

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MILEHNA MARA GUARIDO

**Atividade inseticida de extratos de *Annona foetida* Mart. (Annonaceae)
sobre imaturos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)**

CURITIBA

2009

MILEHNA MARA GUARIDO

**Atividade inseticida de extratos de *Annona foetida* Mart. (Annonaceae)
sobre imaturos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antonio Navarro da Silva

Co-orientadores: Prof. Dr^a. Onilda Santos da Silva

Prof. Dr. Jonny Edward Duque Luna

CURITIBA

2009

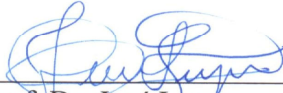
MILEHNA MARA GUARIDO

“Atividade inseticida de extratos de *Annona foetida* (Annonaceae) sobre imaturos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de “Mestre em Ciências Biológicas”, no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Prof. Dr. Mário Antonio Navarro da Silva (Orientador)
(UFPR)



Prof. Dr. José Lopes
(UEL/PR)



Dra. Paula Aparecida Federiche Borges
(UFPR)

Curitiba, 14 de agosto de 2009.

AGRADECIMENTOS

A Deus que nunca me deixou desamparada em todos os momentos, me protegendo e me abençoando.

Aos meus pais Magnólia e Edson Guarido a quem devo tudo que sou e tive, graças ao maravilhoso exemplo de união, amor e perseverança. Aos meus anjinhos da guarda, meus irmãos Christiane e Edson, que juntamente com meus pais sempre me motivaram, incentivaram, tiveram paciência e confiança em mim.

Ao professor Prof. Dr. Mário Navarro, pela confiança, paciência, apoio, incentivo e orientação em todas as etapas, desde a graduação, obrigada por ter me proporcionado essa oportunidade de crescimento intelectual e profissional.

Ao Prof. Dr. Jonny Edward Duque Luna, pela orientação, paciência, otimismo, incentivo nos momentos difíceis, amizade e primordial colaboração deste trabalho.

Ao pesquisador Dr. Emannel Vilaça-Costa por me permitir trabalhar com os extratos e as análises químicas.

A Prof^a. Dr^a. Onilda Santos da Silva da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Prof. Dr. Luiz Kanis da Universidade do Sul de Santa Catarina, pelo auxílio na realização desse trabalho e incessante busca por um extrato.

A todos que me auxiliaram até a obtenção de um extrato, a Prof^a. Dr^a. Carmen, ao colega Larry, os amigos do Laboratório de Química de Carboidratos e aos colegas Marcos (Unisul) e Makeli (UFPR).

Ao Luiz Carlos Geremias Junior, pela paciência em ouvir as lamentações e conquistas alcançadas em cada etapa, por todas as palavras de apoio e incentivo que me motivaram a terminar mais essa etapa.

A Heloísa e Adriano pela acolhida em sua casa, carinho e confiança em todos os momentos de necessidade em Tubarão.

Aos queridos amigos André Gava, Danilo, Antonio Carlos (Catito), Cecília (Ciça), Gabriel, Caroline, Matheus, Patrícia, Cristina, Bruna, Vinicius (Vini) e Silvia, que sempre

alegraram todos os momentos e compartilharam todos os acontecimentos bons e os de inquietude durante a elaboração da dissertação.

À Msc. Elaine Fantinatti e Sullamy Aciole pela amizade, conselhos, convivência, pelas tardes de risadas e por toda a ajuda nos experimentos, troca de idéias e colaboração em todos os passos na realização desse trabalho.

Aos colegas de laboratório de Entomologia Médica e Veterinária Carla, Ana, Rodrigo, Daniel, Betina, Mário e em especial a Josiane Prophiro pela amizade e troca de conhecimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa.

RESUMO

A intensiva utilização de inseticidas sintéticos contra vetores de arboviroses tem selecionado populações de mosquitos resistentes aos princípios ativos que compõem estes produtos, incluindo populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762). O controle dessa espécie baseia-se principalmente na utilização de inseticidas químicos organofosforados e piretróides. Há vários estudos utilizando extratos de plantas ou seus derivados como uma alternativa a esses inseticidas sintéticos, a fim de diminuir a velocidade de seleção de populações resistentes aos inseticidas químicos. *Annona foetida* Mart. é uma planta Amazônica da família Annonaceae conhecida por apresentar diversas atividades biológicas como leishmanicida e antimicrobiana, entretanto até o momento não existem investigações sobre sua atividade inseticida. Outras espécies de Annonaceae apresentam uma classe de substância com atividade inseticida já reportada para Culicidae. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade larvicida de extratos de semente de *Annona foetida* sobre imaturos de *A. aegypti* em condições de laboratório e identificar seus constituintes químicos, contribuindo assim para gerar uma alternativa de controle desse vetor. A análise química foi feita através de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A susceptibilidade aos extratos metanólico, hexânico e diclorometano foi analisada para determinar as CL₅₀, CL₉₅ e CL₉₉ utilizando mosquitos da colônia Rockefeller mantidas sob condições de laboratório. Foram estabelecidas seis concentrações para cada extrato, com quatro réplicas cada e realizado os bioensaios em quatro dias diferentes para os extratos hexânico e diclorometano e em um dia para o metanólico, sob temperatura de 25°C. O período de atividade larvicida e o efeito de concentrações subletais foram analisados para os extratos hexânico e diclorometano, para esse último também foi avaliada a persistência residual. Além disso, calibrou-se o solvente utilizado dimetilsulfóxido (DMSO) para verificar se este apresentava ação larvicida complementar. Para o DMSO foram utilizadas cinco concentrações em quatro dias diferentes, mostrando que a utilização de 1% do mesmo em 200 ml finais de solução não provoca mortalidade das larvas. Todos os extratos apresentaram atividade larvicida em intervalo de concentrações dose-resposta. O extrato mais eficiente foi o diclorometano, seguido pelo hexânico e metanólico. A atividade encontrada pelo extrato diclorometano pode ser devido à alta quantidade de acetogeninas encontradas nele por RMN, provavelmente pelas acetogeninas Muricina A e Muricina F. Para os outros dois extratos não foi possível definir qual classe de substâncias estava presente devido à alta quantidade de impurezas. A persistência larvicida do extrato diclorometano evidenciou a eficácia deste durante um período de 18 dias. Foram observadas alterações morfológicas em larvas e pupas de *Aedes aegypti* submetidas ao tratamento que inviabilizaram a emergência de adultos, entretanto os poucos adultos que emergiram não apresentaram alterações morfológicas visíveis. Assim, os extratos de *Annona foetida* demonstraram-se eficazes no controle de *Aedes aegypti* tanto como larvicida quanto sob efeito de doses subletais, provavelmente devido à presença das acetogeninas.

Palavras-chave: *Annona foetida*, acetogeninas, larvicida botânico, persistência residual, controle biológico.

ABSTRACT

The extensive use of synthetic insecticides against vectors of Arboviruses has selected populations of vectors resistant to the active ingredients of these products, including populations of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762). The control methods to this species is mainly based on the use of chemical insecticides organophosphates and pyrethroids. There are several studies using plant extracts or their derivatives as an alternative for these synthetic insecticides to reduce the speed of selection on these populations. The plant *Annona foetida* Mart. is an amazonian Annonaceae that has shown several biological activities such as antimicrobial and antileishmanial activity, however no research on their insecticidal activity has been made until now. In Annonaceae, a class of substances with insecticidal activity has already been reported for *Aedes*, *Anopheles* and *Culex*. The objective of this study was to evaluate the larvicidal activity of seed extracts of *Annona foetida* on immatures of *Aedes aegypti* at laboratory, and to analyze their chemical constituents, aiming to contribute to an alternative method to control this vector. Chemical analysis was performed using Nuclear Magnetic Resonance. The susceptibility to methanol extracts, hexane and dichloromethane were analyzed to determine the CL50, CL95 and CL99 using mosquitoes of Rockefeller colony kept under laboratory conditions. Six concentrations, with four replicates, were established for each extract and the bioassays were performed on four different days under temperature of 25°C. The duration of larvicidal activity and the effect of sub-lethal concentrations were analyzed for hexane and dichloromethane extracts. For the latter was also evaluated the residual persistence. Moreover, the solvent dimethylsulfoxide (DMSO) was calibrated to show that it was not increasing in mortality. To test DMSO, five concentrations were used in four different days, showing that the use of 1% of that in 200 ml of final solution does not cause larvae mortality. All extracts showed larvicidal activity in the range of concentrations dose-response. The most efficient extract was dichloromethane followed by hexane and methanol. This activity found by the dichloromethane extract may be due to the high amount of acetogenins found there, including acetogenins Muricin A and Muricin F. It was not possible to determine which class of substances was present on the other two extracts due to the high amount of impurities. The persistence of larvicidal effect by dichloromethane extract showed the effectiveness for the time of 18 days. Morphological changes were observed in larvae and pupae of *Aedes aegypti* that were subjected to treatment that prevented the emergence of adults. However, on the few adults that emerged were not visible morphological changes. So, the extracts of *Annona foetida* show effectiveness in the control of *Aedes aegypti* both as a larvicidal method and under effect of sub-lethal doses, probably due to the presence of acetogenins.

Key Words: *Annona foetida*, acetogenins, botanical larvicida, persistence, biological control.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> ; A: Ovo, B: Larva, C: Pupa, D: Adulto.....	14
FIGURA 2 - Imagens da espécie <i>Annona foetida</i> . A. Botões e flor, B. Caule com botões e C. Folha.....	21
FIGURA 3 - Fluxograma de obtenção dos extratos brutos da semente de <i>Annona foetida</i> , em hexano, diclorometano e metanol.....	26
FIGURA 4 - Modelo experimental de suscetibilidade aos extratos de <i>Annona foetida</i> sobre larvas de <i>Aedes aegypti</i>	29
FIGURA 5 - Modelo experimental de análise do período de atividade larvicida dos extratos de <i>Annona foetida</i>	31
FIGURA 6 - Modelo experimental de análise do efeito residual do extrato diclorometano de <i>Annona foetida</i>	32
FIGURA 7 - Modelo experimental de análise do efeito de concentrações sub letais dos extratos diclorometano e hexânico de <i>Annona foetida</i>	34
FIGURA 8 - Estrutura da Muricina A e F.....	35
FIGURA 9 - Espectro de RMN de ^1H do extrato diclorometano (400 MHz, CDCl_3).....	38
FIGURA 10 - Espectro de RMN de ^{13}C do extrato diclorometano (100 MHz, CDCl_3).....	39
FIGURA 11 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do extrato diclorometano (100 MHz, CDCl_3).....	40
FIGURA 12 - Reta de mortalidade Probit de larvas de <i>Aedes aegypti</i> colônia Rockefeller pelo logaritmo da concentração do extrato hexânico de <i>Annona foetida</i>	43
FIGURA 13 - Reta de mortalidade Probit de larvas de <i>Aedes aegypti</i> colônia Rockefeller pelo logaritmo da concentração do extrato diclorometano de <i>Annona foetida</i>	44

