



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO  
TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS

SANDRA MARIA DE TORRES

**AVALIAÇÃO ESTRUTURAL E ULTRAESTRUTURAL DE  
LARVAS E ADULTOS DE *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762)  
(DIPTERA: CULICIDAE) SUBMETIDOS A TRATAMENTO  
COM PRODUTO FORMULADO DE ÓLEOS DE *Azadirachta  
indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* E  
EXTRATO FERMENTADO DE *Carica papaya*.**

Recife  
2014

**SANDRA MARIA DE TORRES**

**AVALIAÇÃO ESTRUTURAL E ULTRAESTRUTURAL DE  
LARVAS E ADULTOS DE *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762)  
(DIPTERA: CULICIDAE) SUBMETIDOS A TRATAMENTO  
COM PRODUTO FORMULADO DE ÓLEOS DE *Azadirachta  
indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* E  
EXTRATO FERMENTADO BACTERIANO DE *Carica papaya*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em  
Medicamentos da Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, como requisito parcial para  
obtenção do grau de doutor em Desenvolvimento  
e Inovação Tecnológica em Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva  
Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Lêucio Câmara Alves

**RECIFE**

**2014**

Ficha catalográfica

T693a Torres, Sandra Maria de  
Avaliação estrutural e ultraestrutural de larvas e adultos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) submetidos a tratamento com produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado bacteriano de *Carica papaya*/ Sandra Maria de Torres. – Recife, 2014.  
75 f. : il.

Orientador: Valdemiro Amaro da Silva Júnior.  
Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2014.  
Referências.

1. Ensaio larvicida 2. Teste de repelência 3. Ensaio inseticida 4. Histologia de *Aedes aegypti* 5. Microscopia Eletrônica de Varredura I. Silva Júnior, Valdemiro Amaro da, orientador II. Título

CDD 591.4





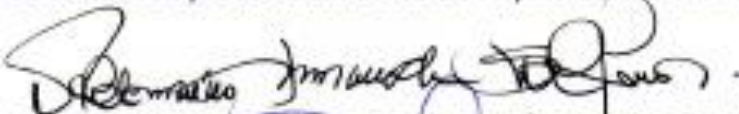
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO  
TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS

AVALIAÇÃO ESTRUTURAL E ULTRAESTRUTURAL DE LARVAS E ADULTOS DE *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE) SUBMETIDOS A TRATAMENTO COM PRODUTO FORMULADO DE ÓLEOS DE *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* E EXTRATO FERMENTADO BACTERIANO DE *Carica papaya*.

Tese elaborada e defendida por:

**SANDRA MARIA DE TORRES**


Tese defendida e aprovada em 27/02/2014 pela banca examinadora:

  
Prof. Dr. VALDEIRO AMARO DA SILVA JÚNIOR - UFRPE/RECIFE  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal/Histologia

  
Prof. Dr. LEUCIO CÂMARA ALVES – UFRPE/RECIFE  
Departamento de Medicina Veterinária/ Doenças Parasitárias

  
Prof. Dr. CLAUDIO AUGUSTO GOMES DA CAMARA – UFRPE/RECIFE  
Departamento de Ciências Moleculares/ Tecnologias Ambientais e Energéticas

  
Profa. Dra. GÍLCIA APARECIDA DE CARVALHO SILVA – UFRPE  
Unidade Acadêmica de Garanhuns

  
Profa. Dra. MÂRCIA PAULA OLIVEIRA FARIAS – UFPI  
Campus Cinobelina Evans

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus** pela sua misericórdia em minha vida, pois sem Ele não teria chegado até aqui.

Aos meus pais **Santina Maria de Tôrres e Antonio José de Tôrres**, meu irmão **Carlos Antonio de Tôrres**, pelo exemplo de vida, pela educação, confiança, carinho, paciência e amor que me dedicaram e que mesmo distantes estiveram sempre presentes.

Ao meu noivo **Danillo Gonçalves Beltrão da Silva** pela dedicação, paciência, compreensão, companherismo, apoio, carinho e amor.

Ao meu orientador Prof<sup>o</sup>. **Valdemiro Amaro da Silva Júnior**, pela amizade, oportunidade da orientação e confiança em mim depositada.

Ao meu coorientador Prof<sup>o</sup>. **Lêucio Câmara Alves** por acreditar no meu potencial me resgatando de volta a pesquisa. Agradeço também pela oportunidade de ter trabalhado com o senhor, pelos ensinamentos e disposição em sempre me ajudar e orientar, pelo carinho e amizade.

Aos amigos conquistados no laboratório de Doenças Parastárias: **Nadine Cruz, Maria Inês de Assis, Gláucia Nascimento, Márcia Paula de Carvalho, Neurisvan Guerra, Hévila Sandes, Rafael Ramos, Edna Michele e Francine França**, pelos inesquecíveis momentos que tivemos e, pelas amizades sinceras construídas.

A minha grande amiga **Luciana Ghinato** agradeço-te por todo o carinho e amizade.

Ao meu grande amigo **Luis André Rodrigues de Lima** pelo respeito e amizade de vários anos, pela disposição em sempre me ajudar a qualquer momento e circunstância. A você meu respeito, gratidão, amizade e carinho.

A minha amiga **Simone Regina Barros** pelo companherismo, carinho e amizade sincera. A **Eulina Teresa Nery Farias** pela ajuda, amizade e carinho.

A Professora **Dra. Maria do Carmo Alves de Lima (Nena)**, do Laboratório de Inovação Terapêutica do Departamento de Antibiótico da Universidade Federal de Pernambuco pela colaboração na elaboração do extrato bruto da *Azadirachta indica*.

Ao professor **Frederico Celso Lyra Maia** pelos ensinamentos, amizade e carinho.

A prof<sup>a</sup>. **Gilcia Aparecida de Carvalho Silva** pelo apoio científico, amizade e ajuda; ao senhor **Marcos Guedes** pela doação do produto testado.

Ao senhor **Renato da empresa Multiave Saude Ambiental** pela doação do larvicida comercial BTI.

A todos os **amigos e familiares** de Caruaru e Boas Novas (Bezerros – PE), em especial a minha **madrinha Dapaz Maria da Silva, Denise Maria Ferreira, meus tios Antônio Aureliano da Silva, João Aureliano da Silva, José Aureliano da Silva e Severino Aureliano da Silva (in memorian) e Enedina Maria da Silva** pela força, amizade e confiança.

Agradeço a **Capes** pelo incentivo financeiro.

Agradeço aos meus cães **Bebê, Scoby, Back, Aretha e Asuscena** pelo carinho, amor e companheirismo.

A todas as pessoas que diretamente ou indiretamente contribuíram para esse momento acontecer, meus sinceros agradecimentos.

*Dedico este trabalho aos meus pais  
Santina Maria de Tôrres e  
Antônio José de Tôrres.*



*Tudo posso naquele que me fortalece,  
pois a misericórdia e a graça de  
Deus tudo permite.*

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS, SIGLAS E FÓRMULAS

AchE	Acetilcolinesterase
BTI	<i>Bacillus thuringiensis</i> subespécie <i>israelenses</i>
%	Percentual
±	Mais ou menos
45°	45 Graus
3°	Terceiro
°C	Graus Celsius
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
CN1; CN2	Controle negativo 1; Controle negativo 2
CP1; CP2	Controle positivo 1; Controle positivo 2
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DEET	N,N-dietil-3-metil benzamida
DL <sub>50</sub>	Dose letal para 50%
DL <sub>90</sub>	Dose letal para 90%
ETH	Hormônio estimulador de ecdise
h	Horas
IGR	Inibidor da síntese de quitina
K <sup>+</sup>	Íon potássio
Kg	Quilograma
L1, L2, L3 e L4	Estádios larvais
LDP	Laboratório de Doenças Parasitárias
MDNO	Membrana dos dendritos dos neurônios olfatórios
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
m	Metro
µm	Micrômetro
mg/mL	Miligramas por mililitro
mg/L	Miligramas por litro
mg/cm <sup>2</sup>	Miligrama por centímetro quadrado
µg/mg	Micrôgrama por miligrama
Na <sup>+</sup>	Íon sódio

OsO <sub>4</sub>	Tetróxido de Ósmio
PBS	Tampão fosfato de sódio
ppm	Partes por milhão
ROI	Receptores olfatórios dos insetos
®	Marca registrada
X <sup>2</sup>	Qui-quadrado

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

Tabela 1 – Taxa de mortalidade (%) de larvas de *Aedes aegypti* avaliados durante 24 horas, e submetidos a tratamento com produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado bacteriano de *Carica papaya* em diferentes concentrações.....19

### Capítulo 2

Tabela 2 – Distribuição dos grupos experimentais de larvas de *Aedes aegypti* expostas durante 24h.....27

Tabela 3 – Diâmetro e altura de túbulo de Malpighi (média  $\pm$  desvio) de larvas de *Aedes aegypti* tratadas com produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado bacteriano de *Carica papaya* durante 24h.....34

### Capítulo 4

Tabela 4 – Quantidade de pousos de formas adultas de *Aedes aegypti* durante 4h de observação numa superfície tratada com produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado bacteriano de *Carica papaya* em diferentes concentrações (média  $\pm$  desvio).....48

### Capítulo 5

Tabela 5 – Mortalidade (média  $\pm$  desvio) de adultos de *Aedes aegypti*, avaliados durante 24h, e submetidos a tratamento com produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* em diferentes concentrações.....57

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 2

Figura 1 – Fotomicrografias de intestino médio, túbulo de Malpighi e gânglio nervoso de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* tratadas com produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado bacteriano de *Carica papaya* nas concentrações de 50%, 25% e 12,5%.....33

Figura 2 – Fotomicrografias de intestino, túbulo de Malpighi e gânglio nervoso de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* controle positivo BTI CL<sub>90</sub> 0,37ppm e CL<sub>50</sub> 0,06ppm.....34

Figura 3 – Fotomicrografias de intestino, túbulo de Malpighi e gânglio nervoso de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* controle negativo durante 24 horas de observação.....35

### Capítulo 3

Figura 4 – Eletromicrografia de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* tratadas com produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado bacteriano de *Carica papaya* do grupo G1 e G2.....39

Figura 5 – Eletromicrografia de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* tratadas com produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* do G3.....40

Figura 6 – Eletromicrografia de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* tratadas com BTI CL<sub>90</sub> 0,37ppm (CP1) e CL<sub>50</sub> 0,06ppm (CP2).....41

Figura 7 – Eletromicrografia de larvas de 3º estágio de *A. aegypti* do grupo CN1 e CN2..... 41

### Capítulo 4

Figura 8 – Percentual de repelência dos grupos tratados no tempo zero. ....49

Figura 9 – Percentual de repelência dos grupos tratados nos tempos 2h (cinza escuro) e 4h (cinza claro).....50

### Capítulo 6

Figura 10 – Fotomicrografias de intestino, túbulo de Malpighi (TM) e cérebro de formas adultas de *Aedes aegypti* controle com água, controle com piretróide e tratados com produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado bacteriano de *Carica papaya* em diferentes concentrações e expostos por 24h. ....71

Figura 11 – Eletromicrografia de varredura de formas adultas de *Aedes aegypti*.....73

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	01
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	
2.1	<i>Aedes</i> (STEGOMYIA) <i>aegypti</i> (LINNAEUS, 1762) .....	02
2.2	CONTROLE .....	03
2.2.1	<b>Controle Químico</b> .....	03
2.2.2	<b>Controle através da Repelência</b> .....	05
2.2.3	<b>Controle Biológico</b> .....	06
2.2.3.1	<b>Biolarvicidas</b> .....	06
2.2.4	<b>Controle Fitobotânico</b> .....	07
2.3	TOXICIDADE DE EXTRATO DE PLANTAS SOBRE OS INSETOS ....	10
3	<b>OBJETIVOS</b>	
3.1	GERAL .....	11
3.2	ESPECÍFICOS .....	11
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	12
4	<b>CAPÍTULO 1</b>	
	<b>MORTALITY OF <i>Aedes aegypti</i> LARVAE TREATED WITH COMPOUNDS</b> .....	15
4.1	INTRODUCTION .....	16
4.2	METHODS .....	17
4.3	RESULTS .....	18
4.4	DISCUSSION.....	19
	REFERENCES.. .....	21
5	<b>CAPÍTULO 2</b>	
	<b>ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DE LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> SUBMETIDAS A TRATAMENTO COM PRODUTO FORMULADO DE ÓLEOS DE <i>Azadirachta indica</i>, <i>Melaleuca alternifolia</i>, <i>Carapa guianensis</i> E EXTRATO FERMENTADO BACTERIANO DE <i>Carica papaya</i></b> .....	26
5.1	INTRODUÇÃO .....	27
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	
5.2.1	<b>Obtenção do Produto Formulado</b> .....	27
5.2.2	<b>Ensaio Larvicida</b> .....	27
5.2.3	<b>Análise Estrutural</b> .....	28
5.2.4	<b>Altura e Diâmetro de Túbulo de Malpighi</b> .....	28
5.2.5	<b>Análise Estatística</b> .....	29

5.3	RESULTADOS .....	29
5.4	DISCUSSÃO .....	34
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>36</b>
6	<b>CAPÍTULO 3</b>	
	<b>AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS DE LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> SUBMETIDAS A TRATAMENTO COM PRODUTO FORMULADO. ....</b>	<b>38</b>
6.1	INTRODUÇÃO .....	39
6.2	MATERIAL E MÉTODOS	
6.2.1	<b>Obtenção do Produto Formulado.....</b>	<b>40</b>
6.2.2	<b>Ensaio Larvicida .....</b>	<b>40</b>
6.2.3	<b>Análise Ultraestrutural .....</b>	<b>40</b>
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>45</b>
7	<b>CAPÍTULO 4</b>	
	<b>ATIVIDADE DE REPELÊNCIA DO PRODUTO FORMULADO DE ÓLEOS DE <i>Azadirachta indica</i>, <i>Melaleuca alternifolia</i>, <i>Carapa guianensis</i> E EXTRATO FERMENTADO BACTERIANO DE <i>Carica papaya</i> SOBRE <i>Aedes aegypti</i> (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE). ....</b>	<b>47</b>
7.1	INTRODUÇÃO .....	48
7.2	MATERIAL E MÉTODOS	
7.2.1	<b>Obtenção do Produto Formulado .....</b>	<b>48</b>
7.2.2	<b>Criação das Colônias .....</b>	<b>49</b>
7.2.3	<b>Ensaio de Repelência .....</b>	<b>49</b>
7.2.4	<b>Análise Estatística .....</b>	<b>50</b>
7.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>54</b>
8	<b>CAPÍTULO 5</b>	
	<b>AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO PRODUTO FERMENTADO DE ÓLEOS DE <i>Azadirachta indica</i>, <i>Melaleuca alternifolia</i>, <i>Carapa guianensis</i> E EXTRATO FERMENTADO BACTERIANO DE <i>Carica papaya</i> SOBRE ADULTOS DE <i>Aedes aegypti</i> (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE).....</b>	<b>56</b>
8.1	INTRODUÇÃO .....	57
8.2	MATERIAL E MÉTODOS	

8.2.1	<b>Obtenção do Composto</b> .....	57
8.2.2	<b>Ensaio Adulticida</b> .....	58
8.2.3	<b>Análise Estatística</b> .....	58
8.3	RESULTADOS .....	58
8.4	DISCUSSÃO .....	59
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	61
9	<b>CAPÍTULO 6</b>	
	<b>ESTUDO MORFO-ESTRUTURAL DE ADULTOS DE <i>Aedes aegypti</i> SUBMETIDAS À EXPOSIÇÃO AO PRODUTO FORMULADO DE ÓLEOS DE <i>Azadirachta indica</i>, <i>Melaleuca alternifolia</i>, <i>Carapa guianensis</i> E EXTRATO FERMENTADO BACTERIANO DE <i>Carica papaya</i>.</b> ....	63
9.1	INTRODUÇÃO .....	64
9.2	MATERIAL E MÉTODOS	
9.2.1	<b>Obtenção do Composto</b> .....	64
9.2.2	<b>Ensaio Inseticida</b> .....	65
9.2.3	<b>Análise Estrutural</b> .....	65
9.2.4	<b>Análise Ultraestrutural</b> .....	65
9.3	RESULTADOS .....	66
9.4	DISCUSSÃO .....	70
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	73



## RESUMO

O *Aedes aegypti* pode ser vetor de vários agentes patogênicos e parasitos ao homem e a outros animais, principalmente viroses como a febre amarela e a dengue, entre outras doenças. Este trabalho objetiva avaliar estrutural e ultraestruturalmente larvas e adultos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera) submetidos a tratamento com produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, e *Carapa guianensis* e extrato fermentado bacteriano de *Carica papaya*. A obtenção de larvas e adultos de *A. aegypti* linhagem Liverpool ocorreram a partir de colônias já existente no insetário do Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos da UFRPE, Recife-PE. Para os ensaios larvicidas foram utilizadas larvas de 3º estágio expostas por 24h aos seguintes grupos experimentais: tratados com produto formulado de óleos e extrato fermentado bacteriano nas concentrações de 50% (G1), 25% (G2) e 12,5% (G3), controle positivo com larvicida industrial *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelenses* (BTI) CL<sub>90</sub> 0,37ppm (CP1) e CL<sub>50</sub> 0,06ppm (CP2), controle negativo com água de clorada (CN1) e controle com dimetil sulfóxido (CN2). Ao final do período experimental, foram coletadas amostras de todos os grupos para análise em microscopia óptica e eletrônica de varredura. O ensaio de repelência foi realizado utilizando fêmeas de até uma semana de idade com voluntários humanos, os quais expuseram uma área de 2cm<sup>2</sup> durante 4h tratadas de acordo com os grupos experimentais: tratado com produto formulado de óleos e extrato fermentado nas concentrações de 100% (C1), 50% (C2) e 25% (C3), controle positivo com N,N-Diethyl-meta-toluamide (DEET) (CP) e controle negativo com água destilada (CN). Os adultos foram expostos por até 24h aos diferentes grupos: tratado com produto formulado nas concentrações de 100% (G1), 50% (G2), 25% (G3) e 12,5% (G4), controle positivo com piretróide (CP) e controle negativo com água destilada (CN). Ao final do período experimental foram coletadas amostras para análise em microscopia óptica e eletrônica de varredura. As larvas tratadas dos grupos G1, G2 e G3 tiveram mortalidade de 83, 81 e 100% respectivamente ao final das 24h. A exposição ao produto formulado causou lesões observadas na microscopia óptica, sendo os maiores danos às estruturas do mesêntero, túbulos de Malpighi e gânglios nervosos encontrados nos grupos G2 e G3. Na microscopia eletrônica de varredura foram observadas as maiores lesões na cutícula das larvas no G3 com enrugamento do tegumento, ruptura de céfalo-tórax e exposição da musculatura subjacente. Como repelente o C2 teve 75% de atividade no tempo inicial. No ensaio adulticida obteve-se nos grupos G1, G2, G3 e G4 mortalidade de 81%, 76%, 89% e

78% ao final das 24h respectivamente. Na avaliação tecidual dos mosquitos expostos aos produtos formulados constatou-se necrose multifocal das células intestinais, necrose e degeneração de células principais do túbulo de Malpighi. Nos gânglios nervosos e cérebro se constatou vacuolização dos neurônios da região medular. Na região cortical, degeneração e necrose foram os achados mais frequentes. A microscopia eletrônica de varredura demonstrou perda de patas e cerdas abdominais nos mosquitos tratados com produto formulado. Portanto, o produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e o extrato fermentado de *Carica papaya* pode ser um método alternativo para o controle de larvas e adultos de *Aedes aegypti* linhagem Liverpool devido os efeitos tóxicos teciduais e indutor da morte.

**Palavras-Chave:** Ensaio larvicida; Teste de repelência; Histologia de *Aedes aegypti*; Microscopia Eletrônica de Varredura.

## ABSTRACT

The *Aedes aegypti* can be the vector of various pathogens to humans and other animals, especially viruses such as yellow fever and dengue, among other diseases. This work aims to evaluate structural and ultrastructural *Aedes aegypti* var. Liverpool (Linnaeus, 1762) (Diptera) larvae and adults submitted to treatment with compound oils of *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, and *Carapa guianensis* and fermented extract of *Carica papaya*. The larvae and adults of *A. aegypti* were obtained from insectary belongs to Laboratory of Parasitic Diseases of Domestic Animals UFRPE, Recife-PE. The larvicide assay was made along to 24h of the third stage larvae exposition. The following experimental groups were formed: treated with compound of essential oils and fermented extract at concentrations of 50% (G1), 25% (G2) and 12.5% (G3) positive control with industrial larvicide *Bacillus thuringiensis* subspecies Israeli (BTI) LC90 0.37 ppm (CP1) and LC50 0.06 ppm (CP2), negative control with dechlorinated water (CN1) and control with dimethyl sulfoxide (CN2). At the end of the experimental period, samples from all groups were collected for analysis by optical and scanning electron microscopy. The repellency assay was done using *A. aegypti* adults female in human volunteers with exposition area of 2cm<sup>2</sup> during 4h. The experimental groups were composed as follow: treated with compound of essential oils and fermented extract at concentrations of 100% (C1) 50% (C2) and 25% (C3), positive control with N, N-Diethyl-meta-toluamide (DEET) (PC) and negative control with distilled water (CN). The adults were submitted along to 24h to different treatments with essential oils compound at concentrations of 100% (G1), 50% (G2), 25% (G3) and 12.5% (G4). The positive was done with control pyrethroid (CP) and distilled water was the negative control (NC). At the end of experimental period, the samples were collected and analyzed by optical and scanning electron microscopy. Larvae submitted to G1, G2 and G3 treatment had a mortality rate of 83, 81 and 100% respectively, at the end of 24h. The essential oils and fermented extract exposition at concentrations 50% (G2) and 25% (G3) caused damage in the midgut, Malpighi tubules and nerve ganglia found. The larvae showed tegument shrinkaged, cephalothorax rupture and muscle cells exposition when submitted to G3 treatment and evaluated by scanning electron microscopy. In the repellency assay, the C2 had 75% of activity after application on the skin. The assay against adult form of *Aedes aegypti* var. Liverpool test obtained mortality of the 81%, 76%, 89% and 78% at

the end of 24 hours to G1, G2, G3 and G4, respectively. The tissue evaluation of mosquitoes exposed to the compounds found multifocal necrosis of the intestinal cells, necrosis and degeneration of principal cells of the Malpighian tubule. The brain and nerve ganglia had vacuolation of neurons in the medullary region. Nevertheless, degeneration and necrosis were the most frequent findings in the cortical region. The scanning electron microscopy showed loss of legs and abdominal hair on the mosquitoes treated with essential oil compound. Therefore, the compound of the essential oils of *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* and fermented *Carica papaya* extract may be an alternative method for controlling larval and adult forms of *Aedes aegypti* variety Liverpool because the tissue inducing toxic effects and death.

**Keywords:** Test larvicidal; Repellent test; Histology of *Aedes aegypti*; Scanning Electron Microscopy.

## 1 INTRODUÇÃO

O *Aedes aegypti* é um mosquito cosmopolita pertencente ao filo Artropoda, classe Insecta, ordem Diptera, subordem Nematocera, família Culicidae e subfamília Culicinae, o qual possui distribuição geográfica entre os paralelos de 45° de latitude norte e 40° latitude sul (GADELHA e TODA, 1985). Seus hábitos estão relacionados com a atividade humana e a outros fatores como topografia regional, umidade, temperatura e altitude (GADELHA e TODA, 1985; CONSOLI e OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

Machos e fêmeas do *A. aegypti* possuem hábitos diurnos, porém as fêmeas realizam o repasto sanguíneo a qualquer horário do dia ou da noite, em locais bem iluminados, provocando grande desconforto ao hospedeiro devido à picada (FORATTINI, 2002).

O *A. aegypti* pode ser o vetor de vários agentes patogênicos ao homem e a outros animais, principalmente viroses como a febre amarela e dengue, além de filaríoses entre outras doenças (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; LOZOVEI, 2001; FORATTINI, 2002).

No Brasil, o *A. aegypti* é encontrado em ambientes domiciliares e peridomiciliares, tendo os grandes centros urbanos a maior colonização devido a presença de muitos criadouros artificiais produzidos pelas populações humanas (TAVEIRA et al., 2001; NATAL, 2002; MENDONÇA et al., 2005).

Várias metodologias têm sido adotadas para controle de vetores com a utilização de inseticidas de origem orgânica ou inorgânica (ROSE, 2001; MACORIS, 2007), porém não tem tido muito sucesso, devido ao aparecimento de populações resistentes (ADEGAS et al., 2005; SPENASSATTO, 2011).

Os inseticidas naturais tem sido uma alternativa, pois possuem vantagens em relação aos químicos sintéticos por serem obtidos facilmente de recursos renováveis, rapidamente degradados, não deixam resíduo em alimentos ou meio ambiente (ROEL, 2001), além de possuírem diversos efeitos, tais como: atraentes, repelentes, estimulantes, fago-inibidores, quimioesterilizantes e inseticidas (CONTE et al., 2002).

Portanto, este trabalho objetiva avaliar estrutural e ultraestruturalmente larvas e adultos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) submetidos a tratamento com produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Aedes (STEGOMYIA) aegypti* (LINNAEUS, 1762)

O *Aedes aegypti* chegou nas Américas e no Brasil através dos navios negreiros originários da África na época da colonização, sendo uma espécie altamente antropofílica adaptando-se rapidamente ao ambiente urbano (BARRETO e TEIXEIRA, 2008).

*Aedes aegypti* depende de condições favoráveis ao seu desenvolvimento, tais como temperatura entre 26° e 28°C, umidade relativa do ar entre 70% e 80%, disponibilidade de alimento carboidratos e sangue, controle de luminosidade e densidade populacional do criadouro (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994; HONORIO, 1999). O ciclo biológico completo do *A. aegypti* pode variar entre 10 e 15 dias e possui as fases: ovo, larva, pupa e adulto.

