegypti* in laboratory

Bioassays were carried out to verify the larvicide activity of the ethanol crude extract (e.c.e) of the stem coat of *Magonia pubescens* towards *Aedes aegypti*, in the field and in laboratory conditions, aiming to find new alternatives to control this mosquito. The stem coat was collected, then, desiccated in a forced air heater at 40° C, ground, percolated in ethanol at room temperature for 72 hours, filtered, concentrated in rotating evaporator and desiccated in a chapel at room temperature. The e.c.e obtained was solved in distilled water and tested for all larval instars of *Ae. aegypti*. In laboratory, the experiments were carried out using 50mL plastic disposable cups, each one containing 25mL of solution and 1 larva. Twenty copies were made for each instar and witness. Mortality was evaluated 48 hours after starting the test. The LC₅₀ found for 1st, 2nd, 3rd and 4th instars was: 35; 36; 75, and 70 mg of e.c.e/100 ml of distilled water, respectively. The LC₁₀₀ was: 45, 85, 125, and 115 mg of e.c.e per 100 mL of distilled water, for 1st, 2nd, 3rd and 4th instars respectively. In the field, bioassays were performed using 3rd instar larvae, within a period of 10 weeks, in the backyard of a house, in the city of Anápolis, Goiás. For these experiments, tap water was used and the LC₁₀₀ was adjusted to 140 mg per 100mL of water. The e.c.e solution in the adjusted concentration was distributed into the seven commonest different artificial habitats of *Ae. aegypti*, to evaluate the residual activity and the influence of the type of container in mortality. The e.c.e. of *M. pubescens* demonstrated larvicide activity for all *Ae. aegypti* instars in laboratory. In field tests, mortality decreased as the solution got old. The type of the habitat interfered in mortality. Toxicological tests were accomplished and e.c.e. of the stem coat of *M. pubescens* has shown to be innocuous, which is in agreement with the requirements of the Ministry of Health for vegetable products.

KEYWORDS: *Magonia pubescens*, *Aedes aegypti*. Botanical insecticide. Vector control.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às fontes financiadoras CNPq, FUNAPE, OPAS e Programa de erradicação do *Aedes aegypti*, o apoio recebido.

REFERÊNCIAS

1. Brito AS. *Manual de ensaios toxicológicos in vivo*. Ed. UNICAMP, Campinas, SP, 1994.
2. Carvalho LAF, Silva IG. Atividade larvicida do Temephos a 1% sobre o *Aedes aegypti* (Lin., 1762), em diferentes criadouros artificiais. *Rev Patol Trop* 28:211-232, 1999.
3. Chastel C. Reflection 2 current viral diseases: yellow fever and dengue. *Ann Biol Clin* 55:415-424, 1997.
4. Ciccía G, Coussio J, Mongelli E. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal south american plants. *J Ethnopharmacol* 72:185-189, 2000.
5. Choochote W, Kanjanapothi D, Panthong A, Taesotikul T, Jitpakdi A, Chaithong U, Pitasawat B. Larvicidal, adulticidal and repellent effects of *Kaempferia galanga*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 30:470-476, 1999.
6. Consoli RAGB, Mendes NM, Pereira JP, Santos BS, Lamounier MLA. Influência de diversos derivados de vegetais na sobrevivência de larvas de *Aedes fluviatilis* (Lutz) (Diptera: Culicidae) em laboratório. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83:87-93, 1988.
7. Consoli RAGB, Oliveira RL. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Ed. Fiocruz, 1994. 255p.
8. Dharmshaktu NS, Prabhakaran PK, Menon PK. Laboratory study on the mosquito larvicidal properties of leaf and seed extract of the plant *Agave americana*. *J Trop Med Hyg* 90:79-82, 1987.
9. Larini L. *Toxicologia*. Ed. Manole Ltda, São Paulo, 1997.
10. Failloux AB, Ung A, Raymond M, Pasteur N. Inseticide susceptibility in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from French Polynesia. *J Med Entomol* 31:639-44, 1994.
11. Forattini OP. *Entomologia Médica*. Ed. EDUSP, São Paulo, 1965.
12. FUNASA. Programa Nacional de Controle de Dengue. <http://www.funasa.gov.br>, 2002.
13. Gratz NG. Emergency control of *Aedes aegypti* as a disease vector in urban areas. *J Am Mosq Control Ass* 7: 353-365, 1991.
14. Green MM, Singer JM, Sutherland DJ, Hibben CB. Larvicidal activity of *Tagetes minuta* (marigold) toward *Aedes aegypti*. *J Am Control Assoc* 7:282-286, 1991.
15. Guimarães VP, Silva IG, Silva HHG, Rocha C. Atividade larvicida do extrato bruto etanólico da casca do caule de *Magonia pubescens* St.Hil. sobre *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera, Culicida). *Rev Patol Trop* 30:243-249, 2001.
16. 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.
17. Macedo ME, Consoli RAGB, Anjos AMG, Oliveira AB, Mendes NN, Queiróz RO, Zani CL. Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for larvicidal activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92:565-570, 1997.
18. Macoris, MLG, Camargo MF, Silva IG, Takaku L, Andrighetti MT. Modificação da suscetibilidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* ao Temephos. *Rev Patol Trop* 24:31-40, 1995.
19. McBride WJ, Bielefeldt-Ohmann H. Dengue viral infections; patogênese and epidemiology. *Microbes Infect* 2:1041-1050, 2000.
20. Mekuria Y, Gwinn TA, Williams DC, Tidwell MA. Inseticide susceptibility of *Aedes aegypti* from Santo Domingo Dominican Republic. *J Am Mosq Control Assoc* 7:69-72, 1991.
21. Ministério da Saúde. *Manual de Dengue*. Ed. FUNASA, Brasília, 1996a.
22. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância Sanitária. Brasília, DF. Portaria nº 106 de 24 de julho de 1996b.
23. Ministério da Saúde. *Manual de Vigilância Epidemiológica e Febre Amarela*. Ed. FUNASA, Brasília, 1999.
24. Ministério da Saúde. *Doenças infecciosas e Parasitárias – Aspectos Clínicos, Vigilância epidemiológica e Medidas de Controle*. 2ª edição, FUNASA, Brasília, 2000.
25. Mondet B, Da Rosa AP, Vasconcelos PF. The risk of urban yellow fever outbreaks in Brazil by dengue vectors. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Bull Soc Pathol Exot*; 89:107-113, 1996.

