

EXTRATOS VEGETAIS

Estudo Comparativo do Efeito Larvicida de Extratos de Frutos Verdes e Maduros de *Melia azedarach* L. (Sapindales: Meliaceae) em *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae)JOSIANE SOMARIVA PROPHIRO^{1,2}, JULIANA CHEDID NOGARED ROSSI², LUIZ ALBERTO KANIS³, TANIA GONÇALVES DOS SANTOS², ONILDA SANTOS DA SILVA²¹Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária, Departamento de Zoologia, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Entomologia. Universidade Federal do Paraná. Caixa Postal 19020, CEP: 81531-980, Curitiba-PR, Brasil.²Laboratório de Entomologia Médica, Curso de Medicina e Curso de Ciências Biológicas, Universidade do Sul de Santa Catarina, Av. José Acácio Moreira, 787, Dehon, CEP: 88704-900, Tubarão-SC, Brasil.E-mail: onilda.silva@unisol.br³Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Curso de Farmácia, Universidade do Sul de Santa Catarina, Av. José Acácio Moreira, 787, Dehon, CEP: 88704-900, Tubarão-SC, Brasil.

BioAssay 3:2 (2008)Comparative Study of the Larvicidal Effect of Ripe and Unripe Fruits Extracts of *Melia azedarach* L. (Sapindales: Meliaceae) on *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae)

ABSTRACT - The insecticidal activity of *Melia azedarach* L. (Sapindales: Meliaceae) in insects of agriculture importance have been extensively evaluated. However, the possibility of the use of this plant in the control of insects of medical importance is poorly studied. The aim of this work was to compare the larvicidal effect of ethanolic extracts of unripe and ripe fruits of *M. azedarach* on *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). The results showed that both extracts of unripe and ripe fruits of *M. azedarach* caused larval mortality. The lethal concentrations (LC₅₀, LC₉₀ e LC₉₅) obtained from unripe fruits were 0.08%, 0.31% and 0.47% respectively to 3^o instar and 0.18%, 0.43% and 0.55% respectively to 4^o instar of *A. aegypti* after 48h exposition. In relation to the ripe fruits the LC₅₀, LC₉₀ and LC₉₅ were 0.05%, 0.10% and 0.12% respectively to the 3^o instar and 0.05%, 0.11% and 0.14% respectively to the 4^o instar, after 48 h of exposition. These results showed that ripe fruits are more effective than unripe fruits for controlling *A. aegypti* larvae.

KEYWORDS - Yellow fever mosquito, Chinaberry, botanic larvicide.

RESUMO - A atividade inseticida de *Melia azedarach* L. (Sapindales: Meliaceae) em insetos de importância agrícola tem sido extensivamente avaliada. Contudo, a possibilidade de uso desta planta no controle de insetos de importância médica é pouco estudada. O objetivo deste estudo foi comparar o efeito larvicida de extratos etanólicos de frutos verdes e maduros de *M. azedarach* em *Aedes aegypti* (Linnaeus: 1762) (Diptera: Culicidae). Os resultados obtidos demonstraram que ambos os frutos verdes e maduros de *M. azedarach* causaram mortalidade nas larvas. As concentrações letais (CL₅₀, CL₉₀ e CL₉₅) obtidas do extrato de frutos verdes foram 0,08%, 0,31%, 0,46% respectivamente para 3^o estágio, e 0,18%, 0,43%, 0,55% respectivamente para 4^o estágio, após 48 horas de exposição. Em relação ao extrato de frutos maduros, as CL₅₀, CL₉₀ e CL₉₅ foram de 0,05%, 0,10%, 0,12% respectivamente para 3^o estágio e 0,05%, 0,12%, 0,14% respectivamente para 4^o estágio, após 48 horas de exposição. Os resultados demonstram que o extrato de frutos maduros é mais eficiente do que frutos verdes, para o controle de larvas de *A. aegypti*.

PALAVRAS-CHAVE - Mosquito-da-dengue, cinamomo, larvicida botânico.

Atualmente, o vírus causador da dengue é considerado como uma das mais importantes arboviroses em saúde pública. Estima-se que entre 50 e 100 milhões de pessoas se infectem anualmente em mais de 100

países de todos os continentes, exceto a Europa (WHO 1997b). O principal responsável pela transmissão mundial do vírus é o *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). Este culicídeo é considerado o

vetor mais eficiente de várias espécies de arbovírus, principalmente o vírus da dengue (WHO 1997a).