FIGURA 14 - Período de atividade larvicida do extrato diclorometano de <i>Annona foetida</i> em horas e em porcentagem não acumulada nas concentrações letais 10, 20, 50 e 99% de mortalidade.....	46
FIGURA 15 - Período de atividade larvicida do extrato hexânico de <i>Annona foetida</i> em horas e em porcentagem não acumulada nas concentrações letais 10 e 50% de mortalidade.....	47
FIGURA 16 - Efeito residual, em dias de atividade larvicida, de solução contendo extrato de diclorometano de <i>A. foetida</i> em populações de <i>A. aegypti</i> colônia Rockefeller em condições de laboratório; temperatura de 25°C, 70% U.R. ± 10 e 12:12 C/E.....	48
FIGURA 17 - Larva e pupa pertencentes ao grupo controle observadas sob microscópio estereoscópio. A. Pupa, aumento de 25 vezes, B. Larva, aumento de 20 vezes. (Escala 1mm).....	51
FIGURA 18 - Alterações morfológicas em larvas expostas ao extrato de <i>Annona foetida</i> de diclorometano observadas sob microscópio estereoscópio. A. Larvas expostas a concentração letal 20%, sem alteração morfológica visível, aumento de 25 vezes B. Larva exposta a concentração letal 50%, sem alteração morfológica externa visível, aumento de 25 vezes. C. Larva distendida com alongamento da região do colar, concentração letal 50%, aumento de 25 vezes. D. Larva menor que as do grupo controle, retraída, concentração letal 50%, aumento de 32 vezes. (Escala 1mm).....	52
FIGURA 19 - Alterações morfológicas de larvas e pupas expostas ao extrato de <i>Annona foetida</i> hexânico observadas sob microscópio estereoscópio. A. Pupa exposta à concentração letal 10% presa a exúvia, aumento de 20 vezes. B. Adulto emergindo preso a exúvia pupal, concentração letal 10%, aumento de 25 vezes. C. Larva exposta à concentração letal 10% menor que as do grupo controle, aumento de 32 vezes. D. Larva exposta a concentração letal 50% presa a exúvia, aumento de 32 vezes. (Escala 1mm).....	53

LISTA DE TABELAS

TABELA I - Deslocamentos químicos do extrato diclorometano ^a e do composto Muricina A ^b	36
TABELA II - Deslocamentos químicos do extrato diclorometano ^a e do composto Muricina F ^b	37
TABELA III – Atividade larvicida de Dimetilsulfóxido, suas concentrações letais em %, respectivos intervalos de confiança, coeficiente angular (C.A.), qui-quadrado (X^2) e grau de liberdade (gl.) em populações de <i>Aedes aegypti</i> colônia Rockefeller, após 24 horas de exposição na temperatura de 25°C, 70%UR e 12:12 C/E.....	41
TABELA IV - Atividade larvicida de extratos de <i>Annona foetida</i> , suas concentrações letais (ppm), respectivos intervalos de confiança, coeficiente angular, qui-quadrado e grau de liberdade em populações de <i>Aedes aegypti</i> colônia Rockefeller, após 24 e 48 horas de exposição na temperatura de 25°C, 70%UR e 12:12 C/E.....	42
Tabela V - Tempo de duração dos experimentos de efeito sub letal dos extratos diclorometano e hexânico nas concentrações letais CL10, CL20 e CL50, apresentando o percentual de mortalidade das larvas, pupas e emergência de adultos.....	50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	12
1.1.1 Biologia.....	12
1.1.2 Vetores de Arboviroses: Problema de Saúde Pública.....	15
1.2 Uma alternativa: Inseticidas Botânicos.....	17
1.3 <i>Annona foetida</i>	20
1.4 Acetogeninas.....	21
1.6 Justificativa.....	23
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivo Geral.....	24
2.2 Objetivos Específicos.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Obtenção dos Extratos de <i>Annona foetida</i>	25
3.2 Análise Química.....	26
3.3 Preparação das Soluções Principais.....	26
3.4 Bioensaios.....	27
3.4.1 Atividade Larvicida.....	27
3.4.2 Período de Atividade Larvicida.....	30
3.4.3 Efeito Residual.....	31
3.4.4 Atividade Sub Letal	32
3.4.5 Análise Estatística.....	34
4. RESULTADOS	35
4.1 Análise Química.....	35
4.2 Atividade Larvicida.....	41
4.3 Período de Atividade Larvicida.....	45
4.4 Efeito Residual do Extrato Diclorometano.....	48
4.5 Atividade Sub Letal.....	49
5. DISCUSSÃO.....	54
5.1 Análise Química.....	54
5.2 Atividade Larvicida.....	55
5.3 Período de Atividade Larvicida e Efeito Residual.....	57
5.4 Atividade Sub Letal	58
6. CONCLUSÕES.....	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762):

1.1.1 Biologia

Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus, 1762) é um mosquito oriundo da África, originalmente descrito no Egito. Apresenta distribuição mundial, encontrando-se entre as latitudes 35° Norte e 35° Sul (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994). Além disso, sua distribuição também é limitada pela altitude e não costuma ser encontrado em zonas acima de 1.000 metros de altitude (Nelson, 1986; Braga & Valle, 2007).

Os adultos são reconhecidos por apresentarem tegumentos escuros com escamas claras presentes nas pernas formando anéis e principalmente por apresentarem uma distinta “lira” desenhada no mesonoto (Nelson, 1986). São adaptados ao ambiente urbano e altamente relacionados com a população humana. Tanto os machos como as fêmeas se alimentam de fluídos açucarados como néctar de flores e de outros nectários. As fêmeas também são hematófagas, pois precisam do sangue para completar o desenvolvimento dos ovos (Gadelha & Toda, 1985).

O número de oviposturas das fêmeas depende essencialmente da quantidade de sangue ingerido para o desenvolvimento dos ovos. O repasto satisfatório poderá ser alcançado com 3,0 a 3,5 mg de sangue. Geralmente, a fêmea faz uma postura após cada repasto sangüíneo, ovipositando cerca de 120 ovos (Forattini, 2002). O intervalo entre a alimentação sangüínea e a postura é, em regra, de três dias, dependendo das condições favoráveis, como temperatura. A fêmea pode se alimentar mais de uma vez, em especial quando perturbada antes de totalmente ingurgitada (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

As fêmeas utilizam preferencialmente criadouros artificiais para oviposição. Utilizam tanto os recipientes abandonados a céu aberto como recipientes que acumulam água, além de reservatórios naturais como bromélias, bambus e escavações em rochas (Consoli, 1994). Lopes *et al.* (1993) estudando a culicideofauna associada à ambiente urbano no sul do Brasil encontraram imaturos

da espécie em pneus, caixas d'água, recipientes plásticos, latas, recipientes metálicos, piscinas; preferindo os recipientes alocadas em sombra e com água limpa.

O tempo necessário para o desenvolvimento do ovo a adulto sofre variações de acordo com as condições de temperatura, umidade, disponibilidade de alimento e, normalmente, completa-se em 10 dias.

Os ovos são menores que 1 mm de comprimento são inicialmente brancos, mas após duas horas escurecem tornando-se praticamente negros e rígidos (Gadelha & Toda, 1985) graças a um processo de esclerotinização do endocóxon (Li, 1994). Segundo Li & Li (2006), os ovos de *A. aegypti* tornam-se acinzentados 60 minutos após a oviposição e completamente pretos após 1,5 horas (Figura 1).

Após a oviposição há o período de incubação, em que os ovos passam por um período no ambiente para que ocorra a embriogênese e a formação de larvas. Em condições favoráveis de temperatura e umidade, varia de quatro a sete dias. Se as condições não forem favoráveis, já que seus ovos não são colocados diretamente na água, pode ocorrer diapausa do ovo, esta é caracterizada como sendo uma suspensão temporária da eclosão após o término do desenvolvimento embrionário (Consoli, 1994). Fatores extrínsecos estão relacionados com a incidência da diapausa, como temperatura, fotoperíodo e umidade. A temperatura de 35°C foi definida como sendo o máximo de temperatura suportado pelo ovo de *A. aegypti* para o desenvolvimento embriogênico, e a menor temperatura que impediria esse desenvolvimento estaria entre 7°C e 12°C (Farnesi *et al.*, 2009).

Também, alguns ovos são extremamente resistentes a dessecação, sendo essa característica um grande obstáculo para o controle dessa espécie. Rezende *et al.* (2008) demonstraram que essa resistência à dessecação está relacionada com a presença de uma cutícula serosa que surge entre 11 e 13 horas após a oviposição.

As larvas eclodem apenas se os ovos estiverem em contato com a água e que esta contenha os estímulos necessários, como a presença de microorganismos e de compostos químicos, dando origem à larva de 1º estágio.

A larva cresce sequencialmente de comprimento, passando por quatro estágios. A duração do desenvolvimento larval depende da temperatura, da disponibilidade de alimento e da densidade larvária (Nelson, 1986) e seu desenvolvimento se completa entre cinco a sete dias. Em média o período larval é

mais longo para as fêmeas que para os machos, o que acarretaria em uma emergência posterior destas (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

As larvas podem filtrar até dois litros de água por dia (Consoli, 1994). Durante a ingestão dos alimentos as peças bucais movem-se juntas, produzindo de 180 a 240 batimentos por minuto e o movimento das escovas labiais faz com que a água flua em direção a cabeça trazendo as partículas de alimento. Passam a maior parte de tempo alimentando-se de detritos orgânicos, bactérias, levedos vivos, esporos de fungos, ou qualquer partícula de matéria orgânica. Não são seletivas às partículas para alimentação, facilitando a ação de substâncias larvicidas por ação digestiva (Forattini, 2002).

As pupas não se alimentam e esse estágio dura de dois a três dias em condições adequadas de temperatura. Correspondem ao estágio de transição entre o indivíduo do meio aquático para o terrestre (Forattini, 2002).

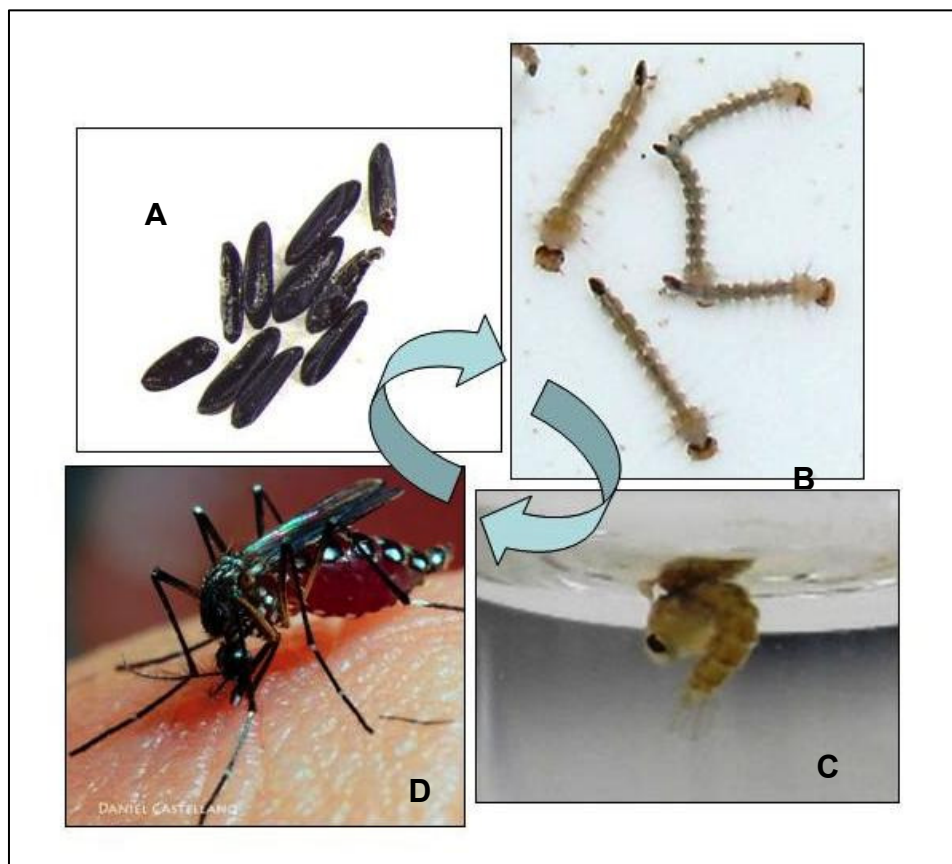


Figura 1: Ciclo de vida de *Aedes aegypti*; A: Ovo, B: Larva, C: Pupa, D: Adulto.

