



UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA IPTSP/UFG**

GEORGE HARRISON FERREIRA DE CARVALHO

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

Orientador: Prof. Dr. Ionizete Garcia da Silva

**Goiânia
2011**

GEORGE HARRISON FERREIRA DE CARVALHO

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

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical e Saúde Pública na área de concentração Parasitologia.

Orientador: Prof.Dr. Ionizete Garcia da Silva

**Goiânia
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
UFG

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG

Carvalho, George Harrison Ferreira.
C331a Atividade inseticida do extrato bruto etanólico de *Persea americana* (Lauraceae) sobre larvas e pupas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) [manuscrito] / George Harrison Ferreira de Carvalho. - 2011.
54 f : il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Ionizete Garcia da Silva.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2011.
Bibliografia.
Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

1. Pupas 2. *Aedes aegypti* 3. *Persea americana*. – Larva I.
Título.

CDU: 595.771:663.55

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: George Harrison Ferreira de Carvalho

Orientador: Ionizete Garcia da Silva

Membros:

1. Ellen Synthia Fernandes de Oliveira

2. Adelair Helena dos Santos

3. Ionizete Garcia da Silva

Data:25/02/2011

“Por honra e por desonra, por infâmia e por boa fama; como enganadores, e sendo verdadeiros; como desconhecidos, mas sendo bem conhecidos; como castigados, e não mortos; como contristado, mas sempre alegres; como pobres, mas enriquecendo a muitos; como nada tendo, e possuindo tudo...” Apóstolo Paulo.

DEDICATÓRIA

Aos meus avós José Ferreira Pinto e Antonia Rodriguez Pinto (in memoriam) e Áurea Ferreira de Carvalho. Aos meus pais João Carlos de Carvalho e Maria Luzia Ferreira de Carvalho, aos irmãos João Carlos de Carvalho Jr e Fabiana Patricia Ferreira de Carvalho a Anny Caroline minha querida cunhada, a todos os familiares e amigos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Jesus Cristo, pela iluminação e auxílio nas adversidades...

Ao Dr. Ionizete Garcia da Silva, Prof. Titular do Departamento de Microbiologia, Imunologia, Patologia e Parasitologia (DMIPP), do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), da Universidade Federal de Goiás (UFG), por ter me aceito como aluno, por consentir minha participação dentre os trabalhadores benévolos e principalmente por acolher-me como amigo.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do IPTESP/UFG, pela oportunidade que me foi concedida.

À Dra. Heloísa Helena Garcia da Silva, professora do DMIPP/IPTSP/UFG, pelo auxílio no Laboratório de Bioatividade de Plantas.

Aos técnicos Carmeci Natalina Elias, Edson de Castro, Cristovão Antônio de Carvalho, Taísia Isabel Vieira, Girlene Sena de Assis e Judison Regozino pelo auxílio na criação dos mosquitos.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	v
SÚMARIO	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE SIMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURA	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1. A dengue.....	1
1.2. A dengue no Brasil.....	1
1.3. Primeiras ocorrências de dengue no Estado de Goiás.....	4
1.4. Mecanismos de transmissão da dengue.....	4
1.5. <i>Aedes aegypti</i>	5
1.6. O <i>Aedes aegypti</i> no Brasil.....	6
1.7. Biologia do <i>Aedes aegypti</i>	6
1.8. Ações integradas a mosquitos vetores de doenças.....	7
1.9. Resistência do <i>Aedes aegypti</i> a inseticidas químicos sintéticos.....	8
1.10. Inseticidas naturais ou botânicos.....	9
1.11. <i>Persea americana</i>	11

2 JUSTIFICATIVA.....	12
3 OBJETIVOS.....	12
3.1. Geral.....	12
3.2. Específico.....	12
4 MÉTODOS.....	13
4.1. Coleta e identificação.....	13
4.2. Extração.....	13
4.3. Secagem e Moagem.....	13
4.4. Percolação e Evaporação.....	13
4.5. Bioensaios.....	13
4.6. Laboratório.....	14
4.7. Campo.....	15
4.8. Toxicidade aguda.....	15
4.8.1. Condições laboratoriais de manutenção e seleção dos animais.....	16
4.8.2. Dieta.....	16
4.8.3. Via e método de administração.....	16
4.9. Avaliação de toxicidade aguda.....	16
4.9.1. Preparo das amostras.....	16
4.9.2. Administração das amostras.....	16
4.9.3. Observações comportamentais.....	17
4.10. Ética.....	17
4.11. Análise estatística.....	17
5. RESULTADOS.....	18
5.1. Bioensaios em laboratório.....	18
5.2. Bioensaios no campo.....	19

5.3. Avaliação da toxicidade aguda em ratos <i>Wistar</i> expostos ao extrato.....	20
etanólico da casca de <i>Persea americana</i> .	
6. DISCUSSÃO.....	21
7. CONCLUSÃO.....	24
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Casos notificados de dengue, semana epidemiológica de 1 a 52 - Brasil 2008 e 2009.....	4
----------	---	---

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Suscetibilidade de larvas de 3 ^o e 4 ^o estágio e de pupas de <i>Aedes aegypti</i> ao extrato bruto etanólico de <i>Persea americana</i> , em condições de laboratório, após 24h de exposição em diferentes criadouros.....	19
Tabela 2	Suscetibilidade de larvas e pupas de <i>Aedes aegypti</i> ao extrato bruto etanólico de <i>Persea americana</i> , após 24h de exposição, em condições de campo em diferentes criadouros.....	20

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Por cento
BS	<i>Bacillus sphericus</i>
Bti	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
CL	Concentração letal
CL ₅₀	Concentração letal para 50% das larvas e pupas
CL ₉₀	Concentração letal para 90% das larvas e pupas
CLH	Fração hexânica de <i>Copifera langsdorfii</i>
CLM	Fração metanólica de <i>Copifera langsdorfii</i>
CRM	Fração do óleo resina <i>Copifera reticulata</i>
DC	Dengue clássica
DCC	Caso de dengue com complicações
Denv	Sorotipo viral (variedades)
DL50	Dose letal para 50% de cobaias testadas
DMSO	Dimetilsulfóxido
Ebe	Extrato bruto etanólico
FD	Febre da dengue
FHD	Febre hemorrágica da dengue
G	Gramas
H	Horas
IC	Intervalo de confiança
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
L3	Larva de terceiro estágio
L4	Larva de quarto estágio

Kg	Kilograma
mg	Miligrama
mg/L	Miligrama/litro
mL	Mililitro
MS	Ministério da Saúde
°C	Grau centigrade
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
P	Nível de significância
Ppm	Partículas por milhão
SCD	Síndrome do choque da dengue
SVS	Secretaria de Vigilância Sanitária
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UFG	Universidade Federal de Goiás
UR	Umidade relativa
UBV	Ultrabaixo-volume
V.O	Via oral
WHO	World Health Organization

RESUMO

Na busca de alternativas ao controle do *Aedes aegypti*, em vista da resistência aos inseticidas sintéticos, a investigação de compostos vegetais vem se destacando, pela degradação mais rápida e menor toxicidade aos vertebrados. Assim, avaliou-se o efeito inseticida do extrato bruto etanólico (ebe) da casca de *Persea americana* Mill sobre larvas e pupas de *Ae. aegypti*. Após a obtenção do ebe este foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo assim a solução-teste. Para cada bioensaio e repetição, tanto em laboratório quanto em campo foram utilizadas 100 larvas de cada estágio e 100 pupas. A mesma quantidade foi usada para os controles positivos e negativos realizados com o temefós (1ppm) e DMSO a 1,6%. Todos os bioensaios foram realizados com os 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 1° e 2° estádios em laboratório na dose de 5ppm e em campo na dose de 10ppm. No laboratório as CL₅₀ e CL₉₀ foram, respectivamente, de 7,2 e 19,3 ppm para o 3° estágio, de 6,6 e 15,4 ppm para 4° estágio e de 93,6 e 158,7ppm para pupas. Seguindo a mesma ordem, no campo, as CL₅₀ e CL₉₀ foram de 27,8 e 51,3ppm para o 3°estádio, de 23,8 e 46,9 ppm para o 4° estágio e de 145,3 e 261,9 ppm para as pupas. O fator mais importante deste trabalho foi o efeito pupicida de *P. americana*, pois é muito raro encontrar esse efeito em outros produtos, tanto naturais quanto sintéticos. Esses resultados são sugestivos de aprimorarem estudos químicos para identificação de compostos ativos. Testes de toxicidade oral aguda com ratos foram realizados com o ebe dessa planta que mostraram-se atóxico de acordo com as normas do (Acute Toxic Class Method - OECD 423) para produtos de origem vegetal.