Em geral, as estratégias de combate à dengue estão baseadas no controle do vetor, que no Brasil é o *A. aegypti*. O controle é tradicionalmente baseado no emprego de produtos químicos sintéticos e biológicos, integrados com programas de manejo ambiental. No Brasil, os programas que visam controlar esta espécie de mosquitos utilizam principalmente inseticidas químicos, onde se destacam os organofosforados e piretróides (Duque *et al.* 2004). Entretanto, o freqüente emprego de inseticidas químicos no controle de vetores pode favorecer o desenvolvimento de resistência dos mesmos, contribuindo para o aumento das populações de mosquitos (Pinheiro & Tadei 2002, Lima *et al.* 2003; Marcoris *et al.* 2003).

Dentre os métodos alternativos ao uso de inseticidas químicos, incluem-se os extratos botânicos, principalmente os que pertencem à família Meliaceae. O maior destaque é dado à planta *Azadirachta indica* A. Juss (Sapindales: Meliaceae), usualmente conhecida por nim, com efeito confirmado em mais de 300 espécies de insetos (Martinez 2002). Esta planta não é nativa do Brasil, mas os bons resultados verificados com o nim têm estimulado pesquisas com outras plantas no intuito de encontrar novas espécies com atividade inseticida.

Dentre estas, destaca-se *Melia azedarach* L. (Sapindales: Meliaceae), planta também pertencente à família Meliaceae, e conhecida popularmente como cinamomo, santa-bárbara, jasmim-de-soldado e pára-raios. É uma espécie proveniente do continente asiático, e no Brasil tem ampla distribuição geográfica, ocorrendo em todas as regiões (Joly 1985).

Atualmente, esta planta vem sendo avaliada para controle de várias espécies de insetos. Salles & Rech (1999) descreveram sobre a ação inseticida de extratos de frutos de *M. azedarach* em mosca-das-frutas *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae), reduzindo a postura, o desenvolvimento larval e pupal do inseto. Brunherotto & Vendramim (2001) avaliaram o efeito inseticida de extratos de *M. azedarach* na traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), constatando que as folhas foram a estrutura vegetal com maior bioatividade sobre a traça. Nardo *et al.* (1997) verificaram interferência na longevidade e no desenvolvimento de formas imaturas da mosca branca *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) (Hemiptera: Aleyrodidae) pela utilização de extratos de *M. azedarach*. Souza & Vendramim (2001) avaliaram o efeito de extratos aquosos de ramos, folhas, frutos verdes e frutos maduros de *M. azedarach*, sobre ovos e ninfas de *B. tabaci* biótipo B, criada em tomateiro. Os frutos verdes de *M. azedarach* foram mais efetivos, seguindo-se as folhas e os frutos maduros. Com relação

a insetos vetores, Valladares *et al.* (1999) avaliaram o efeito de extratos de frutos e folhas de *M. azedarach* sobre *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera:

Reduviidae) vetor do *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae). Os extratos de fruto verde e fruto maduro demonstraram ser repulsivos, enquanto as folhas foram ineficazes. Não foi observado efeito sobre ovos, sobrevivência das ninfas e tempo de desenvolvimento. Nathan *et al.* (2005) testaram extratos metanólicos de folhas e sementes de *M. azedarach* sobre adultos e imaturos de *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). Wandscheer *et al.* (2004) verificaram a bioatividade de extratos etanólicos de endocarpos de frutos maduros de *M. azedarach* e *A. indica* sobre larvas de *Aedes aegypti*, ambos os extratos mostraram letalidade para larvas de 3º e 4º estágio.

Devido a grande necessidade de um controle mais efetivo sobre os vetores do vírus da dengue, é necessário que um maior número de estudos seja conduzido de forma a se desenvolverem inseticidas naturais que não afetem o meio ambiente. Assim, o objetivo deste estudo foi comparar o efeito larvicida de extratos etanólicos de frutos verdes e maduros de *M. azedarach* em uma linhagem de *A. aegypti* resistente ao inseticida temefós, em condições de laboratório.

