
EXTRATOS VEGETAIS

Atividade Larvicida de Extratos Vegetais sobre *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), em Condições de Laboratório

ANDRÉ A.M. COELHO¹, JOSÉ E. DE PAULA², LAILA S. ESPÍNDOLA¹

¹Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.
CEP: 70910-900. E-mail: aamcoelho@gmail.com

²Laboratório de Anatomia Vegetal, Departamento de Botânica, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.
CEP: 70910-900.

BioAssay 4:3 (2009)

Larvicidal Activity of Plant Extracts on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), under Laboratory Conditions

ABSTRACT – Dengue is a virus borne disease, chiefly transmitted by *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) mosquitoes. Vector control remains as the best prophylactics. However, some populations have shown significant levels of resistance to several pesticides, indicating the need of new insecticides for the control of these insects. Insecticidal activity of 67 Cerrado plant extracts were assayed on third instar larvae of *A. aegypti*, under laboratory conditions. For the extract application, ten larvae, in triplicate, were placed into Petri dish containing 20 ml of solution (500 µg/ml). The insects were maintained at 28 ± 5°C, under 70 ± 5% relative humidity and 12h photophase. After 24 h the number of dead larvae was counted. The dichloromethane extract of the leaves of *Kielmeyera coriacea* Mart. (Clusiaceae) showed high toxicity against larvae of *A. aegypti* with LC50 values of 112.79 µg/ml. These data suggest that this extract should be chemically investigated and monitored through biological assays in order to determine their insecticidal components that could be used as a molecular model or as biorational compounds for use in insect control programmes.

KEYWORDS – dengue mosquito, crude extract, insect control, *Kielmeyera coriacea*.

RESUMO – A dengue é uma doença viral transmitida, principalmente, pelo mosquito *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). Nenhuma vacina ainda foi validada, portanto, o controle vetorial ainda é a melhor prevenção. Entretanto, algumas populações já mostraram resistência a vários inseticidas utilizados. Por isso, há necessidade do desenvolvimento de novos produtos com essa atividade. Avaliou-se a ação larvicida de 67 extratos vegetais sobre larvas do terceiro estágio de *A. aegypti*, em condições de laboratório. Para cada extrato, dez larvas, em triplicata, foram colocadas em placa de Petri contendo 20 ml de solução (500 µg/ml). As larvas tratadas e o controle foram mantidos à temperatura de 28 ± 5°C, umidade relativa de 70 ± 5% e fotoperíodo de 12 horas. Os resultados foram registrados após 24h. O extrato diclorometânico da folha de *Kielmeyera coriacea* Mart. (Clusiaceae) foi o que apresentou melhor atividade na concentração inicial testada. A CL₅₀ desse extrato foi determinada, sendo igual a 112.79 µg/ml. Sugere-se que este extrato seja quimicamente fracionado e biomonitorado, isolando as substâncias ativas, pois podem ser úteis na busca por novos compostos naturais inseticidas, mais seletivos e biodegradáveis, sobre larvas do mosquito *A. aegypti*.

PALAVRAS-CHAVE – mosquito da dengue, extrato bruto, controle de insetos, *Kielmeyera coriacea*.

A dengue é uma doença infecciosa, de origem viral, transmitida para o homem por meio da picada de fêmeas de mosquitos contaminadas pertencentes ao gênero *Aedes*. O principal vetor é o inseto *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), também vetor da febre amarela urbana. Quatro sorotipos diferentes foram descritos,

DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4, todos membros do gênero *Flavivirus*, pertencente à família Flaviviridae (Guzmán & Kouri 2001).

A dengue e a dengue hemorrágica ocorrem em mais de 100 países, com uma estimativa anual de 50

milhões de infecções, além de mais de 2,5 bilhões de pessoas em risco de contaminação (WHO 2002).

A prevenção da dengue consiste em três fatores básicos: controle vetorial, implementação de bons sistemas de vigilância e desenvolvimento de vacinas eficazes. Como ainda não existe nenhuma vacina validada, o controle vetorial é muito importante, consistindo, principalmente, na eliminação de criadouros naturais e artificiais dos mosquitos, além da aplicação de inseticidas, tanto para as larvas quanto para os adultos (Ligon 2005).