ABSTRACT

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 be degradable and less toxic to vertebrates. The aim of this study was to evaluate the insecticidal effect of crude ethanol extract (cee) of bark of *Persea americana* Mill, on larvae and pupae of *Ae. aegypti* in the laboratory and field. After obtaining this cee was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), thus obtaining the test solution. For each test, and repetition, in both laboratory and field were used 100 larvae of the 1st, 2nd, 3rd and 4th instars and 100 pupae too. The same amount of larvae and pupae was used for the groups positive and negative controls, performed respectively with temephos at 1 ppm and 1.6% of the DMSO. Both the laboratory bioassays and field were conducted with key artificial urban tire, glass and plastic. The results showed the insecticidal activity of the cee *P. americana* larvae and pupae of *Ae. aegypti*, both in laboratory and field. There was 100% mortality of the larvae of the 1st and 2nd instars in the laboratory at a dose of 5 ppm and field at a dose of 10 ppm. 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 plows 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 effect pupicida of *P. americana*, because it is very rare to find this effect on other products, both natural and synthetic. Tests acute oral toxicity in rats were conducted to cee this plant that proved to be nontoxic according to norms (Acute Toxic Class Method - OECD 423) for products of plant origin.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A dengue

A dengue é uma doença infecciosa causada por um vírus da família *Flaviviridae*, são conhecidos quatro sorotipos, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, e constitui numa das mais importantes patologias re-emergentes no mundo. A infecção confere imunidade permanente para cada sorotipo (Tauil 2001, Denis et al. 2003, Braga & Valle 2007).

Classificada como uma doença de notificação compulsória a dengue caracteriza-se por apresentar dentre seus principais sintomas, quadro febril inespecífico, classificado clinicamente como febre da dengue (FD) ou dengue clássica (DC). Quando podendo evoluir para manifestações mais graves com hemorragia, que é denominada a febre hemorrágica da dengue (FHD), ou síndrome do choque do dengue (SCD), que pode levar a óbito. A Secretaria de Vigilância em Saúde usa também a denominação de caso de dengue com complicações (DCC). A dengue é uma patologia com grande impacto na sociedade por repercutir na força de trabalho, afetando assim a economia e/ou na organização do atendimento à saúde (Braga & Valle 2007, Ministério da Saúde 2009).

1.2. A dengue no Brasil

A primeira epidemia de dengue documentada clínica e laboratorialmente no Brasil ocorreu em 1981-1982, em Boa Vista/Roraima, causada pelos sorotipos DENV-1 e DENV-4. A partir de 1986, foram registradas epidemias em diversos estados e novos surtos começaram a ocorrer por quase todo o país (Ministério da Saúde 1998).

Na região sudeste do Brasil a primeira epidemia ocorreu no Rio de Janeiro em março de 1986, quando o DENV-1 foi isolado (Schatzmayr et al. 1986). Em 1990, o

sorotipo, DENV-2 foi introduzido pela primeira vez no Brasil através do Rio de Janeiro produzindo nesta cidade uma epidemia que se espalhou também pelo nordeste e região Amazônica. Nesta época, ocorreram os primeiros casos de FHD e SCD com óbitos, provavelmente devido a infecções seqüenciais pelo DENV-1, seguido de infecções pelo DENV-2 (Figueiredo 1998).

Durante as duas últimas décadas, os casos de dengue e FHD ocorreram principalmente na população adulta nas formas leve e moderada. Houve aumento do número de hospitalizações na última década indicando aumento da gravidade das formas clínicas. Ainda o número de casos graves entre crianças menores de 15 anos no Estado do Amazonas sugere a possibilidade de mudança no padrão epidemiológico, com acometimento de crianças com FHD/SCD. Em 2005, ocorriam infecções por meio dos sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 que circulavam em 24 unidades federadas o que caracterizava uma situação de hiperendemicidade (Siqueira et al. 2005).

O DENV-3 foi isolado pela primeira vez no Brasil em dezembro de 2000, igualmente ao DENV-2, no estado do Rio de Janeiro. Em 2002, o DENV-3 foi detectado em quase todo o território nacional e houve um aumento expressivo de casos da doença, cerca de 780 mil casos notificados, 2.607 casos de FHD/SCD e 145 óbitos registrados. É importante ressaltar que em 2002, o número absoluto de mortes devido ao FHD excedeu o número de mortes por malária pela primeira vez no Brasil (Barbosa et al. 2002, FUNASA 2002, Siqueira et al. 2005).

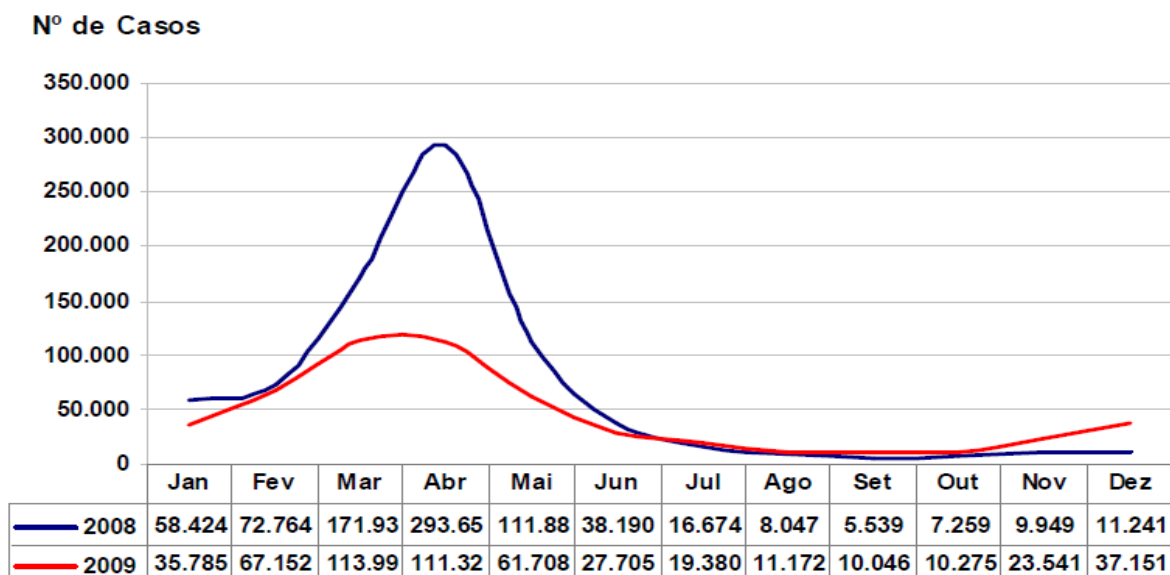
O nível endêmico de dengue no Brasil, já alterou os indicadores de morbidade, a magnitude destas incidências nos últimos anos superou a de todas as outras doenças de notificação compulsória. Em 2006 o país foi responsável por 85% dos casos de dengue notificados nas Américas do Sul e Central (Teixeira et al. 2005, PAHO 2006)

Devido a essa grande incidência a dengue é considerada uma arbovirose humana com grande impacto na saúde pública, por acometer cerca de 50 milhões de pessoas por ano no mundo, e a exposição de 40% da população a seu principal vetor o *Aedes aegypti* (WHO 1999).

No Brasil, atualmente, há transmissão de dengue nos 27 estados, prevalecendo à circulação dos sorotipos, DENV-1, DENV-2 e DENV-3. Entretanto, em agosto de 2010 o Ministério da Saúde (MS) e as Secretarias de Saúde do estado de Roraima publicaram uma nota, revelando a ocorrência dos primeiros casos de DENV-4 no Brasil após 28 anos. Três desses casos de dengue tipo DENV-4 foram confirmados pelo Instituto Evandro Chagas em 11/08/2010 (Ministério da Saúde 2010). Assim, o DENV-4, continuou, paulatinamente, a se dispersar em outras capitais da região Norte do Brasil, Manaus-AM e Belém-PA, depois do último registro de circulação autóctone (Ministério da Saúde 2011). O sorotipo DENV-4 não era detectado no país desde 1982, porém já circula há vários anos em dez países das Américas (Osana et al. 1983, Gluber 1998, Guzman et al. 1999, McBride & Bie 2000, Murthy et al. 2000).

Em uma avaliação realizada anualmente pelo Ministério da Saúde mostrou que a prevalência de dengue no país em 2007 foi de 258.795 casos notificados. Houve uma redução de 10,8%, em 2008 e de 35% no ano seguinte. A ocorrência de óbitos de dengue, em 2008, foi de 154 para FHD e de 144 de DCC, reduzindo 39% em 2009. A distribuição de 80% dos casos confirmados de FHD concentrara-se em Mato Grosso (28%), Bahia (26%), Espírito Santo (17%), Goiás (5%) e Minas Gerais (5%). As curvas epidêmicas dos anos (2008 e 2009) foram representadas na (Figura 1), por semana epidemiológica (Ministério da Saúde 2009). O Ministério da Saúde lançou dados preliminares referente a 2010 com números que partem da primeira até a nona semana

epidemiológica com um total até agora de 227.109 casos notificados (Ministério da Saúde 2010).