1.1.2 : Vetor de Arboviroses: Problema de Saúde Pública

Carlos Finlay em 1881, através da dissertação “The Mosquito, Hypothetically Considered the Carrier of Yellow Fever”, apontou pela primeira vez como vetor do vírus da febre amarela o mosquito *Culex fasciatus* que posteriormente passaria a ser denominado *Aedes aegypti*. Sendo esta espécie responsabilizada como vetor da febre amarela no ecossistema urbano. O último caso da forma urbana da doença no Brasil ocorreu em 1942 (Lima, 1985) e nas Américas ela passou a ser apenas enzoótica (Forattini, 2002). Entretanto, a reurbanização da doença ainda é um risco potencial, devido à ampla distribuição do *A. aegypti*, a dificuldade de seu controle e a migração urbano-rural (Coura, 2005).

A Organização Mundial de Saúde aponta que entre 2.5 bilhões de pessoas estão em risco com essa doença no mundo e são estimados que ocorram 50 milhões de casos anualmente (Who, 2009)¹. Nas Américas, *A. aegypti* também é o único mosquito incriminado por ser vetor do vírus da dengue. A ocorrência de casos de Dengue no Brasil teve seu início em 1846 (Figueiredo, 2003). Devido a oscilações no número de casos ao longo do século 20 nas diferentes regiões do país, principalmente a partir de 1980, tem sido considerada nos últimos anos como um dos principais problemas de saúde pública.

A procura por uma vacina contra o vírus da dengue teve início durante a Segunda Guerra Mundial. Entretanto a ocorrência de quatro sorotipos (DEN 1, 2, 3, 4), a falta de informação dos mecanismos patogênicos e a falta de incentivos econômicos dificultam os avanços nessa área (Hombach, 2007).

Como ainda não há uma vacina eficaz contra o vírus da dengue, a melhor forma de prevenção da doença incluem: programas integrados de vigilância epidemiológica, educação ambiental e principalmente a integração com a sociedade em ações voltadas na redução de potenciais locais de desenvolvimento de formas imaturas (Gubler, 1998). No controle integrado de vetores existe a necessidade de um planejamento, a verificação das condições ambientais e o conhecimento da

¹ World Health Organization. Dengue Fact sheet, 2009. Geneva; 2009. [27/6/2009] Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>

dinâmica populacional dos vetores, direcionando, assim, a seleção do conjunto de ações que devem ser tomadas para manter essas populações em níveis que não causam risco a saúde humana (Braga & Valle, 2007).

A utilização de repelentes e, principalmente, de inseticidas são medidas utilizadas contra esses vetores. As principais classes de inseticidas sintéticos utilizados no controle de vetores são os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (Bisset, 2002).

Os organoclorados, como o diclorodifeniltricloroetano (DDT), são os inseticidas mais antigos. Suas propriedades inseticidas foram descobertas em 1939 por Paul Müller e atuam no canal sódio-potássio nas membranas dos axônios (D'Amato *et al.*, 2002). Os organofosforados são os inseticidas que contem fósforo. O temephos é o único desse grupo com uso generalizado no controle de larvas de mosquitos e age inibindo a Acetilcolinesterase (AChE). Já os piretróides sintéticos como a cipermetrina, utilizada como adulticida, são produzidos em laboratório a partir de uma substância natural o piretro, extraída do crisântemo. Essa substância age mantendo abertos os canais de sódio das membranas dos neurônios (Braga & Valle, 2007).

Quando utilizamos um mesmo produto por diversas gerações no controle de uma determinada espécie, ele pode selecionar populações resistentes. Segundo Georghiou & Taylor (1986) os mecanismos que influenciam na velocidade dessa seleção podem ser categorizados em fatores genéticos, biológicos-ecológicos e operacionais, sendo que apenas esses últimos fatores podem ser controlados pelo homem a fim de diminuir o aparecimento da resistência.

O primeiro registro da seleção da resistência em mosquitos pelo uso de larvicidas e adulticidas data de 1947, quando populações de *Aedes taeniorhynchus* Wiedemann, 1821 e *Aedes sollicitans* Walker, 1856 começaram a demonstrar resistência ao DDT na Florida (Brown, 1986).

O impacto na natureza que os inseticidas sintéticos, como os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides causam e o problema da seleção de populações de mosquitos resistentes a esses, justificam a necessidade de buscar alternativas de controle de vetores mais sustentáveis e menos agressivas ao ambiente.

1.2 Uma Alternativa: Inseticidas Botânicos

Os derivados de planta, extratos e óleos, são amplamente conhecidos pela sua diversidade química e pela sua variada aplicação na indústria. As plantas possuem uma rica fonte de bioativos químicos que podem ajudar no controle de pragas. O conhecimento popular sobre o uso e a eficácia das plantas contribui de forma relevante para a divulgação de suas propriedades, despertando o interesse de pesquisadores de diferentes áreas do conhecimento (Maciel *et al.*, 2002).

Muitas plantas são importantes fornecedoras de metabólitos secundários com atividade inseticida. Essas substâncias são de baixo peso molecular, muitas vezes produzidas em pequena quantidade, como alcalóides, terpenóides e derivados fenilpropanóides, e funcionariam naturalmente como agentes defensivos contra predadores (Barreto, 2005).

Segundo Regnault-Roger (1997) os metabólitos secundários podem ser utilizados como um método alternativo aos inseticidas sintéticos, pois normalmente agem em doses baixas e com ações específicas, além de poucos serem tóxicos a mamíferos.

Muitos trabalhos recentes têm demonstrado a busca e o desenvolvimento de extratos brutos ou óleos essenciais ou, ainda, de compostos isolados que atuam contra mosquitos, inclusive contra *A. aegypti*. Um exemplo é o estudo de Cavalcanti *et al.* (2004) que avaliaram a atividade larvicida de nove óleos essenciais de plantas encontradas no Nordeste brasileiro, observando que os óleos de *Ocimum americanum* e *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae) obtiveram a melhor eficácia contra *A. aegypti*, CL₅₀ de 67 ppm e 60 ppm, respectivamente.

Esses derivados botânicos apresentam diversas atividades contra insetos, podendo ter efeito larvicida, serem inibidores de oviposição, de crescimento e reprodução ou interferir nos receptores olfativos sendo atrativos ou repelentes. Também podem atuar em todos os estágios de vida dos mosquitos ou agir de forma diferenciada nas diferentes espécies (Sukumar, 1991). Prajapati *et al.* (2005) demonstraram que um mesmo extrato pode apresentar mais de um efeito na mesma espécie ou em famílias diferentes. Os autores avaliaram o efeito inibidor da oviposição, a atividade inseticida e repelente de óleos essenciais de 10 plantas medicinais contra *A. aegypti*, *Anopheles stephensi* Liston, 1901 e *Culex*

quinquefasciatus Say, 1823. Concluíram que os óleos de *Juniperus macropoda* (Cupressaceae) e *Pimpinella anisum* (Apiaceae) foram os que apresentaram maior eficácia como larvicida e ovicida.

A composição química das plantas altera conforme a resposta desta aos diferentes estímulos ambientais. Essa característica é importante ao se produzir um produto de origem botânica.

Fatores como diferentes partes da planta, o solvente utilizado para extração; a interferência da luz e a origem geográfica da planta podem alterar a ação dos fitoquímicos (Sukumar, 1991). A importância desses fatores pode ser verificada no estudo de Rahuman *et al.* (2008), onde avaliaram cinco plantas da família Euforbiaceae utilizando extratos de acetato de etila, butanol e de éter de petróleo contra *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*. Nos dois primeiros extratos foi verificada baixa mortalidade das larvas. Entretanto em todos os extratos de éter de petróleo ocorreu elevada mortalidade contra as duas espécies de Culicidae, sendo os mais eficazes o extrato de *Euphorbia tirucalli* L. e *Jatropha curcas* L.

Além dessas variáveis reportadas por Sukumar (1991), as condições de execução dos bioensaios, como a temperatura, o estado nutricional de adultos e imaturos e as substâncias utilizadas na diluição em água dos fitoquímicos após sua extração, podem alterar a suscetibilidade dos indivíduos ou a toxicidade dos extratos. Quando Wandescheer *et al.* (2004) compararam a atividade inseticida de extratos etanólicos do fruto de *Melia azedarach* e *Azadirachta indica*, ambas espécies da família Meliaceae, nas temperaturas de 25°C e 30°C contra larvas de *A. aegypti* alimentadas e não alimentadas durante o experimento, verificaram que os valores das concentrações letais para as larvas não alimentadas foram menores para *Azadirachta indica* em ambas as temperaturas. Quando o experimento foi realizado com alimento, o extrato de *Melia* foi mais eficiente que *Azadirachta indica* a temperatura de 25° C, mas não na temperatura de 30° C, sendo nessa temperatura a concentração letal de *Azadirachta indica* a menor verificada ($CL_{50} = 0,017g\%$) nos experimentos.

Como esses derivados de plantas normalmente não são solúveis em água após sua extração, muitos pesquisadores utilizam Dimetilsulfóxido (DMSO) ($CH_3)_2SO$ como solvente (Kim *et al.*, 2007). Segundo Santos *et al.* (2003) o DMSO possui várias aplicações farmacológicas e terapêuticas, sendo usado no tratamento de várias doenças. Nas células o solvente possui diferentes efeitos como causar

apoptose, interfere no metabolismo de lipídios, age no ciclo celular, na expressão de proteínas, na membrana celular, retira radicais livres, entre outros efeitos (Hanslick *et al.*, 2009; Leekumjorn & Sum, 2006; Santos *et al.*, 2003). O DMSO pode ser tóxico para insetos dependendo da quantidade utilizada podendo potencializar a mortalidade dos indivíduos quando misturados aos extratos ou óleos de plantas.

A utilização de inseticidas a partir de plantas pode ser vantajosa em relação aos sintéticos. Como são provenientes de recursos renováveis e por serem uma mistura de vários compostos ativos agindo sinergicamente, a seleção de resistentes pode ocorrer em menor intensidade (Barreto, 2005). Por outro lado, devem ser bem estudados, pois esses fitoquímicos podem colocar em risco outros organismos que não seriam o alvo do controle. Sivagnaname & Kalyanasundaram (2004) analisaram o efeito de extratos metanólicos de folhas de *Atlantia monophylla* (Rutaceae) contra *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stenphesi* e *Aedes aegypti*. Observaram uma atividade larvicida maior contra *A. aegypti* e as pupas de *Anopheles stenphesi* foram mais suscetíveis. Quando testaram o extrato em outros organismos, observaram que ele foi seguro para três espécies de peixes predadores testados, *Gambusia affinis* (Baird & Girard, 1853) (Cyprinodontiformes: Poeciliidae), *Poecilia reticulata* Peters, 1859 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) e *Diplonychus indicus* Venkatesan & Rao, 1980 (Hemiptera: Belostomatidae).

Estudos que indicam a ação dos produtos botânicos em análises morfológicas das larvas e a indicação da classe do composto químico desses produtos são importantes para saber a real eficácia do inseticida botânico.

Arruda *et al.* (2003) avaliaram o efeito do extrato bruto etanólico da casca do caule de *Magonia pubescens* (Sapindaceae) no tubo digestivo de larvas de *A. aegypti*. Observaram que a maior parte das alterações ocorreu no mesêntero, sendo as principais: destruição total ou parcial das células, alta vacualização citoplasmática, aumento do espaço subperitrófico, hipertrofia das células e aparente estratificação epitelial. Continuando os trabalhos com *Magonia pubescens*, Silva *et al.* (2004) fracionaram o mesmo extrato bruto obtendo nove frações, denominados pelos autores de MP-1 a MP-9. Todas foram avaliadas contra *A. aegypti*. e apenas as frações denominadas MP-7, MP-8 e MP-9 apresentaram-se ativas, essas frações ativas foram caracterizadas por condensados de tanino. A MP-9 foi a que apresentou o maior potencial larvicida com CL₅₀ de 3,1 ppm e CL₉₀ de 36,6 ppm.

Diferentes substâncias inseticidas também já foram identificadas em outras plantas. No extrato de éter de petróleo do fruto de *Piper nigrum* L. (Piperaceae), que apresentou atividade larvicida contra o *A. aegypti*, foram isoladas duas amidas inseticidas, denominadas pipnoohine e pipyahyine (Siddiqui *et.al.*, 2004). Outro exemplo de substâncias que chamam a atenção pelas suas propriedades inseticidas são as acetogeninas, essas isoladas de plantas tropicais da família Annonaceae.