Já foi verificada a resistência a inseticidas em populações de *A. aegypti* em diversos estados brasileiros, como São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Paraná, Sergipe e Alagoas (Lima et al. 2003, Macoris et al. 2003, Braga et al. 2004, Luna et al. 2004), assim como em outros países, por exemplo, Panamá e Cuba (Bisset et al. 2003, Rodriguez et al. 2004). Mais especificamente em relação a temefós, populações de *A. aegypti* de 20 municípios de várias regiões do Brasil apresentaram resistência, excluindo-se apenas a região Sul (Donalísio & Glasser 2002).

Além disso, a utilização indiscriminada de inseticidas sintéticos tem contaminado o ambiente e os organismos vivos (Raizada et al. 2001, Abdollahi et al. 2004, Nakata et al. 2005), fazendo-se necessário, portanto, o desenvolvimento de produtos com um menor impacto ambiental.

Inclusive para os piretróides, já foi verificada neurotoxicidade em mamíferos após exposições agudas ou subcrônicas (Soderlund et al. 2002, Kolaczinski & Curtis 2004, Shafer et al. 2005).

Diversas plantas apresentam compostos inseticidas capazes de afetar processos peculiares às pestes-alvo, perturbando o comportamento de alimentação, os reguladores de crescimento e o balanço endócrino (Balandrin et al. 1985). Um exemplo de composto de origem vegetal com atividade inseticida é o triterpenóide azadiractina, proveniente da *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae), que parece ser seletiva, não mutagênica, rapidamente degradável e com baixa toxicidade para mamíferos, além de causar uma mínima desordem para o ecossistema (Sundaram 1996, Gupta 2004). Já foi verificada ação inseticida de extratos brutos ou moléculas isoladas de *A. indica* em larvas de *A. aegypti* (Siddiqui et al. 2000, Wandscheer et al. 2004).

Portanto, existe a necessidade do desenvolvimento de compostos inseticidas seguros contra os vetores da dengue, que causem um mínimo impacto ambiental e com novos modos de ação (WHO 2003). Assim, avaliou-se a atividade inseticida de 67 extratos em larvas do terceiro estágio de *A. aegypti*.

Material e Métodos

Plantas. As amostras foram coletadas no entorno de Brasília, Distrito Federal, entre 2002 e 2005, juntamente com o botânico Prof. Dr. José Elias de Paula do Laboratório de Anatomia Vegetal, Instituto de

Biologia, Universidade de Brasília. As exsiccatas estão depositadas no Herbário (UB) da Universidade de Brasília.

Preparação dos Extratos. As 29 espécies utilizadas para o preparo dos 67 extratos testados foram dessecadas, estabilizadas, pulverizadas e submetidas a um processo de extração por maceração com hexano (4 x 2 L) seguido de etanol 95% (4 x 2 L) ou com hexano (4 x 2 L), diclorometano (4 x 2 L) e, por fim, solução hidroalcoólica 80% (4 x 2 L). Os diferentes extratos brutos foram obtidos após evaporação dos solventes sob pressão reduzida a 40°C.

Insetos. Para obtenção das larvas de *A. aegypti*, os ovos foram colocados em uma bandeja com 3 L de água destilada acrescida de 40 ml de solução aquosa de alfafa. Após a eclosão, que ocorre em cerca de 24 h, as larvas foram mantidas em água limpa, a $28 \pm 5^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 5\%$, fotofase de 12 h e alimentadas com ração para gato autoclavada (30% de proteína bruta, 10% de extrato etéreo, 4% de matéria fibrosa, 8% de matéria mineral) até atingirem o 3º estágio de desenvolvimento.