Fonte: SVS/SES

Figura 1. Casos notificados de dengue, semana epidemiológica de 1 a 52 - Brasil 2008 e 2009.

1.3. Primeiras ocorrências de dengue no Estado de Goiás

Os primeiros relatos da circulação do vírus da dengue no Estado de Goiás datam de 1994, quando foi isolado o sorotipo viral DENV-1. A introdução do DENV-2 ocorreu em 1998, quando foram evidenciados os primeiros casos de FHD (Maciel 1999, Nascimento 2004). O ano de 2002 foi marcado pela introdução do DENV-3 quando houve um aumento expressivo do número de formas mais graves da doença (FHD/SCD). Este ano caracterizou-se pela ocorrência da maior epidemia de dengue no estado. Neste mesmo ano, a região Centro-Oeste foi responsável por 15.433 casos, com 20 casos de FHD, sendo que o Estado de Goiás notificou o maior número de casos (8.552), 18 destes sendo FHD (Secretaria de Vigilância em Saúde 2005).

1.4. Mecanismos de transmissão da dengue

A fêmea de *Ae. aegypti* (Diptera, Culicidae) se infecta com qualquer um dos sorotipos do vírus da dengue e, após 8 a 12 dias de incubação, é capaz de transmiti-lo a outra pessoa. Há também a possibilidade de transmissão mecânica quando o repasto é interrompido e o mosquito imediatamente se alimenta em outra pessoa. A transmissão vertical pode ocorrer quando a fêmea passa o vírus a sua prole (Monath 1994, Silva et al. 2008, Zeidler et al. 2008).

A forma assintomática é considerada de grande importância epidemiológica, pois constitui fonte silenciosa de transmissão do vírus dengue, podendo dispersá-lo para áreas indenes infestadas com o *Ae. aegypti*. Estima-se que em uma epidemia de dengue ocorra um caso assintomático para cada cinco casos sintomáticos (Serufo et al. 2000). Em alguns casos, podem ocorrer manifestações com quadros clínicos que variam desde doença aguda leve (FD), com recuperação da maioria dos pacientes, até uma doença grave e às vezes fatal (FHD/SCD). As formas graves podem apresentar taxa de letalidade de 1% ou mais, particularmente em crianças (McBride & Bielefeldt-Ohmann 2000). A transmissão é maior nas áreas intertropicais do mundo, com maior pluviosidade (Vasconcelos et al. 1998, Souza et al. 2010).

Nos últimos anos, grandes epidemias de dengue têm acontecido no mundo, devido principalmente, a grande infestação vetorial em todas as regiões. Ondas epidêmicas ocorrem simultaneamente às ondas de densidades vetoriais. As razões para o ressurgimento global de epidemias de dengue não estão completamente compreendidas, mas estão relacionadas a mudanças demográficas, climáticas e sociais (Vanwambeke et al. 2006, WHO 2008, Souza et al. 2010).

1.5. *Aedes aegypti*

O *Ae. aegypti* (Linnaeus, 1762) é um mosquito de origem africana trazido para as Américas logo depois do descobrimento. É um mosquito de hábitos sinantrópico, peridomiciliar, antropofílico, com atividade hematofágica diurna, acompanhando o homem em seus deslocamentos, com a possibilidade de dispersão passiva, através dos meios de transporte como veículos automotores e/ou com o auxílio do vento ainda que seja raro um raio de dispersão de *Ae. aegypti* acima de cem metros.

Por esse fator o *Ae. aegypti* tem conseguido ser reintroduzido em áreas de onde já havia sido erradicado. É considerado o vetor mais eficiente de várias espécies de arbovírus, principalmente o vírus da dengue (WHO 1997, Forattini & Brito 2003).

1.6. O *Aedes aegypti* no Brasil

Segundo o levantamento histórico realizado pela FUNASA, o *Ae. aegypti* é conhecido no Brasil desde o século XVII. No ano de 1985 esse mosquito foi responsável por grande surto de febre amarela nos estados do Nordeste brasileiro, e posteriormente em outras áreas brasileiras (FUNASA 2001).

O *Ae. aegypti*, já foi considerado erradicado no Brasil por duas vezes a primeira com o relato de um suposto último foco que foi eliminado na zona rural do município de Santa Terezinha, Bahia, em 1955. Contudo, o vetor é declarado erradicado no país em 1958. No entanto, esse mosquito surge em 1967, em Belém e em outros municípios do Estado do Pará. Dois anos depois foi encontrado em São Luís e São José do Ribamar, no Maranhão. Em 1973, com a eliminação dos focos o *Ae. aegypti* foi considerado erradicado no Brasil pela segunda vez. A reintrodução foi registrada em 1976 na cidade de Salvador/ BA (Ministério da Saúde, 2001).

1.7. Biologia do *Aedes aegypti*

O desenvolvimento do *Ae. aegypti* é holometábolo que compreende as fases de ovo, larva, pupa e adulto. Os ovos medem cerca de 1 mm de comprimento e contorno alongado e fusiforme. No momento da postura os ovos são brancos, depois escurecem até a cor negra brilhante (Forattini, 1996). A oviposição depende da alimentação sanguínea, entre 3,0 a 3,5 mg, para o desenvolvimento ovariano e produzir cerca de até 120 ovos por fêmea. Geralmente, a postura é feita após cada repasto sanguíneo, em intervalos de três dias. Frequentemente, a fêmea se alimenta mais de uma vez, entre duas posturas sucessivas. Este fato resulta na variação de hospedeiros, com a possibilidade de disseminação do vírus da dengue a outros hospedeiros. O macho alimenta-se de carboidratos extraídos dos vegetais (Silva & Silva 1999, Silva & Silva 2000, Barata et al. 2001, Forattini 2002, Natal 2002, Gomes et al. 2006).

A fêmea de *Ae. aegypti* ovipõe, principalmente, nas paredes dos recipientes artificiais, cerca de 1,5 cm acima da superfície da água. A incubação dos ovos pode variar de algumas horas até 492 dias (quiescência), e isso é determinante na duração do ciclo evolutivo. As larvas apresentam quatro estádios e a duração depende da temperatura, disponibilidade de alimento e densidade. A 28°C, os períodos de larva e de pupa são, respectivamente, cerca de seis e dois dias. Após 24 horas da emergência o adulto acasala, geralmente, durante o vôo, quando a fêmea libera feromônios para atrair o macho. O adulto é morfologicamente caracterizado com anéis prateados nas bases dos artículos tarsais e um desenho da mesma cor no mesonoto, em forma de lira (Monath 1994, Gubler 1998, Silva et al. 1998, Silva et al. 1999, Silva & Silva 2000, Madeira et al. 2002, Silva et al. 2002, Forattini & Brito 2003, Silva et al. 2010).

1.8. Ações integradas de controle a mosquitos vetores de doenças

As ações de controle de mosquitos transmissores de doenças incluem o saneamento do meio ambiente, informação e educação, controle químico e biológico (Gubler & Clark 1994, OPAS 1995). As duas primeiras visam reduzir os potenciais criadouros enquanto que a terceira a eliminação do vetor. Isoladamente essas medidas não surtem os efeitos desejados. É importante considerar que a maioria dos países em desenvolvimento tem tido uma deterioração da infra-estrutura de saúde pública, com redução dos recursos humanos e financeiros. Esse controle na maioria desses países concentra-se na aplicação espacial de inseticidas em UVB, na vigência de uma epidemia, porém pouco efetiva na obtenção e manutenção de baixos índices de infestação predial (Teixeira et al. 1999, Tauil 2001).

Até o momento não há uma vacina pronta para uso contra os quatro sorotipos do vírus da dengue, embora pesquisas estejam em andamento. A opção de controle de dengue continua sendo o controle do *Ae. aegypti*. O que dificulta muito esse processo é a resistência desenvolvida aos inseticidas por esse vetor, aliada a grande disponibilidade de criadouros artificiais e sangue nas áreas urbanas (Whitehead et al. 2003, Rothman 2004, Braga & Valle 2007).

No Brasil as principais estratégias usadas no controle desse vetor foram baseadas na utilização de produtos sintéticos como organofosforados (temefós), piretróides (cipermetrina, deltametrina) que requerem monitoramento constante no manejo desses produtos. No entanto o uso de inseticidas, bem como ações educativas, promovidas pelo governo, não tiveram o êxito esperado no controle das populações desse mosquito (Braga & Valle 2007).