Os ovos são alongados, fusiformes e depositados pela fêmea nas paredes internas dos criadouros (tonéis, pneus, vasos de plantas, lagos artificiais, latas) próximos à superfície da água. Em condições favoráveis de temperatura e umidade, sua eclosão ocorre em dois a três dias após a postura. Sem o contato com a água, podem resistir a longos períodos de dessecação (ate 450 dias) (GUBLER, 2002; FARNESI et al., 2009).

Em condições ambientais favoráveis o desenvolvimento embrionário completo ocorre entre 48 e 72 horas após a ovoposição. Mantidas as condições propícias há a eclosão e liberação das larvas de 1º estágio. No entanto, se em ambiente impróprio ao seu desenvolvimento os ovos entram em dormência por períodos prolongados permanecendo viáveis e resistentes por até um ano (LAURENTINO, 2003).

As larvas possuem fase obrigatoriamente aquática com corpo vermiforme e quatro estádios evolutivos (L1, L2, L3 e L4). Na fase larval ocorre o crescimento e a alimentação oriunda de material orgânico degradado ou microrganismos contidos nas paredes e no fundo dos criadouros. Em L4 cessa a alimentação em decorrência da metamorfose para a fase de pupa. Em condições favoráveis, seu desenvolvimento larval completo se dá entre 5 e 10 dias (DEGALLIER e SÁ FILHO, 2000; FORATTINI, 2002).

As pupas são aquáticas, não requerem alimentação, apenas respiram. Neste período ocorre a metamorfose completa e a emergência do adulto com a saída da vida aquática para o meio terrestre. Este estágio dura cerca de 2 a 3 dias (DEGALLIER e SÁ FILHO, 2000).

Os adultos vivem em média 45 dias e possuem as seguintes características: são macrópteros (possuem grandes asas), delicados, com corpo afiliado, probóscide,

antenas e apêndices compridos e escamas recobrimdo quase totalmente o corpo. A fase adulta representa o ciclo reprodutivo do inseto, onde ocorre a dispersão. Machos e fêmeas realizam repasto açucarado, mas apenas as fêmeas são hematófagas. Este repasto sanguíneo é estimulado pela cópula entre os adultos e tem por finalidade promover a maturação dos ovócitos para colocação de ovos férteis (SPENASSATTO, 2011). O repasto completo poderá ser alcançado com a ingestão de 3,0 a 3,5mg de sangue, isto resulta numa postura com cerca de 120 ovos por fêmea (NATAL, 2002; FORATTINI, 2002; HARBACH, 2007).

## 2.2 CONTROLE

A organização mundial de saúde estabelece que várias estratégias devam ser aplicadas no controle do *A. aegypti*, tais como a utilização de produtos químicos e biológicos, integradas a programas de manejo ambiental (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

Os larvicidas químicos ou biológicos podem ter uma variedade de formulação ativa como o Temefós, *Bacillus thuringiensis* variedade *israelenses* (BTI) e os reguladores do crescimento de insetos (IGR) são recomendados para uso no controle do *Aedes aegypti* (THAVARA et al., 2004).

### 2.2.1 Controle Químico

As principais substâncias utilizadas no controle de insetos adultos são chamadas de inseticidas, mas quando são destinadas a atingir formas larvais dá-se o nome de larvicidas (FORATTINI, 2002).

O controle integrado dos insetos vetores possui algumas restrições devido ao uso desses produtos contribuírem para a poluição ambiental e uma relativa toxicidade ao ser humano. No entanto, seu uso não deixa de ser considerado e dentre os grupos químicos mais usados há os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (CARVALHO e SILVA, 2000; FORATTINI, 2002).

Os produtos químicos utilizados no controle de larvas possuem vários mecanismos de ação, tais como, ação asfixiante por obstrução dos espiráculos, de contato que atravessam a superfície corporal ou penetram o corpo através do sistema respiratório, intestinal, ingeridos pelas larvas e absorvidas no sistema digestório, inibidores do crescimento, onde se observa a interferência nas ecdises ou comprometem a formação de quitina (FORATTINI, 2002).

Os inseticidas comumente utilizados no Brasil pertencem aos grupos dos piretróides e organofosforados (FUNASA, 2001).

Os inseticidas organofosforados (OF) contêm fósforo e são amplamente utilizados em Programas de Saúde Pública por terem muitas vantagens frente aos organoclorados, assim como serem biodegradáveis e não se acumularem nos tecidos. No entanto, a principal desvantagem é a instabilidade química que obriga a renovação periódica de aplicação (BRAGA, 2007).

O mecanismo de ação dos OF se dá através da inibição da colinesterase na sua junção neuromuscular, causando um estado de paralisia no inseto seguido de uma morte lenta (FUNASA, 2001).

O efeito residual não é o único parâmetro a ser analisado na escolha de um inseticida, mas também o seu espectro de ação, estabilidade em condições externas, compatibilidade com outras estratégias de controle e o seu efeito tóxico para humanos e outros animais (HOFFMANN e LORENZ, 1998).

O temefós<sup>1</sup> é um produto comercial a base de organofosforado, o qual foi amplamente utilizado pela FUNASA no controle de larvas e conseqüentemente a isto, provocou a seleção de uma população resistente nos insetos alvo (TITO, 2010). Estudos comparativos entre o larvicida Abate e o Inibidor da Síntese de Quitina (IGR) análogo ao hormônio juvenil<sup>2</sup> realizados por Soares et al (1996), mostram que o IGR possui um menor efeito residual e logo haveria a necessidade de encurtar os ciclos de tratamento no controle do *Aedes aegypti*.

O modo de ação dos inseticidas inclui respostas anatômica, física, bioquímica e fisiológica do organismo ao agente químico administrado. Todos os inseticidas bloqueiam processos metabólicos nos insetos, porém isto acontece de diferentes maneiras, segundo os diversos agentes químicos. Os inseticidas mais utilizados agem sobre o sistema nervoso, muscular e respiratório (PEDIGO, 1989).

Os organoclorados possuem em sua constituição cloro e são classificados em quatro grupos: difenil-alifáticos; hexaclorociclohexanos; ciclodienos; e policloroterpenos. Esses atuam nos canais de sódio e nas membranas dos axônios mantendo-o aberto e destruindo o equilíbrio de íons sódio e potássio dos axônios, impedindo, assim, a transmissão normal de impulsos nervosos em insetos e mamíferos. Seu mecanismo de ação é inversamente proporcional à temperatura, pois quanto mais baixo mais tóxico é o Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT) para os insetos (D'AMANTO *et al.* 2002; BRAGA, 2007).

---

<sup>1</sup> Abate® 500E – BASF S.A.

<sup>2</sup> Altosid® 0,1% IGR – EUA, WELLMARK INTERNATIONAL



Uma grande desvantagem que levou a descontinuidade do uso dos organoclorados nos programas de controle de insetos e até a proibição em alguns países é o efeito acumulativo nos tecidos de animais e humanos, e a persistência no meio ambiente (BRAGA, 2007).

Os piretróides sintéticos derivam da substância natural piretro extraído de crisântemos. São bastante estáveis, muito ativos, não cumulativos e raramente provocam toxicidade aguda para aves e mamífero (BEGUM, 2005). No entanto, podem causar reações de hipersensibilidade e irritação nas mucosas destes animais, além de serem extremamente tóxicos para animais aquáticos (OSTI et al., 2007). Por ser produzida em laboratório, a única desvantagem deste inseticida é o alto custo de produção (BRAGA et al., 2007).

O modo de ação dos piretróides é similar ao do DDT (BRAGA et al., 2007; GARCIA NETO, 2011). Atuam, aparentemente, mantendo abertos os canais de sódio das membranas dos neurônios. Alguns exemplos são: ciflutrina, deltametrina, esfenvalerato, fenpropatrina, flucitrinato, fluvalinato, praletrina, tauflualinato, teflutrina e tralometrina (BRAGA et al, 2007).

## **2.2.2 Controle através da Repelência**

O homem tem buscado meios de repelir e evitar a picada de insetos hematófagos desde épocas remotas (OLIVEIRA, 2008). Os primeiros métodos consistiam na utilização de fumaça, cobrir a pele com lama e substância aromáticas (PETERSON e COATS, 2001; NENTWING, 2003).

O termo repelência é definido como um princípio químico, na fase de vapor, o qual age sobre mosquitos inibindo o comportamento de busca do hospedeiro. Na presença da substância repelente o inseto precisa deixar ou evitar a superfície tratada ou pelo menos se mover para fora da concentração do vapor repelente (CHOU et al., 1997).

Brown e Herbert (1997) consideram o repelente ideal aquele que apresentar as seguintes características: possuir tempo prolongado de ação; ser eficaz frente a diversas espécies de artrópodes; volatilidade suficiente para manter ótima a concentração no ar próximo a pele, não permitindo que sua substância volátil dissipe em pouco tempo; não causar irritação da pele, membranas mucosas ou apresentar toxicidade sistêmica; possuir odor agradável e/ou ser inodoro, além de não causar danos as roupas (PADILHA, 2002).

Em muitas circunstâncias a aplicação de repelentes na pele, pode ser a única alternativa para evitar picadas de insetos. Tendo em vista que uma única picada por

mosquito infectado pode resultar em transmissão de doença, é importante escolher um repelente que seja eficiente e preferencialmente possua efeito duradouro (FRADIN e DAY, 2002).

Os repelentes podem ser divididos em três categorias: os óleos derivados de plantas, as substâncias químicas sintéticas. Dentre os derivados de plantas, podemos citar: óleo de citronela, andiroba e os piretróides, além daqueles que associam substâncias sintéticas e naturais (GARCIA, 2005; TUETUN et al., 2005).

Os produtos sintéticos com atividade repelente mais comuns são indalona, dimetilftalato, hexanodiol e o N,N-dietil-3-metilbenzamida (DEET). O DEET é uma substância orgânica líquida, volátil sob pressão normal e à temperatura ambiente, sendo praticamente insolúvel em água, embora solúvel em solventes orgânicos (GRYBOSKI WEINSTEIN e ORDWAY, 1961; MILLER, 1982). No entanto, ele possui eficácia comprovada, sendo usada em formulações comerciais em concentrações que variam de 7,0 a 50,0% do ativo (MIRANDA, 2005). Embora esteja presente no mercado a mais de 40 anos, o DEET, pode causar efeitos tóxicos, principalmente em crianças e gestantes. Estudos relatam casos de encefalopatias relacionados ao uso do DEET, principalmente em crianças (THAVARA et al., 2001).

### 2.2.3 Controle Biológico

O controle biológico é baseado na utilização de inimigos naturais do vetor como agentes de controle, resultando na redução da proliferação de formas imaturas aquáticas e do mosquito adulto (OPAS, 1995).

#### 2.2.3.1 Biolarvicidas

As larvas do *A. aegypti* podem ser controladas através do uso de biolarvicida. Este controle pode ser realizado por bactérias entomopatogênicas e seus produtos metabólicos (LIMA, 2002).

As principais bactérias entomopatogênicas pertencem às famílias Bacillaceae, Paenibacillaceae, Streptococaceae e Achromobacteriaceae. Dentre elas destacam-se aquelas pertencentes à ordem Bacillales, mais especificamente ao gênero *Bacillus* (ARONSON et al., 1986).

O *Bacillus thuringiensis* (BT) é uma bactéria gram positiva, aeróbica facultativa, cosmopolita, esporulante e formadora de inclusões cristalinas. Algumas cepas de Bt além de produzirem a toxina do cristal (deltaendotoxina) produzem também exotoxinas ( $\beta$ -exotoxinas) que possuem amplo espectro de ação contra os insetos. No entanto, a

$\beta$ -exotoxina tem efeito tóxico para vertebrados, sendo assim, os biolarvicidas são obtidos de cepas que não produzem tal toxina (POLANCZYK e ALVES, 2003).

O *B. thuringiensis*, juntamente com o *B. sphaericus*, são os mais importantes entomopatógenos do ponto de vista científico e industrial devido a um conjunto de características desejáveis, que ambos apresentam. Os *B. thuringiensis* destacam-se por sua importância como biolarvicidas algumas sorovariedades como a *israelensis*, *tenebrionis* e *kurstaki*. A primeira com importante aplicação na saúde pública frente a insetos da Ordem Diptera como o *A. aegypti* e o *Simulium pertinax* (BELTRAO, 2006).

A toxina do *B. thuringiensis* variedade *israelenses* (BTI) tem sido uma alternativa aos inseticidas químicos, sendo este agente biológico mais utilizado no controle de larvas de *A. aegypti*. No entanto, o seu uso favorece a seleção de populações resistentes (PARIS et al., 2011).

A atividade tóxica do BTI inicia com a ingestão das inclusões cristalinas pelas larvas de Culicídeos e Simuliídeos. Após a ingestão, as proteínas que se encontravam insolúveis e presas umas às outras formando o cristal são solubilizadas no mesêntero dos insetos-alvo em pH alcalino próximo a 10. Em seguida, as protoxinas são ativadas (polipeptídeos tóxicos) por enzimas proteolíticas e liberadas no intestino das larvas, onde causam a lise celular e eventual ruptura e desintegração das células do intestino médio (KNOWLES e ELLAR, 1987; ARONSON e SHAI, 2001).

#### 2.2.4 Controle Fitobotânico

Os produtos Bioativos tem sido uma alternativa promissora no controle de vetores. Além de possuírem efeito inseticida os produtos de origem botânica possuem uma enorme diversidade de compostos ativos que poderiam ser empregados em sinegismo para atrair, desalojar ou repelir, sendo dirigido ao controle e monitoramento populações de mosquitos (ISMAN, 2006; NAVARRO-SILVA et al., 2009).

As plantas da família das Meliaceas possuem compostos comprovadamente inseticidas, antialimentares e reguladores do crescimento (NAKATANI et al., 2004).

As plantas com atividade biológica são as principais fontes de novos compostos químicos utilizados no desenvolvimento de moléculas com potencial para interações com sistemas biológicos (MACIAS et al., 2008). Visto que, os inseticidas naturais possuem vantagens em relação aos sintéticos por serem obtidos facilmente de recursos renováveis, rapidamente degradados, não deixam resíduos em alimentos ou meio ambiente. Porém estes compostos precisam ser viáveis economicamente para serem produzidos em grande escala, ter seletividade contra inimigos naturais, baixa e

nenhuma toxicidade para mamíferos, ser biodegradável e não fitotóxico (VIEIRA et al., 2001; VIEIRA-JUNIOR, 2003).

O mecanismo de ação das plantas sobre os insetos pode ocorrer de diversas formas desde repelência, inibição de ovoposição e da alimentação, alterações no sistema hormonal, até distúrbios do desenvolvimento, deformações, infertilidade e mortalidade em diferentes fases do desenvolvimento. O tempo de ação e a extensão do efeito dependem da dose empregada, de modo que a mortalidade é promovida por altas dosagens e os efeitos menos intensos, porém mais duradouros ocorrem nas doses mais baixas (ROEL, 2001).

O nim (*Azadirachta indica*) é uma árvore frondosa pertencente à família Meliaceae, o qual possui vários compostos com ação inseticida, nematicida, repelente, antialimentares, reguladores do crescimento, eficiência em baixa concentração e baixa toxicidade para mamíferos (GALLO et al., 2002; NAKATANI et al., 2004).

A *A. indica* contém em suas sementes o principal composto da planta a azadiractina, um limonóide que age sobre o funcionamento das glândulas endócrinas controladoras da metamorfose nos insetos, além da propriedade fagoinibidora (VIEGAS-JUNIOR, 2003; NEVES, 2004).

A *Carapa guianensis* (andiroba) também pertence à família das Meliaceae e por suas características fitobotânicas pode ser considerado um pesticida (MULLA e SU, 1999). O óleo essencial da andiroba tem sido utilizado como um potente repelente de insetos (GILBEERT et al., 1999), sendo sua atividade inseticida atribuída a presença dos limonóides que representam apenas 2 a 5% da sua constituição: andirobina, epoxiazadiradiona, 6 $\alpha$ -acetoxiepoxiazadiradiona, 6 $\alpha$ -acetoxigedunina, 6 $\beta$ -acetoxigedunina, 11 $\beta$ -acetoxigedunina, 6 $\alpha$ ,11 $\beta$ -diacetoxigedunina, 6 $\beta$ ,11 $\beta$ -diacetoxigedunina, 6 $\alpha$ -hidroxigedunina e 7-desacetoxi-7-oxogedunina (DANTAS et al., 2000).

Estudos realizados por Silva et al. (2004) utilizando o óleo essencial da *C. guianensis* verificaram a sua ação larvicida sobre larvas de 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> estádios de *Aedes albopictus* e sobre os mesmos estádios larvais para os mosquitos *Culex* (EMERICK et al., 2005) e *Aedes aegypti* (ROSSI et al., 2005).

O gênero *Melaleuca* possui aproximadamente 150 espécies, dentre as quais várias possuem alto valor comercial em decorrência da produção de óleos essenciais. Tanto as folhas quanto o caule são utilizados na forma de chá, para tratamento de abrasões cutâneas, picadas de insetos, dor de dente e infecções superficiais e pela sua atividade antifúngica e antimicrobiana (KAWAKAMI et al., 1990; RIELD, 1997).

A *Melaleuca alternifolia*, conhecida como “Tea Tree” (árvore do chá), é uma árvore pequena com até 5m de altura, possui a casca fina (semelhante a folhas de

papel), folhas afiladas com aproximadamente 20mm de comprimento, sua fluorescência ocorre no verão. Trata-se de uma planta nativa da costa sudeste da Austrália, região de New South Wales, e cresce em regiões pantanosas ou próximas a rios (RIEDL, 1997).

A *Melaleuca alternifolia* possui atividade sobre um amplo espectro antimicrobiana, antiviral, antifúngica, antisséptica, anti-inflamatória, cicatrizante, suave ação de analgesia local, imunestimulante (MONDELLO, 2003; HAMMER et al., 2004; OLIVEIRA, 2002).

O óleo obtido das folhas pode ter quantidade diferentes de terpenos (pineno, terpineno e cimeno) e terpinenol (terpinen-4-ol), estes são relacionados principalmente com a ação antimicrobiana (SIMÕES et al., 2002).

A *Carica papaya* pertence à família das Caricaceae e possui em sua fruta quando sofre ranhuras uma exsudação leitosa chamada de papaína. Esta é constituída por várias enzimas que podem degradar proteínas, carboidratos e gorduras. Diversas pesquisas têm avaliado a atividade biológica na fruta, brotos, folhas, casca, sementes, raiz ou látex. Os constituintes da *C. papaya* são a papaína, quimopapaína, cistatina,  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico, flavanóides, glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos (SEIGLER et al., 2002).

A papaína pode ser utilizada como vermífugo, em traumatismos acidental ou cirúrgico controlando o edema e o processo inflamatório relacionado, além do uso na cicatrização de queimaduras, facilitador de digestão, reduz a peroxidação lipídica, ação antioxidante. Uma atividade bactericida e bacteriostática do mamão contra diversos agentes enteropatogênicos tal como o *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureo*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Klebsiella pneumoniae* (EMERUWA, 1982; MUNOZ et al., 2000; SEIGLER et al., 2002; MELLO et al., 2008).

A *C. papaya* juntamente com a *Murraya paniculata*, e *Cleistanhus collinus* possui propriedade larvicida contra *Culex quinquefasciatus*. A eficácia relativa do extrato da *C. papaya* foi a que apresentou melhor resultado comparado aos outros dois extratos (RAWANI et al., 2009).

Diversos pesquisadores tem relatado a ação dos extratos vegetais contra larvas de mosquitos (MEHLHORN et al., 2005; AMER e MEHLHORN, 2006; RAWANI et al., 2009). O extrato alcóolico da folha do *C. papaya* foi estudado por Govindarajan (2009), onde ele constatou a atividade larvicida, ovicida e repelente contra o *A. aegypti*.

#### 2.2.4.1 Toxicidade de Extrato de Plantas sobre os Insetos

Estudos da toxicidade de extratos de plantas sobre larvas de *A. aegypti* tem sido realizados com uso de análises estruturais e ultraestruturais a fim de auxiliar na compreensão das diversas formas de ação desses produtos. (GUSMÃO et al., 2002, ARRUDA et al., 2003a, b). A demonstração da análise morfológica do local de atuação e da forma de ação tem grande importância para a potencialização de seus efeitos (ARRUDA et al., 2003; VALOTTO et al., 2010).

Barreto et al (2006) com a utilização da histopatologia elucidou o mecanismo de ação com a toxicidade da *Sapindus saponaria* sobre larvas de *A. aegypti*, através da visualização da destruição total ou parcial das células, alta vacuolização citoplasmática, hipersecreção das células epiteliais do mesêntero e pavimentação do epitélio.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Avaliar estrutural e ultraestruturalmente larvas e adultos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) submetidos a tratamento com produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado bacteriano de *Carica papaya*.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar estruturalmente os túbulos de Malpighi e intestino médio de larvas e adultos de *A. aegypti* tratados com produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* nas concentrações de 100%, 50%, 25% e 12,5%.

- Analisar ultraestruturalmente a cutícula de larvas e adultos de *A. aegypti* tratados com produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* nas concentrações de 100%, 50%, 25% e 12,5%.

- Verificar a atividade de repelência do produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* nas concentrações de 100%, 50% e 25%.

- Avaliar a atividade adulticida do produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* nas concentrações de 100%, 50%, 25% e 12,5%.

- Avaliar a atividade larvicida do produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* as concentrações de 50%, 25% e 12,5%, durante 24h.

## REFERÊNCIAS

- AMER, A.; MEHLHORN, H. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v.99, p.466–472, 2006.
- ARRUDA, W.; OLIVEIRA, G. M. C.; SILVA, I. G. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, p.17-25, 2003a.
- ARRUDA, W.; OLIVEIRA, G. M. C.; SILVA, I. G. Alterações morfológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) submetidas à ação do extrato bruto etanólico da casca do caule da *Magonia pubescens* St. Hil. **Entomologia y Vectores**, v.10, p.47-60, 2003b.
- BELTRAO, H. B. M. Interação das toxinas Cry do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* com o mesêntero de larvas do vetor *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **(Dissertação de Mestrado). Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (Fiocruz, PE). Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública.** 60p, 2006.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: Inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviço de Saúde**, v.16, n.4, p.279-293, 2007.
- CONSOLI, R.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1 edição, Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 228p, 1994.
- EMERICK, S.; et al. Resultados preliminares do efeito larvicida do óleo de andiroba (*Carapa guianensis*) (Meliaceae) em mosquitos do gênero *Culex* (Diptera: Culicidae). **Congresso Brasileiro de Medicina Tropical**, v.41, p.44-45, 2005.
- FRADIN, M. S.; DAY, J. F. Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. **New England Journal of Medicine**, v.347, n.1, p.13-18, 2002.
- FORANTTINI, O. P. **Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia**. 2ª edição, São Paulo: Edusp, 864p, 2002.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAUDE (FUNASA). **Programa Nacional de Controle da Dengue**. Brasília, Ministério da Saúde, 2001.
- GADELHA, D. P.; TODA, A. T. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v.37, p.29-36, 1985.
- GALLO, D.; et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 920p, 2002.
- GOVINDARAJAN, M. Bioefficacy of *Cassia fistula* Linn. (Leguminosae) leaf extract against chikungunya vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v.13, p.99-103, 2009.
- GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends and Microbiology**, v.10, n.2, p.100-103, 2002.
- LIMA, J. B. P.; MELO, N. V.; VALLE, D. Residual effect of two *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* products assayed against *Aede aegypti* (díptera: culicidae) in



laboratory and outdoors at Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.47, n.3, p.125-130, 2005.

MACÍAS, F. A.; et al. Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models. **Phytochemistry Reviews**, v.7, p.179-194, 2008.

MELO, J. I. M. DE.; LYRA-LEMOS, R. P. DE. Sinopse taxônomica de Boraginaceae *sensu lato*. A. Juss. no Estado de Alagoas, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.22, n.3, p.701-710, 2008.

MIRANDA, M.C. Desenvolvimento de lipossoma com produto repelente de insetos e metodologia analítica. **(Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ, RJ), Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.** 147p, 2005.

NAKATANI, M.; et al. Phragmalin limonoids from *Chukrasia tabularis*. **Phytochemistry**, v.65, p.2833–2841, 2004.

NATAL, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **Biológico**, v.64, n.2, p.205-207, 2002.

NAVARRO-SILVA, M. A.; MARQUES, F. A.; DUQUE, J. E. L. Review of semiochemicals that mediate the oviposition of mosquitoes: a possible sustainable tool for the control and monitoring of Culicidae. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.53, n.1, p.1-6, 2009.

OLIVEIRA, M. C. B. L. DE. Atividade antiinflamatória dos extratos obtidos de *Cordia curassavica* DC. **(Dissertação de Mestrado) Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, SP).** 131p, 2002.

OLIVEIRA, J. Á. Atividade larvívica de *Copaifera reticulata* e *C. langsdorffii* sobre larvas de *Aedes aegypti*, em ensaios de campo. **(Tese de doutorado) Universidade Federal de Goiânia (UFG, GO), Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical.** 2008.

OSTI, S. C.; et al. Comparative studies of Delthametrin acute toxicity in exotic and Brazilian fish. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, n.2, p.101-106, 2007.

RAWANI, A.; et al. Larvicidal activities of three plants against filarial vector *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v.105, p.1411–1417, 2009.

ROSSI, J. N. C.; et al. Uso do óleo de andiroba (*Carapa guianensis* - Meliaceae) como larvívica de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, p.78, 2005.

SILVA, O. S.; et al. The use of andiroba *Carapa guianensis* as larvívica against *Aedes albopictus*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.20, p.456-457, 2004.