Bioensaio. Cada extrato foi testado com uma concentração de 500 µg/ml: 10 mg de cada extrato foram, separadamente, dissolvidos em 0.2 ml de dimetilsulfóxido (DMSO). A seguir, adicionou-se a esta mistura um volume de água destilada suficiente para completar 20 ml. Os testes foram realizados em placas de Petri. Para o extrato que provocou mortalidade superior a 90%, novos testes em concentrações menores (250, 125, 62.5, 31.25 e 15.62 µg/ml) foram realizados para a estimativa da CL₅₀. Como controle, foram utilizados DMSO e água. Para cada amostra, dez larvas de 3º estágio foram testadas em triplicata. As larvas tratadas e o controle foram mantidos sob as mesmas condições da criação. Os resultados foram registrados após 24h, considerando-se como mortas as larvas que não reagiram a estímulos mecânicos (estimulação por uma pinça).

Análise Estatística. A análise de Probit foi utilizada para a estimativa da CL₅₀, utilizando-se o programa SPSS – versão 11.5.

Resultados e Discussão

Dos extratos analisados em concentração de 500 µg/ml (Tabela 1), apenas o diclorometânico da folha de *Kielmeyera coriacea* Mart. (Clusiaceae) causou mortalidade média superior a 90% das larvas testadas. Verificou-se para *K. coriacea*, por meio da análise de Probit, CL₅₀ igual a 112.79 µg/ml (95% LC 52.99 – 309.07). Outros sete extratos provocaram mortalidade média igual ou superior a 50%: hexânicos da casca do caule de *Talauma ovata* A.St.-Hil. (Magnoliaceae), madeira da raiz e folha de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) e da casca da raiz de *Matayba guianensis* Aubl. (Sapindaceae), etanólicos da casca e da madeira do caule de *Xylopia emarginata* Mart. (Annonaceae), e diclorometânico da folha de *S. terebinthifolius*.

Tabela 1. Mortalidade média (\pm EP) de *A. aegypti* tratados com os diferentes extratos na concentração de 500 μ g/ml. Temp.: 28 \pm 5°C, UR: 70 \pm 5%, fotofase: 12 h, N = 10, triplicata.

Família	Nome científico / Controle	Nome popular	Parte da planta utilizada	Solvente	Mortalidade (%) após 24h	
Alismataceae	<i>Echinodorus macrophyllus</i>	Chapéu-de-couro	Folha	Diclorometano	23.3 \pm 8.81	
				Hidroalcoólica	10.0 \pm 0.00	
Anacardiaceae	<i>Schinus terebinthifolius</i>	Aroeira vermelha	Folha	Diclorometano	50.0 \pm 5.77	
				Hexano	53.3 \pm 3.33	
				Diclorometano	10.0 \pm 0.00	
Annonaceae	<i>Cardiopetalum calophyllum</i> <i>Xylopi emarginata</i>	Imbirinha	Madeira da raiz	Hexano	53.3 \pm 3.33	
			Folha	Etanol	0	
				Casca do caule	Etanol	50.0 \pm 5.77
Apocynaceae	<i>Aspidosperma tomentosa</i> <i>Condylcarpon isthmicum</i>	Peroba-do-cerrado	Folha	Diclorometano	6.7 \pm 3.33	
				Hexano	0	
				Hidroalcoólico	0	
Bignoniaceae	<i>Anemopaegma chamberlaynii</i> <i>Arrabidaea florida</i> <i>Tabebuia caraiba</i>	Cipó-de-leite	Casca do caule	Etanol	0	
				Madeira do caule	Etanol	0
				Caule	Hexano	40.0 \pm 10.00
Clusiaceae	<i>Calophyllum brasiliense</i> <i>Kielmeyera coriacea</i>	Guanandi	Folha	Diclorometano	0	
				Hexano	3.3 \pm 3.33	
				Hexano	0	
Magnoliaceae	<i>Talauma ovata</i>	Baguaçu	Casca do caule	Diclorometano	93.3 \pm 6.67	
				Hexano	0	
				Hexano	0	
Malpighiaceae	<i>Byrsonima crassa</i>	Murici	Folha	Diclorometano	33.3 \pm 8.81	
				Hexano	0	
				Etanol	0	
Meliaceae	<i>Guarea guidonia</i>	Açafroa	Caule	Hexano	6.7 \pm 3.33	
				Etanol	0	
				Etanol	0	
	<i>Guarea kunthiana</i>	Jatuaúba	Caule	Folha	6.7 \pm 3.33	
				Raiz	Hexano	13.3 \pm 6.67
				Caule	Etanol	3.3 \pm 3.33
				Hexano	6.7 \pm 3.33	
Mimosaceae	<i>Enterolobium ellipticum</i>	Tamboril	Folha	Etanol	0	
				Hexano	0	
				Fruto	Hexano	40.0 \pm 5.77
				Etanol	0	
				Raiz	Etanol	3.3 \pm 3.33