Assim, os pesticidas sintéticos, como os organofosforados continuarão desempenhando papel importante no controle integrado de vetores, entretanto os inseticidas derivados de plantas podem ser considerados como uma promissora alternativa a ser incluída nas estratégias de controle. Barreiras ainda devem ser superadas até sua possível comercialização em grande escala. Como aprofundamento de estudos envolvendo o potencial de plantas inseticidas, seus compostos e comportamento frente às diversas variáveis que podem alterar a toxicidade.

1.3 *Annona foetida*

Annona foetida é conhecida popularmente como “envira-ata”, “envireira” e “graviola do mato”. Pertencente a família Annonaceae, essa planta distribui-se pela Amazônia Brasileira e Peruana, ocorrendo em platô e vertente. Floresce em abril, julho e outubro, frutificando de outubro a novembro (Maas *et.al.* 2007).

São árvores de 3 a 15 m de altura e possuem de 4 a 15 cm de diâmetro seus ramos são cobertos por uma casca verruculosa, as folhas possuem de 10 a 16 cm de comprimento e 5 a 7,5 cm de largura, são obovaladas e elíptico obovalada, possuem nervuras secundárias conspícuas, a flor é piramidal subglobosa. Os frutos são ovais a cilíndricos, sementes elipsóides, obovóides, com coloração castanha de 7 a 10 cm de comprimento e 6 a 7 mm de largura (Maas *et al.*, 2007).

A. foetida já demonstrou ter atividade biológica, como , por exemplo, atividade antimicrobiana e leishmanicida. Costa *et. al.* (2008a) estudaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de folha dessa planta, concluindo que o óleo tem atividade contra o fungo *Candida albicans* e a bactéria *Rhodococcus equi*. Além disso, apresentou atividade leishmanicida contra o protozoário *Leishmania*

guyanensis e não demonstrou ser citotóxico contra macrófagos. Costa *et.al.* (2008b) também fracionaram o extrato bruto obtendo quatro alcalóides, todos apresentando atividade leishmanicida; sendo eles N-hydroxyannomontine, O-methylmoschatoline, annomontine e liriodenine, os dois últimos apresentaram melhores resultados contra *Leishmania braziliensis*.

Não há registro na literatura de investigação demonstrando atividade inseticida dessa planta.

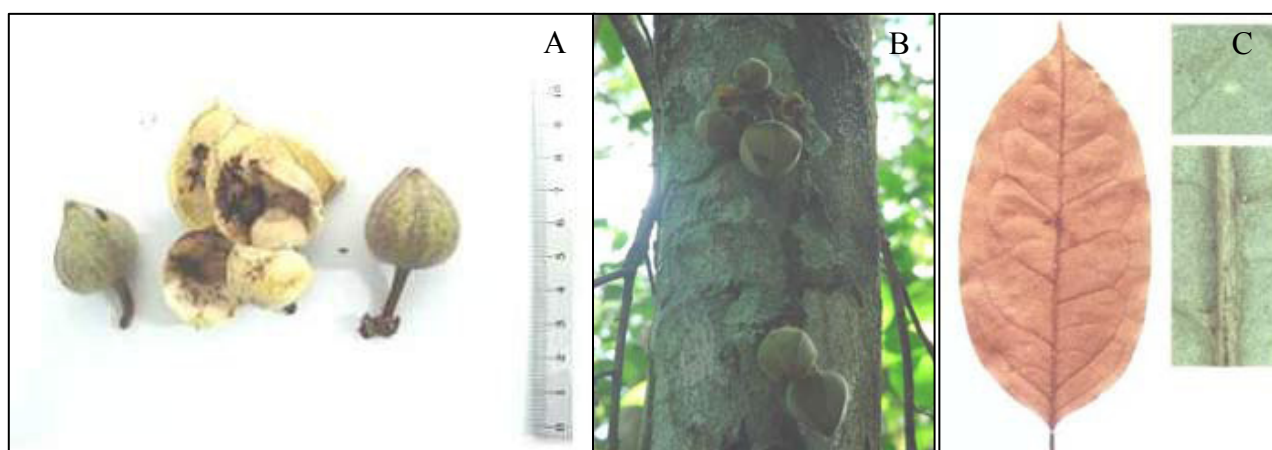


Figura 2: Imagens da espécie *Annona foetida*. A. Botões e flor, B. Caule com botões e C. Folha
Fonte: Vilaça-Costa (2004).

1.4 Acetogeninas

As acetogeninas são substâncias naturais presentes nas cascas, raízes e, principalmente, em sementes de representantes da família Annonaceae. São caracterizadas por apresentarem um esqueleto constituído de 32 a 34 átomos de carbono, contendo um anel γ -lactônico, geralmente α,β -insaturado e um, dois ou três anéis tetrahydrofurânicos, que podem ser ou não adjacentes (Santos *et. al.*, 1994). Algumas dessas substâncias já são protegidas por patentes.

A uvaricina foi a primeira acetogenina isolada, a partir de *Uvaria accuminata* (Annonaceae) em 1982 (Alali *et al.*, 1999). Recentemente, Alali *et al.* (1999) apresentaram revisão das acetogeninas de anonáceas mostrando que até essa data cerca de 350 acetogeninas tinham sido isoladas de 37 espécies, sendo que 50% desses constituintes apresentavam significativas atividades biológicas como antitumoral, antiparasitária, pesticida, antiprotozoários e antimicrobiana. Essas

substâncias agem nas mitocôndrias inibindo a NADH – ubiquinona oxidoreductase (González-Coloma *et al.*, 2002).

1.6 Justificativa

Diante da ausência de uma vacina contra os sorotipos do vírus da Dengue, o controle do vetor apresenta-se como a única alternativa na redução deste agravo a saúde humana. O método de controle ao vetor *Aedes aegypti* é o uso continuado de inseticidas químicos sintéticos e isso tem levado à seleção de populações resistentes. Dessa forma, a busca de produtos alternativos que possam ser integrados ao seu controle químico e que reduzam a velocidade de seleção dessas populações resistentes, direcionou a investigação da atividade biológica de fitoquímicos extraídos de *Annona foetida*, espécie pertencente à Amazônia Brasileira e Peruana.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar a composição química de extratos de *Annona foetida* e avaliar a eficiência dos extratos enquanto inseticida sobre o desenvolvimento de imaturos de *Aedes aegypti*.

2.2 Objetivos específicos

1. Determinar a composição química dos extratos de *Annona foetida* através da análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

2. Determinar a susceptibilidade de larvas de terceiro estágio final ou quarto inicial de *A. aegypti*, aos extratos de *Annona foetida*, para estimar as concentrações letais (CL₅₀, CL₉₅, e CL₉₉).

3. Determinar o período de atividade larvicida (inicial e final) dos extratos hexânico e diclorometano de *Annona foetida* em bioensaios com larvas de terceiro estágio final ou quarto inicial de *A. aegypti*.

4. Analisar a persistência da atividade larvicida do extrato diclorometano de *A. foetida* em bioensaios com larvas de terceiro estágio final ou quarto inicial *A. aegypti* sob temperatura constante de 25°C.

5. Avaliar os efeitos das concentrações sub letais CL₅₀, CL₂₀ e CL₁₀ do extrato hexânico e CL₅₀ e CL₁₀ do extrato diclorometano de *Annona foetida*, sobre o desenvolvimento de *A. aegypti*.

6. Determinar a susceptibilidade de larvas de terceiro estágio final ou quarto inicial de *A. aegypti*, ao solvente Dimetilsulfóxido (DMSO) para estimar as concentrações letais (CL₅₀, CL₉₅, e CL₉₉).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos Extratos de *Annona foetida*:

Os extratos utilizados nesse estudo foram extraídos das sementes de *Annona foetida*. Essas sementes foram coletadas em árvores encontradas na reserva Florestal Adolpho Ducke, no município de Manaus (AM), área pertencente ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, em 17 de outubro de 2007. O material botânico coletado, flores, folhas e sementes, foram identificados pelo Dr. Antonio Carlos Weber do Departamento de Biologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e a exsicata da planta foi depositada no herbário da própria UFAM sob o número de registro 7275.

As sementes foram secas em uma estufa de ar circulante à temperatura de 40° C e reduzidas a pó, obtendo-se no final do processo 45,8 g de material seco.

Após seco e moído, esse material foi submetido à extração em Mariotte à temperatura ambiente durante 28 dias com solventes em ordem crescente de polaridade, hexano (4 x 150 ml), diclorometano (4 x 150 ml) e metanol (4 x 150 ml), com sua renovação em intervalos de 2 a 3 dias. A torta remanescente sempre sendo descartada para aquele solvente sendo usada para a formação do outro extrato conforme a Figura 3.

Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotatório à pressão reduzida e em temperatura de 50°C. Em seguida os mesmos foram secos em dessecador resultando nos extratos hexânico (7,38g), diclorometano (2,52g) e metanólico (1,87g), respectivamente.

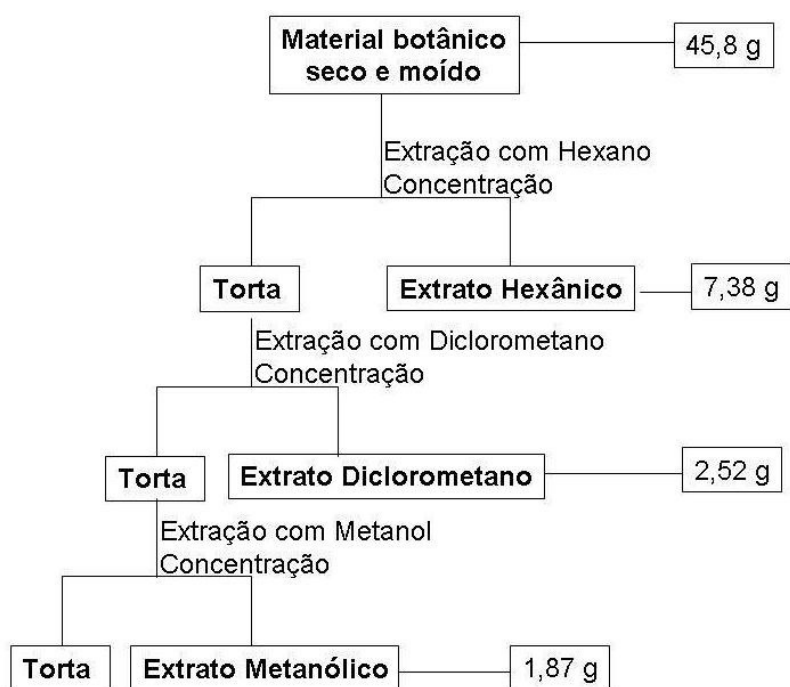


Figura 3: Fluxograma de obtenção dos extratos brutos da semente de *Annona foetida*, em hexano, diclorometano e metanol.

3.2 Análise Química:

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram registrados em um espectrômetro Bruker Avance 400 operando a 9,4 Tesla, observando ^1H a 400 MHz e ^{13}C a 100 MHz. Como solventes deuterados foram utilizados clorofórmio e metanol. Os valores de deslocamentos químicos foram dados em partes por milhão (ppm) relativos ao tetrametilsilano (TMS), utilizado como padrão de referência interna (δ 0,00).

3.3 Preparo das Soluções Principais:

A partir do rendimento total dos extratos, fez-se uma solução principal para cada extrato de *Annona foetida*.

Para a fração de hexano e diclorometano a concentração da solução principal foi de 100.000 ppm (partes por milhão). Para isso, pesou-se um grama do extrato, em uma balança analítica de precisão, e solubilizou-se com 9 ml com o promotor de solubilidade o dimetilsulfóxido (DMSO - PA) - marca Biotec® e pureza 99% - chegando a um volume final de 10 ml. Essa solução foi agitada até a completa diluição. Essas soluções foram preparadas em um balão volumétrico de 10 ml. Após estarem prontas e homogeneizadas, elas foram envolvidas com papel alumínio, protegendo-as da luminosidade e guardadas à temperatura ambiente em local seco e seguro.