SOARES, S. S.; et al. Comparação da efetividade dos inseticidas Abate® (Temephos - organofosforado granulado 1%) e Altosid® (Methoprene - regulador do crescimento 1,3% P/P), no controle do *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762). **Parasitologia al Dia, Santiago de Chile**, v.20, p.53-58, 1996.

TAVEIRA, L. A., FONTES, L. R., NATAL, D. **Manual de diretrizes e procedimentos no controle do *Aedes aegypti***. Ribeirão Preto: Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto, 2001.

THAVARA, U.; et al. Laboratory and field evaluation of the insect repellent 3535 (Ethyl butylacethylaminopropionate) and deet against mosquito vectors in Thailand. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.17, p.190-195, 2001.

THAVARA, U.; et al. Efficacy and longevity of a new formulation of temephos larvicide tested in trials against larval *Aedes aegypti* in water storage containers. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.20, p.176-82, 2004.

VIEGAS JUNIOR, C. Terpenes with insecticidal activity: an alternative to chemical control of insects. **Química Nova**, v.26, p.390-400, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides**. 2005. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13

#### 4 CAPÍTULO 1

Artigo aceito para publicação na Revista de Saude Pública da USP em 2014.

#### MORTALIDADE DE LARVAS DE *Aedes aegypti* tratadas COM COMPOSTOS

#### MORTALITY OF *Aedes aegypti* LARVAE TREATED WITH COMPOUNDS

Sandra Maria de Torres<sup>1</sup>, Nadine Louise Nicolau da Cruz<sup>2</sup>, Vitor Pereira Matos Rolim<sup>2</sup>,  
Maria Inês de Assis Cavalcanti<sup>2</sup>, Lêucio Câmara Alves<sup>2</sup>, Valdemiro Amaro da Silva  
Júnior<sup>1</sup>.

#### RESUMO

**OBJETIVO:** Avaliar a eficácia de composto de óleos essenciais de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* sobre larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).

**MÉTODOS:** O ensaio larvicida foi realizado em triplicata com 300 larvas para cada grupo experimental utilizando larvas de terceiro estágio, as quais foram expostas por 24h, em 2013. Os grupos foram: controles positivos com larvicida industrial (BTI) nas concentrações de 0,37 ppm (CP1) e 0,06 ppm (CP2); tratado com composto de óleos essenciais e extrato fermentado na concentração de 50,0% (G1); tratado composto e óleos essenciais e extrato fermentado na concentração de 25,0% (G2); tratado com composto de óleos essenciais e um extrato fermentado na concentração de 12,5% (G3); controle negativo com água (CN1) e controle dimetil sulfóxido (CN2). As larvas foram monitoradas a cada 60 min através de visualização direta.

**RESULTADO:** Larvas dos grupos CN1 e CN2 não tiveram mortalidade durante o período de 24h de exposição, mas os grupos CP1 e CP2 apresentaram taxa de mortalidade de 100% em relação a CN1 e CN2. Os tratamentos G1, G2 e G3 exerceram atividade larvicida de 65,0%, 50,0% e 78,0%, respectivamente, quando comparados a CN1 e CN2

**CONCLUSÕES:** A associação entre os três óleos essenciais de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* foi eficiente em todas as concentrações testadas, podendo ser utilizado no controle de larvas de terceiro estágio de *A. aegypti* linhagem Liverpool.

**Descritores:** *Aedes*, crescimento & desenvolvimento. Óleos Vegetais, toxicidade. Controle de Insetos. Vetores de Doenças.

#### ABSTRACT

**OBJETIVE:** To evaluate the larvicidal activity of *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *carapa guianensis* essential oils and fermented extract of *Carica papaya* against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).

**METHODS:** The larvicide test was performed in triplicate with 300 larvae for each experimental group using the third larval stage, which were exposed for 24h. The groups were: positive control with industrial larvicide (BTI) in concentrations of 0.37 ppm (CP1) and 0.06 ppm (PC2); treated with compounds of essential oils and fermented extract, 50.0% concentration (G1); treated with compounds of essential oils and fermented extract, 25.0% concentration (G2); treated with compounds of essential oils and fermented extract, 12.5% concentration (G3);

and negative control group using water (CN1) and using dimethyl (CN2). The larvae were monitored every 60 min using direct visualization.

**RESULTS:** No mortality occurred in experimental groups CN1 and CN2 in the 24h exposure period, whereas there was 100% mortality in the CP1 and CP2 groups compared to CM1 and CN2. Mortality rates of 65.0%, 50.0% and 78.0% were observed in the groups G1, G2 and G3 respectively, compared with CN1 and CN2.

**CONCLUSIONS:** The association between three essential oils from *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* and fermented extract of *Carica papaya* was efficient at all concentrations. Therefore, it can be used in *Aedes aegypti* Liverpool third larvae stage control programs.

**DESCRIPTORS:** *Aedes*, growth & development. Plant Oils, toxicity. Insect Control. Disease Vectors.

#### 4.1 INTRODUCTION

The World Health Organization (WHO) has established various strategies for controlling the *Aedes aegypti*, population, especially in the use of chemical and biological products integrated with environmental management programs capable of eliminating the larval forms and adult insects.<sup>31</sup>

Conventional chemical insecticides used to control *Aedes aegypti* have encouraged the selection of resistant populations. Increasingly strong doses are needed, leading to toxic effects when accumulated in human and animal tissue, and to environmental contamination.<sup>4,30</sup> Ongoing use of biological control using the *Bacillus thuringiensis, israelensis* (BTI) variety also encourages the selection of resistant *A. aegypti* populations.<sup>22</sup>

Plant-based compounds are the main source of new molecules with the potential to be inserted into biological systems.<sup>13</sup> Natural insecticides meet the needs for alternatives to controlling resistant populations of *Aedes aegypti*, a vector for a variety of viruses. They can affect different stages of development through a variety of mechanisms.<sup>18</sup>

*Azadirachta indica* and the *Carapa guianensis* are from the Meliaceae family. There are various compounds which have a larvicidal action on *Aedes aegypti*, *A. albopictus* and *Culex*,<sup>25,27</sup> as well as acting as an insecticide, repellent, antifungal, antimicrobial, acaricide, antifeedant and growth regulator. They are effective at low concentrations and are, for mammals, of low toxicity.<sup>17,18</sup>

*Melaleuca alternifolia* belongs to the Myrtaceae family and is used for its antimicrobial, antiviral, antifungal, antiseptic, anti-inflammatory and healing actions.<sup>10,15</sup> The oxygenated monoterpenes present in *M. alternifolia* essential oil

are toxic to *Aedes albopictus* larvae and lethal in concentrations (LC<sub>50</sub>) above 267.13 ppm.<sup>6</sup>

*Carica papaya* is from the Caricaceae and has bactericidal and bacteriostatic properties, and is used as a dewormer, facilitating digestion, reducing lipid peroxidation and an antioxidant.<sup>14</sup> Fermented extract of *C. Papaya* leaf has larvicidal, ovicidal and repellent actions against *Aedes aegypti*.<sup>9</sup>

In isolation, all of the components of the compound possess larvicidal properties, although there have been no studies on their efficacy when blended to form one single product.

The aim of this study was to evaluate the efficacy of the compound of *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* essential oils and fermented extract of *Carica papaya* on *Aedes aegypti* larvae (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).

#### 4.2 METHODS

The essential oils and fermented extract compound is a commercial product obtained from Gued's Biotecnologia<sup>®</sup>. Its formulation is as follows: essential oil from *Azadirachta indica* seeds 10%, essential oil from *Melaleuca alternifolia* fruit 0.3%, essential oil from *Carapa guianensis* 1.0%, bacterial fermented extract of *Carica papaya* fruit 5.0%.

The essential oil and fermented extract compound is immiscible in water and forms a film on the surface of the container, causing the larvae to die of asphyxiation. It needed to be dissolved in an organic solvent, Dimethyl Sulfoxide, to enable it to be mixed with water. This was tested separately to analyze its toxicity for *Aedes aegypti* larvae.

*Aedes aegypti* Liverpool colonies were established from strains from the Universidade Federal Rural de Pernambuco, Laboratory of Domestic Animal Parasitic Diseases insectarium, Recife, PE, 2013. They were kept in a room with controlled temperature of 28°C (SD = 1), 80.0% (SD = 5.0) relative air humidity and a natural 12/12h photoperiod cycle.

Plastic containers holding two liters of de-chlorinated water were used to hatch the larvae. They were fed industrialized powdered cat food.

The toxicological trials followed the methodology recommended by the WHO.<sup>11,31</sup> Three hundred larvae were collected and transferred to a disposable container holding 50 mL of de-chlorinated water (26°C to 28°C) when they reached the 3<sup>rd</sup> larval stage. Each test was conducted in triplicate, making 900 larvae in each experimental group, giving a total of 7,200 specimens. The larvae

were exposed to the solutions for a 24h period and were monitored every 60 min. Larvae which survived the larvicide trial remained under observation until pupae and adult emerged. The behavioral parameters of the larvae were observed during the period of the experiment to verify alterations such as: stereotyped movement, forming clusters, agitation, lethargy, change of color, shedding exuviae and death.

The experimental groups were organized as followed: treated with *A. indica*, *M. alternifolia* and *C. guianensis* essential oils and bacterial fermented extract of *C. papaya* in concentrations of 50.0% (G1), 25.0% (G2) and 12.5% (G3) a positive control with *Bacillus thuringiensis* serotype *israelensis* (BTI) industrial larvicide at concentrations of CL<sub>90</sub> 0.37 ppm (PC1) and CL<sub>50</sub> 0.06 ppm (PC2) and a negative control with de-chlorinated water (NC1) and negative control with Dimethyl Sulfoxide (NC2).

The data concerning the compound's efficacy were expressed using statistics describing centrality and dispersion trends (mean and standard deviation). The non-parametric Kruskal-Wallis and the Dunn post-hoc tests were used in order to analyze significance between the results and see which groups differed between themselves. The non-parametric Chi square test ( $\chi^2$ ) was used in the analyses regarding the behavior of the larvae during the 24h period. The GraphPad Software, Inc., 2000 program was used for analyses with a significance level of 0.05.

#### 4.3 RESULTS

During the larvicide test, the behavior of the larvae in groups G1, G2 and G3 altered,  $p < 0.05$ , compared to that of those in NC1 and NC2 groups, 60 min after exposure to the compound. Movement gradually decreased, the larvae formed clusters and were lethargic, remaining immobile even when touched after three hours. The larvae in the positive control groups, PC1 and PC2, became lethargic two hours after exposure, remaining inert to touch and with dark, rigid cephalic capsule (Table).

**Table.** Mortality rate of *Aedes aegypti* larvae evaluated over a 24h period, and treated with different concentrations of a compound of *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* essential oils and *Carica papaya* bacterial fermented extract. Recife, PE, 2013.

Time (h)	Experimental group							
	G1	G2	G3	CP1	CP2	CN1	CN2	p
2	0 <sup>a</sup>	1 <sup>ab</sup>	2 <sup>ab</sup>	92 <sup>b</sup>	90 <sup>ab</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0.0032
6	21 <sup>ab</sup>	25 <sup>ab</sup>	66 <sup>ab</sup>	99 <sup>a</sup>	99 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0.0028
10	65 <sup>ab</sup>	50 <sup>ab</sup>	78 <sup>ab</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0.0028
16	68 <sup>ab</sup>	78 <sup>ab</sup>	97 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0.0028
20	73 <sup>ab</sup>	79 <sup>ab</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0.0028
24	83 <sup>a</sup>	81 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0.0028

G1: Treated with 50.0% compound; G2: Treated with 25.0% compound; G3: Treated with 12.5% compound; CP1: BTI CL<sub>90</sub> 0.37 ppm; CP2: BTI CL<sub>50</sub> 0.06 ppm; CN1: Control, water; CN2: control, dimethyl sulfoxide; p < 0.05 according to the Kruskal-Wallis non parametric and Dunn *post-hoc* tests

Different letters in the same row represent statistical significance.

The larvae in the negative control group NC1 and NC2 were fed and developed into pupae and adults within 72 hours of the experiment. However, the surviving larvae in G1 and G2 did not shed their exuviae and did not develop into pupae and adults during the 21 days following exposure. Compounds in concentrations of 50.0% and 25.0% inhibited their development.

Larvae in groups treated with the compound (G1, G2 and G3) had mortality rates of 65.0%, 50.0% and 78.0%, respectively, in the first ten hours of exposure, whereas the mortality rate in the positive control groups (PC1 and PC2) was 100%, p < 0.05, compared with NC1 and NC2. Larvae died in all of the treated groups. However, after 24h, the group with the most efficacious treatment was G3, in which 100% of the larvae died, comparable to groups PC1 and PC2.

Larvae in the negative control groups using water (NC1) and Dimethyl Sulfoxide (NC2) did not die in the 24h following exposure. The Dimethyl Sulfoxide used in diluting the compound did not provoke mortality in the NC2 group, indicating that it had no effect on larvae development or death in groups G1, G2 and G3.

*A. aegypti* larvae were susceptible to the compound of *A. indica*, *M. alternifolia* and *C. guianensis* essential oils and *C. papaya* fermented extract, especially at concentrations of 12.5%.

#### 4.4 DISCUSSION

The compound of essential oils and bacterial fermented extract possessed hydro-soluble active substances with larvicidal properties on third stage *Aedes*

*aegypti* Liverpool larvae. Such products, highly efficient, with low toxicity and little environmental contamination are preferred in studies on controlling culicidae larvae.<sup>5,24</sup>

The first sign of a product with larvicidal properties is decreased movement of the larvae.<sup>26</sup> Arruda et al<sup>3</sup> showed how the movement of *A. aegypti* larvae decreased when treated with *Magonia pubescens*. Such a decrease was also observed in *A. aegypti*, *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles albimanus* larvae when exposed to BTI.<sup>26</sup>

The main active ingredient in *A. indica* essential oil is azadirachtin, which acts as a larvicide on *A. Aegypti* and is reported to cause irreversible physiological alterations.<sup>7</sup> Ndione et al<sup>19</sup> investigated the larvicidal action of *A. Indica* essential oil and found that 64.0% of fourth stage *A. Aegypti* larvae died at concentrations of 8 mg/L (1.0%), and 82.0% of larvae when the concentration was reduced to 3 mg/L (0.3%) in 24h exposure. This data showed the best performing larvicide in the G3, group treated with the lowest concentration of the compound.

The development of *A. aegypti* arvae exposed to *A. indica* was compromised. Azadirachtin blocks the synthesis and release of ecdysone,<sup>13</sup> impedes shedding the exuvia and causes the cuticle to deteriorate,<sup>1</sup> as well as blocking ecdysteroid protein receptors. This inhibits growth, and causes deformities, sterility and death in the larvae.<sup>16,29</sup>

Silva et al<sup>28</sup> studied the larvicide action of *C. guianensis* on all *A. Aegypti* Rockefeller larvae stages and reported that: CL<sub>90</sub> and CL<sub>95</sub> were 164 ppm and 182 ppm after 48h for first stage larvae; 212 ppm and 224 ppm for second stage; 210 ppm and 226 ppm for third stage; and 450 ppm and 490 ppm for fourth stage, respectively.<sup>8</sup> Third and fourth stage *Aedes albopictus*, *Culex* and *A. aegypti* larvae also died after using the oil from this plant at different dilutions.<sup>25,27</sup>

There are various species of *Melaleuca* spp with larvicide actions against *A. Aegypti*, including *Melaleuca linariifolia*, *M. dissitiflora* and *M. quinquenervia*, the essential oils of which obtained mortality of more than 80.0% in concentrations of 0.1 mg/mL in 48h of exposure.<sup>21</sup> However, in a study of larvicides conducted by Amer & Mehlhorn,<sup>2</sup> *M. quinquenervia* oil in a 50 ppm solution caused mortality in 30.0% of third stage *A. Aegypti* larvae 24h after exposure.

Rawani et al<sup>23</sup> tested raw extract of *Carica papaya*, *Murraya paniculata* and *Cleistanhus collinus* on *Culex quinquefasciatus* larvae and observed the best larvicide activity in *Carica papaya*. This may be explained by the bioactive



secondary metabolites in isolation or in combination. Kovendan<sup>12</sup> tested raw extract of *C. papaya* leaf in isolation and obtained 92.0% mortality in *A. aegypti* larvae at a concentration of 500 ppm.

Controlling *A. aegypti* larvae and adults and *Culex quinquefasciatus* larvae using extract of *C. papaya* seed is due to inhibition of amylase, which reduces life span and fecundity in adults, as well as provoking mortality in larvae.<sup>20,23</sup>

As in the above mentioned individual studies, in this article larvicidal activity remained even when associated with low concentrations of the essential oils and fermented extract, found in the commercial product; 1 mL contains 0.01 mg/L of *A. indica*, 0.003 mg/L of *M. alternifolia*, 0.01 mg/L of *C. guianensis* and 0.05 mg/L of *C. papaya*. This concentration is below those found used in isolation in the indexed journals, even when undiluted. Thus, the larvacidal efficacy remained.

To conclude, the mixture of *A. indica*, *M. alternifolia*, *C. guianensis* essential oils and *C. papaya* bacterial fermented extract act in synergy as a larvicide on *Aedes aegypti*, Liverpool at all concentrations in laboratory conditions. It is necessary to evaluate this compound against *A. aegypti* populations in the field and with larvae at other stages.

## REFERENCES

1. Aliero BL. Larvaecidal effects of aqueous extracts of *Azadirachta indica* (neem) on the larvae of *Anopheles* mosquito. *Afr J Biotechnol*. 2003;2(9):325-7.
2. Amer A, Mehlhorn H. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). *Parasitol Res*. 2006;99(4):466-72. DOI:10.1007/s00436-006-0182-3
3. Arruda W, Oliveira GMC, Silva IG. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(1):17-25. DOI:10.1590/S0037-86822003000100004
4. Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. *Epidemiol Serv Saude*. 2007;16(4):295-302. DOI:10.5123/S1679-49742007000400007
5. Caser CRS, Carlos GA, Gasperazzo W, Cruz ZMA, Silva AG. Atividade biológica das folhas secas de Neem, *Azadirachta indica*, sobre larvas de *Aedes aegypti*. *Natureza on line* [Internet]. 2007 [citado 2014 mar 28];5(1):19-24.

Disponível em:

[http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/03\\_CaserCRSetal\\_1924.pdf](http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/03_CaserCRSetal_1924.pdf)

6. Conti B, Flamini G, Cioni PL, Ceccarini L, Macchia M, Benelli G. Mosquitocidal essential oils: are they safe against non-target aquatic organisms? *Parasitol Res.* 2014;113(1):251-9. DOI:10.1007/s00436-013-3651-5

7. Dua VK, Pandey AC, Raghavendra K, Gupta A, Sharma T, Dash AP. Larvicidal activity of neem oil (*Azadirachta indica*) formulation against mosquitoes. *Malaria J.* 2009;8:124. DOI:10.1186/1475-2875-8-124

8. Emerick S, Prophiro J, Rossi J, et al. Resultados preliminares do efeito larvicida do óleo de andiroba (*Carapa guianensis*) (Meliaceae) em mosquitos do gênero *Culex* (Diptera: Culicidae). *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005;41:44-45.

9. Govindarajan M. Bioefficacy of Cassia fistula Linn. (Leguminosae) leaf extract against chikungunya vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2009;13(2):99-103.

10. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Antimicrob Chemother.* 2004;53(6):1081-5. DOI:10.1093/jac/dkh243

11. Jang YS, Kim MK, Ahn YS, Lee HS. Larvicidal activity of Brazilian plant against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Agri Chem Biotechnol.* 2002;45 (3):131-4.

12. Kovendan K, Murugan K, Kumar AN, Vincent S, Hwang JS. Bioefficacy of larvicidal and pupicidal properties of *Carica papaya* (Caricaceae) leaf extract and bacterial insecticide, spinosad, against chikungunya vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res.* 2012;110(2):669-78. DOI:10.1007/s00436-011-2540-z

13. Macías FA, Oliveros-Bastidas A, Marín D, Carrera C, Chinchilla N, Molinillo JMG. Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and

potential use as herbicide models. *Phytochemistry Rev.* 2008;7(1):179-94.  
DOI:10.1007/s11101-007-9062-4

14. Mello VJ, Gomes MT, Lemos FO, Delfino JL, Andrade SP, Lopes MT, et al. The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*. *Phytomedicine.* 2008;15(4):237-44.  
DOI:10.1016/j.phymed.2007.06.004

15. Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Cassone A, Salvatore G. In vivo activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. *BMC Infect Dis.* 2006;6:158. DOI:10.1186/1471-2334-6-158

16. Murugan K, Hwang JS, Kovendan K, Kumar KP, Vasugi C, Kumar AN. Use of plant products and copepods for control of the dengue vector, *Aedes aegypti*. *Hydrobiologia.* 2011;666(1):331-8. DOI:10.1007/s10750-011-0629-0

17. Nakatani M, Abdelgaleil SAM, Saad MMG, Huang RC, Doe N, Iwagawa T. Phragmalin limonoids from *Chukrasia tabularis*. *Phytochemistry.* 2004;65(20):2833-41. DOI:10.1016/j.phytochem.2004.08.010

18. Navarro-Silva MA, Marques FA, Duque L JE. Review of semiochemicals that mediate the oviposition of mosquitoes: a possible sustainable tool for the control and monitoring of Culicidae. *Rev Bras Entomol.* 2009;53(1):1-6.  
DOI:10.1590/S0085-56262009000100002

19. Ndione RD, Faye O, Ndiaye M, Dieye A, Afoutou JM. Toxic effects of neem products (*Azadirachta indica* A. Juss) on *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 larvae. *Afr J Biotechnol.* 2007;6(24):2846-54.

20. Nunes NNS, Santana LA, Sampaio MU, Lemos FJA, Oliva ML. The component of *Carica papaya* seed toxic to *A. aegypti* and the identification of tegupain, the enzyme that generates it. *Chemosphere.* 2013;92(4):413-20.  
DOI:10.1016/j.chemosphere.2012.12.078

21. Park HM, Kim J, Chang KS, Kim BS, Yang YJ, Kim GH, et al. Larvicidal activity of Myrtaceae essential oils and their components against *Aedes aegypti*,

- acute toxicity on *Daphnia magna*, and aqueous residue. *J Med Entomol*. 2011; 48(2):405-10. DOI:10.1603/ME10108
22. Paris M, Tetreau G, Laurent F, Lelu M, Despres L, David JP. Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in the environment induces resistance to multiple Bti toxins in mosquitoes. *Pest Manag Sci*. 2011;67(1):122-8. DOI:10.1002/ps.2046
23. Rawani A, Haldar KM, Ghosh A, Chandra G. Larvicidal activities of three plants against filarial vector *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res*. 2009;105(5):1411-7. DOI:10.1007/s00436-009-1573-z
24. Resende MC, Gama RA. Persistência e eficácia do regulador de crescimento pyriproxyfen em condições de laboratório para *Aedes aegypti*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(1):72-5. DOI:10.1590/S0037-86822006000100014
25. Rossi JCN, Prophiro JS, Pedroso MF, Torquato MF, Emerick TV, Mendes S, et al. Uso do óleo de andiroba (*Carapa guianensis* - Meliaceae) como larvicida de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005; 41:78.
26. Ruiz LM, Segura C, Trujillo J, Orduz S. In vivo binding of the Cry11bB toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* to the midgut of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99(1):73-9. DOI:10.1590/S0074-02762004000100013
27. Silva OS, Romão PRT, Blazius RD, Prohiro JS. The use of andiroba *Carapa guianensis* as larvicide against *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc*. 2004;20(4):456-7.
28. Silva OS, Prophiro JS, Nogared JC, Kanis L, Emerick S, Blazius RD, Romão PRT. Larvicidal effect of andiroba oil, *Carapa guianensis* (Meliaceae), against *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc*. 2006;22(4):699-701.
29. Tateishi K, Kiuchi M, Takeda S. New cuticle formation and moult inhibition by RH- 5849 in the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl Entomol Zool*. 1993;28(2):177-84.

30. Viegas Júnior C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quim Nova*. 2003;26(3):390-400.

DOI:10.1590/S0100-40422003000300017

31. World Health Organization. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Geneva; 1970. (Technical Report Series, 443).

Study based on the Doctoral thesis of Torres SM, entitled: “Avaliação estrutural e ultraestrutural de larvas e adultos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) submetidos a tratamento com composto de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado bacteriano de *Carica papaya*”, presented to the Universidade Federal Rural de Pernambuco, in 2014.

The authors declare that there are no conflicts of interest.

**Rev Saúde Pública 2014**

**Recebido:** 2/7/2013

**Aprovado:** 10/2/2014

## 5 CAPÍTULO 2

### ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DE LARVAS DE *Aedes aegypti* SUBMETIDAS A TRATAMENTO COM PRODUTO FORMULADO DE ÓLEOS DE *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* E EXTRATO FERMENTADO BACTERIANO DE *Carica papaya*.

Sandra Maria de Torres<sup>1</sup>, Maria do Carmo Alves de Lima<sup>2</sup>, Luis André Rodrigues de Lima<sup>1</sup>, Lêucio Câmara Alves<sup>3</sup>, Valdemiro Amaro da Silva Júnior<sup>1</sup>.

#### RESUMO

Ensaio de toxicidade com extratos de diversas plantas são alvos de estudos sobre larvas de *Aedes aegypti*. O objetivo deste trabalho foi avaliar as modificações estruturais de larvas de *Aedes aegypti* submetidas a tratamento com produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya*. O ensaio larvicida foi realizado em triplicata com larvas de 3º estágio expostas por 24h ao produto formulado de óleos e extrato fermentado nas concentrações de 50% (G1), 25% (G2) e 12,5% (G3). Os controles positivos foram feitos com larvicida industrial (BTI) nas concentrações de 0,37ppm (CP1) e 0,06ppm (CP2). Os controles negativos utilizaram água (CN1) e dimetil sulfóxido (CN2). Ao final do período experimental as larvas foram fixadas em solução tamponada de glutaraldeído a 4% em tampão fosfato de sódio, 0,01M, pH7.3 e processadas rotineiramente em historesina. Contudo, a exposição das larvas de *A. aegypti* ao produto formulado nas concentrações de 12,5% e 25% provocaram maiores danos às estruturas do mesêntero, túbulos de Malpighi e gânglios nervosos. Conclui-se que o produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* nas concentrações de 12,5 e 25% pode ser empregado no controle das populações de larvas de *Aedes aegypti*.