				Hexano	3.3 ± 3.33
				Hidroalcoólica	0
	<i>Stryphnodendron adstringens</i>	Barbatimão	Folha	Diclorometano	0
				Hexano	0
Monimiaceae	<i>Siparuna cujabana</i>	Pau-limão	Fruto	Etanol	0
			Raiz	Etanol	0
Rubiaceae	<i>Palicourea rígida</i>	Bate-caixa	Folha	Diclorometano	3.3 ± 3.33
				Hexano	0
	<i>Sabicea brasiliensis</i>	Sangue-de-cristo	Raiz	Hexano	0
				Etanol	0
Sapindaceae	<i>Cupania vernalis</i>	Olho-de-cotia	Madeira da raiz	Etanol	0
	<i>Magonia pubescens</i>	Tingui	Casca da raiz	Hexano	0
			Madeira da raiz	Hexano	13.3 ± 3.33
	<i>Matayba guianensis</i>	Camboatá	Casca da raiz	Hexano	53.3 ± 6.67
Sapotaceae	<i>Pouteria gardneri</i>	Sapotinha	Madeira da raiz	Etanol	0
			Raiz	Hexano	23.3 ± 3.33
	<i>Pouteria ramiflora</i>	Figo-do-cerrado	Madeira da raiz	Hexano	0
				Hexano	0
	<i>Pouteria torta</i>	Guapeva	Madeira da raiz	Etanol	3.3 ± 3.33
Solanaceae	<i>Solanum lycocarpum</i>	Lobeira	Folha	Hexano	13.3 ± 3.33
Vochysiaceae	<i>Qualea grandiflora</i>	Pau-terra	Folha	Diclorometano	0
				Hexano	13.3 ± 6.67
			Madeira do caule	Hexano	0
			Raiz	Hexano	0
Zingiberaceae	<i>Renealmia alpinia</i>	—	Folha	Hexano	23.3 ± 3.33
				Etanol	0
	Controle DMSO 1%				0

O nível de atividade larvicida (aproximadamente 50% de mortalidade a 500 µg/ml) apresentado por sete extratos justifica o interesse nas espécies vegetais em questão. O valor potencial de subprodutos destas espécies é ainda maior pela possibilidade de realização de testes sistemáticos das combinações de diferentes métodos de extração e partes das plantas. Novos paradigmas de uso e produção de inseticidas, como no Manejo Integrado de Pragas (MIP), também podem alterar substancialmente o valor relativo de extratos vegetais com atividades moderadas associadas a características como degradabilidade, efeitos tóxicos indesejados, características do cultivo da espécie e mecanismos de ação.

K. coriacea é usada popularmente para o tratamento de esquistossomose, malária e infecções fúngica e bacteriana. Audi *et al.* (2002) verificaram que o extrato etanólico da folha dessa planta possui efeito ansiolítico significativo em ratos, apesar de não apresentar efeito antidepressivo. Os autores também sugerem, por prospecção fitoquímica, a presença de flavonóides, esteróides, triterpenóides e taninos nesta espécie.

Cortez *et al.* (1998) fracionaram o extrato diclorometânico das folhas e do caule de *K. coriacea*, isolando e identificando dez xantonas, dois triterpenos e

um bifenil. Ainda no mesmo trabalho, os autores verificaram que quatro xantonas e o bifenil exibiram atividade antifúngica em *Cladosporium cucumerinum* Ellis & Arthur, e outras duas xantonas inibiram o crescimento de *Candida albicans* (Robin) Berkhout.

Deve-se ressaltar que os terpenos possuem ampla atividade inseticida conhecida (Viegas Júnior 2003), podendo estas substâncias, pelo menos em parte, ser as responsáveis pela atividade larvicida observada.