1.9. Resistência do *Aedes aegypti* a inseticidas químicos sintéticos

O aparecimento de alteração da suscetibilidade e populações resistentes tem ocasionado sérios problemas para o controle de mosquitos. Isso se deve, em muitos casos, a freqüente exposição aos produtos químicos utilizados no controle, e podem influenciar nos resultados dos programas, pela permanência do vetor, favorecendo a transmissão de dengue e contribuindo para o surgimento de novos casos (Brogdon & McAllister 1998, Carvalho et al. 2004, Braga & Valle 2007, Marcombe et al. 2009, Harris et al. 2010).

A resistência de populações de *Ae. aegypti* ao temefós foi registrada em várias localidades de diversas unidades federadas do Brasil (Campos & Andrade 2001, Macoris et al. 2003, Carvalho et al. 2004, Braga & Valle 2007). Nos estados onde foi comprovada essa resistência adotou-se o uso do diflubenzuron que é um regulador de crescimento.

Na busca de novas alternativas ao controle de vetores, produtos naturais e biológicos vêm sendo investigados, a exemplo disso, destaca-se o controle biológico através de *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) e *Bacillus sphaericus* (*Bs*) com possível ação e uso integrado com os produtos sintéticos e naturais (Andrade & Modolo 1991, Polanczyk et al. 2003, Praça et al. 2004, Espindola et al. 2008).

1.10. Inseticidas naturais ou botânicos

Até a descoberta dos inseticidas organossintéticos, na primeira metade do século passado, as substâncias extraídas de vegetais eram amplamente utilizadas no controle de insetos. As variações na eficiência do controle foi devido às diferenças na concentração do ingrediente ativo entre plantas e, principalmente, o baixo efeito residual, que apontava à necessidade de várias aplicações em períodos curtos, fez com que os inseticidas vegetais fossem gradativamente substituídos pelos sintéticos.

O piretro extraído das flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* mantém um efeito residual de até sete dias nos vegetais tratados. A sua instabilidade em presença da luz motivou a busca por piretróides sintéticos. Antes da década de 70 do século XX, foram desenvolvidos princípios ativos cujas formulações também se mostraram altamente instáveis em presença de luz. A partir de 1970, foram obtidos os sintéticos permetrina, cipermetrina e fenvalerato, os quais apresentaram menor toxicidade em comparação aos outros produtos químicos da época, excelente efeito de contato e fotoestabilidade (Cavero 1980).

Vários autores têm ressaltado a busca e o desenvolvimento de substâncias derivadas de plantas para controle de mosquitos (Schmutterer 1990, Sukamar et al. 1991, Silva et al. 2004, Mendonça et al. 2005, Amer & Mehlhorn 2006ab, Silva et al. 2006, Champakaew et al. 2007, Gleiser & Zygadlo 2007, Cheng et al. 2009, Mullai et al. 2008, Pavela 2008, Pushpanathan et al. 2008, Rahuman et al. 2008, Silva et al. 2008). As plantas que apresentam aplicação na área farmacêutica tem sido as mais procuradas para desenvolver compostos com propriedades inseticidas (Penido et al. 2005). Esses compostos originários de plantas têm recebido especial atenção por serem alternativas ecologicamente corretas e dentre outros fatores favoráveis apresentam aspectos seletivos, biodegradáveis e de baixo impacto ambiental, dando maior segurança à população. Vários estudos vêm sendo realizados com plantas na busca de moléculas ativas contra mosquitos principalmente o *Ae. aegypti* (Pizarro et al. 1999, Aguilera et al. 2003, Silva et al. 2003, Cavalcanti et al. 2004, Silva et al. 2004, Simas et al. 2004, Silva et al. 2007 e Magadula et al. 2009).

A flora brasileira representa uma das mais ricas fontes de novas substâncias bioativas no mundo. A combinação da biodiversidade com o conhecimento tradicional de seu uso concede ao Brasil uma posição privilegiada para o desenvolvimento de novos

produtos. As propriedades biológicas das plantas na região neotropical já eram aproveitadas pelos ameríndios antes mesmo da chegada dos europeus ao continente. Registros históricos demonstram o extenso uso do abacate (*Persea americana* Miller), da batata doce (*Ipomoea batatas*), do mate (*Ilex paraguariensis*) e do cacau (*Theobroma cacao*) como alimentos (Wolters 1992, Beinart & Middleton 2009).

1.11. *Persea americana*

A *Persea americana* Miller, denominada popularmente como abacateiro, apresenta porte arbóreo, pertence à família Lauraceae e distribui-se nas Américas Central e do Sul. É cultivado 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 no mundo com uma produção anual aproximada de 3,2 milhões de toneladas e área de 416 mil hectares (Ferreira 2008).

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 pesquisas são as folhas, a casca, o fruto e a semente, por apresentarem composições químicas variadas bioativas. As principais substâncias encontradas são carboidratos, proteínas, gordura, taninos, persito, metilegenol, dopamina, esparagina, ácidos málico, acético, gordura monoinsaturada e carotenóides. Essas substâncias são utilizadas no tratamento de diversas enfermidades, como a anemia, helmintíases, doenças renais, reumatismo, e ajuda na prevenção de câncer (Pamplora & Roger, 1999, Lu et al. 2005, Barbosa et al. 2010).

Na busca de alternativas para o controle de insetos vetores, especialmente mosquitos, substâncias extraídas de plantas têm recebido especial atenção. Vários estudos vêm sendo realizados com plantas na busca de substâncias candidatas ao controle do *Ae.*

aegypti (Silva et al. 2006 , Barreto et al. 2006). Apresenta-se neste trabalho o extrato bruto etanólico extraído da casca do caule de *P. americana*, como possível candidata e/ou alternativa ao controle do *Ae. aegypti*.

2. JUSTIFICATIVA

O uso de inseticidas químicos sintéticos no controle ao *Ae. aegypti*, por vários anos, como é o caso do larvicida temefós, usado no controle ao *Ae. aegypti*, há mais de 30 anos, além de ser carcinogênico e teratogênico para vertebrados, tem induzido ao desenvolvimento de populações do mosquito resistentes aos produtos utilizados. Assim, torna-se necessário o avanço de pesquisas de outros larvicidas contra o *Ae. aegypti*, que sejam menos tóxicos aos vertebrados e mais seguros ao meio ambiente, como é esta proposta de trabalhar com inseticidas botânico.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

A proposta desse estudo foi realizar a prospecção para a obtenção do extrato bruto etanólico de *P. americana* e avaliar o seu potencial inseticida contra o *Ae. aegypti*.

3.2. Específico

Verificar a atividade larvicida e pupicida do extrato bruto etanólico de *P. americana*, em laboratório e campo em diferentes tipos de criadouros contra o *Ae. aegypti*, disponibilizando informações que sejam úteis ao planejamento e controle desse vetor.

Avaliar a toxicidade aguda, do extrato bruto etanólico de *P. americana*, seguindo diretrizes da OECD (2001), para teste de dose aguda tóxica (*Guideline 423*), em ratos *Rattus norvegicus* linhagem *Wistar*, machos e fêmeas, para verificar alterações fisiológicas através do *screening* hipocrático e óbitos.

4. MÉTODOS

4.1. Coleta e identificação - Folhas e flores de *P. americana* foram coletadas no município de Aparecida de Goiânia, Goiás, e encaminhadas ao herbário Departamento de Botânica da Universidade Federal de Goiás (UFG) sendo a exsicata registrada pelo Prof. Dr. Ângelo Rizzo com o nº 43.394.

4.2. Extração - Dois quilogramas de Casca do caule dessa planta foram encaminhados ao laboratório de Bioatividade de Plantas do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da (UFG) para a extração em evaporador rotativo.

4.3. 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 fina granulometria.

4.4. 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 72h.

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

4.5. 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±1°C, 80±5% de umidade relativa (UR) e fotofase de 12h (Silva et al. 1998, Silva & Silva (2000). Os experimentos de campo foram realizados no mês de julho, a temperatura média foi de 30±1,4°C, umidade relativa de 40,4±2,6%.

Para realização dos bioensaios em laboratório cartelas de ovos foram retiradas da *ovoteca* e 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 tanto para os bioensaios realizados em laboratório como 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 que pode ser 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.

4.6. Laboratório - Os bioensaios foram realizados em 3 recipientes que representam 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, nas quais se adicionaram 100 larvas de 1º, 2º, 3º e 4º estágio e 100 pupas separadamente.

Os primeiros bioensaios foram iniciados com concentrações partindo de 100ppm diluindo-se até 10ppm, para as larvas de todos os estádios e tipos de criadouros. O experimento foi realizado em triplicata e foi avaliada a mortalidade em 24 horas de exposição das larvas ao ebe de *P. americana*.

Todos os bioensaios foram realizados em sala climatizada similarmente à câmara de criação. As CL₅₀ e CL₉₀ foram determinadas com experimentos em triplicata após 24h de exposição das pupas ao ebe de *P. americana*. 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, caso houvesse emergência do mosquito.