**Palavras-chave:** Intestino; Túbulo de Malpighi; Gânglios nervosos; Histologia de *Aedes aegypti*.

#### ABSTRACT

Toxicity assays using extracts of plants are targets of study to *Aedes aegypti* larvae. The aim of this work was to evaluate the structural changes of *Aedes aegypti* larvae after exposition of oils formulated product within *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* and fermented extract of *Carica papaya*. The larvicide assay was made in triplicate with 3rd stage larvae exposed by 24 hours to oils formulated product and fermented extract at concentration of 50% (G1), 25% (G2) and 12,5% (G3). Positive controls were made with standard larvicidal in the 0.37 ppm (CP1) and 0.06 ppm (CP2) concentrations. The negative controls used water (CN1) and DMSO (CN2). IN the end of experimental period larvae were fixed in 4% glutaraldehyde in sodium phosphate buffer solution, 0.01M, pH7.3 and routinely processed to glycol methacrilate resin. The exposition of *A. aegypti* larvae to 12.5% and 25% of composite caused more damages in the mesenterium, Malpighi tubules and ganglion nerve. According to results concludes that oils formulated product within *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* and fermented extract of *Carica papaya* in the 12.5 and 25% concentrations can be used to control *Aedes aegypti* larvae population.

**Key-words:** Intestine; Malpighian tubule; nerve ganglion; Histology of *Aedes aegypti*.

## 5.1 INTRODUÇÃO

O *Aedes aegypti* é um díptero de grande importância epidemiológica, devido ao seu papel como transmissor de várias arboviroses, dentre elas os vírus da dengue e febre amarela (GUBLER, 2002).

O controle biológico é uma alternativa ao uso inseticidas químicos, sendo o *Bacillus thuringiensis* variedade *israelenses* (BTI) o mais utilizados no controle de larvas do *A. aegypti* (PARIS et al., 2011).

Plantas com atividade biológica são promissoras no controle de vetores, pois são fontes de novos compostos químicos utilizados no desenvolvimento de moléculas com potencial para interações com sistemas biológicos (MACIAS et al., 2008).

Estudos da toxicidade com extratos de várias plantas sobre larvas de *A. aegypti* tem sido realizados utilizando avaliações estruturais, a fim de auxiliar na compreensão dos diversos sítios de ação desses produtos (GUSMÃO et al., 2002; ARRUDA et al., 2003; 2003a).

O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações estruturais no intestino, nos túbulos de Malpighi e gânglios nervosos em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) submetidas a tratamento com produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya*.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Obtenção do Produto Formulado

O produto formulado de óleos e o extrato fermentado foram obtidos junto a Gued's Biotecnologia® tendo a seguinte formulação: 1% do óleo fixo da semente da *Azadirachta indica*, 0,3% do óleo fixo do fruto da *Melaleuca alternifolia*, 1% do óleo essencial da *Carapa guianensis* e 5% do extrato fermentado bacteriano do fruto de *Carica papaya*.

### 5.2.2 Ensaio Larvicida

O ensaio toxicológico seguiu a metodologia preconizada pela Organização Mundial de Saúde (1970) com algumas modificações a seguir (JANG et al., 2002), utilizando larvas de terceiro estágio. O teste foi realizado em triplicata com 300 larvas

para cada grupo experimental totalizando 6300 espécimes. As larvas foram expostas às soluções por 24h, sendo monitoradas a cada hora. Os grupos experimentais seguiram a distribuição encontrada na tabela 1.

Tabela 2 – Distribuição dos grupos experimentais de larvas de *Aedes aegypti* expostas durante 24h.

<b>Grupos tratados</b>	<b>Controle Positivo</b>	<b>Controle Negativo</b>
G1 – produto formulado 5 (n=900)	CP1 – BTI CL <sub>90</sub> 0,37ppm (n=900)	CN1 – água de clorada (n=900)
G2 – produto formulado 2 (n=900)	CP2 – BTI CL <sub>50</sub> 0,06ppm (n=900)	CN2 – dimetil sulfoxido (n=900)
G3 – produto formulado 12 (n=900)		

Fonte: TORRES, S. M. (2014)

### 5.2.3 Análise Estrutural

Para o estudo histológico das larvas foram selecionados exemplares de todos os grupos experimentais, mortas e vivas, os quais foram fixados em glutaraldeído tamponado a 4% com tampão fosfato de sódio (PBS) 0,01M e pH de 7,3 e posteriormente submetidos ao processo inclusão em historesina, conforme metodologia descrita por Arruda et al. (2003). Os cortes de 4µm de espessura foram corados em hematoxilina-floxina ou azul de toluidina 1%.

### 5.2.4 Altura e Diâmetro dos Túbulos de Malpighi

As lâminas histológicas com cortes transversais foram utilizadas para obtenção de dados da altura de epitélio e diâmetro dos túbulos de Malpighi, os quais foram realizadas com o auxílio da captura das imagens através de um microscópio óptico com aumento de 400X, MOTIC<sup>®</sup> BA300, acoplado a uma câmera digital, Moticam<sup>®</sup> 2300, ligado a um microcomputador. A altura do epitélio e o diâmetro dos túbulos de Malpighi por seção transversal e foram obtidos a partir da medição de 15 túbulos escolhidos aleatoriamente.

A medida da altura do epitélio foi realizada através de duas mensurações diametralmente opostas, utilizando-se como referência a membrana basal e o lúmen tubular. Enquanto o diâmetro teve como referência as membranas basais opostas.



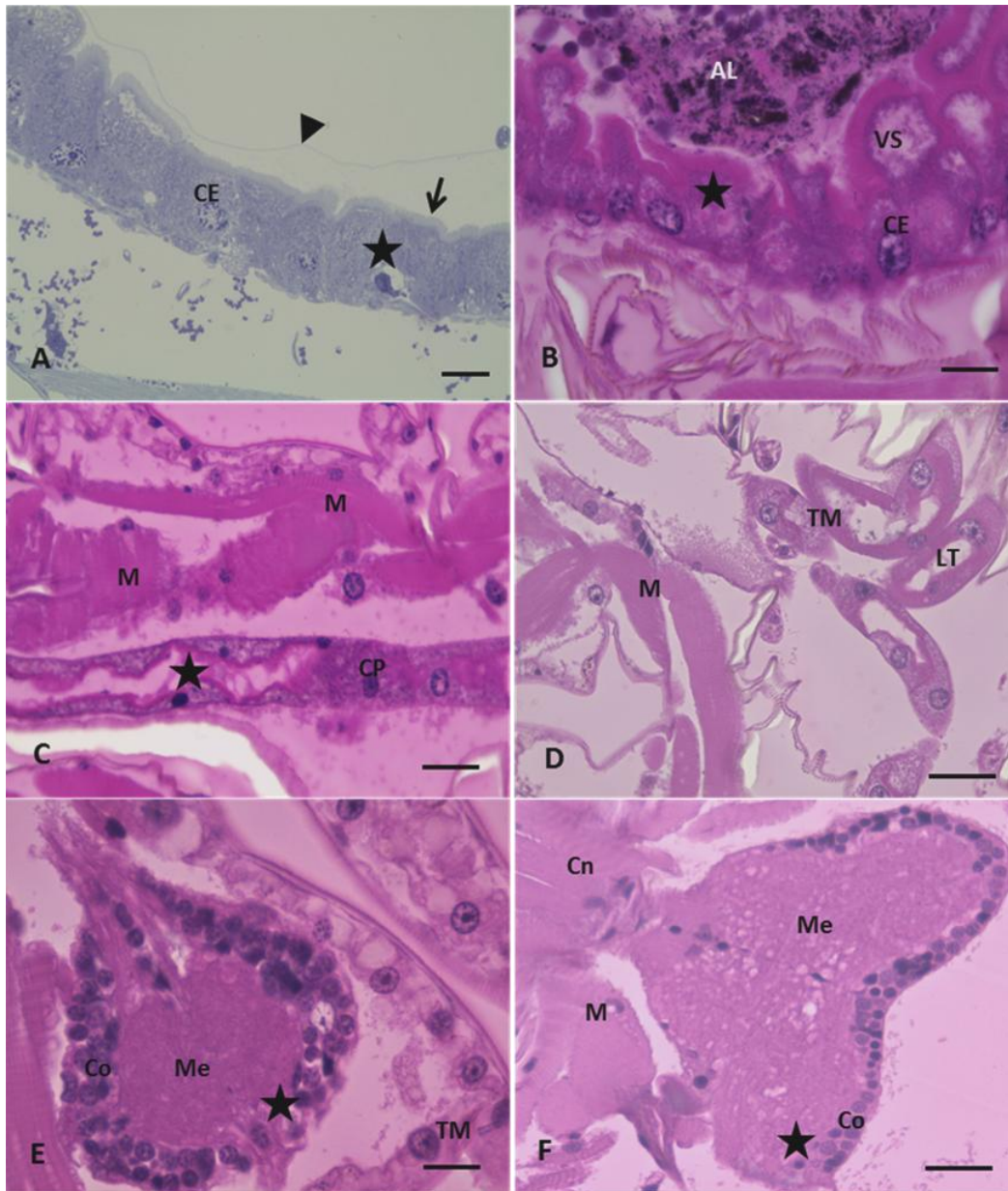
### 5.2.5 Análise Estatística

Os dados obtidos foram expressos através de medidas de centralidade e dispersão (média  $\pm$  desvio padrão) seguindo distribuição não Gaussiana utilizando o teste de Mann-Whitney ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com post-hoc de Dunn. Para tais análises foi utilizado o programa computacional InStat (GraphPad Software, Inc., 2000). O tratamento estatístico foi delineado com nível de significância para  $p < 0,05$ .

### 5.3 RESULTADO

As alterações estruturais encontradas nas larvas tratadas com o produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado bacteriano de *Carica papaya* são visibilizadas na figura 1.

Figura 1 – Fotomicrografias de intestino, túbulo de Malpighi e gânglio nervoso de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* tratadas com produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* nas concentrações de 50%, 25% e 12,5%. **A:** Região de intestino médio do G1 com células epiteliais necrosadas. Barra 4 $\mu$ m. **B:** Região posterior do intestino do G2 com necrose e vacuolização citoplasmática. Barra 50 $\mu$ m. **C:** Túbulo de Malpighi (TM) do G2 com aumento do lúmen e necrose tubular, além de necrose de musculatura (M). Barra 50 $\mu$ m. **D:** Túbulo de Malpighi do G3 com aumento do lúmen e necrose tubular. Barra 50 $\mu$ m. **E e F:** Gânglio nervoso do G2 e G3 com necrose cortical e consequente rarefação celular, vacuolização medular. Barra 50 $\mu$ m. Célula epitelial (CE); Vesícula de secreção (VS); Alimento (AL); Necrose celular (estrela); Músculo (M); Matriz peritrófica (cabeça de seta); borda em escova (seta); Célula principal (CP); Lúmen tubular (LT); Região cortical (Co); Região medular (M); Cordão nervoso (Cn).



Fonte: TORRES, S. M. (2014)

No intestino ou mesêntero do G1 foi observado epitélio em processo degenerativo com tumefação celular e formação de vacúolos citoplasmáticos, além de células intestinais em necrose. Não houve perda de matriz peritrófica e borda em escova. No G2 as lesões intestinais foram às mesmas, porém houve diminuição na altura da borda em escova e manutenção da matriz peritrófica, além de necrose multifocal. As lesões intestinais do G3 foram maiores quando comparado aos demais grupos submetidos a tratamento com o composto. Houve necrose de extensas áreas do intestino, aumento do espaço subperitrófico, diminuição da borda em escova com sinais de destruição e vesículas secretoras vacuolizadas.

O diâmetro dos túbulos de Malpighi (TM) e a altura de epitélio de todos os grupos experimentais estão descritos na tabela 2. Nos TM dos grupos G1, G2 e G3 houve diminuição dose-dependente significativa ( $p < 0,0001$ ) da altura do TM com relação aos grupos CP1, CP2, CN1 e CN2. No entanto, os tratados com o composto obtiveram os menores valores de diâmetro tubular, sendo o grupo G3 o menor dentre eles ( $p = 0,0001$ ) em relação ao G1 e G2.

Tabela 3 – Diâmetro e altura de Túbulo de Malpighi (média  $\pm$  desvio) de larvas de *Aedes aegypti* tratados com produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado bacteriano de *Carica papaya* durante 24h.

Parâmetros ( $\mu\text{m}$ )	G1	G2	G3	CP1
Altura	1410 $\pm$ 262a	1180 $\pm$ 289a	1162 $\pm$ 213a	1758 $\pm$ 497bc
Diâmetro	4440 $\pm$ 678ad	4077 $\pm$ 918ad	2779 $\pm$ 291a	5158 $\pm$ 65bc
Parâmetros ( $\mu\text{m}$ )	CP2	CN1	CN2	P
Altura	1933 $\pm$ 547bc	1833 $\pm$ 436bc	1910 $\pm$ 387bc	0,0001
Diâmetro	5300 $\pm$ 717b	4120 $\pm$ 699a	4600 $\pm$ 617c	0,0001

Fonte: TORRES, S. M. (2014)

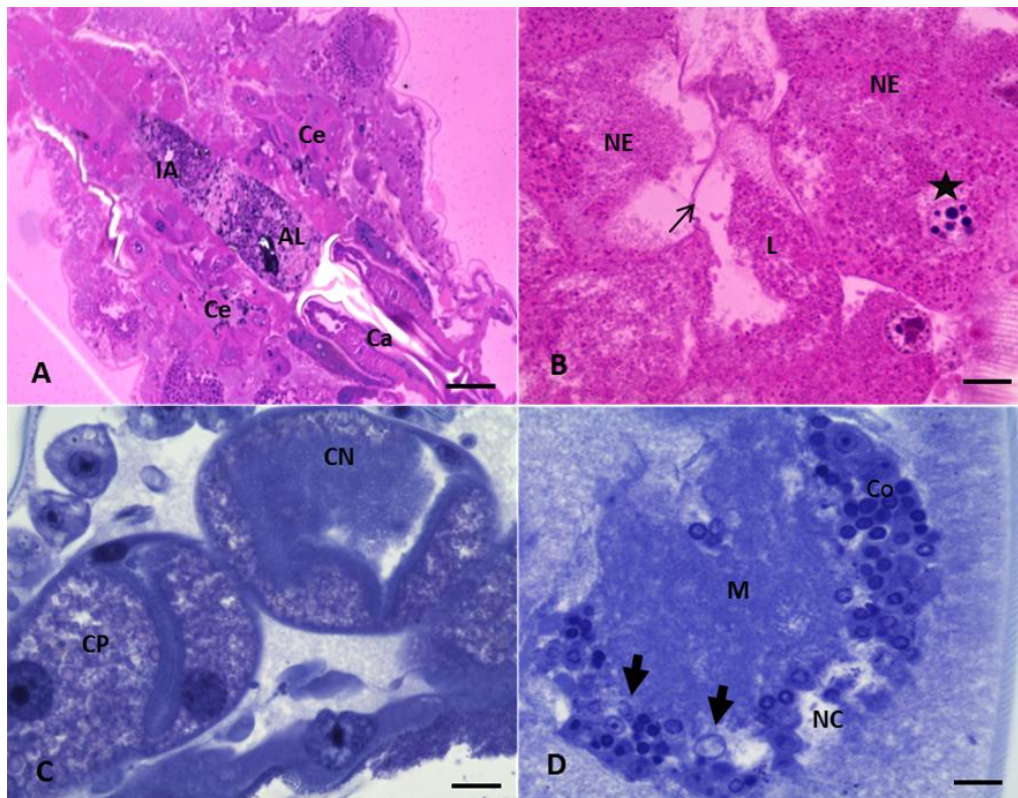
(P = significância  $< 0,05$ ) letras diferentes na mesma linha representam significância.

Estruturalmente, pode ser observado na figura 1 o aumento do lúmen do TM no G1, algumas células necrosadas, tumefação celular e nuclear, porém com manutenção da borda em escova. No G2 houve extensa área de necrose de TM com aumento do lúmen tubular e diminuição da borda em escova. No entanto, o TM do G3 teve as mesmas alterações do G2 acrescido de células em necrose, diminuição da borda em escova, aumentos nos vacúolos de secreção citoplasmática e no lúmen tubular.

Os gânglios nervosos dos grupos G1, G2 e G3 podem ser visibilizados na figura 1. Observa-se que independente da diluição houve vacuolização da parte medular e necrose cortical, sendo as lesões maiores observadas no G3.

As alterações estruturais do intestino médio de larvas de *A. aegypti* expostas ao larvicida industrial *Bacillus thuringiensis* variedade *israelensis* (BTI) em CL<sub>90</sub> 0,37ppm e CL<sub>50</sub> 0,06ppm são visibilizadas na figura 2.

Figura 2 – Fotomicrografias de intestino, túbulo de Malpighi e gânglio nervoso de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* controle positivo BTI CL<sub>90</sub> 0,37ppm e CL<sub>50</sub> 0,06ppm. A: Região anterior do intestino onde pode ser visualizada a extensão da necrose. Barra 200 $\mu\text{m}$ . B: Observação mais aproximada da região média do intestino necrosado. Barra 4 $\mu\text{m}$ . C: Túbulo de Malpighi necrosado. Barra 4 $\mu\text{m}$ . D: Gânglio nervoso com necrose na região cortical. Barra 4 $\mu\text{m}$ . Intestino anterior (IA); Cecos gástricos (Ce); Cárdia (Ca); Alimento (AL); Necrose epitelial (NE); Lúmen intestinal (L); Matriz peritrófica (seta fina); Necrose cortical (seta grossa); Corpos apoptóticos (estrela); Célula principal (CP); Necrose celular (CN); Região cortical (Co); Região medular (M).



Fonte: TORRES, S. M. (2014)

As lesões nas células epiteliais do intestino foram observadas por todo o órgão, mas as alterações mais relevantes foram constatadas no mesêntero anterior, próximo aos cecos e no intestino médio. Necrose difusa da parede intestinal e da membrana basal, perda de limite celular com extravasamento de conteúdo intestinal para a hemolinfa foram às alterações mais observadas. No intestino posterior as lesões foram menos agressivas, contudo, ainda se constatou necrose celular, vacuolização citoplasmática, perda de vesículas secretoras, matriz peritrófica e borda em escova.

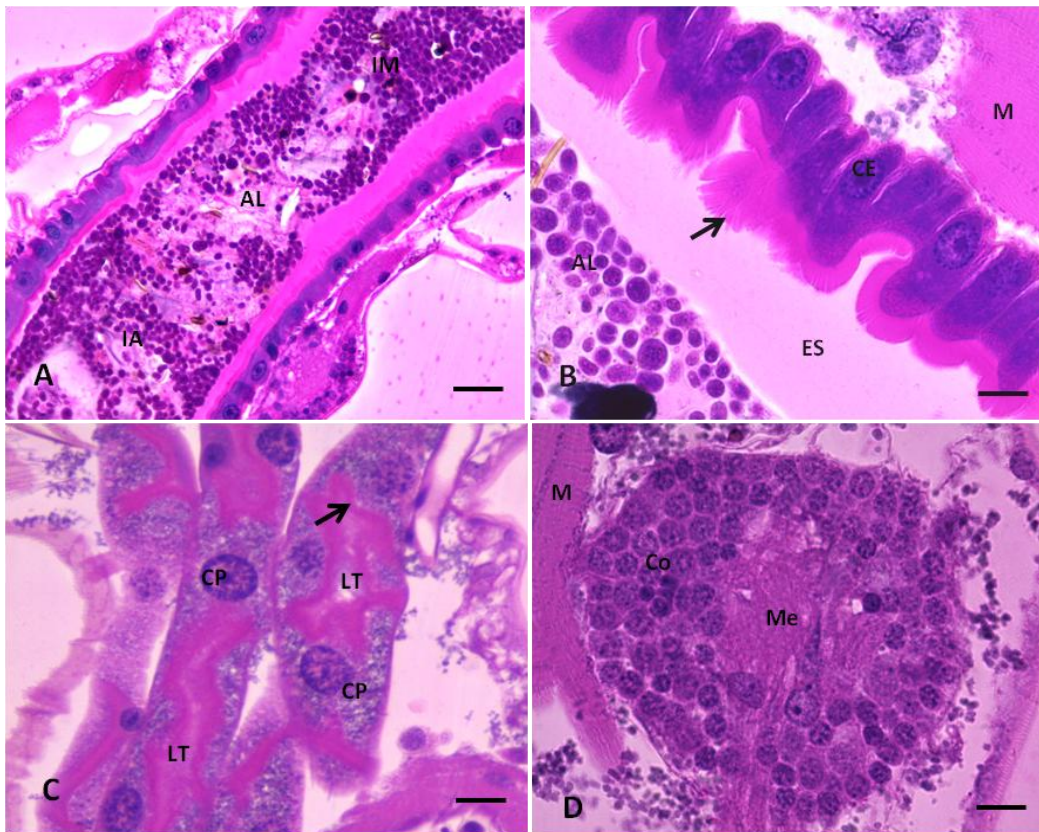
Nos túbulos de Malpighi (TM) das larvas expostas ao BTI em CL<sub>50</sub> 0,37ppm e CL<sub>90</sub> 0,06ppm houve uma tendência a diminuição da altura de túbulo no CP1 e aumento no CP2, porém não significativo em relação aos CN1 e CN2. No entanto o diâmetro de TM teve um aumento significativo ( $p < 0,0001$ ) do CP1 e CP2 em relação aos demais grupos experimentais (G1, G2, G3, CN1 e CN2). Foram observadas células degeneradas ou em necrose com extravasamento de conteúdo celular para o lúmen tubular. Nos gânglios nervosos visibilizou-se degeneração e necrose difusa dos neurônios da região cortical com perda da organização estrutural (figura 2). Nas larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* do grupo controle não foram observadas alterações na arquitetura das células do mesêntero.

Na região abdominal das larvas dos grupos controle CN1 e CN2 foram observados túbulos de Malpighi sem lesões, com núcleos grandes e alongados,



abundante citoplasma basofílico com presença de numerosas inclusões citoplasmáticas de tamanhos variados e vacúolos dispersos (Figura 3).

Figura 3 – Fotomicrografias de intestino, túbulo de Malpighi e gânglio nervoso de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* controle negativo durante 24h de observação. A e B: Intestino do grupo CN1 observar preservação das estruturas. Barra 50µm. B: Túbulo de Malpighi do grupo CN1. Barra 50µm. C: Gânglio nervoso do grupo CN1. Barra 50µm. Intestino anterior (IA); Intestino médio (IM); Alimento (AL); borda em escova (seta); Espaço sub peritrófico (ES); Músculo (M); Célula principal (CP); Lúmen tubular (LT); Região cortical do gânglio nervoso (Co); Região medular do gânglio nervoso (Me).



Fonte: TORRES, S. M. (2014)

Ao corte longitudinal da região abdominal, observou-se nos grupos CN1 e CN2 preservação estrutural dos túbulos de Malpighi, com núcleos grandes e alongados, abundante citoplasma basofílico com numerosas concreções citoplasmáticas mineralizadas para armazenamento de íons, metais e ácido úrico, no lúmen tubular há uma matriz densa de vilosidades alongadas que formam a borda em escova (Figura 3).

Nos gânglios nervosos dos grupos controle não foram notadas alterações estruturais (Figura 3). Esses dispunham de região cortical formada por corpos de neurônios e uma região medular com glândula protorácica e massa amorfa.

## 5.4 DISCUSSÃO

As larvas de *A. aegypti* tratadas com produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* apresentaram alterações estruturais no mesêntero semelhantes às observadas em larvas da mesma espécie expostas ao extrato da *Sapindus saponaria* evidenciando a ação tóxica do produto formulado (BARRETO et al., 2006).

Valotto et al., (2010) descreveram a utilização nos seus ensaios larvicidas do extrato de *Alnus glutinosa*, *Populus nigra* e *Quercus robur*. Esses autores observaram edema na superfície apical da célula, vacuolização citoplasmática, ruptura da membrana basal, liberação de conteúdo citoplasmático no lúmen intestinal, principalmente no mesêntero, cecos gástricos e túbulo de Malpighi de larvas de *A. aegypti*, sendo essas alterações semelhantes às obtidas neste estudo.

Segundo dados de literatura, sabe-se que o óleo da *Copaifera* ocasiona apoptose com destruição parcial ou total das células epiteliais, vacuolização citoplasmática, aumento do espaço subperitrófico com acúmulo de material acidófilo internamente, além de danos nos nervos periféricos e microvilosidades de larvas de *A. aegypti* (ABED et al., 2007).

Lesões semelhantes às descritas anteriormente foram verificadas nos grupos CP1 e CP2, porém nas larvas destes grupos os danos foram maiores no intestino anterior, cecos gástricos e intestino posterior. Isso pode ser explicado pelo fato desses órgãos apresentarem sítios de ligação para toxina (LIMA et al., 2003; RUIZ et al., 2004). O *Bacillus thuringiensis* ocasiona alterações no balanço iônico das células intestinais e no labirinto basal, resultando no aumentando da superfície celular ou espaço intercelular e transporte excessivo de fluido celular para hemocele (BAUER e PANKRATZ, 1992).