Muitas meliacinas, triterpenóides com sabor amargo, possuem atividade pesticida e uma das principais fontes dessas substâncias são plantas da família Meliaceae (Viegas Júnior 2003). Entre elas, as dos gêneros *Azadirachta* e *Melia* têm sido intensamente investigadas, inclusive, sendo verificada ação larvicida de extratos brutos ou moléculas isoladas de *A. indica* e *Melia azedarach* L. em *A. aegypti* (Siddiqui *et al.* 2000, Wandscheer *et al.* 2004). Entretanto, nas duas espécies dessa família utilizadas neste estudo, *Guarea guidonia* (L.) Sleumer e *Guarea kunthiana* A. Juss., não foi observada nenhuma atividade larvicida em *A. aegypti*, apesar de terem aumentado significativamente a taxa de mortalidade em ninfas do 4º estágio de *Rhodnius milesi* Carcavallo, Rocha, Galvão & Jurberg (Hemiptera: Reduviidae) (Coelho *et al.* 2006).

Como observado por Kao *et al.* (2001), extratos vegetais devem ser analisados também em conjunto, visto que existe a possibilidade de uma ação sinérgica ou aditiva entre eles. Assim, estudos futuros poderiam verificar se tais efeitos existem entre os oito extratos ativos testados, pois o desenvolvimento de resistência é dificultado quando mais de um tipo de pesticida é utilizado ou quando há uma rotatividade dos mesmos (Flores *et al.* 2001). Ainda, sugere-se que o extrato diclorometânico da folha de *K. coriacea* seja quimicamente fracionado e biomonitorado, isolando as substâncias ativas, pois podem ser úteis na busca por novos compostos naturais inseticidas, mais seletivos e biodegradáveis, sobre larvas do mosquito *A. aegypti*.

Agradecimentos

Agradecemos à Prof^a Diana Gonçalves Simões e Daniel Diniz pela revisão do manuscrito. Também somos gratos à Diretoria de Vigilância Ambiental do Distrito Federal por ceder as larvas e o laboratório utilizados para a realização dos experimentos.