Para o extrato metanólico fez-se uma solução a 50.000 ppm. Pesou-se em um balão volumétrico de 10 ml, 0,5 gramas do extrato e completou seu volume com dimetilsulfóxido, agitando até a completa diluição, essa solução foi preparada como descrito para os extratos hexânico e diclorometano e armazenada da mesma maneira.

Essas soluções principais foram utilizadas para a calibração dos extratos a partir de uma série de concentrações, sendo escolhidas aquelas que apresentaram bons resultados.

3.4 Bioensaios

3.4.1 Atividade Larvicida

Os bioensaios de atividade larvicida seguiram o protocolo da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1981a, 1981b), com algumas modificações. Os testes foram realizados em apenas um dia ou em quatro dias diferentes e, em geral, o desenho experimental seguiu Robertson & Preisler, 1992.

A susceptibilidade larval de *A. aegypti* foi determinada sob a temperatura de 25°C em câmara tipo BOD modelo 347 CDG. As larvas utilizadas nos bioensaios foram provenientes de uma colônia da linhagem Rockefeller CDC (Center for Disease Control) mantida em condições de laboratório a 25°C (± 1) com fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas de escuro a 70% ($\pm 10\%$) de umidade relativa. Os ovos da colônia Rockefeller foram submersos em água desclorada em copos plásticos com

capacidade para 700 ml. Adicionou-se 0,026g de ração de gato triturada Purina Cat Chow® para induzir a eclosão larval. Após a ocorrência da eclosão, essas foram transferidas para bandejas plásticas (35,5 cm x 21,5 cm x 6,5 cm) contendo 3000 ml de água também desclorada. Essas foram alimentadas com ração de gato triturada Purina Cat Chow® (0,026g) até atingir o terceiro estágio final ou quarto inicial.

Atingindo o estágio larval descrito anteriormente, as larvas foram contadas e transferidas com auxílio de uma pipeta de Pasteur, para copos plásticos descartáveis de 50 ml. Cada copo continha 20 larvas e 20 ml da mesma água desclorada que se encontravam as larvas anteriormente. Essas larvas ficaram armazenadas em câmara climatizada enquanto os copos com as soluções eram preparados.

As larvas de terceiro estágio final ou quarto inicial foram expostas a seis concentrações diferentes de extrato de *Annona foetida*, para cada fração do extrato e para a calibração do DMSO.

Os experimentos foram realizados em quadruplicada, totalizando 80 larvas por concentração. Cada réplica continha 2 ml de solução que era composta de extrato (conforme a concentração) mais DMSO a 1% . A solução com DMSO era agitada em um equipamento Vortex da marca Vertex modelo QL-901 e, após a agitação, era misturada nos recipientes com capacidade de 300 ml, com 178 ml de água mineral Frescale®, ficando com um volume de 180 ml. Após homogeneização da solução, com um auxílio de um bastão de vidro por 20 segundos, esperou-se cerca de 5 minutos e então as larvas anteriormente separadas foram adicionadas juntamente com os 20 ml de água, chegando a um volume final de 200 ml (água mineral mais DMSO e extrato) (Figura 4).

Previamente, o dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado como solvente foi calibrado em cinco concentrações diferentes de 1% a 5%, até se encontrar uma concentração que não ocasionasse nenhuma mortalidade nas larvas. A metodologia utilizada na calibração foi a mesma descrita, acima, para os extratos.

As soluções escolhidas para a realização dos testes da fração hexânica foram as concentrações de um a 25 ppm (1, 3, 10, 15, 20 e 25 ppm), para a fração diclorometano de 0.1 a 2 ppm (0.1, 0.5, 0.8, 1 e 2 ppm) e as concentrações de 10 a 110 ppm (10, 20, 60, 90 e 110 ppm), através da diluição da solução principal em água mineral (Frescale®). Todas as concentrações foram realizadas em quadruplicata e para as frações hexânica e diclorometano foram realizadas em

quatro dias diferentes. Pelo baixo rendimento obtido na extração metanólica não houve material suficiente para repetir o experimento por quatro dias diferentes como nas outras frações, assim foi realizado apenas um bioensaio.

Para o controle dos bioensaios com as frações do extrato, 80 larvas foram expostas ao DMSO na concentração de 1%.

Após a preparação, os recipientes contendo a solução com as larvas foram mantidos em câmara climatizada modelo 347 CDG, à temperatura de 25° C e umidade relativa de 70% ($\pm 10\%$).

A mortalidade foi verificada após 24 e 48 horas de exposição aos extratos e para o DMSO após 24 horas. Larvas incapazes de atingir a superfície da solução foram consideradas mortas. As larvas mortas foram descartadas após 24 horas e as vivas deixadas para serem avaliadas em 48 horas. As larvas sobreviventes no final do experimento foram descartadas.

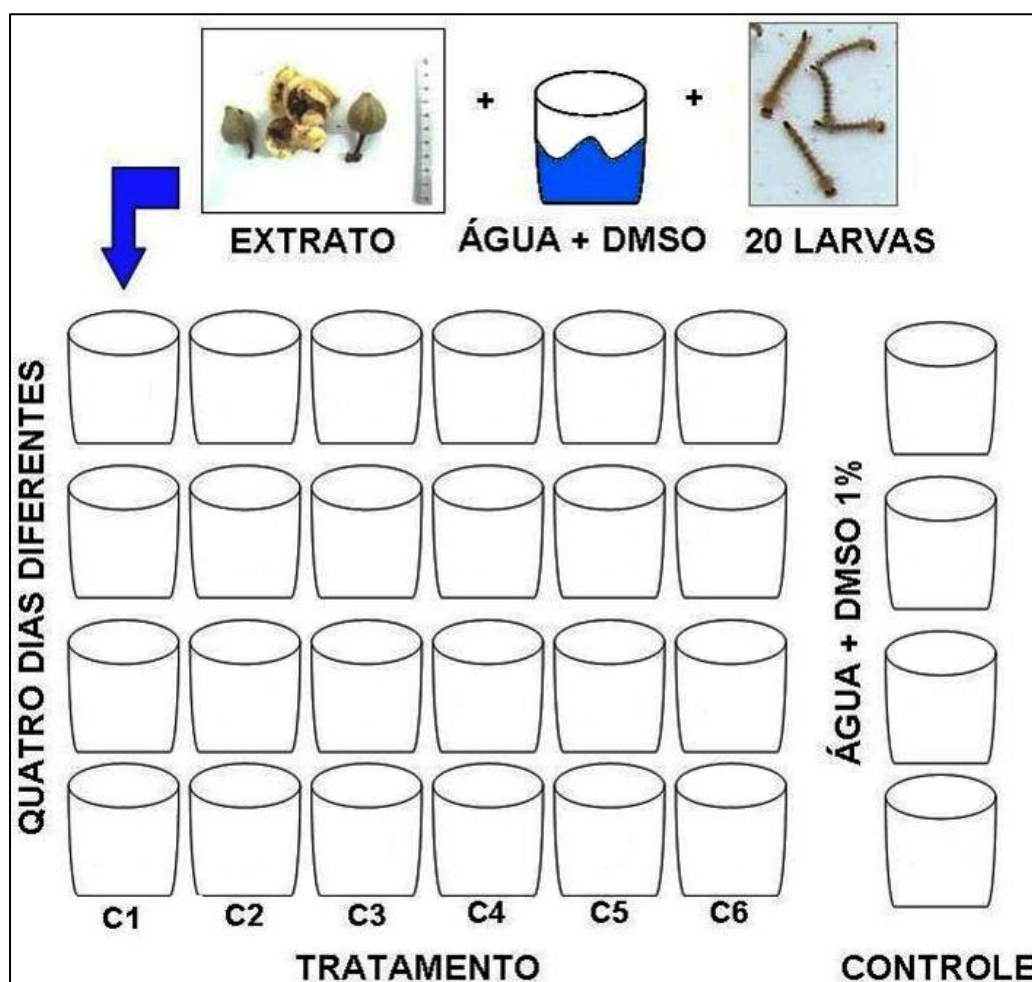


Figura 4: Modelo experimental de suscetibilidade aos extratos de *Annona foetida* sobre larvas de *Aedes aegypti*.

C: concentração.

3.4.2 Período de Atividade Larvicida:

Foram utilizadas larvas de terceiro estágio final ou quarto inicial da colônia Rockefeller, para avaliar o período de atividade larvicida, segundo metodologia utilizada por Prophiro (2008), com modificações. Para tanto, utilizou-se a concentração correspondente a CL₉₉ (47,22 ppm), CL₅₀ (0,73 ppm), CL₁₀ (0,074 ppm) e CL₂₀ (0,16 ppm) para o extrato diclorometano e na concentração correspondente a CL₅₀ (15,17 ppm) e CL₁₀ (1,79 ppm) para o extrato hexânico. Essas concentrações foram anteriormente obtidas nos resultados do experimento de atividade larvicida.

Vinte larvas foram colocadas em recipientes, com capacidade para 300 ml, contendo 200 ml de solução, preparadas conforme descrito no item 3.4.1 (Atividade Larvicida). Após, foram acondicionadas em câmara climatizada (BOD), à temperatura de 25°C, umidade relativa de 70% ($\pm 10\%$) e fotoperíodo de 12 horas luz 12 horas escuro. Foram realizadas quatro réplicas em quatro dias diferentes para o extrato hexânico e diclorometano (Figura 5).

A mortalidade foi verificada após 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 24 horas de exposição aos extratos. Larvas moribundas, incapazes de atingir a superfície da solução quando tocadas foram consideradas mortas (WHO 1981a, 1981b). A cada hora foi verificada a mortalidade, as larvas mortas foram retiradas e mantidas as vivas. O mesmo procedimento foi realizado com o grupo controle, esse contendo apenas água e DMSO a 1%.

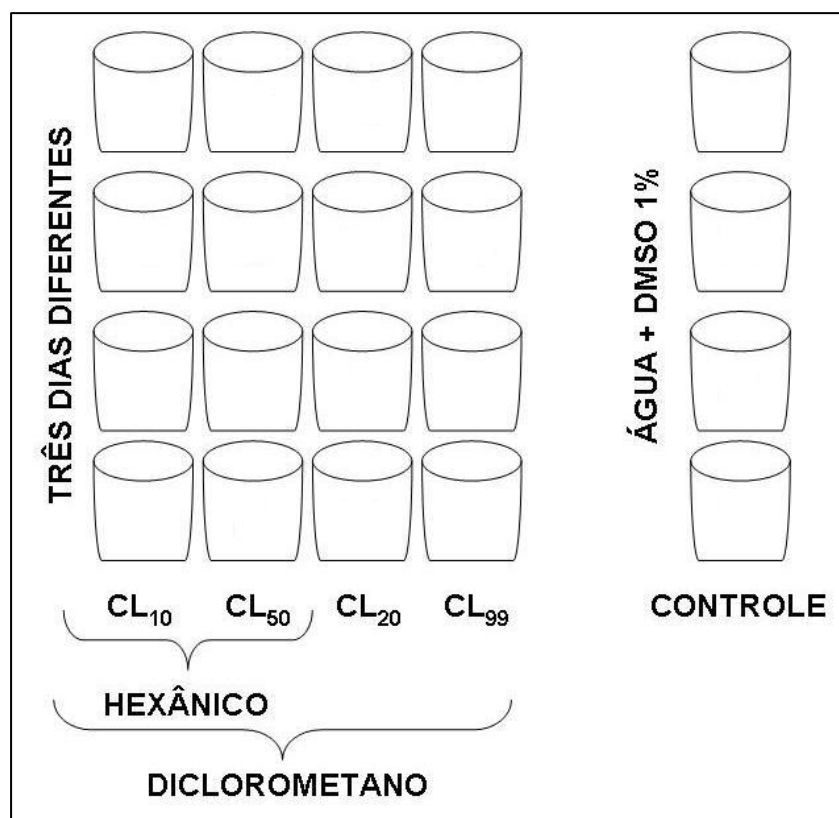


Figura 5: Modelo experimental de análise do período de atividade larvívora dos extratos de *Annona foetida*. CL: concentração letal.