Material e Métodos

Mosquitos. Para a realização dos biosensaio foram utilizadas larvas de 3º e 4º estádios de uma colônia de *Aedes aegypti* (GCZ - Gerência de Controle de Vetores), recebidos da Fundação Nacional de Saúde – Brasília. A colônia é mantida no Laboratório de Entomologia Médica em temperatura de 25 ± 2 °C e $80\% \pm 2$ UR, e fotofase de 14h. As larvas foram criadas em potes plásticos com água fervida, e alimentadas com ração para filhotes de cães, três vezes por semana. Machos e fêmeas adultos foram providos constantemente com uma solução de 5% de mel, e, para o repasto sanguíneo das fêmeas, foi oferecido um camundongo anestesiado duas vezes na semana. Para a oviposição das fêmeas, pedaços de papel filtro umedecidos foram colocados em placas de Petri no interior da gaiola.

Extratos. As amostras de frutos verdes e frutos maduros de *M. azedarach* foram coletados de árvores localizadas na região de Sertão dos Corrêas, no município de Tubarão, SC, durante os anos de 2004 e 2005. Para a obtenção dos extratos etanólicos, uma massa de 300 gramas de cada material foi mantida em maceração com agitação mecânica durante cinco dias com 1,9 litros de líquido extrator (etanol 100%). Em seguida, os extratos foram filtrados e concentrados em evaporador rotatório sob vácuo e temperatura de 40°C, até a obtenção do extrato bruto.

Bioensaio. O extrato bruto foi previamente solubilizado em Tween 20 na concentração de 0,015% à temperatura de 40 °C; em seguida foi adicionado volume pré-definido de água-deionizada a 40 °C e mantido sob agitação mecânica durante 30 minutos. Recipientes

plásticos com capacidade de 350 ml foram preenchidos com 100 ml das soluções contendo o extrato e em cada um foram adicionadas 20 larvas ativas de 3º ou 4º estágio. Para cada concentração e estágio larval, os testes foram repetidos pelo menos cinco vezes. Para cada experimento, um controle com água e Tween-20 foi utilizado. A mortalidade das larvas foi medida em 24 e 48h de exposição aos extratos testados. A mortalidade foi comprovada quando as larvas foram tocadas com agulhas histológicas e não apresentaram movimentos. Os testes seguiram o protocolo da Organização Mundial de Saúde (WHO 1981).

Análise estatística. Os valores de concentração letal CL_{50} , CL_{90} e CL_{95} nos períodos de 24 e 48h foram estimados pela análise Probit (Finney 1971). Para detectar diferenças entre os tratamentos em relação à mortalidade de 3º e 4º estágios, entre 24 e 48h de exposição e entre os extratos, aplicou-se análise de variância (ANOVA/MANOVA) pelo programa STATISTICA 6.0. O nível de significância adotado para os testes foi de 5%.

Resultados e Discussão

Nas condições em que foram desenvolvidos todos os testes de suscetibilidade das larvas de *A. aegypti*, obteve-se mortalidade em doses dependentes de todos os extratos botânicos de *M. azedarach* (Tabela 1). A inexistência de mortalidade em todos os grupos controle indica que o Tween utilizado para diluir o extrato, não afetou o desenvolvimento larval.

A mortalidade causada pelos extratos de frutos verdes e extratos de frutos maduros não expressou diferença significativa entre os estágios (3º e 4º), tanto em 24 como em 48h de exposição ($F = 0,5$; $gl = 4$; $P < 0,73$).

Por outro lado, pode-se observar que houve diferença significativa na mortalidade larval entre os períodos avaliados (24 e 48h) de exposição ao extrato de frutos verdes e extrato de frutos maduros ($F = 26,42$; $gl = 16$; $P = 0,0001$). Quando se compara a mortalidade, causada apenas pelo extrato de frutos verdes, entre os períodos de 24 e 48h observa-se diferença significativa ($F = 11,23$; $gl = 8$; $P = 0,0012$). Do mesmo modo, ocorre com a mortalidade causada apenas pelo extrato de frutos maduros, entre 24 e 48h de exposição ($F = 14,20$; $gl = 8$; $P = 0,00055$).