4.7. Campo – Utilizaram-se 100 larvas de cada um dos estádios e 100 pupas, colocadas em 100 mL de cada concentração. Normalmente das concentrações letais obtidas em laboratório se ajusta as concentrações que serão utilizadas no campo. Contudo, em situação de campo foi necessário realizar os bioensaios com a solução teste principiada a 100ppm e feita diluições até 10ppm para as larvas, e de 500ppm com diluições de até 100ppm para as pupas.

Nos bioensaios de campo utilizaram-se os mesmos tipos de criadouros do laboratório. Estes foram colocados em ambientes sombreados, em quintais e jardins de residências, no setor Jardim América, Goiânia, Goiás (Figura 3), após prévia autorização dos moradores, que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

As leituras de mortalidade foram feitas 24h após o início do experimento. Todos os experimentos eram acompanhados por controle positivo (temefós a 1ppm) e negativo (DMSO), diluídos em água. As larvas foram consideradas mortas quando inertes e com corpo e cápsula cefálica escurecidos (Silva et al. 2003). Para as pupas a morte foi constatada pela inércia ao serem tocadas com agulhas (WHO 1981). Os dados climatológicos de campo foram obtidos através de termômetro vertical e higrômetro.

4.8. Toxicidade aguda - Foram utilizados 06 ratos machos e 06 fêmeas da espécie *Rattus norvegicus* linhagem *Wistar*, pesando entre 200 e 300g, provenientes do Biotério Central da UFG, acondicionados no biotério setorial do Núcleo de Estudos e Pesquisas Toxicológicas (NEPET-UFG).

4.8.1. Condições laboratoriais de manutenção e seleção dos animais - Os ratos (machos e fêmeas) foram mantidos sob temperatura ambiente controlada para 23 ± 2 °C, fotofase aproximada de 12 h, até o início dos experimentos.

4.8.2. Dieta - Os animais foram tratados com água filtrada e ração. Os ratos permaneceram em jejum por 4 horas antes da administração das amostras, sendo restituídas água e ração 1 hora após a administração do extrato bruto etanólico de *P. americana*, o mesmo protocolo foi utilizado no grupo controle (DMSO e água).

4.8.3. Via e método de administração – o extrato bruto etanólico de *P. americana* foi administrado por via oral (gavage).

4.9. Avaliação de toxicidade aguda - A avaliação da toxicidade aguda seguiu as diretrizes da Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD, 2001), para o teste de classe de dose aguda tóxica (*Acute Toxic Class Method* - OECD 423), aprovado pelo comitê de ética da UFG nº 057/2010.

4.9.1. Preparo das amostras - O extrato bruto etanólico da casca de *P. americana* foi solubilizado em água e DMSO.

4.9.2. Administração das amostras - As doses administradas foram calculadas e selecionadas entre a dose fixa de 2.000 mg.Kg⁻¹ (OECD 423). Por se tratar de extrato de origem vegetal com finalidade inseticida e devido à inexistência de informações sobre casos de intoxicação pela casca dessa planta, a triagem foi iniciada com a dose de 2.000 mg.Kg⁻¹ a qual é considerada dose-limite superior.

Inicialmente o extrato etanólico de *P. americana* foi administrado na dose de 2.000 mg.Kg⁻¹ de peso corporal para machos, em seguida para as fêmeas. Os controles foram feitos com água e DMSO.

4.9.3. Observações comportamentais - foram realizadas inicialmente em intervalos de 10 e 30 minutos, e depois de 1, 2, 4, 6, 12 e 24h, a partir de então, 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, piloereção, 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 foram baseadas no modelo proposto por Malone (1977).

A quantidade de excretas e o consumo de água e ração foram avaliados a cada 48 horas, durante os 15 dias de experimento. No 15º dia, os ratos foram pesados, anestesiados, pela via intraperitoneal, com cetamina a 5% e xilazina a 10%, depois, eutanasiados. Em seguida, coração, pulmão, fígado, rim, baço, estômago, ílio e pâncreas, foram retirados para estudos histopatológicos.

4.10. Ética

Este projeto foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG e identificado pelo número 297/2010. Os bioensaios de campo foram realizados jardins e quintais de residências cujos proprietários assinaram o TCLE, conforme exigido pelo Comitê.

4.11. Análise estatística - Os valores das concentrações letais CL_{50} e CL_{90} foram determinados pela análise Probit (Thomas & Alexandra Sparks 1987). A diferença de mortalidade entre os grupos tratados e criadouros, utilizaram-se a Análise de variância, o teste de Tukey, pelo programa GraphPad Prism5, ao nível de 5%.

5. RESULTADOS

5.1. Bioensaios em laboratório

A mortalidade das larvas de 1º e 2º estádios foi de 100% a 5ppm, em todas as repetições e criadouros. As concentrações letais CL₅₀ e CL₉₀ encontradas para larvas de 3º estádio de *Ae. aegypti* (Tabela 1) foram, respectivamente, de 9,3 e 20,2ppm no pneu, de 7,2 e 19,3ppm no plástico e de 8,2 e 21,8ppm no vidro. Não houve diferença significativa das concentrações letais entre pneu, plástico e vidro, ao nível de 5 %.

Para larvas de 4º estádios as CL₅₀ e CL₉₀ foram, respectivamente, de 7,6 e 19,2ppm no pneu, de 6,6 e 15,4ppm no plástico, e de 6,9 e 16,2ppm em vidro. Não houve diferença significativa entre os criadouros testados. A maior parte das larvas de 4º estádio morreu na tentativa de sair do contato do produto, empupando. Esse processo ocorreu em todas as concentrações.

Os valores das CL₅₀ e CL₉₀ encontrados para as pupas foram de 110,1 e 175,1ppm, de 93,6 e 158,7ppm e de 98,8 e 163,7ppm, 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 controle negativo. Houve mortalidade total das larvas no controle positivo (temefós 1 ppm) e nesse controle, houve a sobrevivência total de pupas.

Tabela 1. Suscetibilidade de larvas 3°, 4° estádios e pupas de *Aedes aegypti* ao extrato bruto etanólico de *Persea americana* em laboratório, após 24h de exposição em diferentes criadouros.

Criadouros	Estádio	CL ₅₀ /ppm (IC 95%)	CL ₉₀ /ppm(IC 95%)
Pneu	L ₃	9,3 (4,8-13,5)	20,9 (15,4-26,6)
	L ₄	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	L ₃	7,2 (3,4-10,8)	19,3 (13,7-28,2)
	L ₄	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	L ₃	8,2 (3,8-10,8)	21,8 (14,4-32,6)
	L ₄	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 de 90% para larvas e pupas, L₃ – larva de terceiro estádio e L₄ – larva de quarto estádio.

5.2. Bioensaios no campo

As concentrações letais CL₅₀ e CL₉₀ encontradas para larvas de 3° estádio de *Ae. aegypti* foram, respectivamente, de 45,0 e 65,4ppm, de 27,8 e 51,3ppm e de 29,4 e 52,9ppm, para experimentos realizados em pneu, plástico e vidro. Não houve diferença significativa da mortalidade entre os recipientes, ao nível de 5%.

Para larvas de 4° estádios as CL₅₀ e CL₉₀ foram, respectivamente, de 30, 3ppm para pneu, de 23, 8 e 46, 9ppm para plástico, e de 26, 0 e 49, 4ppm para vidro. Não houve diferenças significativas da mortalidade entre os criadouros.

As CL₅₀ e CL₉₀ encontradas para as pupas foram de 253,5 e 350,5ppm; 145,3 e 261,9ppm, e de 167,9 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%.

A dose de 10ppm causou 100% de mortalidade em larvas de 1° e 2° estádios, em todas as repetições e criadouros em campo.

Tabela 2. Suscetibilidade de larvas e pupas de *Aedes aegypti* ao extrato bruto etanólico de *Persea americana*, após 24h de exposição, em condições de campo, em diferentes criadouros.

Criadouros	Estádio	CL ₅₀ /ppm (IC 95%)	CL ₉₀ /ppm(IC 95%)
Pneu	L ₃	45,0 (33,3–53,7)	65,4 (54,9–80,5)
	L ₄	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	L ₃	27,8 (19,9–34,8)	51,3 (36,6–57,6)
	L ₄	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	L ₃	29,4 (20,7–37,1)	52,9 (42,3–69,0)
	L ₄	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% para larvas e pupas, L₃ – larva de terceiro estágio e L₄ – larva de quarto estágio.

5.3. Avaliação da toxicidade aguda em ratos *Wistar* expostos ao extrato etanólico da casca de *Persea americana*

A avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico bruto 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, não apresentaram ptose em nenhum momento do tratamento. Apresentaram-se dóceis à manipulação para as pesagens e troca de caixas. Não foram observados óbitos dos animais experimentais nem do grupo controle.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi demonstrada atividade larvicida e pupicida do extrato bruto etanólico da planta *P. americana* sobre o *Ae. aegypti*, tanto em laboratório como em campo e ressalta 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 aos sintéticos é que, o desenvolvimento de resistência dos insetos a essas substâncias, compostas da associação de vários princípios ativos é lento, além de não deixarem resíduos. De acordo com Roel (2001) uma alternativa para evitar o desenvolvimento rápido de resistência a produtos químicos sintéticos é a utilização de produto envolvendo plantas inseticidas.