3.4.3 Efeito Residual:

O efeito residual foi verificado apenas para a CL₉₉ (47,22 ppm) do extrato diclorometano. Em virtude da quantidade de material obtido dos outros extratos não foi possível a realização deste experimento com as outras frações.

Para tanto, utilizou-se larvas de terceiro estágio inicial ou quarto estágio final de *Aedes aegypti* da colônia Rockefeller. Vinte larvas foram adicionadas a solução contendo 200 ml de água, extrato e DMSO, conforme já descrito no item 3.4.1 (Atividade Larvívora), os recipientes foram mantidos em câmara climatizada (BOD), à temperatura de 25°C, umidade relativa de 70% (±10%) e fotoperíodo de 12 horas luz 12 horas escura. Foram realizadas quatro réplicas em três dias diferentes (Figura 6).

Após 24 horas de exposição ao tratamento, a mortalidade foi verificada. As larvas sobreviventes foram descartadas, a solução era filtrada, com peneira de malha de 4 mm, e novas vinte larvas de terceiro estágio final ou quarto inicial eram adicionadas. Esse procedimento foi repetido até não se obter mais mortalidade. No grupo controle, a solução continha apenas DMSO a 1% e água e o mesmo procedimento observado.

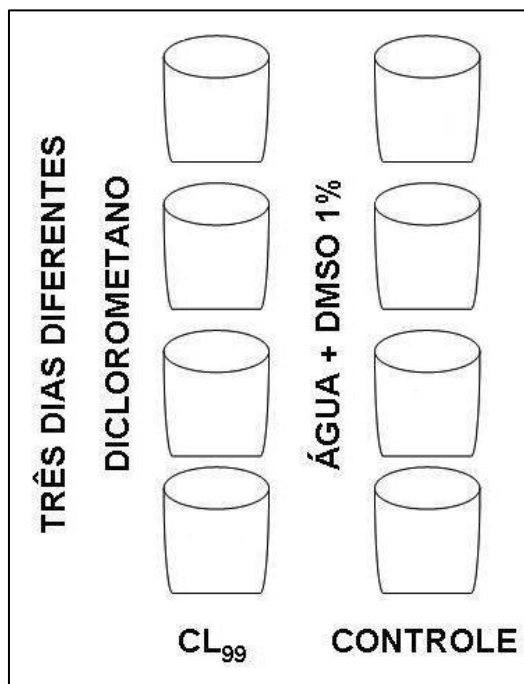


Figura 6: Modelo experimental de análise do efeito residual do extrato diclorometano de *Annona foetida*. CL: concentração letal.

3.4.4. Atividade sub letal:

Para avaliar o efeito de concentrações sub letais, considerou-se concentrações sub letais como concentrações letais que não matam 100% das larvas em 24 horas, utilizou-se as concentrações correspondentes a CL₅₀ e CL₁₀ da fração hexânica e as concentrações CL₅₀, CL₂₀ e CL₁₀ do extrato diclorometano, previamente calculados nos experimentos de Atividade Larvicida. Assim, as concentrações utilizadas foram: fração hexânica: CL₅₀: 15,17 ppm; CL₁₀: 1,79 ppm; fração diclorometano: CL₅₀: 0,73 ppm; CL₂₀: 0,16 ppm; CL₁₀: 0,074 ppm; para larvas

de terceiro instar final e quarto inicial de larvas de *Aedes aegypti* da colônia Rockefeller.

Cada uma das quatro réplicas continha vinte larvas. O seu conteúdo era de 200 ml de solução, preparadas em recipientes com capacidade de 300 ml. No grupo controle a solução utilizada foi apenas água e DMSO, na concentração de 1%. O preparo das soluções foi executado conforme o item 3.4.1 (Atividade Larvicida). Para alimentação das larvas adicionou-se ração para gatos Purina Cat Chow® (0,026g para cada copo) triturada em cada réplica a cada 96 horas, para viabilizar a possível emergência de adultos. Posteriormente, os recipientes foram acondicionados em câmara climatizada (BOD), à temperatura de 25°C, umidade relativa de 70% ($\pm 10\%$) e fotoperíodo de 12 horas luz 12 horas escuro (Figura 7).

O comportamento larval, mudança de estágio, presença de exúvias emergência de adultos e mortalidade das larvas e pupas, foram avaliadas diariamente até a obtenção dos adultos. Foram considerados adultos vivos apenas aqueles que conseguiram se libertar completamente da exúvia. O experimento foi conduzido até a última pupa ou adulto morrer ou o último adulto emergir.

As larvas e pupas mortas foram retiradas e fotografadas nos equipamentos ópticos do Tax-online, Rede Paranaense de Coleções Biológicas (Foto: Leica IM50 Versão 5; Montagem: Auto-montage Pro 5.03 Syncroscopy; Câmara: Leica DFC500; Lupa: Leica Mz16). As larvas vivas continuaram expostas ao extrato para continuarem seu desenvolvimento.

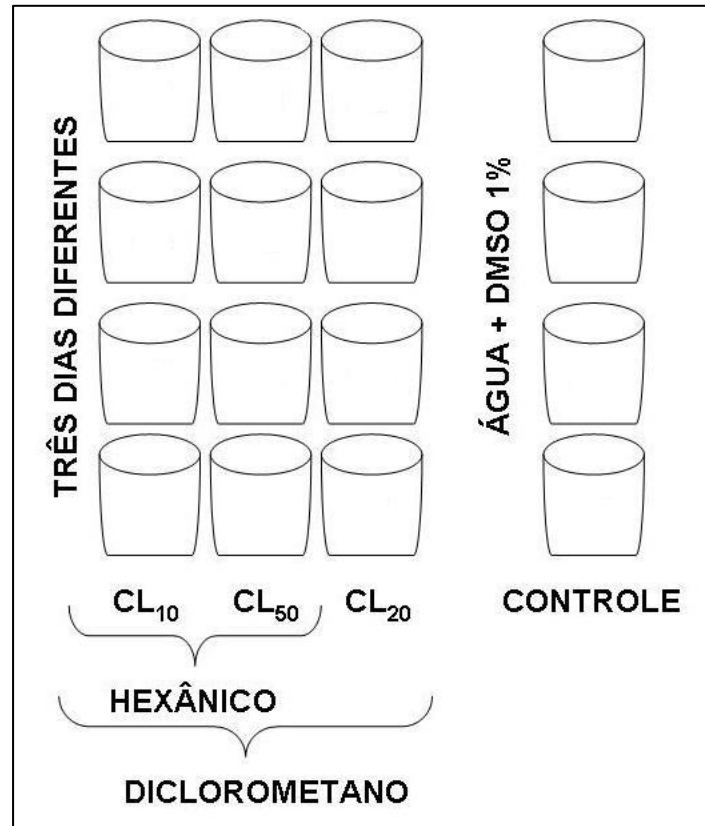


Figura 7: Modelo experimental de análise do efeito de concentrações sub letais dos extratos diclorometano e hexânico de *Annona foetida*. CL: concentração letal.

3.5 Análise Estatística:

Os valores das concentrações letais (CL_{10} , CL_{20} , CL_{50} , CL_{95} e CL_{99}), o valor de X^2 , coeficiente angular e intervalos de confiança foram determinados pela análise PROBIT GW-BASIC (Finney, 1971), com nível de significância $p < 0,05$. Os dados de período de atividade larvídica foram sujeitos a análise de Kruskal-Wallis (KW) através do programas estatístico STATISTICA 7.0, com nível de significância $p < 0,05$. Os gráficos foram confeccionados nesse mesmo programa e a curva de regressão no programa estatístico BIostat 2008 PROFESSIONAL.

4. RESULTADOS

4.1 Análise Química

A análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H (Figura 9) e ^{13}C (Figuras 10 e 11) do extrato diclorometano de *Annona foetida*, demonstrou uma alta concentração de acetogeninas. Pela análise do espectro de RMN de ^1H , observou-se sinais típicos de acetogeninas de anonáceas de acordo com o modelo das acetogeninas muricina A e muricina F (Figura 8) isoladas de *Annona muricata* (Annonaceae) (Chang & Wu, 2001).

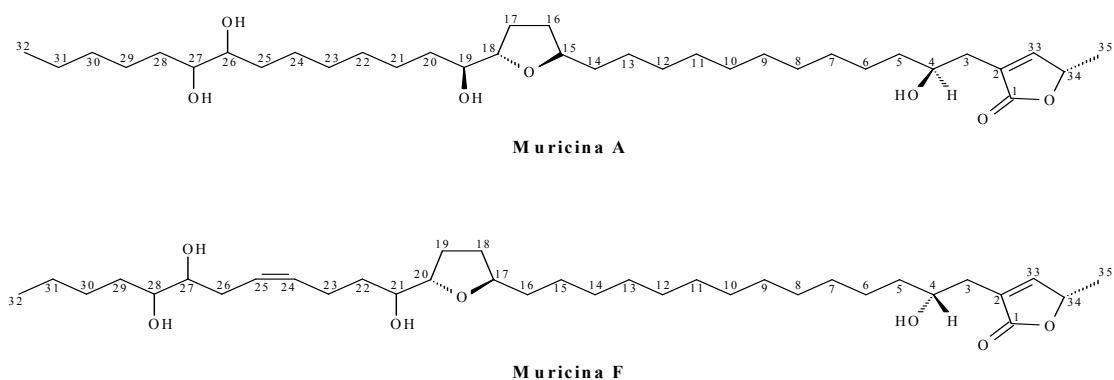


Figura 8. Estrutura da Muricina A e F

A presença dos sinais do anel γ -lactônico α,β -insaturado das acetogeninas com um provável grupo hidroxila em C-4 foram observados em δ 7,22 (d, $J = 1,3$ Hz, H-33), δ 5,06 (m, H-34), δ 3,81 (m, H-4), δ 2,52 (m, H-3a), δ 2,48 (m, H-3b) e δ 1,43 (d, $J = 6,7$ Hz, H-35). Pelo espectro observou-se ainda o sinal do grupo metílico terminal (H-32) das acetogeninas em δ 0,88 (t, $J = 7,0$ Hz). A presença do anel γ -lactônico α,β -insaturado com um provável grupo hidroxila em C-4, bem como o sinal do grupo metílico terminal (C-32) das acetogeninas foi ainda confirmada pela análise do espectro de RMN de ^{13}C , pelos sinais em δ 174,6 (C-1), δ 131,0 (C-2), δ 151,9 (C-33), δ 78,0 (C-34), δ 69,8 (C-4), δ 19,0 (C-35) e δ 14,1 (C-32). Sinais entre δ 83,3-81,9 (C-18), δ 79,3 (C-15) e δ 74,4-74,1 (C-19) indicaram a presença de

acetogeninas contendo um anel monotetraidrofurano (mono-THF) (Rupprecht *et al.*, 1990; Alali *et al.*, 1999; Chang & Wu, 2001).

Pela alta quantidade de impurezas contidas nos extratos metanólico e hexânico não foi possível confirmar a presença de acetogeninas nessas frações.