As alterações provocadas pelo óleo da *Carapa guianensis* sobre o mesêntero de larvas de *A. aegypti* e *Aedes albopictus* incluíram apoptose no intestino e morte das larvas poucas horas após sua ingestão (SILVA et al. 2004). Arruda et al. (2003) estudaram a exposição de larvas de *A. aegypti* ao extrato etanólico de *Magonia pubescens* e verificaram lesões estruturais localizadas principalmente no mesêntero anterior, as quais incluíam destruição celular, elevada vacuolização citoplasmática, aumento do espaço subperitrófico, estratificação do epitélio, aumento da espessura da matriz peritrófica e hipertrofia celular.

O segmento distal do túbulo de Malpighi do *A. aegypti* é constituído por células principais e células estreladas com distribuição de 5:1 (YU e BEYENBACH, 2004; BEYENBACH et al., 2009, BEYENBACH et al., 2010). Essas células principais

transepitelial ocupam cerca de 90% do túbulo (WU e BEYENBACH, 2003) e são as responsáveis pela mediação da secreção de íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ), através de transporte ativo, da hemolinfa para o lúmen tubular (BEYENBACH, 2003; YU e BEYENBACH, 2004). Assim, é provável que em virtude das lesões verificadas nas células do TM das larvas de *A. aegypti* no presente estudo, o transporte iônico tenha sido comprometido.

Embora na literatura hajam poucos relatos sobre alterações estruturais em cérebro ou em gânglios nervosos promovidas por moléculas sintéticas ou naturais sobre o *A. aegypti*, já foram reportados que componentes da *A. indica*, azadiractina e meliantrio possuem propriedades fago-inibidoras de glândulas endócrinas controladoras da metamorfose e do desenvolvimento larval, assim como degeneração do *corpus cardiacum* causando uma redução do material neurosecretor (VALLADARES et al., 1997). Tal processo degenerativo promove diminuição dos níveis hormonais morfogenéticos em larvas e em insetos jovens (VIEGAS JUNIOR, 2003).

Os achados encontrados neste trabalho sugerem que primariamente o produto formulado ao ser ingerido causa lesões no tubo digestivo e após sua absorção ocasiona lesões irreversíveis em túbulo de Malpighi e gânglios nervosos.

Neste estudo, verificou-se que a exposição de larvas de 3º estágio de *A. aegypti* linhagem Liverpool ao produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya*, nas concentrações de 25 e 12,5%, provocaram danos celulares no mesêntero, túbulos de Malpighi e gânglios nervosos. Baseado nos resultados apresentados, podemos concluir que o produto formulado pode ser empregado no controle populacional das larvas de *Aedes aegypti* linhagem Liverpool, sendo necessário mais estudos com populações de campo e com larvas de outros estádios larvais de *Aedes aegypti*.

## REFERÊNCIAS

- ABED, R.A.; et al. Alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pela atividade larvicida do óleo-resina da planta medicinal *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae). **Revista de Patologia Tropical**, v.36, p.87-95, 2007.
- ARRUDA, W.; OLIVEIRA, G.M.C.; SILVA, I.G. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, p.17-25, 2003.
- ARRUDA, W.; OLIVEIRA, G.M.C.; SILVA, I.G. Alterações morfológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) submetidas à ação do extrato bruto etanólico da casca do caule da *Magonia pubescens* St. Hil. **Entomologia y Vectores**, v.10, p.47-60, 2003a.
- BAUER, L.S.; PANKRATZ, H.S. Ultrastructural effects of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* on midgut cells of the cottonwood leaf beetle. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.60, p.15-25, 1992.
- BEYENBACH, K. W. Transport mechanisms of diuresis in Malpighian tubules of insects. **The Journal of Experimental Biology**, v.206, p.3845-3856, 2003.
- BARRETO, C.F.; et al. Estudos das alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindus saponaria* Lin (Sapindaceae). **Revista de Patologia Tropical**, v.35, p.37-57, 2006.
- BEYENBACH, K.W.; et al. Signaling to the apical membrane and to the paracellular pathway: changes in the cytosolic proteome of *Aedes* Malpighian tubules. **The Journal of Experimental Biology**, v.212, p.329–340, 2009.
- BEYENBACH, K.W.; SKAER, H.; DOW, J.A. The developmental, molecular, and transport biology of Malpighian tubules. **Annual Review of Entomology**, v.55, p.351–374, 2010.
- GUBLER, D.J. Epidemic dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends in Microbiology**, v.10, p.100-103, 2002.
- GUSMÃO, D.S.; et al. *Derris* (Lonchocarpus) *urucu* (Leguminosae) extract modifies the peritrophic matrix structure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.371-375, 2002.
- JANG, Y.S.; et al. Larvicidal activity of Brazilian plant against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Agricultural Chemistry Biotechnology**, v.4, p.131-134, 2002.
- MACÍAS, F.A.; et al. Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models. **Phytochemistry Reviews**, v.7, p.179-194, 2008.
- PARIS, M.; et al. Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in the environment induces resistance to multiple Bti toxins in mosquitoes. **Pest Management Sciences**, v.67, p.122–128, 2011.



RUIZ, M.L.; et al. In vivo binding of the Cry11bB toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Medellin* to the midgut of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, p.73-79, 2004.

SILVA, O.S.; et al. The use of andiroba *Carapa guianensis* as larvicide against *Aedes albopictus*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.20, p.456-457, 2004.

SILVA, I. G.; ZANON, V. O. M.; SILVA, H. H. G. Larvicidal activity of *Copaifera reticulata* ducke oil-resin against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v.32, n.4, p.729-732, 2003.

VALLADARES, G.; et al. Laboratory evaluation of *Melia azedarach* (Meliaceae) extracts against the Elm Leaf Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal Economic Entomology**, v.90, n.3, p.747-750, 1997.

VALOTTO, C.F.B.; et al. Alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pelo tanino catéquico isolado da planta do cerrado *Magonia pubescens* (Sapindaceae). **Revista de Patologia Tropical**, v.39, n.4, p.309-321, 2010.

VIEGAS JUNIOR, C. Terpenes with insecticidal activity: an alternative to chemical control of insects. **Química Nova**, v.26, p.390-400, 2003.

YU, M. J.; BEYENBACH, K. W. Effects of leucokinin-VIII on *Aedes* Malpighian tubule segments lacking stellate cells. **Journal of Experimental Biology**, v.207, p.519-526, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. **Technical Report Series**, n.443, 1970.

WU, D. S.; BEYENBACH, K. W. The dependence of electrical transport pathways in Malpighian tubules on ATP. **Journal of Experimental Biology**, v.206, p.233-243, 2003.

## 6 CAPÍTULO 3

### AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS DE LARVAS DE *Aedes aegypti* SUBMETIDAS A TRATAMENTO COM PRODUTO FORMULADO DE ÓLEOS E EXTRATO FERMENTADO BACTERIANO.

Sandra Maria de Torres<sup>1</sup>, Rafael J.R. Padilha<sup>2</sup>, Fábio A. Brayner<sup>2</sup>, Lêucio Câmara Alves<sup>3</sup>, Valdemiro Amaro da Silva Júnior<sup>1</sup>.

#### RESUMO

Os produtos bioativos têm sido utilizados contra larvas de *Aedes aegypti*. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações ultraestruturais de larvas de *Aedes aegypti* submetidas a tratamento com produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya*. O ensaio larvicida foi realizado com larvas de 3º estágio de *A. aegypti*, em triplicata (n=900) durante 24h. Os grupos experimentais foram: grupo G1 (50% do produto formulado de óleos e extrato fermentado), grupo G2 (25%); grupo G3 (12,5%); controles positivos com larvicida industrial (*Bacillus thuringiensis* variedade *israelensis*) nas concentrações de 0,37ppm (CP1); 0,06ppm (CP2); controle negativo com água (CN1); dimetil sulfoxido (CN2). Ao final do período experimental foram coletados espécimes de todos os grupos para estudo ultraestrutural de varredura, sendo fixado em glutaraldeído 2,5%, pós-fixado em tetróxido de ósmio 2%. Posteriormente, todas as amostras foram processadas rotineiramente por microscopia eletrônica de varredura. As larvas tratadas com 12,5% (G3) do produto formulado de óleos e extrato fermentado mostraram enrugamento, lesão de tegumento, ruptura da cabeça e do tórax com exposição da musculatura subjacente. O produto formulado de óleos da *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* foi responsável por mudanças na cutícula e morte de larvas. Podendo ser utilizado com eficiência no controle de 3º estágio de *A. aegypti* linhagem Liverpool.

**Palavras-chave:** Tegumento; sifão respiratório; papilas anais; microscopia eletrônica de varredura.

#### ABSTRACT

The bioactive products had been used against *Aedes aegypti* larvae. The aim of this study was to evaluate the ultrastructural changes of *Aedes aegypti* larvae after treatment with an essential oils mix of the *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* and extract fermented of *Carica papaya*. The larvicid assay it was done in tree times with 3<sup>rd</sup> larvae stage of *Aedes aegypti* during 24 hours (n=900). The experimental group were divided as following: G1 group (50% of essential oils and fermented extract); G2 group (25%); G3 group (12.5%); BTI (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*)-CP1 (0.37ppm); BTI-CP2 (0.06ppm); negative control with water (CN1) and DMSO (CN2). At the end of experimental period samples were collected and fixed with 2.5% of glutaraldehyde and post-fixed with 2% of osmium tetroxide. After this, all samples were processed routinely by scanning electron microscopy. The larvae treated with 12.5% (G3) of the essential oils mix and fermented extract showed shrinkage, tegument lesion, cephalo and thorax rupture with exposition of musculature subjacent. The mix of essential oils of the *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* and extract fermented of *Carica papaya* was responsible by cuticle changes and dead observed in 3<sup>rd</sup> larvae stage of *Aedes aegypti*. According to results this mix could be efficiently used in the control 3<sup>rd</sup> larvae stage of *Aedes aegypti* var. Liverpool.

**Keywords:** *Aedes aegypti*, larvae control, essential oils, tegument.

## 6.1 INTRODUÇÃO

O *Aedes aegypti* encontrou no mundo atual condições muito favoráveis a sua rápida propagação (TAUIL, 2001) e com isto o *A. aegypti* se tornou o vetor mais importante de várias viroses e dirofilarias ao homem e aos animais (FORATTINI, 2002).

O desenvolvimento do *A. aegypti* na fase larval depende de várias alterações morfofisiológicas ocorridas no exoesqueleto durante a ecdise (CHAPMAN, 1998). A cutícula corresponde a uma estrutura rica em escleroproteínas que dá o aspecto de ligeiramente rígida que limita o crescimento, devendo ser substituída para continuidade do desenvolvimento do inseto (MERZENDORFER e ZIMMICH, 2003).

Os inseticidas reguladores do crescimento de insetos (IGR) como o diflubenzuron e o methoprene interferem na formação e muda do exoesqueleto, sendo utilizados no controle de *Culex* spp., *Aedes* spp. e *Anopheles* spp (BATRA et al., 2005).

O controle das formas larvais deste díptero é necessário e pode ser realizado com uso de larvicidas naturais, sendo uma excelente alternativa aos inseticidas sintéticos, devido à variedade de compostos ativos obtidos de fontes renováveis, assim como a rápida degradação sem acúmulo de resíduos tóxicos nos alimentos ou ambientais (ROEL, 2001; NAVARRO-SILVA et al., 2009).

Diversos autores têm relatado a ação dos extratos vegetais contra larvas de mosquitos (MEHLHORN et al., 2005; AMER e MEHLHORN, 2006; RAWANI et al., 2009). Contudo, estudos ultraestruturais da cutícula de larvas do *A. aegypti* são bastante escassos (BORGES et al., 2012). Esse tipo de estudo tem sido realizado com a finalidade de auxiliar na compreensão das diversas formas de ação dos produtos bioativos para posteriormente serem utilizados no desenvolvimento de inseticidas comerciais (GUSMÃO et al., 2002; VALOTTO et al., 2010; BORGES et al., 2012).

O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações ultraestruturais de larvas de *A. aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) submetidas a tratamento com produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya*.

## 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.2.1 Obtenção do Produto Formulado

O produto formulado de óleos e o extrato fermentado foram obtidos junto a Gued's Biotecnologia<sup>®</sup> tendo a seguinte formulação: 1% do óleo da semente da *Azadirachta indica*, 0,3% do óleo do fruto da *Melaleuca alternifolia*, 1% do óleo essencial da *Carapa guianensis* e 5% do extrato fermentado bacteriano do fruto de *Carica papaya*.

### 6.2.2 Ensaio Larvicida

O ensaio toxicológico seguiu a metodologia descrita por Jang et al. (2002), utilizando larvas de terceiro estágio, o teste foi realizado em triplicata com 300 larvas para cada grupo experimental totalizando 2100 espécimes. As larvas foram expostas às soluções por 24h, sendo monitoradas a cada hora.

Os grupos experimentais seguiram a seguinte constituição: tratados com produto formulado de óleos nas concentrações de 50% (G1), 25% (G2) e 12,5% (G3), controle positivo com larvicida industrial *Bacillus thuringiensis* variedade *israelenses* (BTI) nas concentrações de CL<sub>90</sub> 0,37ppm (CP1) e CL<sub>50</sub> 0,06ppm (CP2), controle negativo com água deionada (CN1) e dimetil sulfoxido<sup>3</sup> (CN2).

### 6.2.3 Análise Ultraestrutural

Para análise ultraestrutural de varredura (MEV) foram coletadas amostras de todos os grupos experimentais, vivas e mortas, sendo fixados *overnight* em solução fixadora de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 e pós-fixados em tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) a 2%. Posteriormente, as amostras foram submetidas à secagem pelo método do ponto crítico, metalizadas com ouro e levadas para análise em microscópio JEOL-5600LV.

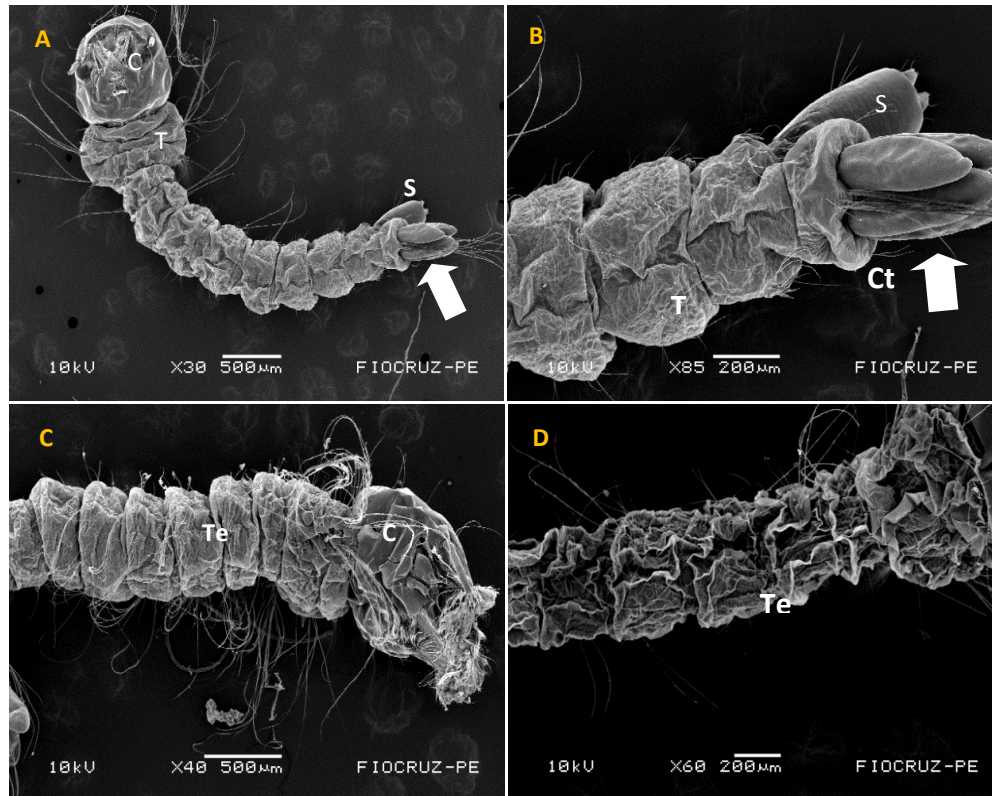
## 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise da microscopia eletrônica de varredura (MEV) de larvas de 3º estágio de *A. aegypti* dos grupos G1 e G2 tratados com o produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* apresentaram morfologia corporal e tegumentar íntegras, exceto pelo aspecto de desidratação generalizado (figuras 4).

---

<sup>3</sup> DMSO Vetec PA

Figura 4 – Eletromicrografia de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* tratadas com produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* do grupo G1 e G2. **(A)**: Observar morfologia das larvas com aspecto de desidratação da cabeça (C) e tórax (T), tegumento (Te) dos segmentos abdominais e sifão respiratório (S), porém as papilas anais (seta larga) permanecem íntegras.

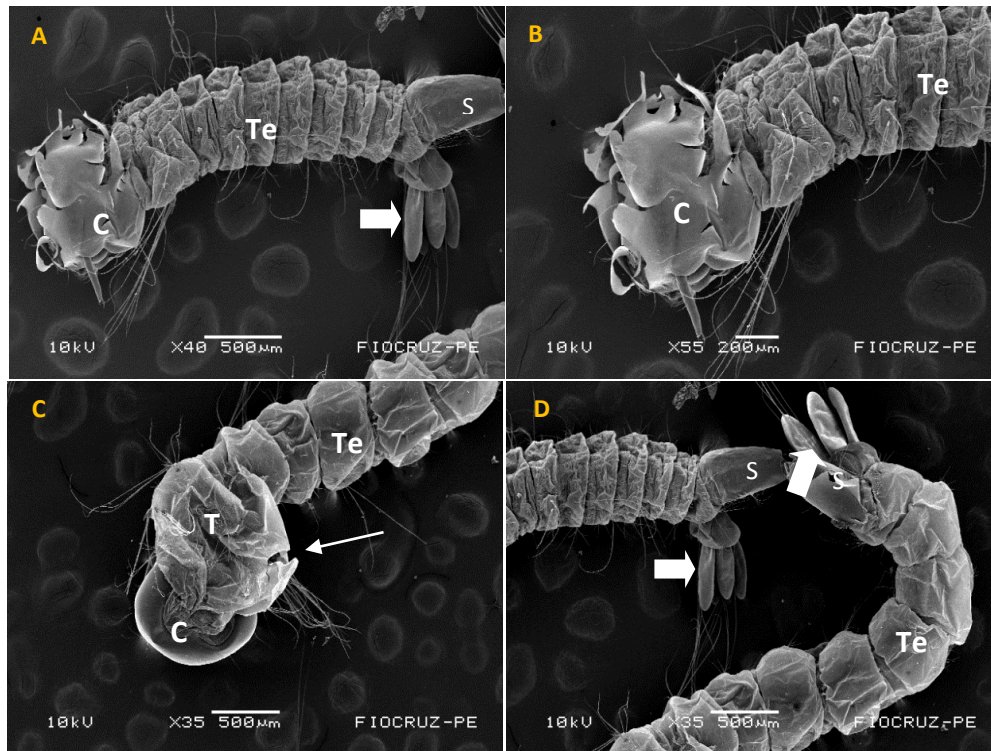


Fonte: TORRES, S. M. (2014)

O estudo ultraestrutural das larvas do grupo G3 mostra que houve ruptura da cabeça e do tórax com exposição da musculatura, além de aspecto enrugado e lesões na cutícula (Figura 5).

Pesquisas realizadas por Borges et al. (2012) com larvas de 3º estágio de *A. aegypti* utilizando o diflubenzuron mostram lesões parecidas com as encontradas neste estudo nos grupos G2 e G3, como ruptura da cápsula cefálica, mumificação, aspecto de encolhimento devido a sobreposição de cutículas (BORGES et al., 2004). Estudo utilizando óleo de *Copaifera reticulata* sobre larvas de *A. aegypti* evidenciaram os mesmos achados já descritos provocados pelas dobras da cutícula (ADEB et al. 2007).

Figura 5 – Eletromicrografia de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* tratadas com produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* do G3. Visualizar larva com cabeça (C) e do tórax (T) rompido acarretando exposição da musculatura subjacente, no tegumento (Te) se observar algumas lesões focais (seta fina) no tórax, mas as papilas anais (seta larga) e o sifão respiratório (S) têm sua morfologia preservada.

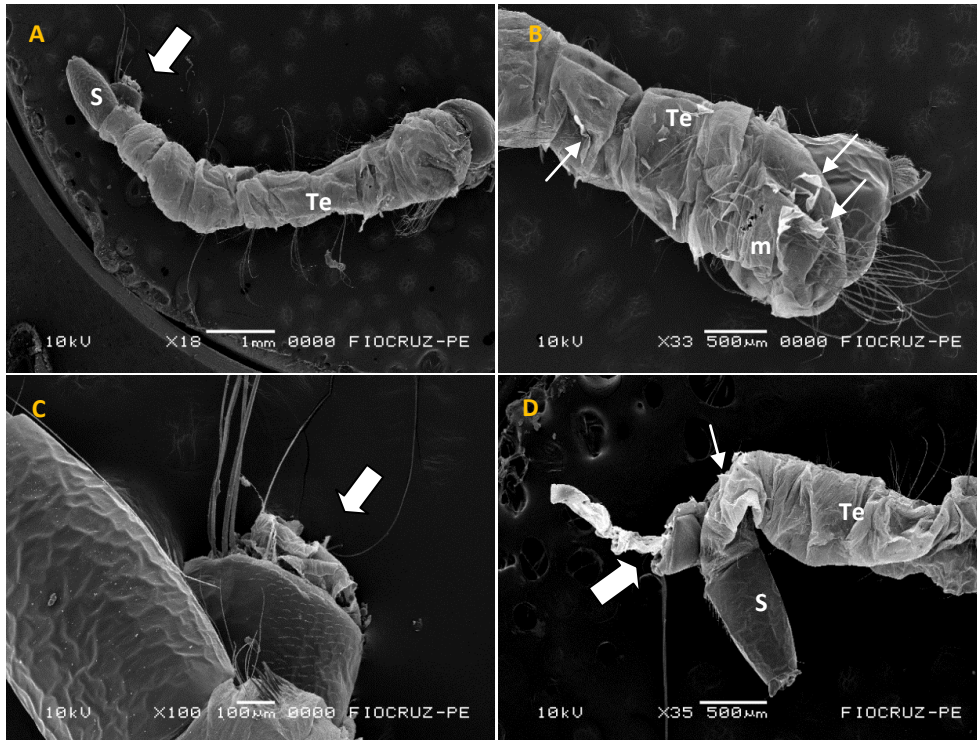


Fonte: TORRES, S. M. (2014).

As lesões nos grupos CP1 e CP2 são visualizadas na figura 6. Em ambos os grupos houve lesão extensa na cutícula de todo o segmento abdominal da larva, ocasionando exposição da musculatura subjacente. Na região anal observa-se ausência das papilas anais, com prolapso de túbulos de Malpighi, porém, sem alteração no sifão respiratório. Estruturalmente a ação do BTI tem sido estudada apenas com foco no tubo digestório e as alterações causadas por suas endotoxinas na formação de cristais (REGIS et al., 2001; GOMEZ et al., 2011). No entanto, em nenhum estudo foi mostrado às lesões ocasionadas pelo BTI na cutícula mostrando que ele não causa apenas danos internos, sendo este relatado pela primeira vez.

Figura 6 – Eletromicrografia de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* tratadas com BTI CL<sub>90</sub> 0,37ppm (CP1) e CL<sub>50</sub> 0,06ppm (CP2). Visibilizar no tegumento (Te) lesões multifocais com descamação da camada superficial (seta fina) e exposição da musculatura (m) subjacente no tórax. Na região anal pode ser observada perda das papilas anais (seta larga) com prolapso dos Túbulos de Malpighi e integridade morfológica do sifão respiratório (S).





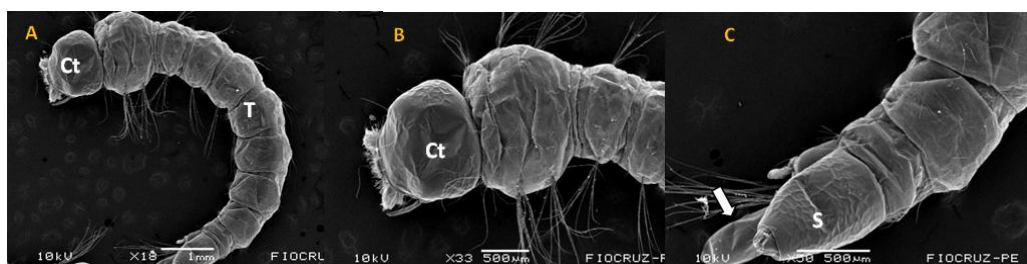
Fonte: TORRES, S. M. (2014)

As larvas do grupo controle negativo podem ser visualizadas na figura 7. Nela são visualizados aspectos normais de tegumento e de estruturas externas das larvas de *A. aegypti*. Em CN1 e CN2, observam-se larvas com segmentos abdominais íntegros, ausência de lesão tegumentar, preservação de papilas anais e sifão respiratório.

Figura 7 – Eletromicrografia de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* do grupo CN1 e CN2.

**(A-C):** Larva com cabeça (C) e tórax (T), tegumento (T) e segmentos abdominais íntegros, com preservação das papilas anais (seta larga) e do sifão respiratório (S).

Fonte: TORRES, S. M. (2014)



Barreto et al. (2006) estudaram o extrato da *Sapindus saponaria* sobre larvas de *A. aegypti* e verificaram que o extrato ocasionou o encolhimento das larvas com formação de grandes dobras de cutícula, promovendo um escurecimento pela sobreposição das cutículas dos segmentos abdominais.

Salvador (2002) também visualizou escurecimento abdominal e diminuição em até 50% no comprimento das larvas de *A. aegypti* tratadas com temephos. Larvas do

mesmo mosquito expostas ao inibidor do crescimento diflubezuron também tiveram redução do tamanho e aspecto morfológico alterado devido ao acúmulo de mudas incompletas (BORGES et al., 2004). O aspecto de enrugamento observado nos grupos tratados com o composto (G1, G2 e G3) são semelhantes aos achados descritos nos trabalhos acima.