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 a temperatura, umidade e fotoperíodo. Conforme já evidenciado por Prophiro et al. (2008) com relação à temperatura 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 3º estágio, em recipiente plástico em laboratório foi de 7,2ppm, semelhante a obtida por Leite et al. (2009) que obtiveram CL_{50} de 8,87mg/L (ou ppm), utilizando o extrato da semente dessa 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) que observaram efeitos tóxicos de alguns constituintes voláteis presentes nos óleos de *Syzigium aromaticum*, *Lippia sidoides*, e *Hyptis martiusii*, sobre larvas de terceiro estágio de *Ae.*

aegypti em laboratório. Essas plantas apresentaram as CL₅₀ de 21,4; 19,5 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 CL₉₀ de 65,4, 51,3 e 52,9ppm, respectivamente, para os criadouros pneu, vidro e plástico. Essas concentrações foram inferiores às obtidas por Oliveira et al. (2008) utilizando frações hexânicas e metanólicas do óleo-resina de *Copaifera langsdorffii*.

Maheswaran et al. (2008) constataram efeito larvicida do extrato bruto hexânico de folhos de *Leucas aspera* contra larvas de 1°, 2°, 3° e 4° estádios de *Ae. aegypti*, em laboratório e encontraram as CL₅₀ de 77,4, 144,0, 199,7 e 257,1ppm, respectivamente. Comparando essas concentrações letais com as de *P. americana* que apresentou CL₁₀₀ de 5ppm, para 1° e 2° estádios e CL₅₀ de 7,2ppm e 6,6ppm, respectivamente, para 3° e 4° estádios, verifica-se um potencial larvicida cerca de dez vezes maior dessa planta em relação a *L. aspera*.

O ebe de *P. americana* apresentou as CL₅₀ e CL₉₀ de 6,6 e 15,4ppm, para 3° e 4° estádios de *Ae. aegypti*, respectivamente. Essas concentrações foram inferiores às encontradas por Kim et al. (2002), Choochote et al. (2004), Morais et al. (2006), Kanis et al. (2009), Kaushik & Saini (2009) para as plantas *Apium graveolens*, *Croton nepetaefolius*, *Croton argyrophyloides*, *Croton sonderianus*, *Croton zenhtneri*, *Vanillosmopsis arbórea*, *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*, apresentada nos resultados desse estudo, foi a avaliação dos efeitos pupicida sobre pupas de *Ae. Aegypti* este em contraste com o controle positivo com temefós (a 1ppm), que é o produto

químico-sintético de maior eficácia contra as larvas desse mosquito foi inócuo para pupas que apresentaram 100% de sobrevivência.

A atividade pupicida *P. americana* sobre *Ae. aegypti* foi o resultado mais relevante em função da escassez de produtos de origem químico-sintética ou botânicas que apresentassem efeitos similares. As concentrações letais observadas nos bioensaios com as larvas foram bem menores do que as das pupas. Isso se deve, provavelmente, as vias de intoxicação do produto que é ingerido pelas larvas junto ao plancton e outras partículas e, por contato, no caso das pupas. No caso do ebe de *P. americana* atravessou o exoesqueleto intoxicando as pupas levando-as a morte. As CL₉₀ foram de 175,1 e 350,5ppm, em experimentos realizados no pneu em laboratório e campo, respectivamente. Esse resultado é comparável ao de Macchioni et al (2004) para planta *Callitris glaucophylla* e com saponinas extraídas de frutos de *Balanites aegyptiaca* interferindo na emergência de adultos, com concentração letal de 500ppm para alcance de 100% de mortalidade. Na literatura pertinente ao assunto, estudo com extratos de *Albizzia amara* e *Ocimum basilicum* mostraram ação pupicida em concentrações cerca de cem vezes maiores do que deste trabalho (Murugan et al. 2007).

As probabilidades de diminuir as concentrações letais se ampliam quando substâncias ativas são isoladas e purificadas, como fizeram Silva et al. (2007) com as frações do óleo-resina de *Copaifera reticulata* CRM₁₋₄ (sesquiterpenos) e CRM₅₋₇ (diterpeno labdano) com a CL₅₀ de 0,2 e 0,8ppm, respectivamente. Com o isolamento e purificação do e.b.e *P. americana* espera-se que o mesmo venha acontecer, pois e.b.e dessa planta apresentou a CL₅₀ de 7,30ppm.

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

7. CONCLUSÕES

O extrato bruto etanólico de *P. americana* apresentou atividade inseticida para larvas e pupas de *Ae. aegypti*.

Há perspectivas de diminuir as concentrações letais através do isolamento e purificação dos compostos ativos através de estudos químicos monitorados por cromatografia de camada delgada e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e espectrometria de massas.

O extrato bruto etanólico de *P. americana* mostrou-se atóxico a vertebrados, de acordo com ensaio de toxicidade oral aguda, ampliando as possibilidades de ser candidato ao controle de *Ae. aegypti*.

8. REFERÊNCIAS

- Aguilera L, Navarro A, Tacoronte JE, Leyva M, Marquetti MC 2003. Efecto letal de myrtaceas cubanas sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Rev Cubana Med Trop* 55: 100-104.
- Amer A, Mehlhorn H 2006a. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). *Parasitol Res* 99: 466-472.
- Amer A, Mehlhorn H 2006b. Persistency of larvicidal effects of plant oil extracts under different storage conditions. *Parasitol Res* 99: 473-477.
- Andrade CFS, Modolo M 1991. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* in integrated control. *Rev Saúde Publ* 25: 184-187.
- Barata EAMF, Costa F, Chiaravalloti CM, Glasser JMS 2001. População de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, sudeste do Brasil. *Rev Saúde Pública* 35: 237-242.
- Barbosa JS, Aguiar CB, Souza ENA 2010. A Fitomedicina da Feira de Campina Grande-PB. *RBC* 1: 1-1.
- Barbosa SJJ, Siqueira JBJ, Coelho GE, Vilarinhos PT, Pimenta FGJ 2002. Dengue in Brazil: current situation and prevention and control activities. *Epidemiol Bull* 23: 3-6.

- Barreto CF, Cavasin GM, Silva HHG, Silva IG 2006. Estudo das alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindus saponaria* Lin (Sapindaceae). *Rev Patrol Trop* 35:37-57.
- Beinart W, Middleton K 2009. Transferência de plantas em uma perspectiva histórica: o estado da discussão. *Topoi* 10:160-180.
- Braga IM, Valle D 2007. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde* 16:113-118.
- Braga IM, Valle D 2007. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol Serv Saúde* 16:279-293.
- Brogdon WG, McAllister JC 1998. Simplification of adult mosquito bioassays through use time-mortality determinations in glass bottles. *J Am Mosquito Control Assoc* 14:59-164.
- Campos J, Andrade CFS 2001. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Rev Saúde Pública* 35:232-6.
- Carvalho M do SL de, Caldas ED, Degallier N, Vilarinhos P de TR, Souza LCK de, Yoshizawa MAC, Knox MB, Oliveira C 2004. Susceptibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. *Rev Saúde Públ.* 38: 623-629.
- Cavalcanti ESB, Morais SM, Lima MAA, Santana EWP 2004. Larvicidal Activity of Essential Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 541-544.
- Cavero ES 1980. O piretro e os piretróides. *Acta Toxicologica*, 3:19-35.
- Champakaew D, Choochote W, Pongpaibul Y, Chaithong U, Jitpakdi A, Tuetun B, Pitasawat B 2007. 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.
- Chapagain BP, Saharan V, Wiesman Z 2008. Larvicidal activity of saponins from *Balanites aegyptiaca* callus against *Aedes aegypti* mosquito. *Bioresource Technol* 99: 1165-1168.
- Cheng SS, Huang CG, Chen YJ, Yu JJ, Chen WJ, Chang ST 2009. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. *Bioresource Technol* 1: 452-456.
- Choochote W, Tuetun B, Kanjanapothi D, Rattanachanpichai E, Chaithong U, Chaiwong P, Jitpakdi A, Tippawangkosol P, Riyong D, Pitasawat B 2004. Potential of crude extract of celery, *Apium graveolens* L., against the insect *Aedes aegypti* (L) (Diptera: Culicidae). *J Vector Ecol* 29, 340:6.
- Coelho AAM, Paula JE, Espindola LS 2009. Atividade larvicida de extratos vegetais sobre *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. *BioAssay* 1: 4-3.
- Costa JGM, Rodrigues FFG, Angélico EC, Silva MR, Mota ML, Santos NKA, Cardoso ALH, Lemos TLG 2005. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. *Rev Bras Farmacogn* 15:304-309.
- Denis Ck, Cavalcanti KM, Meirelles RC, Martinelli B, Valença DC 2003. Manifestações otorrinolaringológicas em pacientes com dengue. *Rev Bras Otorrinolaringol* 69:644-647.