TABELA I: Deslocamentos químicos do extrato diclorometano^a e do composto Muricina A^b

Posição	Muricina A ^b	CH ₂ Cl ₂ extract ^a	Muricina A ^b	CH ₂ Cl ₂ extract ^a
	¹ H δ (mult., J in Hz)	¹ H δ (mult., J in Hz)	δ (¹³ C)	δ (¹³ C)
1			174,9	174,6
2			131,2	131,0
3a	2,54 (m)	2,52 (m)	32,2	32,3
3b	2,47 (m)	2,48 (m)		
4	3,81 (m)	3,81 (m)	69,8	69,8
5	1,2-1,5	1,26-1,50	37,1	37,2
6-13	1,2-1,5	1,26-1,50	25,3-29,8	25,5-29,6
14	1,2-1,5	1,26-1,50	35,3	35,4
15	3,81 (m)	3,81	79,3	79,3
16	1,97, 1,62 (m)	2,00-1,62 (m)	25,3-29,8	25,5-29,6
17	1,97, 1,62 (m)	2,00-1,62 (m)	25,3-29,8	25,5-29,6
18	3,81 (m)	3,81 (m)	81,8	81,9
19	3,41 (m)	3,41 (m)	74,4	74,2
20	1,5-1,6	1,50-1,60	33,1-33,3	33,1-33,3
21-24	1,2-1,5	1,26-1,50	25,3-29,8	25,5-29,6
25	1,2-1,5	1,26-1,50	33,1-33,3	33,1-33,3
26	3,41 (m)	3,41 (m)	74,9	74,4
27	3,41 (m)	3,41 (m)	74,2	74,1
28	1,2-1,5	1,26-1,50	33,1-33,3	33,1-33,3
29	1,2-1,5	1,26-1,50	25,3-29,8	25,5-29,6
30	1,2-1,5	1,26-1,50	31,8	31,9
31	1,2-1,5	1,26-1,50	22,5	22,6
32	0,86 (t, J = 6,7)	0,88 (t, J = 7,0)	13,9	14,1
33	7,18 (d, J = 1,6)	7,22 (d, J = 1,3)	152,1	151,9
34	5,06 (qd, J = 6,8 e 1,6)	5,06 (m)	78,0	78,0
35	1,41 (d, J = 6,8)	1,43 (d, J = 6,7)	18,9	19,0

^a¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz, CDCl₃. ^b Chang & Wu (2001) (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz, CDCl₃).

TABELA II: Deslocamentos químicos do extrato diclorometano^a e do composto Muricina F^b

Posição	Muricina F ^b	CH ₂ Cl ₂ extract ^a	Muricina F ^b	CH ₂ Cl ₂ extract ^a
	¹ H δ (mult., J in Hz)	¹ H δ (mult., J in Hz)	δ (¹³ C)	δ (¹³ C)
1			174,6	174,6
2	2,52 (m)	2,48 (m)	131,1	131,0
3a	2,40 (m)	2,41 (m)	32,4	32,3
3b	3,80 (m)	3,81 (m)		
4	1,2-1,5	1,26-1,50	37,4	37,2
5	1,2-1,5	1,26-1,50	25,5-29,9	25,5-29,6
6-8	1,2-1,5	1,26-1,50	25,5-29,9	25,5-29,6
9	1,2-1,5	1,26-1,50	25,5-29,9	25,5-29,6
10	1,2-1,5	1,26-1,50	25,5-29,9	25,5-29,6
11	1,2-1,5	1,26-1,50	25,5-29,9	25,5-29,6
12-13	1,2-1,5	1,26-1,50	25,5-29,9	25,5-29,6
14	1,2-1,5	1,26-1,50	25,5-29,9	25,5-29,6
15	1,2-1,5	1,26-1,50	25,5-29,9	25,5-29,6
16	1,2-1,5	1,26-1,50	25,5-29,9	25,5-29,6
17	3,86 (m)	3,89 (m)	79,3	79,3
18	1,97-1,65 (m)	2,00-1,62 (m)	25,5-29,9	25,5-29,6
19	1,97-1,65 (m)	2,00-1,62 (m)	25,5-29,9	25,5-29,6
20	3,86 (m)	3,89 (m)	81,7	81,8
21	3,43 (m)	3,41 (m)	74,4	74,2
22	1,5-1,6	1,50-1,60	33,1-35,4	33,1-35,4
23	2,01	2,01	25,5-29,9	25,5-29,6
24	5,39 (m)	5,35 (m)	130,1	130,2
25	5,39 (m)	5,35 (m)	129,5	129,9
26	2,01	2,01	33,1-35,4	33,1-35,4
27	3,42 (m)	3,41 (m)	74,6	74,4
28	3,42 (m)	3,41 (m)	74,3	74,1
29	1,2-1,5	1,26-1,50	33,1-35,4	33,1-35,4
30	1,2-1,5	1,26-1,50	31,4	31,5
31	1,2-1,5	1,26-1,50	22,6	22,6
32	0,87 (t, J = 6,7)	0,88 (t, J = 7,0)	14,0	14,1
33	7,18 (d, J = 1,2)	7,22 (d, J = 1,3)	151,9	151,9
34	5,06 (qd, J = 6,8 e 1,2)	5,06 (m)	78,0	78,0
35	1,42 (d, J = 6,8)	1,43 (d, J = 6,7)	19,1	19,0

^a¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz, CDCl₃. ^b Chang & Wu (2001) (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz, CDCl₃).

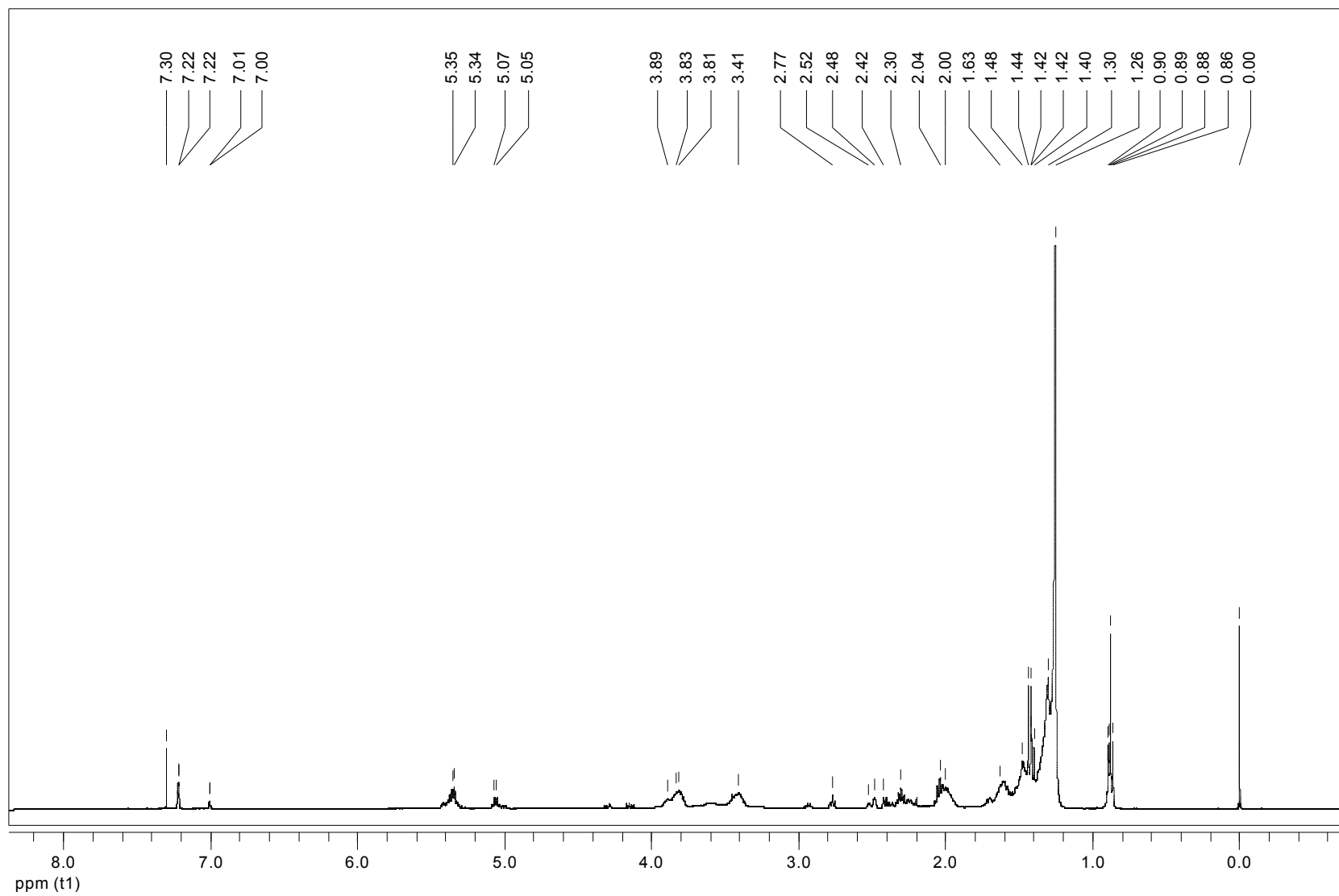


Figura 9: Espectro de RMN de ^1H do extrato diclorometano (400 MHz, CDCl_3).

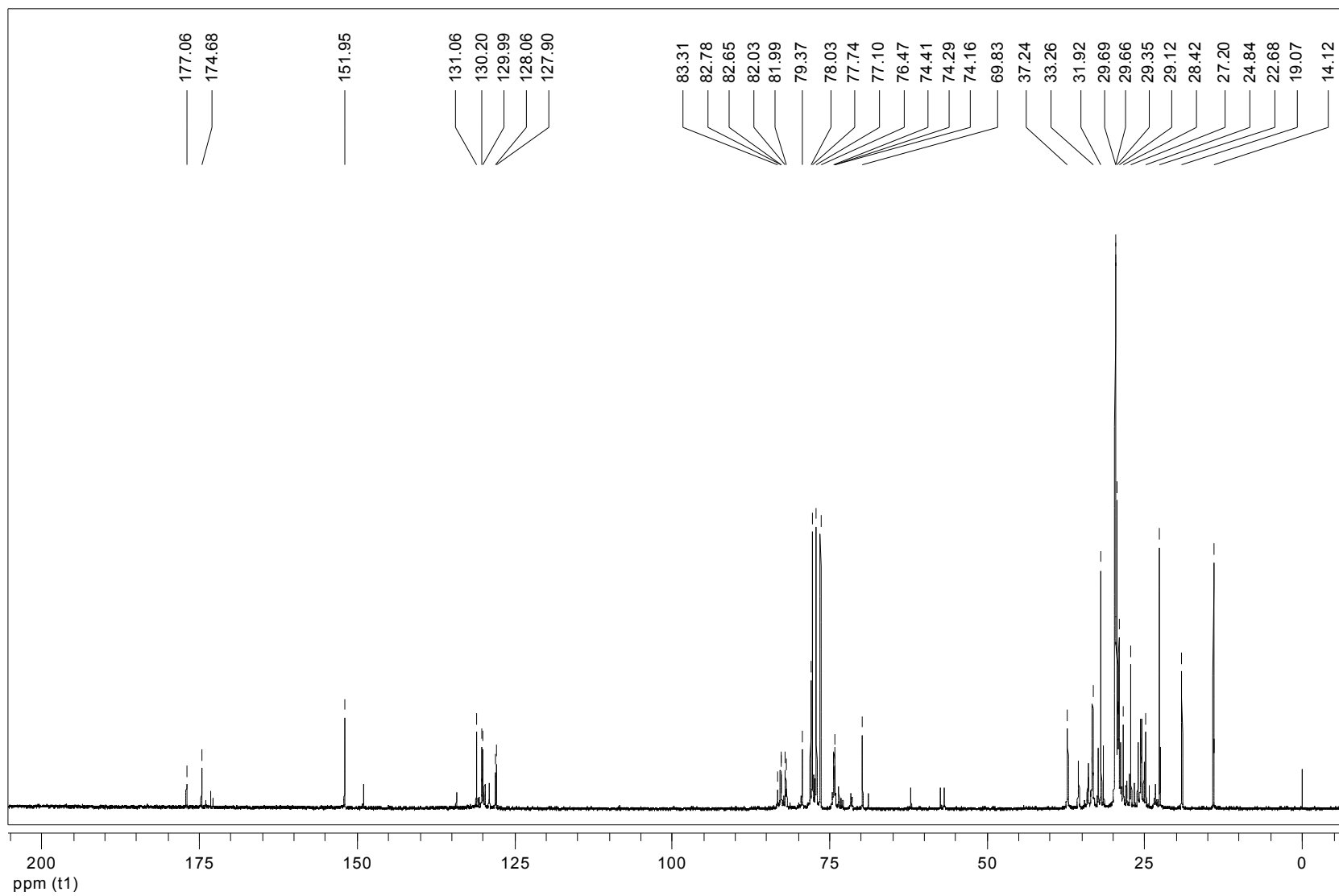


Figura 10: Espectro de RMN de ^{13}C do extrato diclorometano (100 MHz, CDCl_3).