26. Monzon RB, Alvior JP, Luczon LL, Morales AS, Mutuc FE. Larvicidal potential of five Philippine plants against *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Culex quinquefasciatus* (Say). *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 25:755-759, 1994.
27. Mourya DT, Gokhale MD, Mishra AC. Biochemical basis of DDT-resistance in *Aedes aegypti* population from a dengue affected area in Shahjahanpur city. *Indian J Med Res* 99:212-215, 1997.
28. Murthy HM, Judge K, Delucas L, Padmanabhan R. Crystal structure of Dengue virus NS3 protease in complex with a Bowman-Birk inhibitor: implications for flaviviral polyprotein processing and drug design. *J Mol Biol* 301: 759-767, 2000.
29. Nobre A, Antezana D, Tauil PL. Febre amarela e Dengue no Brasil: epidemiologia e controle. *Rev Soc Bras Med Trop* 27:59-66, 1994.
30. Perich MJ, Wells C, Bertsch W, Tredway KE. Toxicity of extracts from three *Tagetes* against adults and larvae of yellow fever mosquito and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 31:833-837, 1994.
31. Pinheiro FP, Corber SJ. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever. and its emergence in the Americas. *World Health Statq* 50:161-169, 1997.
32. Pizarro AP, Oliveira Filho AM, Parente JP, Melo MT, Santos CE, Lima PR. Utilization of the waste of sisal industry in control of mosquito larvae. *Rev Soc Bras Med Trop* 32:23-29, 1999.
33. Rawlins SC. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. *Rev Panam Salud Publica* 4:243-251, 1998.
34. Rodhain F. Ecology of *Aedes aegypti* in Africa and Asia. *Bull Soc Pathol Exot* 89:103-106, 1996.
35. Rosen L. Comments on the epidemiology, pathogenesis and control of dengue. *Med. Trop* 59:495-498, 1999.
36. Sagar SK, Sehgal SS, Agarwala SP. Bioactivity of ethanol extract of Karanja (*Pongamia Glabra* Vent) seed coat against mosquitoes. *J Commun Dis* 31:107-111, 1999.
37. Schwartz AM, Paskewitz SM, Orth AP, Tesch MJ, Toong YC, Goodman WG. The lethal effects of *Cyperus iria* on *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc* 14:78-82, 1998.
38. Siddiqui BS, Afshan F, Ghiasuddin Faizi S, Naqvi SN, Tariq RM. Two insecticidal tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica*. *Phytochemistry* 53:371-376, 2000.
39. Silva HHG, Silva IG, Oliveira CLNS, Elias CN. Adaptação do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em criadouros artificiais com água poluída. *Entomologia y Vectores* 6:383-391, 1999.
40. 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* 27:51-63, 1998.
41. Silva IG, Camargo MF, Elias CN, Silva HHG, Irata Y, Antunes SM. Provas biológicas para verificar a suscetibilidade do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) ao Cythion. *Rev Patol Trop* 26: 31-35, 1997.
42. Silva IG, Santos AH, Ferri PH, Alves FBN, Melo RQ, Peixoto L, Silva HHG, Elias CN, Isaac E, Lira KS, Camargo MF. Ação larvicida de extrato bruto etanólico de *Magonia pubescens* St. Hil (tingui-do-Cerrado), sobre o *Aedes aegypti* (Lin.) em laboratório. *Rev Patol Trop* 25:51-59, 1996.
43. Slimestad R, Marston A, Mavi A, Hostettmann K. Larvicidal constituents of *Melantheria albinervia*. *Planta Med* 61:562-563, 1995.
44. Vasconcelos PFC, Rosa ELT, Rosa JFST, Freitas RB, Dégallier N, Rodrigues SG, Rosa APAT. Epidemia de febre clássica de Dengue causada pelo sorotipo 2 em Araguaina, Tocantins, Brasil. *Rev Inst Med trop São Paulo* 35:141-148, 1993.
45. Teixeira MG, Barreto ML, Zouraide G. Epidemiologia e medidas de prevenção do Dengue. Informe epidemiológico do SUS. 8: 5-33, 1999.
46. Thavaselvam D, Kumar A, Sumodan PK. Insecticide susceptibility status of *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus*, and *Aedes aegypti* in Panaji, Goa. *Indian J Malariol* 30: 75-79, 1993.