Literatura Citada

- Abdollahi, M., A. Ranjbar, S. Shadnia, S. Nikfar & A. Rezaie. 2004. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med. Sci. Monit.* 10: 141-147.
- Audi, E.A., F. Otobone, J.V.C. Martins & D.A.G. Cortez. 2002. Preliminary evaluation of *Kielmeyera coriacea* leaves extract on the central nervous system. *Fitoterapia* 73: 517-519.
- Balandrin, M.F., J.A. Klocke, E.S. Wurtele & W.H. Bollinger. 1985. Natural plant chemicals: source of industrial and medicinal materials. *Science (Wash. D. C.)* 228: 1154-1160.
- Bisset, J.A., M.M. Rodriguez & L. Cáceres. 2003. Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos em 2 cepas de *Aedes aegypti* de Panamá. *Rev. Cuba. Med. Trop.* 55: 191-195.
- Braga, I.A., J.B.P. Lima, S.S. Soares & D. Valle. 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99: 199-203.
- Coelho, A.A.M., J.E. de Paula & L.S. Espíndola. 2006. Insecticidal activity of cerrado plant extracts on *Rhodnius milesi* Carcavallo, Rocha, Galvão & Jurberg (Hemiptera: Reduviidae), under laboratory conditions. *Neotrop. Entomol.* 35: 133-138.
- Cortez, D.A.G., M.C.M. Young, A. Marston, J.L. Wolfender & K. Hostettmann. 1998. Xanthonés, triterpenes and a biphenyl from *Kielmeyera coriacea*. *Phytochemistry (Oxf.)* 47: 1367-1374.
- Donalísio, M.R. & C.M. Glasser. 2002. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. *Rev. Bras. Epidemiol.* 5: 259-272.
- Flores, A.E., M.H. Badii & G.G. Ponce. 2001. Resistencia a insecticidas en insectos vectores de enfermedades con énfasis en mosquitos. *Respyn* 2: 1-9.
- Gupta, P.K. 2004. Pesticide exposure – Indian scene. *Toxicology* 198: 83-90.
- Guzmán, M.G. & G. Kouri. 2001. Dengue: an update. *Lancet Infect. Dis.* 2: 33-42.
- Kao, S.T., C.C. Yeh, C.C. Hsieh, M.D. Yahg, M.R. Lee, H.S. Liu & J.G. Lin. 2001. The chinese medicine Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang inhibited proliferation of hepatoma cell lines by inducing apoptosis via G0/G1 arrest. *Life Sci.* 69: 1485-1496.
- Kolaczinski, J.H. & C.F. Curtis. 2004. Chronic illness as a result of low-level exposure to synthetic pyrethroids insecticides: a review of the debate. *Food Chem. Toxicol.* 42: 697-706.
- Ligon, B.L. 2005. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: a review of the history, transmission, treatment and prevention. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* 16: 60-65.
- Lima, J.B.P., M.P. Cunha, R.C. Silva Júnior, A.K.R. Galardo, S.S. Soares, I.A. Braga, R.P. Ramos & D. Valle. 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several Municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito santo, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68: 329-333.
- Luna, J.D., M.F. Martins, A.F. Anjos, E.F. Kuwabara & M.A. Navarro-Silva. 2004. Susceptibility of *Aedes aegypti* to temephos and cypermethrin insecticides, Brazil. *Rev. Saúde Pública* 38: 1-2.
- Macoris, M.L.G., M.T.M. Andrighetti, L. Takaku, C.M. Glasser, V.C. Garbeloto & J.E. Bracco. 2003. Resistance of *Aedes aegypti* from the State of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98: 703-708.
- Nakata, H., Y. Hirakawa, M. Kawazo, T. Nakabo, K. Arizono, S.I. Abe, T. Kitano, H. Shimada, I. Watanabe, W. Li & X. Ding. 2005. Concentrations and compositions of organochlorine contaminants in sediments, soils, crustaceans, fishes and birds collected from Lake Tai, Hangzhou Bay and Shanghai city region, China. *Environ. Pollut.* 133: 415-429.
- Raizada, R.B., M.K. Srivastava, R.A. Kaushal & R.P. Singh. 2001. Azadirachtin, a neem biopesticide: subchronic toxicity assessment in rats. *Food Chem. Toxicol.* 39: 477-483.
- Rodriguez, M.M., J.A. Bisset, D. Fernandez & O. Perez. 2004. Resistencia a insecticidas en larvas y adultos de *Aedes aegypti*: prevalencia de la esterasa A4 asociada con la resistencia a temefos. *Rev. Cuba. Med. Trop.* 56: 54-60.
- Shafer, T.J., D.A. Meyer & K.M. Crofton. 2005. Developmental neurotoxicity of pyrethroids insecticides: critical review and future research needs. *Environ. Health Perspect.* 113: 123-136.

- Siddiqui, B.S., F. Afshan, Ghiasuddin, S. Faizi, S.N.H. Naqvi & R.M. Tariq. 2000. Two insecticidal tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica*. *Phytochemistry* 53: 371-376.
- Soderlund, D.M., J.M. Clark, L.P. Sheets, L.S. Mullin, V.J. Piccirillo, D. Sargent, J.T. Stevens & M.L. Weiner. 2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology* 171: 3-59.
- Sundaram, K.M.S. 1996. Azadirachtin biopesticide: a review of studies conducted on its analytical chemistry, environmental behaviour and biological effects. *J. Environ. Sci. Health Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* B31: 913-948.
- Viegas Júnior, C. 2003. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quím. Nova* 26: 390-400.
- Wandscheer, C.B., J.E. Duque, M.A.N. da Silva, Y. Fukuyama, J.L. Wohlke, J. Adelman & J.D. Fontana. 2004. Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. *Toxicon* 44: 829-835.
- WHO-World Health Organization. 2003. Report on Insect Vectors and Human Health. Geneva, 80 p.
- WHO-World Health Organization. 2002. TDR Strategic direction: Dengue, Geneva, TDR, 4 p.

Received: 04/VI/2008 Accepted: 30/XI/2008 Published: 25/VI/2009 Available online: www.bioassay.org.br/ojs/index.php/bioassay/article/view/22/57