A associação dos óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* promovem alterações ultraestruturais na cutícula de larvas 3º estágio de *A. aegypti* linhagem Liverpool pode ser uma boa alternativa para uso como larvicida. No entanto, são necessários mais estudos utilizando populações de campo e diferentes estádios larvais de *Aedes aegypti*.



## REFERÊNCIA

- ABED, R.A.; et al. Alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pela atividade larvicida do óleo-resina da planta medicinal *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae). **Revista de Patologia Tropical**, v.36, p.87-95, 2007.
- AMER, A.; MEHLHORN, H. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v.99, p.466–472, 2006.
- BARRETO, C.F.; et al. Estudos das alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindus saponaria* Lin (Sapindaceae). **Revista de Patologia Tropical**, v.35, p.37-57, 2006.
- BATRA, C.P.; et al. Efficacy of IGR compound Starycide 480 SC (Triflumuron) against mosquito larvae in clear and polluted water. **Journal of Vector Borne Diseases**, v.42, p.109-116, 2005.
- BORGES, R.A.; et al. Mortalidade e alterações morfológicas provocadas pela ação inibidora do diflubenzuron na ecdise de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista de Patologia Tropical**, v.33, p.91-105, 2004.
- BORGES, R.A.; et al. Mecanismos da ação larvicida do diflubenzuron sobre *Aedes aegypti* evidenciados pelas alterações ultraestruturais. **Revista de Patologia Tropical**, v.41, n.2, p.222-232, 2012.
- CHAPMAN, R.F. **The Insects - Structure and Function**. American Elsevier Publishing Company Inc., p.770, 1998.
- FORANTTINI, O.P. **Culicidologia Médica: identificação, biologia, epidemiologia**. 2ª edição, São Paulo: Edusp, 864p, 2002.
- GÓMEZ, A.; et al. Comparison of the insecticide susceptibilities of laboratory strains of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.106, n.8, p. 993-996, 2011.
- GUSMÃO, D.S.; et al. Derris (*Lonchocarpus*) urucu (Leguminosae) extract modifies the peritrophic matrix structure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.371-375, 2002.
- JANG, Y.S.; et al. Larvicidal activity of Brazilian plant against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) **Agricultural Chemical Biotechnology**, v.4, p.131-134, 2002.
- MEHLHORN, H.; SCHMAHL, G.; SCHMID T, J. Extract of the seeds of the plant *Vitex agnus castus* proven to be highly efficacious as a repellent against ticks, fleas, mosquitoes and biting flies. **Parasitology Research**, v.95, n.5, p.363-365, 2005.
- MERZENDORFER, H.; ZIMMICH, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **The Journal of Experimental Biology**, v.206, p.4393–4412, 2003.
- NAVARRO-SILVA, M. A.; MARQUES, F. A.; DUQUE, J. E. L. Review of semiochemicals that mediate the oviposition of mosquitoes: a possible sustainable tool

for the control and monitoring of Culicidae. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.53, n.1, p.1-6, 2009.

RAWANI, A.; et al. Larvicidal activities of three plants against filarial vector *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v.105, p.1411-1417, 2009.

REGIS, L.; et al. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. **Trends in Parasitology**, v.17, n.8, 2001.

ROEL, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. Universidade Católica Dom Bosco. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, v.1, p.43-50, 2001.

SALVADOR, Z.L. Avaliação morfohistológica de larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao Temephos. **(Dissertação de Mestrado) Universidade Federal de Goiás (UFG, GO), Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas**, 2002.

TAUIL, P.L. Urbanização e ecologia do dengue. **Caderno de Saúde Pública**, v.17, p.99-102, 2001.

VALOTTO, C.F.B.; et al. Alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pelo tanino catéquito isolado da planta do cerrado *Magonia pubescens* (Sapindaceae). **Revista de Patologia Tropical**, v.39, n.4, p.309-321, 2010.

## 7 CAPITULO 4

### **ATIVIDADE DE REPELÊNCIA DO PRODUTO FORMULADO DE ÓLEOS DE *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).**

Sandra Maria de Torres<sup>1</sup>, Nadine Louise Nicolau da Cruz<sup>2</sup>, Vitor Pereira Matos Rolim<sup>2</sup>, Maria Inês de Assis Cavalcanti<sup>2</sup>, Gilcia Aparecida de Carvalho Silva<sup>2</sup>, Lêucio Câmara Alves<sup>2</sup>, Valdemiro Amaro da Silva Júnior<sup>1</sup>.

#### **Resumo**

Os óleos essenciais utilizados como repelentes possuem maior atividade e tempo de ação mais duradouro quando comparado aos produtos sintéticos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade de repelência do produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* sobre *Aedes aegypti* linhagem Liverpool. O ensaio foi realizado com três voluntários humanos, os quais expuseram uma área de 2cm<sup>2</sup> na falange média dos dedos. Neste local foi aplicado 10µL do produto formulado nas concentrações de 100% (C1), 50% (C2) e 25% (C3), controle positivo com repelente industrial (CP1), controle negativo com água destilada (CN1). O período de avaliação foi iniciado imediatamente após aplicação (tempo zero) e o poder residual no tempo de 2h e 4h. O ensaio com repelente industrial foi significativo em relação ao CN1 no tempo zero e duas horas pós-tratamento. O tratamento com 50% do produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* teve melhor ação (75%) no tempo zero, quando comparado com outros grupos. Duas e quatro horas após a aplicação, não houve diferença significativa entre os grupos tratados com diferentes concentrações do produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* contra *Aedes aegypti* linhagem Liverpool. Portanto, neste trabalho verificou-se a baixa atividade repelente do produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* sobre adultos de *A. aegypti* linhagem Liverpool.

**Palavras-chave:** Repelente; Tempo residual; *Aedes aegypti*; Óleos essenciais.

#### **Abstract**

Essential oils used like repellents have more activity and life span when compared with synthetic products. The aim of this study was to evaluate the repellent activity of essential oils mix of the *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* and extract fermented of *Carica papaya* against *Aedes aegypti* var. Liverpool. The assay was done with three human volunteers who left exposed a 2cm<sup>2</sup> area of middle phalanx of the fingers. On this place it was applied 10µL of the 100% of essential oils and fermented extract (C1); C2 (50%); C3 (25%); positive control with industrial repellent (CP1) and negative control with water (CN1). The evaluation period was started immediately after application (time zero) and residual power with 2 and 4 hours.

The assay with industrial repellent was significant when compared with CN1 at time zero and two hours. The treatment using 50% essential oils mix of the *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* and extract fermented of *Carica papaya* had better action (75%) in the time zero when compared with another groups. Two and four hours after application there was no difference between groups treated with different concentration of essential oils mix of the *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* and extract fermented of *Carica papaya* against *Aedes aegypti* var. Liverpool.

**Keyword:** Repellent, Residual time; *Aedes aegypti*; essential oils.

## 7.1 INTRODUÇÃO

O *Aedes aegypti* é o vetor carreador de vários agentes patogênicos ao homem e a outros animais, principalmente viroses e dirofilarioses (FORATTINI, 2002; GUBLER 2002). As substâncias com ação repelente inibem o comportamento dos mosquitos na busca do hospedeiro (GLEISER et al., 2011).

O DEET (N, N-dietil-3-metilbenzamida) é o repelente sintético mais utilizado e nenhum derivado de plantas testado até o momento demonstrou eficácia e duração semelhante a esse produto (MIOT et al., 2004; RAJAN, 2005; VALEIRO E MAROLI, 2005).

Os repelentes naturais são atóxicos, de fácil degradação, biodegradável e comparado aos sintéticos são mais seguro para o ser humano, porém sua atividade repelente dura um curto período (DIOGENES E MATOS, 1999).

Os produtos bioativos de plantas são uma alternativa aos repelentes sintéticos. Estudos destes com ação repelente contra mosquito são crescentes (GLEISER e ZYGADLO, 2009) e em diversos casos, o tempo de ação repelente dos óleos essenciais é mais duradouro comparado aos químicos sintéticos ou sua atividade de repelência é maior (MOORE et al 2002; OMOLO et al., 2004).

Este trabalho tem por objetivo verificar a atividade de repelência do produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).

## 7.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 7.2.1 Obtenção do Produto Formulado

O produto formulado de óleos e extrato fermentado foi obtido junto a Gued's Biotecnologia® tendo a seguinte formulação: óleo da semente da *Azadirachta indica*

1%, óleo do fruto da *Melaleuca alternifolia* 0,3%, óleo essencial da *Carapa guianensis* 1% e extrato fermentado do fruto de *Carica papaya* 5%.

### 7.2.2 Criação de *Aedes aegypti*

Os espécimes de *Aedes aegypti* linhagem Liverpool foram obtidas a partir de colônias já existente no Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP) dos Animais Domésticos da UFRPE. A manutenção das colônias foi feita em sala climatizada com temperatura de  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa do ar de  $80\pm 5\%$  e ciclo natural de fotoperíodo.

Foram utilizados 3600 indivíduos adultos distribuídos em três gaiolas, com 900 fêmeas cada, com até uma semana de vida. Estes espécimes nunca tinham sido alimentadas com sangue, mas apenas solução açucarada 10% e colocadas em uma gaiola (35x35x35cm) revestida com tela de mosquiteiro e a parte superior com vidro para melhor visualização.

### 7.2.3 Ensaio de repelência

O ensaio de repelência seguiu adaptações ao método de Soares et al. (2010), no qual utilizou-se três voluntários humanos, que calçaram uma luvas de látex na mão esquerda, preparadas de forma a expor apenas a área de  $2\text{cm}^2$  na falange média dos dedos. Em cada dedo foi aplicado  $10\mu\text{L}$  de cada produto teste.

O ensaio foi realizado entre 10:00 e 14:00h, horário mais quente do dia, em uma sala de experimentação com temperatura de  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de  $70\pm 10\%$ . Os mosquitos foram mantidos em jejum por 24h antes do experimento.

Os grupos experimentais foram: dedo polegar controle positivo com repelente industrial<sup>4</sup> (CP1), dedo indicador controle negativo com água destilada (CN1), dedo médio tratado com produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* na concentração de 100% (G1), dedo anelar tratado com produto formulado na concentração de 50% (G2) e dedo mínimo tratado com o produto formulado na concentração de 25% (G3).

Após a aplicação na área de todos os dedos foi iniciado imediatamente o teste de repelência sendo este o tempo zero, estimou-se também o poder residual no tempo de duas horas e quatro horas após a aplicação dos produtos testados sem

---

<sup>4</sup> Autan® (DEET)

reaplicações. Em todos os tempos seguiu-se o método de permanência da mão na gaiola por 5min e contabilizar a quantidade de fêmeas que pousarem na área tratada e tentarem picar. Terminado o tempo a mão foi removida da gaiola e permaneceu imóvel aguardando o próximo tempo de testes.

#### 7.2.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos através da estatística descritiva de tendência de centralidade e dispersão (média e desvio padrão) seguindo uma distribuição não Gaussiana através do teste de Mann-Whitney ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com post-hoc de Dunn. O tratamento estatístico foi delineado com nível de significância para  $p < 0,05$ .

### 7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio de repelência realizado em adultos de *A. aegypti* com até uma semana de idade utilizando o DEET e o produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* em diferentes concentrações são apresentados na tabela 1.

Tabela 3: Quantidade de pousos de adultos de *Aedes aegypti* durante 4h de observação numa superfície tratada com produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* em diferentes concentrações (média  $\pm$  desvio).

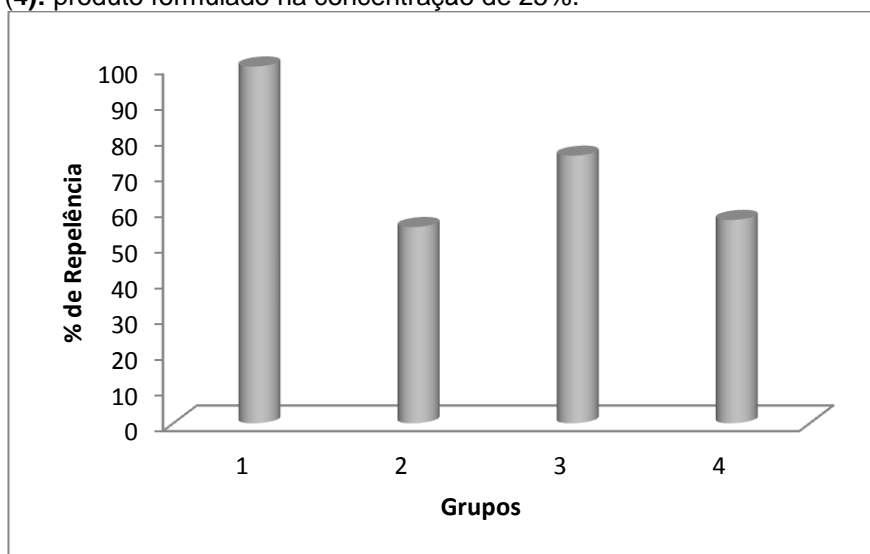
Tempo (h)	Grupos experimentais		
	CP1	CN1	G1
0	0,0 $\pm$ 0,0a	51,0 $\pm$ 18,5b	23,7 $\pm$ 14,1ab
2	8,3 $\pm$ 10,2a	77,7 $\pm$ 5,9b	51,3 $\pm$ 13,6ab
4	33,0 $\pm$ 16,1	58,3 $\pm$ 29,0	46,3 $\pm$ 17,9
Tempo (h)	G2	G3	P
0	13,3 $\pm$ 9,1ab	22,3 $\pm$ 8,4ab	0,0299
2	45,7 $\pm$ 6,3ab	45,0 $\pm$ 25,1ab	0,0400
4	55,7 $\pm$ 11,0	46,7 $\pm$ 21,4	0,4936

Fonte: TORRES, S. M. (2014)

CP1: controle positivo DEET; CN1: Controle negativo água; G1: Tratado com produto formulado 100%; G2: Tratado com produto formulado 50%; G3: Tratado com o produto formulado 25%. P: significância  $< 0,05$

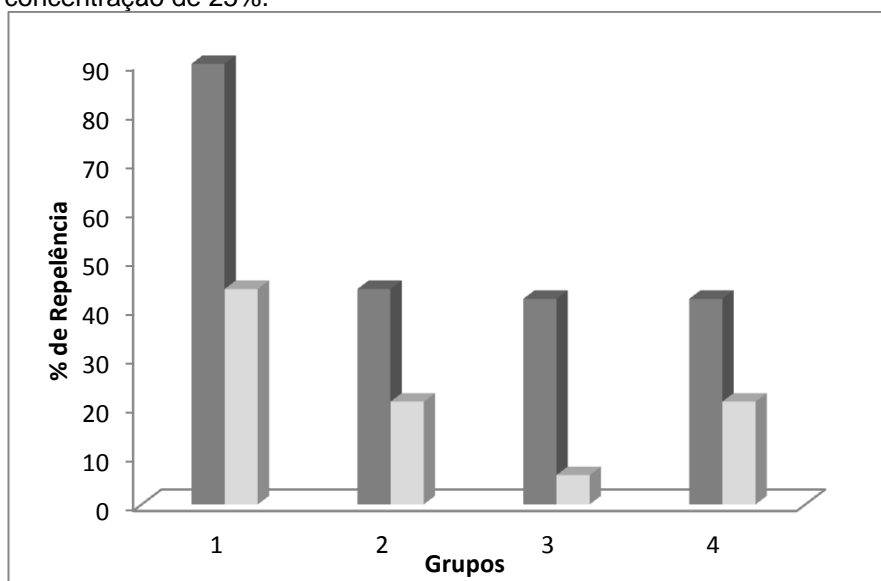
Nos ensaios de repelência pode ser observado que o grupo CP1 no tempo zero e 2h (Figura 1) teve resultado significativo com  $p < 0,05$  em relação ao controle. Dentre os grupos tratados com o composto na concentração de 50% no tempo inicial (zero hora) teve a tendência de melhor ação com 75% de repelência quando comparado aos demais grupos tratados no mesmo tempo, porém sem diferença significativa.

Figura 7 – Percentual de repelência dos grupos tratados no tempo zero. **(1):** CP1 **(2):** produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* na concentração de 100%; **(3):** produto formulado na concentração de 50% e **(4):** produto formulado na concentração de 25%.



Após 2h e 4h de aplicação não houve diferença significativa com  $p > 0,05$  entre os grupos tratados com o produto formulado (Figura 2). Observando todos os tempos nos grupos tratados com o produto formulado G1, G2 e G3 o número de pousos não superou em nenhum momento o CN1, tendo apenas uma aproximação do G2 após 4h de aplicação em relação ao CN1, porém não houve significância do CN1 em relação aos tratados com o produto formulado.

Figura 8 – Percentual de repelência dos grupos tratados nos tempos 2h (cinza escuro) e 4h (cinza claro) **1:** CP1; **2:** produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* na concentração de 100%; **3:** produto formulado na concentração de 50% e **4:** produto formulado na concentração de 25%.



Fonte: TORRES, S. M. (2014).

Os óleos e o extrato fermentado utilizado neste trabalho são pouco estudados com atividade repelente sobre *Aedes aegypti*. Nas pesquisas os produtos bioativos de cada planta são estudados separadamente, exceto o óleo de citronela que é o princípio ativo mais utilizado nas associações com produtos de atividade repelente comprovada ou não (THAVARA et al., 2002).

A *Azadirachta indica* possui atividade de repelência sobre diversos artrópodes, sendo uma alternativa ao controle de mosquitos (FRADIN e DAY, 2002; PRABHU et al., 2011). O seu uso tópico pode irritar a pele se utilizado sem diluição, mesmo tendo baixa toxicidade (REUTEMANN e EHRLICH, 2008).

Ribas e Carreño (2010) utilizaram a associação em partes iguais do repelente natural de óleo de andiroba, óleo de copaíba e óleo Johnson e obtiveram 85,7% de repelência.

Diversas espécies de plantas possuem comprovadamente atividade repelente contra mosquitos com tempo de ação de 2 a 30 minutos, dentre elas há citronela (*Melissa officinalis*), cedro (*Cedrus*), eucalipto (*Eucalyptus*), pimenta (*Pimenta*), limão (*Citrus*), geranio (*Geranium*), andiroba (*Carapa*), melisa (*Melissa*) e grão de soja (*Glycine*) (FRADIN e DAY 2002; MAROLI e KHOURY, 2004). O tempo de ação do azeite de soja pode chegar até 90 minutos (TAWATSIN et al., 2001; KATZ et al., 2008).

Estudo realizado por Mandal (2011) verificaram a atividade repelente do óleo essencial da *A. indica* nas concentrações de 50% e 100% sobre *Culex quinquefasciatus* e obteve-se 90,26% e 88,83% de proteção por até 4h.

O óleo de *C. guianensis* foi avaliado quanto à atividade de repelência na concentração de 100% e emulsão de 15% e como resultado foi visto que houve uma discreta atividade do óleo 100% em relação ao controle e significativamente inferior em relação aos tratados com DEET (MIOT et al., 2004).

Noosidum et al. (2008), observaram que o óleo da *Melaleuca leucadredron* possui atividade repelente sobre o *A. aegypti*, porém causou irritação da pele. No entanto, ao associar o óleo da citronela ao óleo da *Melaleuca* na concentração de 5% a ação repelente contra várias espécies de *Culex* chega a 3h de atividade (THAVARA et al., 2002).

A formulação do produto estudado entre os três óleos utilizados e o extrato houve uma baixa ação de repelência contra *A. aegypti*, visto que após 2h a atividade repelente ficou abaixo dos 50%. Não sendo indicada esta associação para uso como repelente nas condições empregadas.

As substâncias consideradas repelente possuem alta eficácia, além de exercer efeito de proteção prolongada, durante 8 horas ou mais, contra todos os artrópodes:



voadores (*Aedes*, *Anopheles*, pernilongo), carrapatos, barbeiro, pulga, ácaros, entre outros (RIBAS e CARREÑO, 2010).

A atividade repelente do CP1 foi significativa com  $p < 0,05$  em relação ao CN1 nas duas primeiras horas, porém passado este período o produto perde sua ação. O modo de ação do DEET foi estudado por Corbel et al. (2009) e eles sugerem que as grandes quantidades deste princípio químico afetam a função de receptores olfativos dos insetos (ROI) e acetilcolinesterase (AchE). Estes receptores são encontrados na membrana dos dendritos dos neurônios olfatórios (MDNO), sendo os mesmos responsáveis pela ativação da transdução dos sinais olfativos desencadeando um potencial de ação para o cérebro (KAUPP, 2010; MAIA e MOORE, 2010).

Acredita-se que os bioativos com ação repelente atuam como agonistas ou antagonistas de ROI ou MDNO de acordo com a presença ou ausência da solução odorizante (DITZEN et al, 2008; LIU et al. 2010).

No estudo realizado neste trabalho verificou-se o antagonismo dos componentes do produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya*, pois isoladamente esses possuem atividade de repelência. Portanto, o produto formulado tem baixa atividade repelente sobre adultos de *Aedes aegypti* linhagem Liverpool, não sendo recomendada esta associação. Porém, mais estudos são necessários para verificar a eficácia deste produto formulado em populações de campo.

## REFERÊNCIAS

- CHEN, W.Y.; KO, F.N.; WU, Y.C.; LU, S.T.; TENG, C.M. Vasorelaxing effect in rat thoracic aorta caused by laurotetanine isolated from *Litsea cubeba* Persoon. **Journal of the Pharmacology**. v.46, p.380-382, 1994.
- CORBEL, V.; STANKIEWICZ, M.; PENNETIER, C.; FOURNIER, D.; STOJAN, J.; GIRARD, E.; DIMITROV, M.; MOLGO, J.; HOUGARD, J.M.; LAPIED, B. Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet. **BMC Biology**. v.7, p.47, 2009.
- DIOGENES MJ, MATOS FJ. Dermatite de contato por plantas (DCP). **Anais Brasileiro de Dermatologia**. v.74, p.629-34, 1999.
- DITZEN, M.; PELLEGRINO, M.; VOSSHALL, L.B. Insect odorant receptors are molecular targets of the insect repellent DEET. **Science**. v.319, n.5869, p.1471, 2008.
- FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica: Identificação, biologia, epidemiologia**. 2ª edição, São Paulo: Ed. Universidade de São Paulo, 2002.
- FRADIN, M.; DAY, J. Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. **The New England Journal of Medicine**. v.347, p.13-18, 2002.
- GLEISER, R.M.; ZYGADLO, J.A. Essential oils as potential bioactive compounds against mosquitoes. In: **Imperato F (ed) Recent advances in phytochemistry**. Research Signpost, Kerala, p.53-76, 2009.
- GLEISER, R.M.; BONINO, M.A.; ZYGADLO, J.A. Repellence of essential oils of aromatic plants growing in Argentina against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**. v.108, p.69-78, 2011.
- GUBLER, D.J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives of Medicine Research**. v.33, p.330-342, 2002.
- KATZ, T.M.; MILLER, J.H.; HEBERT, A.A. Insect repellents: Historical perspectives and new developments. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v.58, p.865-871, 2008.
- KAUPP, U.B. Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities. **Nature Reviews Neuroscience**. v.11, p.188–200, 2010.
- LIU, C.; PITTS, R.J.; BOHBOT, J.D.; JONES, P.L.; WANG, G.; ZWIEBEL, L.J. Distinct olfactory signalling mechanisms in the malária vector mosquito *Anopheles gambiae*. **PLoS Biology**. v.8, e1000467, 2010.
- MAIA, M.F.; MOORE, S. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. **Malaria Journal**. v. 10, n.1, p.S11, 2010.
- MANDAL, S. Repellent activity of Eucalyptus and *Azadirachta indica* seed oil against the filarial mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) in India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. S109-S112, 2011.
- MAROLI, M.; KHOURY, C. Prevention and control of leishmaniasis vector: current approaches. **Parassitologia**. v.46, p.211-215, 2004.

MIOT, H.A.; BATISTELLA, R.F.; BATISTA, K.D.E.A; VOLPATO, D.E.; AUGUSTO, L.S.; MADEIRA, N.G.; et al. Comparative study of the topical effectiveness of the andiroba oil (*Carapa guianensis*) and Deet 50% as repellent for aedes sp. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.46, p.253-6, 2004.

MOORE, S.J.; LENGLET, A.; HILL, N. Field evaluation of three plant-based insect repellents against malaria vectors in Vaca Diez Province, the Bolivian Amazon. **Journal of the American Mosquito Control Association**. v.18, p.107-110, 2002.

NOOSIDUM, A.; PRABARIPAI, A.; CHAREONVIRIYAPHAP, T.; CHANDRAPATYA, A. Excito-repellency properties of essential oils from *Melaleuca leucadendron* L., *Litsea cubeba* (Lour.) Persoon, and *Litsea salicifolia* (Nees) on *Aedes aegypti* (L.) mosquitoes. **Journal of Vector Ecology**. v.33, n.2, p.305-312, 2008.

OMOLO, M.O.; OKINYO, D.; NDIEGE, I.O.; LWANDE, W. HASSANALI, A. Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. **Phytochemistry**. v.65, p.2797-2802, 2004.

PRABHU, K.; MURUGAN, K.; NARESHKUMAR, A.; RAMASUBRAMANIAN, N.; BRAGADEESWARAN, S. Larvicidal and repellent potential of *Moringa oleifera* against dengue vector, *Anopheles stephensi* Liston (Insecta: Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v.1, p.127-32, 2011.

RAJAN, T.V. A double-blinded, placebo-controlled trial of garlic as mosquito repellent; a preliminary study. *Journal of Medicinal Veterinary and Entomology*. 2005;19:84-9.