- Espindola BR, Guedes RN, Souza RCP 2008. Avaliação da eficácia do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* no controle de formas imaturas do *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em ambiente de laboratório. *Entomo Brasiliis* 1: 10-13.
- Ferreira BP, 2008. Propagação do abacateiro (*Persea sp.*) por estaquia e mergulha [monografia na Internet].Porto Alegre: Monografia acadêmica, Disponível em: www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/14310/000658708.pdf
- Figueiredo LT 1998. History, present and future of dengue fever in Brazil. In APA Travassos da Rosa, PFC Vasconcelos, JFS Travassos da Rosa, *An overview of Arbovirology on Brazil and Neighboring Countries*. Instituto Evandro Chagas, Belém. p.154-163.
- Forattini OP, Brito M 2003. Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*. *Rev Saúde Pública* 37: 676-677.
- Forattini OP. 2002. *Culicidologia Médica*, Vol.II. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 860pp.
- Franco O. História da febre amarela no Brasil. Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, 1976.
- FUNASA - fevereiro/2001 [pagina na internet] - pag. 12 Biologia dos vetores acessado 28/11/2010 disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ipcv_002.pdf
- FUNASA - fevereiro/2001 [pagina na internet] - pag. 15 Biologia dos vetores acessado 28/11/2010 disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ipcv_002.pdf
- FUNASA - fevereiro/2001 [pagina na internet] - pag. 23. Histórico da Presença do *Aedes Aegypti* e *Aedes Albopictus* no Brasil acessado em: 28/11/2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ipcv_003.pdf
- FUNASA - fevereiro/2001 [pagina na internet] - pag. 11 Biologia dos vetores acessado 28/11/2010 disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ipcv_002.pdf

- FUNASA- março/2002. [pagina na internet] *Programa Nacional de Controle da Dengue*.
Ministerio da Saude, Brasilia, 32 pp.
- Furtado RF, Lima MGA, M. Andrade MN, Bezerra JNS & Silva MGV 2005. Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Neotrop Entomol.* 34: 843-847.
- Gleiser RM, Zygadlo JA 2007. Insecticidal properties of essential oils from *Lippia turbinata* and *Lippia polystachya* (Verbenaceae) against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 101: 1349-1354.
- Gomes AS, Sciavico CJS, Eiras AE 2006. Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em laboratório e campo. *Rev Soc Bras Med Trop* 39:327-332.
- Gubler DJ 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 11: 480-496.
- Gubler DJ, Clark GG 1994. Community based integrate control of *Aedes aegypti*: a brief overview of current programs. *Am J Trop Med Hyg* 50: 50-60.
- Guzman MGT, Kouri GF, Bravo JRG 1999. Emergence of dengue hemorrhagic fever in the Americas. Reemergence of dengue. *Rev Cubana Med Trop* 51:5-13.
- Harris AF, Shavanthi R, Ranson H 2010. Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am J Trop Med Hyg* 83: 277-284.
- Kanis LA, Antonio RD, Antunes ÉP, Prophiro JS, Silva OS 2009. Larvicidal effect of dried leaf extracts from *Pinus caribaea* against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) *Rev Soc Bras Med Trop* 42: 373-376.

- Kaushik R, Saini P 2009. Screening of some semi-arid region plants for larvicidal activity against *Aedes aegypti* mosquitoes. *J Vector Borne Dis* 46: 244-246.
- Kim MK, Jang YS, Ahn YJ, Lee DK, Lee HS 2002. Larvicidal activity of Australian and Mexican plant extracts against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae). *J Asia-Pacific Entomol* 5: 227-231.
- Leite JJ, Brito EH, Cordeiro RA, Brilhante RS, Sidrim JJ, Bertini LM, Morais SM, Rocha MF 2009. Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts. *Rev Soc Bras Med Trop* 42: 110-113.
- Lu QY, Arteaga JR, Zhang Q, Huerta S, Go VLW, Heber D 2005. Inhibition of prostate cancer cell growth by an avocado extract: role of lipid-soluble bioactive substances. *J Nutr Biochem* 16: 23-30.
- Macchioni F, Carugini S, Cecchi F, Siciliano T, Braca A, Cioni P, Morelli I 2004. Aqueous extract of *Codonopsis javanica* against larval and pupal stages of *Aedes albopictus*. *Annali Faci Med Vet*: 57:215-20.
- Macchioni F, Carugini S, Cecchi F, Siciliano T, Braca A, Cioni P, Morelli I 2004. Aqueous extract of *Codonopsis javanica* against larval and pupal stages of *Aedes albopictus*. *Annali Faci Med Vet*: 57:215-20.
- Macoris M de LG, Andrighetti MTM, Takaku L, Glasser CL, Garbeloto VC, Bracco JE 2003. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98:703-708.

- Madeira NG, Macharelli CA, Carvalho LR 2002. Variation of the oviposition preferences of *Aedes aegypti* in function of substratum and humidity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 415-420.
- Magadula JJ, Innocent E, Otieno JN 2009. Mosquito larvicidal and cytotoxic activities of 3 *Annona* species and isolation of active principles. *J Med Plants Res* 3(9): 674-680.
- Maheswaran R, Sathish S, Ignacimuthu S 2008. Larvicidal activity of *Leucas aspera* (Willd.) against the larvae of *Culex quinquefasciatus* Say and *Aedes aegypti* L. *Inter J Integrat Biol* 2: 214-217.
- Malone MH 1977. "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, p. 23-53.
- Marcombe S , Carron A , Darriet F, Etienne M , Agnew P , Tolosa M, Yp-Tcha MM, Lagneau C , Yébakima A , Corbel V 2009. 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.
- McBride WJ, Bielefeldt-Ohmann H 2000. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes Infect* 2: 1041-1050.
- Mcbride WJ, Bielefeldt-Ohmann H 2000. Dengue viral infections; patogenesis and epidemiology. *Microbes Infect* 2:1041-1050.

- Mendonça FA, Silva KF, Santos KK, Ribeiro KAJr, Sant'Ana AE 2005. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Fitoterapia* 76: 629-636.
- Ministério da Saúde 1998 [pagina da Internet]. Brasília: Guia de Vigilância Epidemiológica; 1998-2010 [02 paginas]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_para_denv4_18_01_11.pdf
- Ministério da Saúde 2009 [pagina da Internet]. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde ;2009-2010. Informe Epidemiológico da Dengue Semanas de 1 a 52 de 2009: [28 paginas]. Disponível em: portal.saude.gov.br/.../informe_epidemiologico_semana_1a52_09_revisado.pdf
- Ministério da Saúde 2011 [pagina da Internet]. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde Atualização em 17/01/2011 [10 paginas]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/area.cfm?id_area=1498
- Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Dengue - Manual de Normas Técnicas, Instrução para pessoal de combate ao vetor. Brasília, 2001. 83p.
- Ministério da Saúde. Portal da Saúde – Principal 2010. [página na internet]. Busca de casos suspeitos é reforçada após confirmação de dengue tipo 4 em Boa Vista [citado 2010 Ago]. Disponível em: www.saude.gov.br-principal 2010.
- Monath TP 1994. Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc Nat Acad Sci* 91: 2395-2400.

- Morais SM, Cavalcanti ES, Bertini LM, Oliveira CL, Rodrigues JR, Cardoso JH 2006. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian Croton species against *Aedes aegypti* L. *J Am Mosq Control Assoc* 4: 22-161.
- Mullai K, Jebanesan A, Pushpanathan T 2008. Effect of bioactive fractions of *Citrullus vulgaris* Schrad. leaf extract against *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. *Parasitol Res* 102: 951-955.
- Murthy HM, Judge K, Delucas L, Padmanabhan R 2000. 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.
- Murugan K, Murugan P, Noortheen A 2007. 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.
- Murugan K, Murugan P, Noortheen A 2007. 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.
- Natal, D 2002. Bioecologia do *Aedes aegypti*. *Biológico* 64: 205-207.
- Nathan SS 2007. The use of *Eucalyptus tereticornis* Sm. (Myrtaceae) oil (leaf extract) as a natural larvicidal agent against the malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Bioresource Technol* 98:1856–60.
- Nathan SS, Savitha G, George DK, Narmadha A, Suganya L, Chung PG 2006. Efficacy of *Melia azedarach* L. extract on the malarial vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Bioresource Technol*: 97:1316–23.
- Oliveira JA, editor. Atividade larvicida de *Copaifera reticulata* E *C. langsdorffii* Sobre larvas de *Aedes aegypti*, em ensaios de campo [Tese na Internet]. Goiânia: Tese

de doutorado, 2008 [citado em 2010 nov 10]. Disponível em:
www.ufg.org.br/iptsp

OPAS – Organizacao Panamericana de Saude 1995. Dengue y dengue hemorragico em las Americas: guias para su prevencion y control. Washington DC: OPS. Publicacion Cientifica.