A análise comparativa entre a mortalidade larval causada pelo extrato de frutos verdes e extrato de frutos maduros, demonstrou que existe diferença significativa entre os extratos, tanto em 24 como em 48h de exposição ($F = 8,99$; $gl = 8$; $P = 0,0027$ e $F = 16,68$; $gl = 8$; $P = 0,000311$), respectivamente.

Através deste estudo, foi comprovada a susceptibilidade de *A. aegypti* aos extratos botânicos de *M. azedarach*, principalmente aos extratos de frutos maduros. De acordo com Roel (2001), uma alternativa para evitar o desenvolvimento de resistência a produtos

químicos sintéticos é a utilização de produtos envolvendo plantas inseticidas. Substâncias extraídas dessas plantas têm inúmeras vantagens quando comparadas ao emprego de sintéticos. Os inseticidas naturais são obtidos de recursos renováveis e rapidamente degradáveis e o desenvolvimento de resistência dos insetos a essas substâncias (compostas da associação de vários princípios ativos) é um processo lento, além de não deixarem resíduos.

Todos os extratos aliados causaram mortalidade nas larvas. Entretanto, aqueles de concentrações 0,50% para frutos maduros e 0,65% para frutos verdes, causaram mortalidade total em 48 horas de exposição. Comparando os resultados entre o extrato bruto de frutos verdes e o extrato bruto de frutos maduros de *M. azedarach*, o extrato de frutos maduros é o melhor larvicida para *A. aegypti*.

Nathan *et al.* (2005), utilizando extratos metanólicos de folhas e sementes de *M. azedarach* constataram atividade larvicida, contra outro culicídeo de importância médica, *Anopheles stephensi*. Relações de dose-resposta claras foram estabelecidas com a dose mais alta de 2% de extrato da planta que induziu a mortalidade de 96%. Além disso, verificaram importante atividade letal sobre pupas e adultos, além de efeito repelente e deterrente. Para os autores, o extrato das sementes evidenciou alta bioatividade em todas as doses, enquanto os extratos de folhas foram ativos, somente na dose mais elevada. Por outro lado os extratos da semente suprimiram a atividade pupal e do adulto de *Anopheles stephensi*, mesmo na menor dose.

Ainda com relação à utilização de extratos botânicos de *M. azedarach* em insetos de importância médica, Valladares *et al.* (1999) verificaram os efeitos de extratos etanólicos de folhas, frutos verdes e maduros de *M. azedarach* sobre ovos e ninfas de *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), um dos vetores do *Trypanosoma cruzi*.

Wandscheer *et al.* (2004) avaliaram o efeito tóxico de extratos de sementes dos frutos maduros de *M. azedarach* em larvas de *Aedes aegypti* cepa Rockefeller, e obtiveram concentrações letais de CL_{50} : 0,166%, CL_{90} : 0,604% e CL_{99} : 1,03%, respectivamente. Parte dos resultados obtidos no presente estudo foi similar aos apresentados por esses autores. Entretanto, é importante observar que os mesmos utilizaram apenas as sementes dos frutos maduros. A utilização integral dos frutos, como em nosso estudo, proporciona uma melhor valorização da parte botânica utilizada, aumentando o potencial para uso da planta no controle de larvas de mosquitos.

A confirmação do efeito larvicida de frutos verdes e maduros de *M. azedarach* em *A. aegypti*, assim como de outras espécies de plantas inseticidas, é de grande importância para o desenvolvimento de larvicidas naturais.

Tabela 1. Susceptibilidade de larvas (3° e 4° estádios) de *A. aegypti* (Cepa: GCZ) em 24 e 48h, após exposição aos extratos etanólicos de frutos verdes e maduros de *Melia azedarach*.