REUTEMANN P, EHRLICH A. Neem oil: an herbal therapy for alopecia causes dermatites. **Dermatitis**. v.19, n.3, p.E12-5, 2008.

RIBAS, J.; CARREÑO, A.M. Avaliação do uso de repelentes contra picada de mosquitos em militares na Bacia Amazônica. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. v.85, n.1, p.33-8, 2010.

SOARES, S.F.; BRAGA, R.S.; FERREIRA, L.L.; LOULY, C.C.B.; SOUZA, L.A.D.; SILVA, A.C.; BORGES, L.M.F. Repellent activity of DEET against *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) nymphs submitted to different laboratory bioassays. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.19, n.1, p.12-16, 2010.

THAVARA, U.; TAWATSIN, A.; CHOMPOOSRI, J. Phytochemicals as Repellents against Mosquitoes in Thailand. **Proceedings International Conference on Biopesticide**. v.3, n.21-26, p. 244-250, 2002.

TAWATSIN, A.; WRATTEN, S.D.; SCOTT, R.R.; THAVARA, U.; TECHADAMRONGSIN, Y. Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. **Journal of Vector Ecology**. v.26, p.76-82, 2001.

VALERIO, L.; MAROLI, M. Evaluation of repellent and anti-feeding effect of garlic oil (*Allium sativum*) against the bite of phlebotomine sandflies diptera: psychodidae. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**. v.41, p.253-6, 2005.

## 8 CAPÍTULO 5

### **AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA DO PRODUTO FORMULADO DE ÓLEOS DE *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* E EXTRATO FERMENTADO DE *Carica papaya* SOBRE ADULTOS DE *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE).**

Sandra Maria de Torres<sup>1</sup>, Nadine Louise Nicolau da Cruz<sup>2</sup>, Vitor Pereira Matos Rolim<sup>2</sup>, Maria Inês de Assis Cavalcanti<sup>2</sup>, Lêucio Câmara Alves<sup>2</sup>, Valdemiro Amaro da Silva Júnior<sup>1</sup>.

#### **Resumo**

Medidas de controle para o *Aedes aegypti* vêm sendo estudadas, merecendo destaque o controle biológico com o *Bacillus thuringiensis* variedade *israelensis* (Bti). Contudo, tem aumentado o interesse por substâncias de origem vegetal como alternativa para esse controle. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* sobre adultos de *A. aegypti*. O teste de eficácia do inseticida foi realizado em triplicata com 600 adultos para cada grupo experimental utilizando indivíduos com até uma semana de vida, os quais foram borrifados com spray de 670µL do produto e monitorados a cada seis horas num período de 24h de exposição. Os grupos foram subdivididos em: tratado com produto formulado de óleos e extrato fermentado nas concentrações de 100% (G1), 50% (G2), 25% (G3), 12,5% (G4), controle negativo com água destilada (CN) e o controle positivo com produto industrial (CP). No final do período do estudo, foi observado mortalidade de 100% dos adultos do CP. Enquanto, nos grupos tratados G1, G2, G3 e G4 foram visualizados mortalidade de 81%, 76%, 89% e 78% respectivamente e no CN houve 4,7% de mortos ao final das 24 horas de exposição. A associação entre os óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e o extrato fermentado de *Carica papaya* pode ser um método alternativo no controle de *A. aegypti*, particularmente na concentração de 25%.

**Palavras-chave:** Inseticida natural; *Aedes aegypti*; Óleos voláteis; Extrato fermentado bacteriano.

#### **Abstract**

Measures to control *Aedes aegypti* have been studied, with emphasis biological control with *Bacillus thuringiensis* variedade *israelensis* (Bti). However, there has been increasing interest in plant substances as an alternative for this control. The aim of this study was to evaluate the efficacy of the compound of essential oils of *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *carapa guianensis* and fermented extract of *Carica papaya* on adults of *A. aegypti*. The test effectiveness of the insecticide was performed in triplicate with 600 adult forms for each experimental group using adults up to a week old, which were monitored every six hours over a period of 24 h exposure. The groups were subdivided into: treated with compound of essential oils and fermented extract at a concentration of 100% (G1), 50% (G2), 25% (G3), 12.5% (G4), negative control with distilled water (CN) and the positive control with industrial product (CP). At the end of the study period, 100% mortality of adult CP was observed. While , in the treated groups G1, G2, G3 and G4 mortality of 81%, 76%, 89% and 78% respectively were

visualized and CN was 4.7% of deaths at 24 hours of exposure. The association between the essential oils of *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* and fermented extract of *Carica papaya* can be an alternative method to control *A. aegypti*, particularly at a concentration of 25%.

**Key-words:** Natural insecticide; *Aedes aegypti*, oils volatile; Extract fermented bacterial.

## 8.1 INTRODUÇÃO

O controle integrado dos insetos vetores possui algumas restrições, devido ao uso de DEET (N,N-dietil-3-metilbenzamida) contribuir para a poluição ambiental e relativa toxicidade ao ser humano (CARVALHO e SILVA, 2000; FORATTINI, 2002).

As plantas com atividade biológica são as principais fontes compostos químicos com potencial para interações com sistemas biológicos (MACIAS et al., 2008). A *Azadirachta indica* possui vários compostos com ação inseticida e, a azadiractina, obtida de suas sementes, age sobre o funcionamento das glândulas endócrinas controladoras da metamorfose nos insetos, além da propriedade fagoinibidora (VIEGAS-JUNIOR, 2003; NEVES, 2004).

A andirobina presente na *Carapa guianensis* ocasiona apoptose do intestino das larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus* acarretando morte delas poucas horas após ingestão (SILVA et al., 2006).

O extrato da semente da *Carica papaya* tem sido utilizado com efeito inseticida em *Spodoptera frugiperda* ocasionando níveis elevados de mortalidade larval (FRANCO-ARCHUNDIA et al., 2006). Esse extrato também tem sido alvo de estudos com ação moluscicida e antiparasitário em peixes (EKANEM et al., 2004).

Este trabalho objetiva avaliar a eficácia do produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* sobre adultos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).

## 8.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 8.2.1 Obtenção do produto Formulado

O produto formulado de óleos e o extrato fermentado foram obtidos junto a Gued's Biotecnologia® tendo a seguinte formulação: 1% do óleo da semente da *Azadirachta indica*, 0,3% do óleo do fruto da *Melaleuca alternifolia*, 1% do óleo essencial da *Carapa guianensis* e 5% do extrato fermentado do fruto de *Carica papaya*.

### 8.2.2 Ensaio Adulticida

O ensaio adulticida seguiu a metodologia descrita por Govindarajan e Sivakuma (2012), utilizando adultos de *A. aegypti* com até 5 dias de idade, alimentados apenas com solução açucarada a 10% e alocados em gaiolas teladas com dimensão de 35x35x35cm. O teste foi realizado em triplicata com 600 indivíduos para cada grupo experimental, totalizando 10.800 mosquitos, os quais foram borrifados com 670 $\mu$ L de acordo com o grupo teste e expostos por 24h, sendo monitoradas a cada seis horas. Durante toda a fase experimental a temperatura se manteve entre 27 $\pm$ 2°C e umidade relativa do ar 65-75%.

Os grupos experimentais seguiram a seguinte constituição: tratados com produto formulado de óleos de *A. indica*, *M. alternifolia*, *C. guianensis* e extrato fermentado de *C. papaya* nas concentrações de 100% (G1), 50% (G2), 25% (G3) e 12,5% (G4), controle positivo com inseticida DEET (CP) e controle negativo com água destilada (CN).

### 8.2.3 Análise Estatística

Os dados obtidos foram expressos através da estatística descritiva de tendência de centralidade e dispersão (média e desvio padrão) seguindo uma distribuição não Gaussiana através do teste de Mann-Whitney ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com post-hoc de Dunn. O tratamento estatístico foi delineado com nível de significância para  $p < 0,05$ .

## 8.3 RESULTADOS

Os resultados do ensaio biológico realizado com adultos de *A. aegypti* utilizando o produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* são apresentados na tabela 1.

Os adultos do grupo controle negativo com água (CN) tiveram 4,7% de mortalidade após 24 horas de exposição, houve neste período muita perda de cerdas corporais observados no fundo da gaiola. As espécimes do CP tiveram mortalidade de 100% com 5 minutos de exposição ao produto, sendo estatisticamente significativo com  $p < 0,05$  em relação ao CN em todos os tempos de observação. No entanto, nos grupos tratados G1, G2, G3 e G4 foram constatadas mortalidades de 81%, 76%, 89% e 78% ao final do período de exposição, respectivamente.

Tabela 5 – Mortalidade (média ± desvio) de adultos de *A. aegypti*, avaliados durante 24h, e submetidos a tratamento com produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* em diferentes concentrações.

TEMPO (h)	Grupos			P
	G1	G2	G3	
2	32,7±2,5ak	43,7±4,2ab	42,3±8,1ab	0,0136
10	187,3±49,3ε	162,0±77,1ab	256,0±14ab	0,0144
18	353,7±76,0ε	364,3±13,8ab	351,3±18,4at	0,0228
24	489,7±64,4ε	459,3±18,8ab	534,7±25,7at	0,0132
TEMPO (h)	G4	CP	CN	P
2	36,0±8,1ak	1800±0,0a	1,7±0,58b	0,0136
10	200,3±64,4ε	1800±0,0a	3,7±2,1b	0,0144
18	339,3±9,2ak	1800±0,0a	15,7±3,2b	0,0228
24	470±26,5ε	1800±0,0a	28,0±2,6b	0,0132

Fonte: TORRES, S. M. (2014).

G1: Tratado produto formulado 100%; G2: Tratado produto formulado 50%; G3: Tratado produto formulado 25%; G4: Tratado com produto formulado 12,5%; CP: Controle positivo com piretróide sintético; CN: Controle negativo com água. P: significância <0,05. Letras diferentes na mesma linha determinam significância.

#### 8.4 DISCUSSÃO

Há poucos registros na literatura sobre a utilização dos componentes do produto formulado estudado neste trabalho em adultos de *A. aegypti* linhagem Liverpool. Porém, o óleo essencial da *Melaleuca* foi testado por Bakar et al., (2012) isoladamente, sendo utilizando o spray aerossol da *Melaleuca cajuputi* em adultos de *A. aegypti* e obtiveram 22% de mortalidade quando utilizaram o óleo na concentração de 5%, e quando duplicou a concentração do óleo este índice atingiu 48%.

Os óleos essenciais são constituídos por compostos terpenóides voláteis detectados pelas antenas ou tarso dos insetos (DE PAULA et al., 2004). As principais alterações ocasionadas por esses são inibição do crescimento, maturação, redução da capacidade reprodutiva, inibição do apetite e toxicidade por contato direto (VIEGAS-JUNIOR, 2003).

A ação inseticida do monoterpeno limoneno ocorre devido a sua penetração na cutícula, ao efeito fumigante e efeito tóxico após absorção pelo sistema digestivo (PRATES et al., 1998). Óleos essenciais obtidos *Mentha piperita* tiveram ação inseticida em adultos de *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* e *Anopheles tessellatus* sendo o mentol o componente de maior relevância (SAMARASEKERA et al., 2008).

Existem vários trabalhos testando outros óleos essenciais sobre adultos de *A. aegypti*, como o Dua et al. (2010) que utilizou os óleo das folhas da *Lantana camara* contra *A. aegypti*, *C. quinquefasciatus*, *Anopheles culicifacies*, *Anopheles fluviatilis* e

*Anopheles stephensi* com DL<sub>90</sub> de 0,10, 0,10, 0,09, 0,09 e 0,10mg/cm<sup>2</sup> respectivamente. Já o óleo de *Psoralea corylifolia* sobre *C. quinquefasciatus* teve DL<sub>50</sub> e DL<sub>90</sub> de 0,054 e 0,109mg/cm<sup>2</sup> respectivamente (DUA et al., 2013).

Yang et al. (2005) estudaram a atividade aduicida de cinco óleos essenciais: *Citrus sinensis*, *Mentha pipreta*, *Carvocryl*, o óleo de citronela e o óleo citral, sobre *C. quinquefasciatus* e o que teve o melhor ação foi o *C. sinensis* com DL<sub>50</sub> de 0,0513 mg/cm<sup>2</sup>.

Não foi encontrado na literatura, até o presente momento, o uso do óleo essencial da *C. guianensis* em adultos de *A. aegypti*. Entretanto, o óleo já foi utilizado no controle de larvas de *A. aegypti* com 100% de mortalidade na concentração de 500mg/L (PROPHIRO et al., 2012). Em outros artrópodes, como adultos de *Anocentor nitens* e o *Rhipicephalus sanguineus*, o óleo da andiroba teve 100% de mortalidade com ação acaricida nas diluições de 100%, 50%, 30%, 25% e 10% (FARIAS et al., 2009).

Portanto, a associação entre os óleos essenciais de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* pode ser um método alternativo no controle de *A. aegypti* linhagem Liverpool, particularmente na concentração de 25%. No entanto, há necessidade de avaliar esse produto formulado contra adultos de *Aedes aegypti* de populações de campo.



## REFERÊNCIAS

- BAKAR, A. A.; et al. Evaluation of *Melaleuca cajuputi* (Family: Myrtaceae) essential oil in aerosol spray cans against dengue vectors in low cost housing flats. **Journal of Arthropod-Borne Disease**, v.6, n.1, p.28-35, 2012.
- CARVALHO, L. A. F.; SILVA, I. G. Avaliação longitudinal da atividade do Temephos a 1% sobre o *Aedes aegypti* (Lin., 1762). **Entomologia y Vectores**, v.7, p.191-201, 2000.
- DE PAULA, J.P.; et al. Atividade repelente do óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth (variedade eugenol) contra o *Anopheles braziliensis* Chagas. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.23, p.376-378, 2004.
- DUA, V. K.; PANDEY, A. C.; DASH, A. P. Adulticidal activity of essential oil of *Lantana camara* leaves against mosquitos. **Indian Journal of Medical Research**, v.131, p.434-439, 2010.
- DUA, V.K.; et al. Insecticidal and genotoxic activity of *Psoralea corylifolia* Linn. (Fabaceae) against *Culex quinquefasciatus* Say, 1823. **Parasites and Vectors**, v.6, p.30, 2013.
- EKANEM, E. J.; LORI, J. A.; THOMAS, S. A. The determination of wear metals in used lubricating oils by flame atomic absorption spectrometry using sulphanic acid as ashing agent. **Talanta**, v.44, n.11, p.2103-2108, 1997.
- FARIAS, M.P.O.; et al. Potencial acaricida do óleo de andiroba *Carapa guianensis* Aubl. sobre fêmeas adultas ingurgitadas de *Anocentor nitens* Neumann, 1897 e *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.4, p.877-882, 2009.
- FORANTTINI, O.P. **Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia**. 2ª edição, São Paulo: Edusp, 864p, 2002.
- FRANCO-ARCHUNDIA, S. L.; et al. Efecto tóxico de semillas de cuatro variedades de *Carica papaya* (Caricaceae) en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Folia Entomologica Mexico**, v.45, p.171-177, 2006.
- FOSTER, J. E. Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of Stored Products Research**, v.34, n.4, p.243-249, 1998.
- GOVINDARAJAN, M.; SIVAKUMAR, R. Adulticidal properties of *Cardiospermum halicacabum* plant extracts against three important vector mosquitoes. **European Review for Medical and Pharmacology Sciences**, v.16, n.3, p.95-104, 2012.
- MACÍAS, F. A.; et al. Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models. **Phytochemistry Reviews**, v.7, p.179-194, 2008.
- NEVES, E. J. M. Importância dos fatores edafo-climáticos para o uso do nim (*Azadirachta indica* A. Juss) em programas florestais e agroflorestais nas diferentes regiões do Brasil. **Boletim de Pesquisa Florestal**. n.49, p.99-107, 2004.

PRATES, H. T.; et al. Insecticidal Activity of Monoterpenes Against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbs). **Journal of Stored Products Research**. v.34, p.243-249, 1998.

PROPHIRO, J. S.; et al. Evaluation of time toxicity, residual effect, and growth-inhibiting property of *Carapa guianensis* and *Copaifera* sp. in *Aedes aegypti*. **Parasitology Research**. v.110, n.2, p.713-9, 2012.

SAMARASEKERA, R.; WEERASINGHE, I. S.; HEMALAL, K.P. Insecticidal activity of menthol derivatives against mosquitoes. **Pest Management Sciences**. v.64, n.3, p.290-5, 2008.

SILVA, O. S.; et al. Larvicidal effect of andiroba oil, *Carapa guianensis* (Meliaceae), against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**. v.22, n.4, p.699–701, 2006.

VIEGAS-JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v.26, p.390-400, 2003.

YANG, P.; MA, Y. Repellent effects of plants essential oils against *Ae albopictus*. **Journal of Vector Ecology**. v.30, n.2, p.231-4, 2005.

## 9 CAPÍTULO 6

### ESTUDO MORFO-ESTRUTURAL DE ADULTOS DE *Aedes aegypti* SUBMETIDOS A EXPOSIÇÃO AO PRODUTO FORMULADO DE ÓLEOS DE *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* E EXTRATO FERMENTADO DE *Carica papaya*.

Sandra Maria de Torres<sup>1</sup>, Lêucio Câmara Alves<sup>2</sup>, Valdemiro Amaro da Silva Júnior<sup>1</sup>.

#### RESUMO

Inseticidas químicos usados contra *Aedes aegypti* tem proporcionado o surgimento de populações resistentes. Diversas alternativas têm sido avaliadas, dentre elas os inseticidas naturais. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações morfológicas em *Aedes aegypti* linhagem Liverpool adultos decorrentes da exposição ao produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya*. O ensaio foi realizado em triplicata com 1800 mosquitos adultos com até uma semana de vida. Os mosquitos foram expostos por 24 horas a diferentes tratamentos: óleos e extrato fermentado nas concentrações de 100% (G1), 50% (G2), 25% (G3), 12,5% (G4), controle negativo com água destilada (CN) e o controle positivo com produto industrial piretróide (CP). No final do período do estudo, os tecidos coletados foram processados rotineiramente para microscopia óptica (glicolmetacrilato) e microscopia eletrônica de varredura. Na avaliação tecidual dos mosquitos expostos aos produto formulado constatou-se necrose multifocal das células intestinais, necrose e degeneração de células principais do túbulo de Malpighi. Nos gânglios nervosos e cérebro se constatou vacuolização dos neurônios da região medular. Na região cortical, degeneração e necrose foram os achados mais frequentes. A microscopia eletrônica de varredura demonstrou perda de patas e cerdas abdominais nos mosquitos tratados com produto formulado. A associação entre os óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e o extrato fermentado de *Carica papaya* pode ser um método alternativo para o controle mosquitos de *Aedes aegypti* linhagem Liverpool devido os efeitos tóxicos teciduais e indutor da morte.

**Palavras-chave:** Histologia de *Aedes aegypti*; Microscopia de varredura.

#### Abstract

Chemical insecticides used against *Aedes aegypti* has provided the emergence of resistant populations. Several possibilities have been tested, among them the natural insecticide. The aim of this study was to evaluate the morphological changes in *Aedes aegypti* var. Liverpool adults from exposure to the compound of oils of *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* and fermented extract of the *Carica papaya*. The assay was performed in triplicate with 1800 adult mosquitoes with one week of life. Mosquitoes were exposed for 24 hours to different treatments: oils and fermented extract with concentration of the 100% (G1), 50% (G2), 25% (G3), 12.5% (G4), negative control with distilled water (CN) and positive control with industrial product pyrethroid-based (CP). At the end of experimental period, the tissues were collected and routinely processed for optical and scanning electron microscopy. The histological evaluation of intestinal cells and major cells of the Malpighian tubule showed necrosis and degeneration. Vacuolation of neurons was found medullary region of the nerve ganglia and brain. In the cortical region, degeneration and necrosis were the most frequent findings in neurons. The scanning electron microscopy showed loss of hair on the legs and in the abdominal region of mosquitoes treated with

compound of essential oils. The association between the oils of *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* and fermented extract of *Carica papaya* can be an alternative method to control *Aedes aegypti* mosquitoes variety Liverpool due to the toxic effects and tissue inducer of death.

**Key-words:** Histology of *Aedes aegypti*; Scanning electron microscopy.

## 9.1 INTRODUÇÃO

O *Aedes aegypti* é o vetor de várias viroses e microfilarias, como febre amarela, dengue e dirofilarias que acomete os humanos e outros animais (LOZOVEI, 2001). O controle da forma alada tem sido realizado com a utilização de produtos químicos e biológicos (ROSE, 2001, MACORIS et al., 2007), mas este tipo de controle, além de ocasionarem a contaminação do ambiente tem favorecido o surgimento de populações de insetos resistentes (ADEGAS et al., 2005; SPENASSATTO, 2011).

Os inseticidas químicos mais utilizados no Brasil pertencem ao grupo dos piretróides e organofosforados, mas em detrimento da exposição contínua a estes produtos predispõe à seleção de espécimes mais aptos a resistência, sendo necessário o uso de doses cada vez maiores no controle do *A. aegypti* (FUNASA, 2001; POLANCZYK et al., 2003).

As plantas com atividade inseticidas são uma alternativa promissora no controle de vetores, pois possuem grande diversidade de compostos ativos capazes de atuar em sinergismo para atrair, desalojar ou repelir as populações de mosquitos (ISMAN, 2006; NAVARRO-SILVA et al., 2009).

A análise estrutural e ultraestrutural de varredura de adultos de *A. aegypti* não foi encontrada na literatura, sendo de fundamental importância para compreensão das diversas formas de ação dos produtos inseticidas (GUSMÃO et al., 2002).

Portanto, este trabalho tem como objetivo realizar o estudo morfo-estrutural de adultos de *A. aegypti* submetidos à exposição ao produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya*.

## 9.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 9.2.1 Obtenção do Produto Formulado

O produto formulado de óleos e o extrato fermentado foram obtidos junto a Gued's Biotecnologia<sup>®</sup> tendo a seguinte formulação: 1% do óleo da semente da *Azadirachta indica*, 0,3% do óleo do fruto da *Melaleuca alternifolia*, 1% do óleo

essencial da *Carapa guianensis* e 5% do extrato fermentado bacteriano do fruto de *Carica papaya*.

### 9.2.2 Ensaio Inseticida

O ensaio adulticida seguiu a metodologia descrita por Govindarajan e Sivakuma (2012), utilizando adultos de *Aedes aegypti* com até 5 dias de idade, alimentados apenas com solução açucarada a 10% e alocados em gaiolas teladas com dimensão de 35x35x35cm. O teste foi realizado em triplicata com 600 indivíduos para cada grupo experimental, totalizando 10.800 mosquitos, os quais foram borrifados com 670 $\mu$ L de acordo com o grupo teste e expostos por 24h, sendo monitoradas a cada seis horas.

Os grupos experimentais seguiram a seguinte constituição: tratados com produto formulado de óleos de *A. indica*, *M. alternifolia*, *C. guianensis* e um extrato fermentado de *C. papaya* nas concentrações de 100% (G1), 50% (G2), 25% (G3) e 12,5% (G4), controle positivo com inseticida industrial piretróide (CP) e controle negativo com água destilada (CN).

### 9.2.3 Análise Estrutural

Para o estudo histológico dos adultos, foram selecionados exemplares de todos os grupos experimentais, vivos e mortos, os quais foram fixados em glutaraldeído tamponado com tampão fosfato de sódio (PBS) em pH de 7,3 a 4%, sendo mantidos sob refrigeração a 4° C por oito horas para fixação dos tecidos.

Após 24h os espécimes foram lavados com solução tampão fosfato para remoção do fixador e posteriormente submetidos ao processo de desidratação e impregnação em resina conforme metodologia descrita por Schwartz et al. (1998) e Arruda et al. (2003<sup>a</sup>, 2003<sup>b</sup>) com algumas modificações. Os cortes de 4 $\mu$ m de espessura foram realizados com micrótomo rotatório, e posteriormente corados em hematoxilina-floxina.