OPAS-Pan American Health Organization. [pagina na Internet]. Number of reported cases of dengue & dengue hemorrhagic fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregion). Figures for 2006 (to week noted by each country) [update 2007 April 27; cited 2010 sept 15]OPAS [just 1 screen]. Disponível em:
<http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/dengue-cases-2006.htm>

Organisation For Economic Cooperation And Developmente (OECD) 2001. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development.

Osanai CH, Travassos-Da-Rosa APA, Amaral S, Passos ACD, Tauil PL 1983. Surto de Dengue em Boa Vista, Roraima. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1:53-54.

Pamplona GD, Roger MD 1999. Encyclopaedia of Medicinal Plants, pp. 719 -720.

Pavela R 2008. Larvicidal effects of various Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 102: 555- 559.

Penido C, Costa KA, Pennaforte RJ, Costa MFS, Pereira JFG, Siani AC, Henriques MGMO 2005. Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergeninduced vascular permeability and hyperalgesia. *Inflamm Res* 54: 295-303.

- Pizarro APB, Filho AMO, Parente JP, Melo MTV, Santos CE, Lima PA 1999. O aproveitamento do resíduo do sisal no controle de larvas de mosquitos. *Rev. Soc Bras Med Trop* 32: 23-29.
- Polanczyk RA, Garcia MO, Alves SB 2003. Potencial de *Bacillus thuringiensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. *Rev Saúde Pública* 37: 813-816.
- Praça LB, Batista AC, Martins ES, Siqueira CB, Dias DGS, Gomes ACMM, Falcão R, Monnerat RG 2004. Estirpes de *Bacillus thurnigiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. *Pesq Agropec Bras* 39: 11-16.
- Prophiro JS, Rossi JCN, Kanis LA, Santos TE, Silva OSS 2008. 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.
- Pushpanathan T, Jebanesan A, Govindarajan M 2008. 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.
- Rahuman AA, Gopalakrishnan G, Venkatesan P, Geetha K 2008. Larvicidal activity of some Euphorbiaceae plant extracts against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 102: 867-873.
- Roel AR 2001. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. Universidade Católica Dom Bosco. *Rev Inter Desenvol Local* 1: 43-50. 2001.

- Rothman AL 2004. Dengue: definig protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest* 113: 946-951.
- Schatzmayer HG, Nogueira RM, Travassos da Rosa AP 1986. An outbreak of dengue vírus at Rio de Janeiro - 1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81: 245-246.
- Schmutterer H 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annu Rev Entomol* 35: 271-297.
- Secretaria de Vigilancia em Saude 2005. [Pagina da internet] Dengue - Boletim da semana 14 / 2005. Ministerio da Saude Disponivel em: http://dtr2001.saude.gov.br/svs/epi/dengue/boletim/pdfs/be_dengue_14_2005.pdf. Acessado em: 15/03/2005.
- Serufo JC, Nobre V, Rayes A, marcial TM, Lambertucci JR 2000. Dengue: uma nova abordagem. *Rev Soc Bras Med Trop* 33: 465-476.
- Shalan EAS, Canyon DV, Younes MWF, Wahab HA, Mansour AH 2005. Effects of sub-lethal concentrations of synthetic insecticides and *Callitris glaucophylla* extracts on the development of *Aedes aegypti*. *J Vector Ecol* 30: 295-298.
- Silva H H G, Geris R, Silva IG, Rodrigues filho E 2007. Larvicidal activity of oil-resin fractions from the brazilian medicinal plant *Copaifera reticulata*. *Rev Soc Bras Med Trop* 40:264-267.
- Silva HHG, IG Silva 1999. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. *Rev Soc Brasil Méd Tropical* 32: 349-355.

- Silva HHG, Silva IG 2000. Estudos do ciclo evolutivo do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) a partir de ovos com quatro meses de estocagem em laboratório. *Rev Pat Trop* 29: 95-100.
- Silva HHG, Silva IG, Lira KS 1998. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. *Rev Patol Trop* 27: 53-63.
- Silva HHG, Silva IG, Oliveira CLNS, Elias CN 1999. Adaptação do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em criadouros artificiais com água poluída. *Entomol Vect* 6: 383-391.
- Silva HHG, Silva IG, Santos RMG, Filho ER, Elias CN 2004. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindácea) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev Soc Bras Med Trop* 37: 396-399.
- Silva IG, Guimarães VP, Lima CG, Silva HHG, Elias CN, Mady CM, Silva VVM, Nery AP, Rocha KR, Rocha C, Isac E 2003. 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.
- Silva IG, Silva HHG, Guimarães VP, Elias CN, Lima CG 2002. Atividade de espécies de culicíneos sinantrópicos em uma cidade brasileira com transmissão de dengue. *Entomol Vect* 9: 15-24.
- Silva JS, Mariano FZ, Scopel I 2008. Ano dengue no Brasil e as políticas de combate ao *Aedes aegypti*: Da tentativa de erradicação as políticas de controle. *Hygeia* 3: 163-175.

- Silva OS, Prophiro JS, Rossi JCN, Kanis LA, Romão PRT, Blazius RD 2006. Larvicidal effect of andiroba oil *Carapa guianensis* (Meliaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Am Mosq Control Assoc* 22: 699-701.
- Silva OS, Romão PR, Blazius RD, Prophiro JS 2004. The use of andiroba *Carapa guianensis* as larvicide against *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc* 20: 456-457.
- Simas NK, Lima EC, Conceição SR, Kuster RM, Filho AMO 2004. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myrozylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Quim Nova* 27: 46-49.
- Siqueira Jr. JB, Martelli CMT, Coelho GE, Simplicio AC, Hatch DL 2005. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. *Emerg Infect Dis* 11: 48-53.
- Souza SS, Silva IG, Silva HHG 2010. Associação entre incidência de dengue, pluviosidade e densidade larvária de *Aedes aegypti*, no Estado de Goiás. *Rev Soc Bras Med Trop* 43: 152-155.
- Sukamar K, Perich MJ, Boobar LR 1991. Botanical derivatives in mosquito control: a review. *J Am Mosq Control Assoc* 7: 210-237.
- Tauil PL 2001. Urbanização e ecologia do dengue. *Cad Saúde Pública*. 17: 99-102.
- Tauil PL 2001. Urbanization and dengue ecology. *Cad Saude Publica* 17 (Suppl): 99-102.
- Teixeira MG, Barreto ML, Guerra Z 1999. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. *Inf Epidem SUS* 8: 5-33.

- Teixeira MG, Costa MC, Barreto ML, Mota E 2005. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? *Cad Saúde Pública* 21: 1307-1315.
- Vanwambeke SO, Benthem BHB, Khantikul N, Burghoorn-Maas C, Panart K, Oskam L, Eric F Lambin EF, Somboon P 2006. Multi-level analyses of spatial and temporal determinants for dengue infection. *Int J Health Geogr* 5: 5-5.
- Vasconcelos PFC, Lima JWO, Rosa APAT, Timbó MJ, Rosa EST, H.R. Lima, Rodrigues SG, Rosa JFST 1998. Epidemia de dengue em Fortaleza, Ceará: inquérito sorológico epidemiológico aleatório. *Rev de Saúde Pública* 32: 447-454.
- Whitehead SS, Falgout B, Hanley KA, Blaney JE, Markoff L, Murphy BR 2003. 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: 1.653-1.657.
- WHO 1997– World Health Organization. Vector Control: methods for use by individuals and communities. Geneva WHO. 2nd ed. 1997 84p.
- WHO -World Health Organization 1999. Dengue/dengue haemorrhagic fever. [pagina na internet] [acessado 2010 out 12]. página: 5. Disponível em: http://www.searo.who.int/LinkFiles/Dengue_Guideline-dengue.pdf
- WHO-World Health Organization 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides, unpublished document, WHO/VBC/81.807, 6 pp.

Wolters B 1992. Jahrtausend vor Kolumbus: Indianische kulturpflanzen und
Arzneidrogen Deutsche Apotheker Zeitung 40:1-10.

Zeidler JD, Acosta POA, Barrêto PC, Cordeiro JS 2008. Vírus dengue em larvas de
Aedes aegypti e sua dinâmica de infestação. *Rev Saúde Públ* 42: 986-993.

ANEXOS

**Anexo 1 – Comprovantes de submissão dos artigos/ aceite para
publicação para artigos ainda não publicados/ cópias dos artigos publicados**