Extratos	Período	Estádio	Nº de larvas	CL ₅₀ (%) (limites)	CL ₉₀ (%) (limites)	CL ₉₅ (%) (limites)	Coefficiente Angular ± E.P.	χ^2	Grau de liberdade
Frutos verdes	24h	3°	600	0,14 (0,12-0,16)	0,57 (0,45-0,79)	0,85 (0,64-1,27)	2,11 ± 0,20	2,84	2
		4°	600	0,20 (0,17-0,23)	0,50 (0,44-0,59)	0,65 (0,56-0,78)	3,30 ± 0,27	1,64	2
	48h	3°	600	0,08 (0,06-0,09)	0,31 (0,25-0,41)	0,46 (0,36-0,66)	2,15 ± 0,22	4,85	2
		4°	600	0,18 (0,15-0,21)	0,43 (0,37-0,50)	0,55 (0,47-1,10)	3,44 ± 0,26	0,45	2
Frutos maduros	24h	3°	600	0,09 (0,07-0,11)	0,28 (0,24-0,35)	0,39 (0,32-0,50)	2,65 ± 0,21	5,11	2
		4°	600	0,07 (0,06-0,08)	0,13 (0,11-0,16)	0,16 (0,13-0,20)	4,71 ± 0,48	1,30	1
	48h	3°	600	0,05 (0,04-0,05)	0,10 (0,09-0,12)	0,12 (0,10-0,15)	4,28 ± 0,39	2,10	1
		4°	600	0,05 (0,04-0,06)	0,11 (0,10-0,14)	0,14 (0,12-0,18)	3,86 ± 0,35	0,16	1

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro ao projeto, processo 501527/03-6, e às bolsas de iniciação científica processos: 100569/04-8 (NV) e 100568/04-1 (NV).

Literatura Citada

- Brunherotto, R. & J.D. Vendramim. 2001. Bioatividade de extratos aquosos de *Melia azedarach* L. sobre o desenvolvimento de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em Tomateiro. Neotrop. Entomol. 30: 455-459.
- Duque, J.E.L., M.F. Martins, A.F. Anjos, E.F. Kuwabara & M.A. Navarro-Silva. 2004. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. Rev. Saúde Pública. 38: 842-843.
- Finney, D.J. 1971. Probit analysis. Cambridge (UK), Cambridge University Press, 333 p.
- Joly, A.B. 1985. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. 7. ed. São Paulo, Ed. Nacional, 777 p.
- Lima, J.B., P.M. Da-Cunha, R.C. da Silva, A.K. 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. 68:329-33.
- Marcoris, M.L., M.T. Andrighetti, L. Takuku, C.M. Glasser, V.C. Garbeloto & J.E. Bracco. 2003. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of Sao Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 98:703-708.
- Martinez, S S. 2002. O Nim - *Azadirachta indica* - Natureza, Usos Múltiplos, Produção. Londrina, IAPAR, 142 p.
- Nardo, E.A.B.D., A.S. Costa & A.L. Lourenção. 1997. *Melia azedarach* extracts as an antifeedant to *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). Florida Entomol. 80: 92-94.
- Nathan, S.S., G. Savitha, D.K. George, A. Narmadha, L. Suganya & P.G. Chung. 2005. Efficacy of *Melia azedarach* L. extract on the malarial vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). Bioresour. Technol. 97: 1316 – 1323.
- Pinheiro, V.C. & W.P. Tadei. 2002. Evaluation of the residual effect of temephos on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae in artificial containers in Manaus, Amazonas State, Brazil. Cad. Saúde Pública. 18:1529-1536.
- Roel, A.R. 2001. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. Revista Internacional de Desenvolvimento Local. 1: 43-50.
- Salles, L.A. & N.L. Rech. 1999. Efeito de extratos de nim (*Azadirachta indica*) e cinamomo (*Melia azedarach*) sobre *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). Rev. Bras. Agrocência. 5: 225-227.
- Souza, A.P. & J.D. Vendramim. 2001. Atividade inseticida de extratos aquosos de meliáceas sobre a mosca branca *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). Neotropical Entomol. 30: 133-137.
- Valladares, G.R., D. Ferreyra, M.T. Defago, M.C. Carpinella & S. Palácios. 1999. Effects of *Melia azedarach* on *Triatoma infestans*. Fitoterapia. 70: 421-424.
- Wandscheer, C.B., J.E.L. Duque, M.A. Navarro-Silva, Y. Fukuyama, J.L. Wohlke, J. Adelmann & 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: 829-35.
- WHO – World Health Organization, 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Geneva: World Health Organization, WHO/VBC/81.807.
- WHO – World Health Organization. 1997a. Vector Control: methods for use by individuals and communities. Geneva WHO.
- WHO – World Health Organization. 1997b. Dengue haemorrhagic fever: Diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva WHO.