### 9.2.4 Análise Ultraestrutural

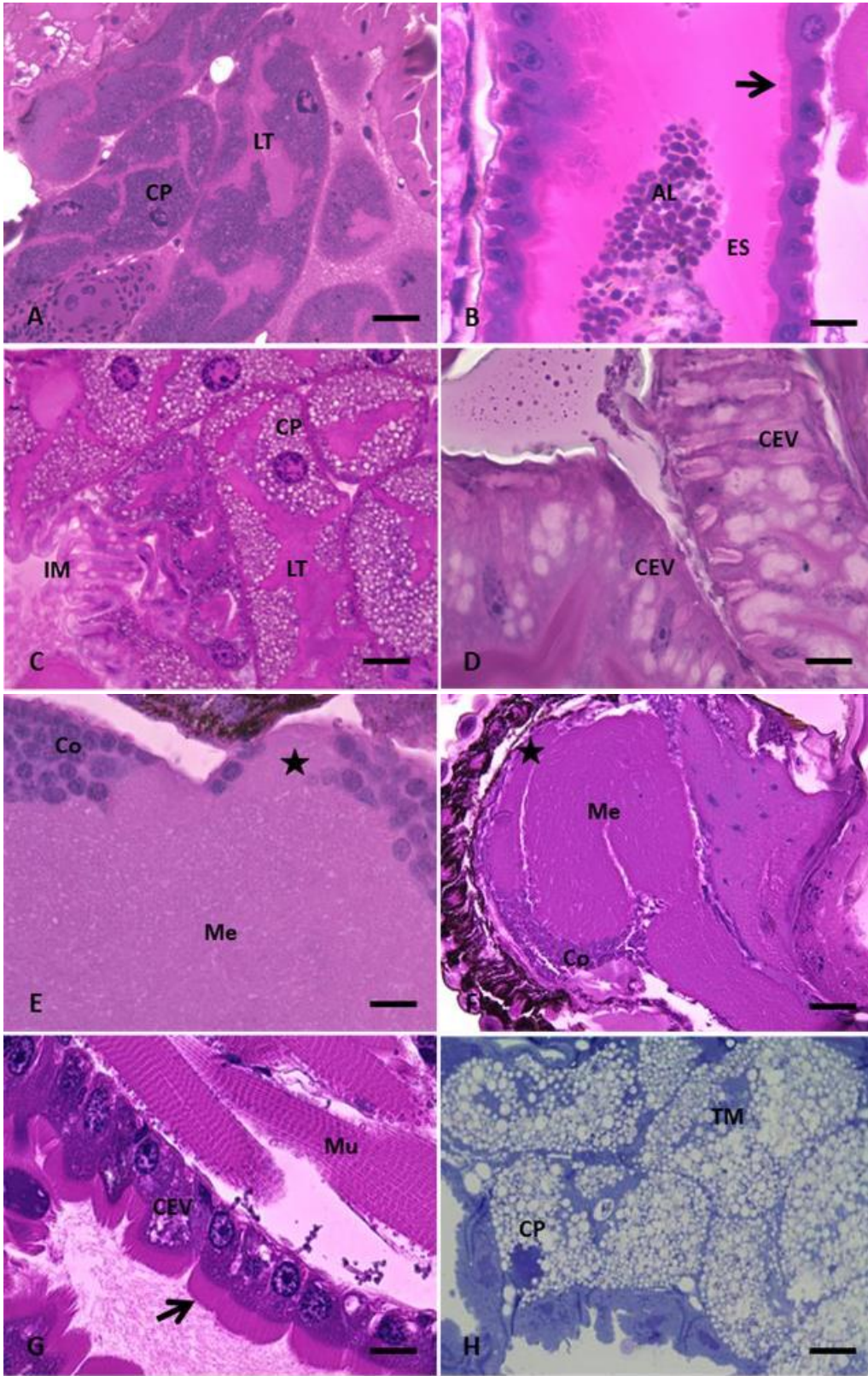
Para análise ultraestrutural de varredura (MEV) foram coletadas amostras de todos os grupos experimentais, sendo fixados *overnight* em solução fixadora de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 e pós-fixados em tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) a 2%. Posteriormente, as amostras foram submetidas à secagem pelo

método do ponto crítico, metalizadas com ouro e levadas para análise em microscópio JEOL-5600LV.

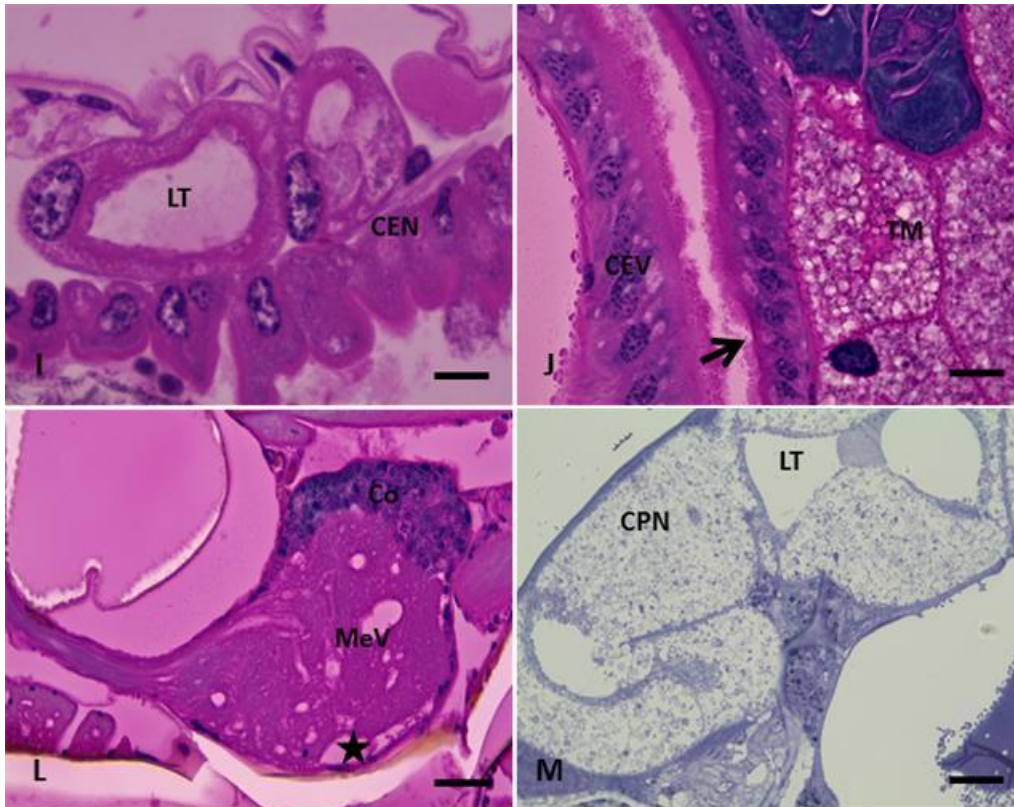
### 9.3 RESULTADOS

As alterações estruturais encontradas nos adultos de *Aedes aegypti* tratados com o produto formulado de óleos e o extrato fermentado na concentração de 100% (G1), 50% (G2), 25% (G3) e 12,5% (G4) são observadas na figura 9.

Figura 9 – Fotomicrografias de intestino, túbulo de Malpighi (TM) e cérebro de adultos de *Aedes aegypti* controle com água, controle com piretróide e tratados com produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* em diferentes concentrações e expostos por 24h. **A e B:** Grupo CN. Observar TM e intestino médio sem alterações. Barra 50µm **C:** TM do grupo CP. Visualizar aumento da vacuolização citoplasmática. Barra 50µm. **D:** Observar vacuolização generalizada das células epiteliais do intestino do grupo CP. Barra 4µm. **E:** Visibilizar necrose da região cortical do cérebro do grupo G2. Barra 4µm. **F:** Cérebro do grupo tratado com o produto formulado na concentração de 50%. Observar diminuição da área cortical. Barra 50µm. **G:** Grupo G1 visualizar células intestinais vacuolizadas. Barra 50µm. **H:** Grupo G1: Observar TM com aumento de vacuolização citoplasmática e necrose celular. Barra 50µm. **I:** Grupo G3. Observar aumento do lúmen e diminuição da altura do TM, além de necrose do epitélio intestinal. Barra 50µm. **J, L e M:** Grupo G4. Visualizar intestino com citoplasma vacuolizado e diminuição da borda em escova. Notar necrose do córtex cerebral e vacuolização das regiões cortical e medular. TM necrosado (CPN) com aumento de lúmen tubular e depósito de material protéico intraluminal. Barra 50µm. Intestino médio (IM); Alimento (AL); Borda em escova (seta); Espaço sub peritrófico (ES); Músculo (Mu); Túbulo de Malpighi (TM); Célula principal (CP); Lúmen tubular (LT); Região cortical do cérebro (Co); Região medular cérebro (Me). Célula epitelial vacuolizada (CEV); estrela (necrose cortical); Célula epitelial necrosada (CEN); Célula principal necrosada (CPN); Região medular necrosada (MeV).







Fonte: TORRES, S. M. (2014).

No intestino médio dos grupos G1 e G2 foram observados vacuolização citoplasmática do epitélio e das vesículas de secreção, formação de espaços intercelulares, necrose multifocal da parede intestinal, com redução da altura da borda em escova e manutenção da matriz peritrófica. Nos grupos G3 e G4 as lesões intestinais são as mesmas encontradas nos grupos anteriores.

Nos túbulos de Malpighi (TM) dos grupos G1 e G2 foram observados: necrose e degeneração de célula principal, perda de superfície de absorção, aumento luminal e acúmulo de material protéico no lúmen tubular. Os TM dos grupos G3 e G4 foram visibilizados diminuição da altura celular, aumento luminal, além de necrose celular.

No cérebro e gânglios nervosos dos grupos tratados com o composto (G1, G2, G3 e G4) foram encontradas as mesmas lesões como, discreta vacuolização medular, degeneração e necrose da região cortical, porém o cérebro do G4 encontra-se com extensa necrose cortical e vacuolização cortical e medular.

Nos adultos do grupo controle com água (CN) não foi observado alterações na arquitetura das células do intestino médio e do túbulo de Malpighi (TM) Figuras A e B. Em corte longitudinal observa-se na região abdominal, o lúmen intestinal com as células epiteliais cilíndricas, citoplasma acidófilo, núcleo alongado e nucléolos evidentes, além de borda em escova bem delimitada presente na superfície apical das células. O túbulo de Malpighi estava sem lesões, com núcleo grande e alongado,

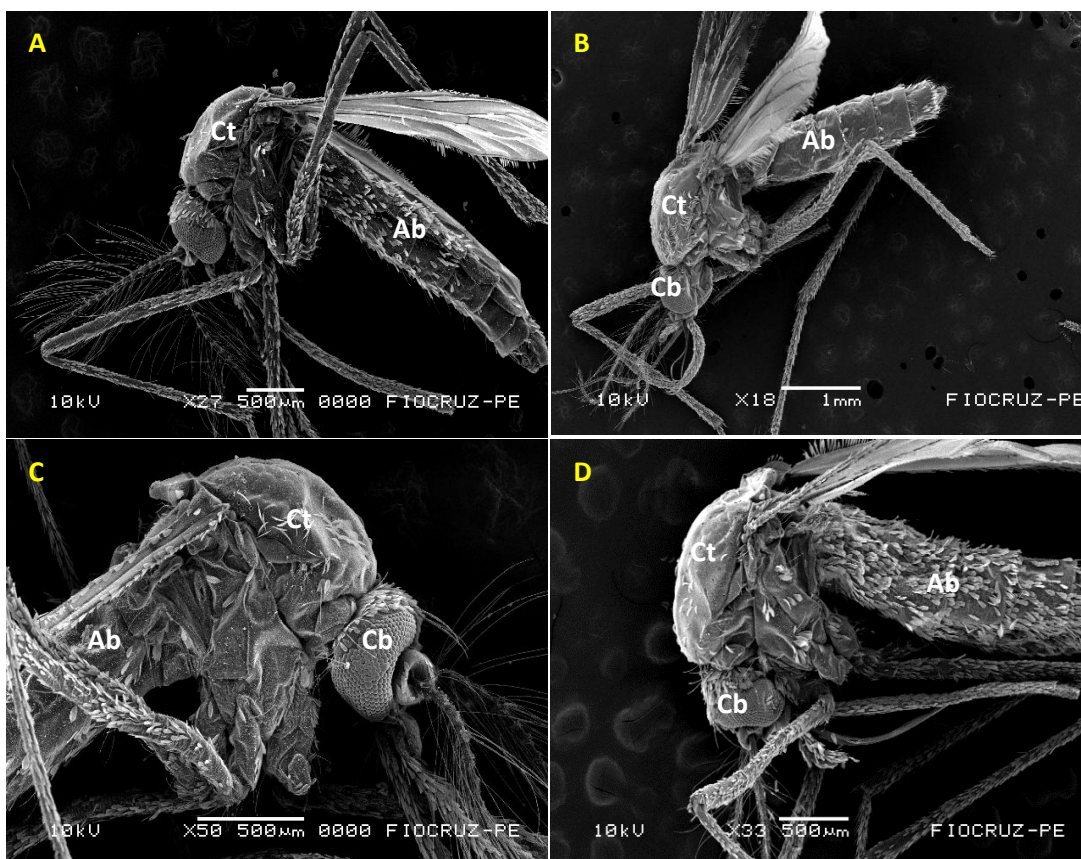


citoplasma basofílico abundante com presença de numerosas inclusões citoplasmáticas de tamanhos variados e vacúolos dispersos.

As alterações estruturais do intestino médio e do TM de adultos de *A. aegypti* expostas a derivado de piretróide praletrina (CP) são visibilizadas na figura C e D. Após a exposição à praletrina os adultos exibiram comportamento de letargia, paralisia e morte após 3 a 5 minutos da aplicação. As lesões nas células epiteliais do intestino se distribuem por todo o órgão, mas principalmente no intestino anterior e médio com degeneração e vacuolização difusas das células epiteliais, além de perda de delimitação da borda em escova e da matriz peritrófica, ausência de vesículas secretoras. No intestino posterior as lesões são as mesmas, porém multifocais. As alterações no TM são pouco evidentes com apenas aumento da basofilia e da vacuolização citoplasmática. No cérebro do CP podem ser visualizadas lesões significativas de degeneração e necrose multifocal da região cortical com perda da arquitetura do órgão e função (Figura E).

O estudo ultraestrutural de varredura (MEV) de formas adultas de *A. aegypti* pode ser observado na figura 10.

Figura 10 – Eletromicrografia de adultos de *Aedes aegypti*. **A:** Adulto CN, onde é possível observar os três segmentos do mosquito íntegros, exceto pela perda de cerdas nos últimos segmentos abdominais. **B:** Adulto CP, observar a quase ausência de cerdas em todo o segmento abdominal (estrela), além de perda de patas (seta branca). **C e D:** Adultos tratados com o produto formulado. Visibilizar edema de omatídeos (seta vermelha), perda de patas (seta branca) e cerdas.



Fonte: TORRES, S. M. (2014).

Nos mosquitos tratados com o produto formulado de óleos e extrato fermentado foi possível observar edema do segmento ocular, além de perda de patas.

Os adultos controles negativos se observaram os três segmentos íntegros. Na cabeça se visualizou integridade dos olhos compostos, a antena longa e plumosa, a probóscide proeminente. A face dorsal do tórax observa-se um par de asas e três pares de patas. O abdômen composto por oito segmentos, sendo o VIII segmento abdominal estreito e retrátil, onde se a genitália externa.

#### 9.4 DISCUSSÃO

Na literatura estudo de alterações estruturais e ultraestruturais de varredura em adultos de *Aedes aegypti* são bastante escassas, sendo este estudo realizado apenas em larvas (ARRUDA et al., 2003a, 2003b; BARRETO et al., 2006; ABED et al., 2007; VALOTTO et al., 2010; BORGES et al., 2012).

O composto contém duas espécies de Meliáceas ricas em terpenóides altamente oxigenados com comprovada ação biológica contra diversos insetos (SENTHILNATHAN, 2013). Os limonóides destas plantas apresentam pouca toxicidade contra espécies não-alvo quando comparado aos inseticidas sintéticos.

Estudos realizados por Valotto et al (2011) utilizando diterpenos isolados da *Copaifera reticulata* e o tanino da *Magonia pubescens* verificaram intensas lesões intestinais em larvas de *Aedes aegypti* com degeneração celular, vacuolização citoplasmática, desorganização celular e formação de vesículas.

As lesões descritas anteriormente são semelhantes às provocadas pelo produto formulado contendo óleo de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* no presente trabalho. As mesmas lesões foram causadas pelas plantas *Alnus glutinosa*, *Populus nigra* e *Quercus robur* (ARRUDA et al., 2003; DAVID et al., 2000; DELPHINE et al., 1999).

O óleo da *Azadirachta indica* pode ter sido o maior responsável pelas alterações estruturais encontradas no epitélio intestinal do presente estudo, visto que lesões semelhantes foram observados no mesêntero do bicho lixeiro adulto (*Ceraeochrysa claveri*) tratadas com o mesmo produto (LÜ et al., 2010; ALMEHMADI, 2011; QI et al., 2011). Estas modificações incluem redução da altura das vilosidades, ruptura de membrana plasmática, vacuolização citoplasmática, hipertrofia celular, além de processo degenerativo por necrose celular (NDIONE et al., 2007; ROEL et al., 2010; ALMEHMADI, 2011).

A redução das vilosidades ocorre em reações tóxicas devido à desintegração dos filamentos de actina que perdem conexão com a membrana plasmática apical e consequentemente perda da arquitetura celular (CHEVILLE, 2009).

O processo de hipertofia das células colunares intestinais ocorre como consequência de lesão aguda causada pela administração de óleos essenciais, extratos vegetais ou toxinas, a qual é provocada pela perda do controle iônico e entrada de água na célula (BAUER e PANKRATZ, 1992; CHEVILLE, 2009).

Os componentes do óleo essencial da *A. indica* pode provocar essas alterações no balanço iônico celular como descrito em bicho lixeiro (*Ceraeochrysa claveri*) e em percevejo (*Rhodnius prolixus*) (NOGUEIRA et al., 1997).

Nas células intestinais dos adultos de *A. aegypti* tratados com o composto foram observadas áreas de edema ou formação de espaços intercelulares, sendo estas mesmas alterações visualizadas em adultos do *C. claveri* ocasionada pela exposição ao óleo da *A. indica* (NDIONE et al., 2007), pode também ser consequência da exposição a tanino (REY et al., 1999) e ácido bórico (CRUZ et al., 2010).

A necrose intestinal foi à alteração histopatológica mais visualizada em adultos de *A. aegypti* tratados com o produto formulado de óleos e extrato fermentado, o qual contém *A. indica*. Corroboram com este achado de necrose das células intestinais e de outros tecidos subjacentes expostos a *A. indica*, além da necrose das células foliculares de *Anopholes stephensi* (LUCANTONI et al., 2006) e *Heteracris littoralis* (gafanhoto) (GHAZAWI et al., 2007), assim como, em adipócitos e corpora allata de *Labidura riparia* (tesourinha) (SAYAH et al., 1996; SAYAH, 2002).

O óleo essencial da *Melaleuca cajuputi* utilizado contra formas adultas de *A. aegypti* e *A. albopictus* causou mortalidade destes devido ao bloqueio do sistema nervoso octoparaminérgico (KOUL et al., 2008). As lesões degenerativas e necróticas encontradas nos gânglios nervosos, bem como, a mortalidade das formas adultas de *A. aegypti*, no presente experimento, podem estar relacionadas à utilização do óleo da *Melaleuca alternifolia*.

O piretroíde sintético praletрина utilizado como controle positivo no grupo CP, interferem no sistema nervoso atuando na permeabilidade de membrana do axônio, inibindo a repolarização normal do impulso nervoso e consequentemente matando rapidamente os insetos (BISSET, 2002). As lesões histopatológicas encontradas neste grupo CP foram semelhantes às observadas nos tratados com o composto de óleos essenciais e extrato fermentado, isto denota a importância deste produto como um substituto e preventivo ao desenvolvimento de resistência ao produto sintético.

As alterações encontradas no intestino, túbulos de Malpighi e gânglios nervosos de adultos de *Aedes aegypti* linhagem Liverpool são decorrentes da exposição ao

produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya*. Portanto, este produto tem excelente potencial inseticida por causar alterações celulares irreversíveis e morte. Porém, mais estudos devem ser realizados para testar o produto formulado em populações de campo.

## REFERÊNCIAS

- ABED, R. A.; et al. Alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pela atividade larvicida do óleo-resina da planta medicinal *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae). **Revista de Patologia Tropical**. v.36, p.87-95, 2007.
- ADEGAS, M. G.; KRAUSE, C. B.; LIMA, J. B. P.; VALLE, D. **Parâmetros de Biossegurança para Insetários e Infectórios de Vetores**. Ministerio da Saude – Fundacao Oswaldo Cruz – Instituto Oswaldo Cruz, 2005.
- ALMEHMADI, R. M. Larvicidal, histopathological and ultra-structure studies of *Matricharia chamomella* extracts against the rift valley fever mosquito *Culex quinquefasciatus* (Culicidae:Diptera). **Journal of Entomology**, n.8, v.1, p.63-72, 2011.
- ARRUDA, W.; OLIVEIRA, G. M. C.; SILVA, I. G. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.36, p.17-25, 2003a.
- ARRUDA, W.; OLIVEIRA, G. M. C.; SILVA, I. G. Alterações morfológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) submetidas à ação do extrato bruto etanólico da casca do caule da *Magonia pubescens* St. Hil. **Entomología y Vectores**. v.10, p.47-60, 2003b.
- BARRETO, C. F.; et al. Estudos das alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindus saponaria* Lin (Sapindaceae). **Revista de Patologia Tropical**. v.35, p. 37-57, 2006.
- BAUER, L. S.; PANKRATZ, H. S. Ultrastructural effects of *Bacillus thuringiensis* var. san diego on midgut cells of the cottonwood leaf beetle. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.60, p.15-25, 1992.
- BISSET, J. A. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. **Revista Cubana de Medicina Tropical**. v.54, n.3, p.202-19, 2002.
- BORGES, R. A.; et al. Mecanismos da ação larvicida do diflubenzuron sobre *Aedes aegypti* evidenciados pelas alterações ultraestruturais. **Revista de Patologia Tropical**. v. 41, n.2, p. 222-232, 2012.
- CHEVILLE, N. F. **Ultrastructural pathology: the comparative cellular basis of disease**. 2ª edição, Ames: Willey-Blackwell, 973p. 2009.
- CRUZ, A. S.; et al. Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of *Worker honeybee* (*Apis mellifera* L.) larvae. **Cell Biology and Toxicology**, v.26, p.165-176, 2010.
- DAVID, J. P.; et al. Differential toxicity of leaf litter to dipteran larvae of mosquito developmental sites. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.75, p. 9-18, 2000.
- DELPHINE, R.; PAUTOU, M. P.; MEYRAN, J. P. Histopathological effects of tannic acid on the midgut epithelium of some aquatic Diptera larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.73, p.173-181, 1999.

GHAZAWI, N. A.; et al. Effects of azadirachtin on mortality rate and reproductive system of the grasshopper *Heteracris littoralis* Ramb. (Orthoptera: Acrididae). **Journal of Orthoptera Research**. v.16, n.1, p.57-65, 2007.

GOVINDARAJAN, M.; SIVAKUMAR, R. Adulticidal and repellent properties of indigenous plant extracts against *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**. v.110, p.1607-1620, 2012.

GUSMÃO, D. S.; et al. *Derris* (Lonchocarpus) *urucu* (Leguminosae) extract modifies the peritrophic matrix structure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v.97, p. 371-375, 2002.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrent and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**. v. 51, p.45-66, 2006.

KOUL, O.; WALIA, S.; DHALIWAL, G. S. Essential oil as green pesticides: potential and constraints. **Biopesticides Internation**. v.4, n.1, p.63–84, 2008.

LOZOVEI, A. L. In: MARCONDES, C.B. **Entomologia Médica e Veterinária**. (1ª edição). Rio de Janeiro: Editora Atheneu. 432p, 2001.

LUCANTONI, L.; et al. Effects of neem extract on blood feeding, oviposition and oocyte ultrastructure in *Anopholes stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). **Tissue and Cell**, v.38, p.361-371, 2006.

LÜ, M.; WU, W.; LIU, H. Effects of fraxinellone on the midgut ultrastructural changes of *Mythimna separata* Walker. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.98, p.263-268, 2010.

MACORIS, M. L. G.; et al. Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 102, n.8, p.895-900, 2007.

NAVARRO-SILVA, M. A.; MARQUES, F. A.; DUQUE, J. E. L. Review of semiochemicals that mediate the oviposition of mosquitoes: a possible sustainable tool for the control and monitoring of Culicidae. **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 53, n.1, p.1-6, 2009.

NDIONE, R. D.; et al. Toxic effects of neem products (*Azadirachta indica* A. Juss) on *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 larvae. **African Journal of Biotechnology**. v.6, n.24, p.2846-2854, 2007.

NOGUEIRA, N. F. S.; et al. Effect of Azadirachtin A on the fine structure of the midgut of *Rhodnius prolixus*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.69, p.58-63, 1997.

POLANCZIK, R.; ALVES, S. B. *Bacillus thuringiensis* – Uma Breve Revisão. **Agrociência**. v. 7, n.2, p.1-10, 2003.

QI, Z.; et al. Ultrastructural effects of Celangulin V on midgut cells of the oriental armyworm, *Mythimna separata* walker (Lepidoptera: Noctuidae). **Ecotoxicology Environmental Safety**, v.74, n.3, p.439-44, 2011.

REY, D.; PAUTOU, M. P.; MEYRAN, J. C. Histopathological effects of tannic acid on the midgut epithelium of some aquatic dipter larval. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.73, p.173-181, 1999.

ROEL, A. R.; et al. The effect of sub-lethal doses of *Azadirachta indica* (Meliaceae) oil on the midgut of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Entomologia**. v.54, n.3, p.505-510, 2010.

ROSE, R. I. Pesticides and public health integrated methods of mosquito management. **Emerging Infectious Disease Journal**. v.7, p.17–23, 2001.

SAYAH, F.; et al. Effect of azadirachtin on vitellogenesis of *Labidura riparia* (Insect Dermoptera). **Tissue and Cell**, v.28, n.6, p.741-749, 1996.

SAYAH, F. Ultrastructural changes in the corpus allatum after azadirachtin and 20-hydroxyecdysone treatment in adult females of *Labidura riparia* (Dermoptera). **Tissue and Cell**, v.34, n.2, p.53-62, 2002.

SCHWARTZ, A. M.; et al. The lethal effects of *Cyperus iria* on *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**. v.14, p.78-82, 1998.

SENTHIL-NATHAN, S. Physiological and biochemical effect of neem and other Meliaceae plants secondary metabolites against Lepidopteran insects. **Frontiers in Physiology / Invertebrate Physiology**. v.4, n.359, 2013.

SPENASSATTO, C. Desenvolvimento de metodologia high-throughput para estudo populacional do mosquito *Aedes aegypti* e comparação de dados de genes nucleares com dados de genes mitocondriais. (**Dissertação de Mestrado**) **Universidade Estadual Paulista (USP, SP), Instituto de Biociência Botucatu**. 112p, 2011.

VALOTTO, C. F. B.; et al. Alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pelo tanino catéquico da planta do cerrado *Magonia pubescens* (Sapindaceae). **Revista de patologia Tropical**. v.39,n.4, p. 309-321, 2010.

VALOTTO, C. F. B.; et al. Alterações ultraestruturais em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao diterpeno labdano, isolado de *Copaifera reticulata* (Leguminosae), e à uma fração rica em taninos de *Magonia pubescens* (Sapindaceae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**.v. 44,n.2,p.194-200, 2011.