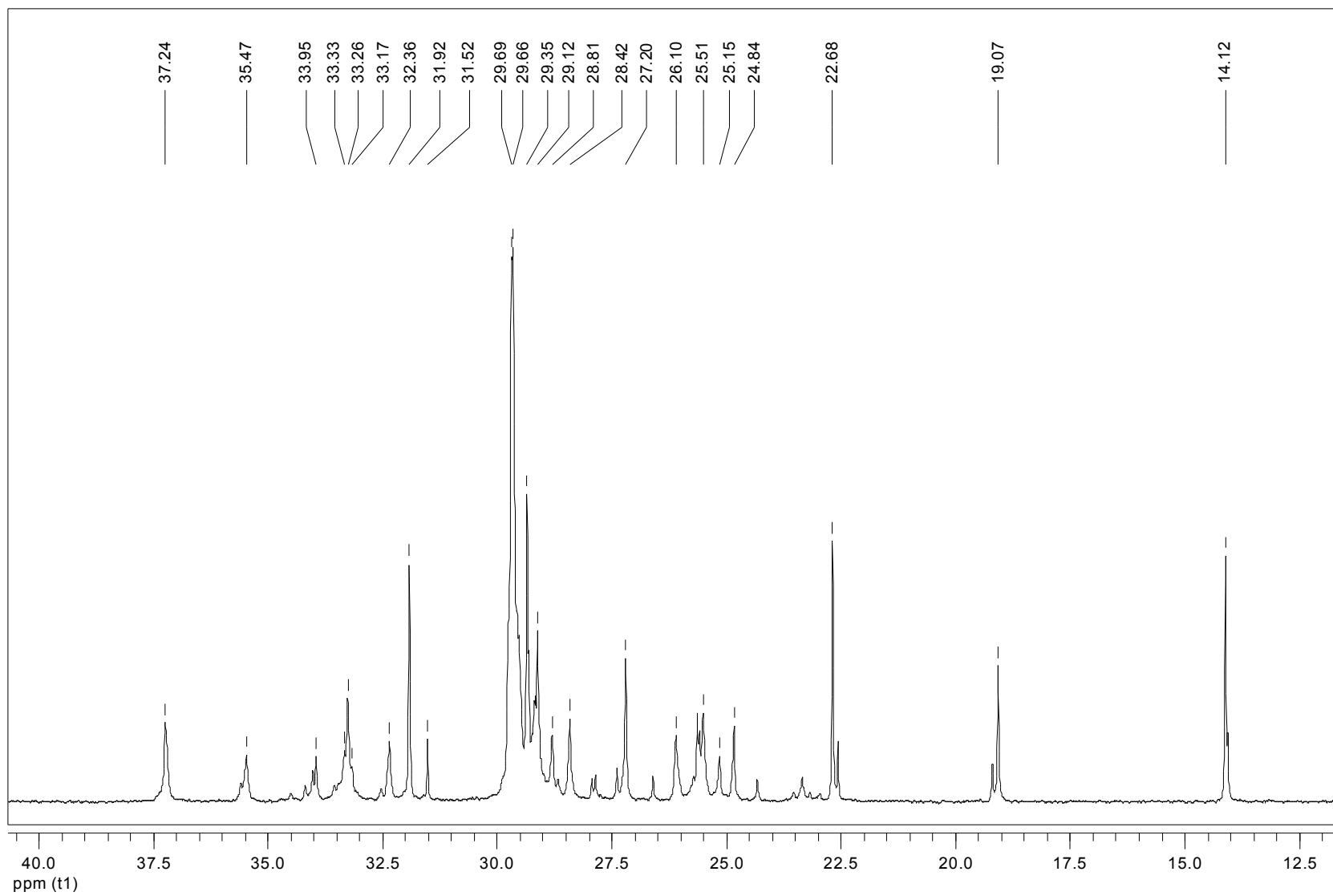


Figura 11: Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do extrato diclorometano (100 MHz, CDCl_3).

4.2 Atividade Larvicida

Através da análise do Probit para a calibração do Dimetilsulfóxido (DMSO), constatou-se que a concentração de 1% não causa mortalidade nas larvas. Suas respectivas concentrações letais CL₅₀, CL₉₅ e CL₉₉ estão apresentadas na TABELA III.

TABELA III Atividade larvicida de Dimetilsulfóxido, suas concentrações letais em %, respectivos intervalos de confiança, coeficiente angular (C.A.), qui-quadrado (X^2) e grau de liberdade (gl.) em populações de *Aedes aegypti* colônia Rockefeller, após 24 horas de exposição na temperatura de 25°C, 70%UR e 12:12 C/E.

Dimetilsulfóxido	
%	
CL₅₀	4,70 (4,45-5,02)
CL₉₅	9,47 (8,31-11,29)
CL₉₉	12,66 (10,71-15,87)
X²	0,72
gl.	1
C.A.	5,40 ± 0,42

* Não houve mortalidade no grupo controle.

Todos os extratos de *Annona foetida* analisados, extratos metanólico, hexânico e diclorometano, demonstraram atividade larvicida sob condições controladas (temperatura de 25°C, umidade relativa de 70 ±10% e fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro) em intervalo de concentração dose-resposta, sobre populações de *Aedes aegypti* colônia Rockefeller (Figuras 12 e 13). Os valores das concentrações letais CL₅₀, CL₉₅ e CL₉₉ estimadas através da análise Probit estão apresentadas na Tabela IV.

Dos extratos avaliados, o extrato diclorometano foi o mais eficiente contra as larvas de *A. aegypti* após 24 horas de exposição, sendo a CL₅₀ de 0,73 ppm. Após 48 horas a CL₅₀ de 0,33 ppm. Seguido do extrato diclorometano, por ordem de eficiência, obteve-se o extrato hexânico com CL₅₀ de 15,17 ppm e o extrato metanólico com CL₅₀ de 78,15 ppm, com ambas as concentrações letais calculadas após 24 horas de exposição.

TABELA IV: Atividade larvicida de extratos de *Annona foetida*, suas concentrações letais (ppm), respectivos intervalos de confiança, coeficiente angular (C.A.), qui-quadrado (X^2) e grau de liberdade (gl.) em populações de *Aedes aegypti* colônia Rockefeller, após 24 e 48 horas de exposição ao tratamento na temperatura de 25°C, 70%UR e 12:12 C/E.

EXTRATOS		CL ₅₀	CL ₉₅	CL ₉₉	X ²	gl	CA
Metanólico (ppm)	24h	76,15 (60,79-101,96)	1014,93 (527,33-3008,48)	2967,58 (1247,70-12645,46)	6,71	3	1,46±0,19
	48h	62,28 (49,68-82,71)	671,42 (370,29-1767,98)	1797,98 (821,54-6512,36)	5,97	2	1,59±0,2
Hexânico (ppm)	24h	15,17 (13,65-17,02)	234,54 (170,08-348,81)	729,09 (474,45-1242,31)	7,98	4	1,38±7,74 E-2
	48h	6,72 (6,14-7,31)	54,53 (46,44-65,71)	129,81 (103,98-168,39)	8,58	4	1,8±7,79 E-2
Diclorometano (ppm)	24h	0,73 (0,65-0,83)	13,96 (9,70-22,27)	47,22 (28,67-89,86)	5,62	3	1,28±8,5 E-2
	48h	0,33 (0,29-0,37)	3,79 (3,08-4,88)	10,41 (7,74-14,99)	7,53	3	1,55±8,45 E-2

* Não houve mortalidade nos grupos controles.

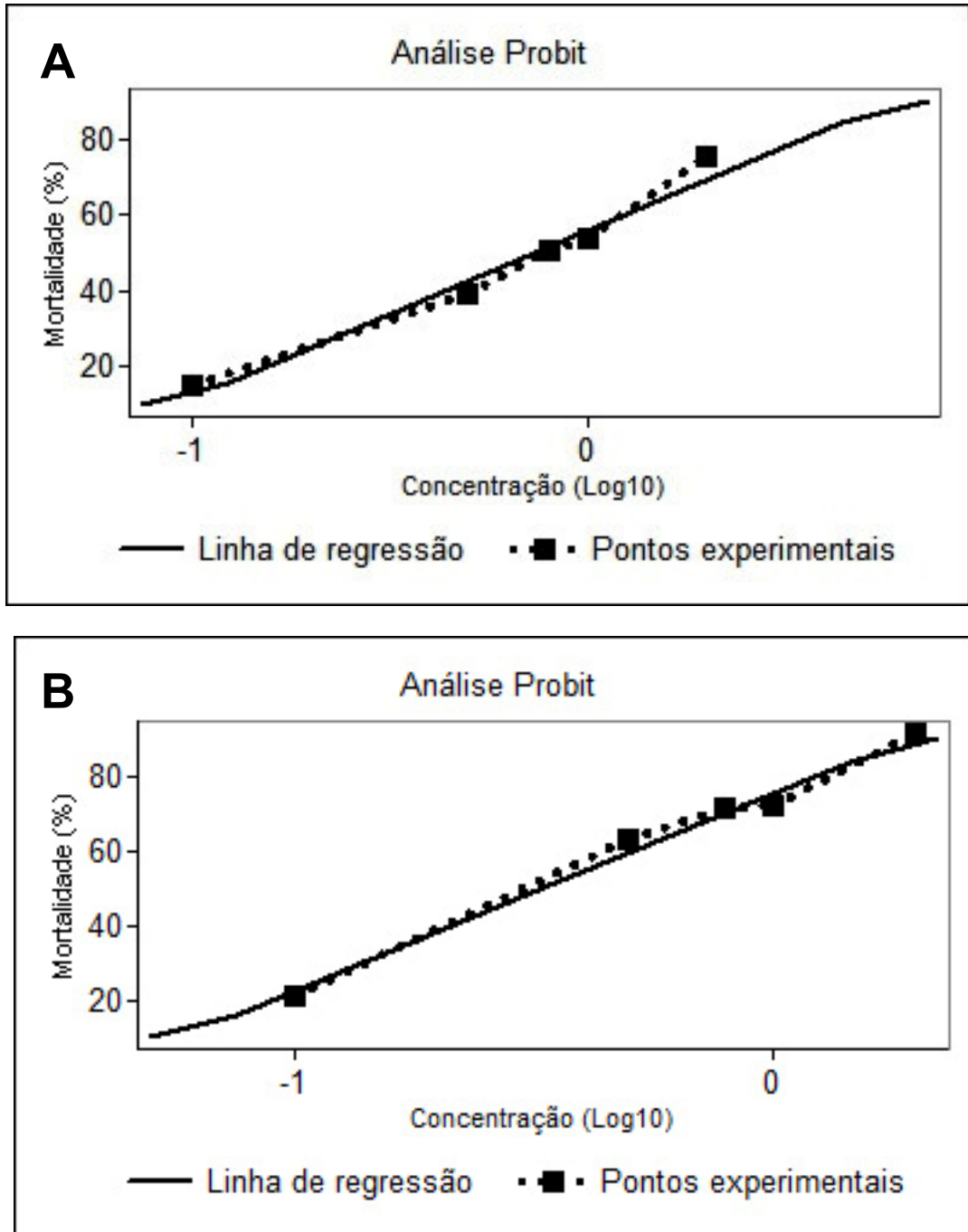


Figura 12: Retas de mortalidade Probit de larvas de *Aedes aegypti* colônia Rockefeller pelo logaritmo da concentração do extrato diclorometano de *Annona foetida*. A. 24 horas de exposição ao extrato B. 48 horas de exposição ao extrato.

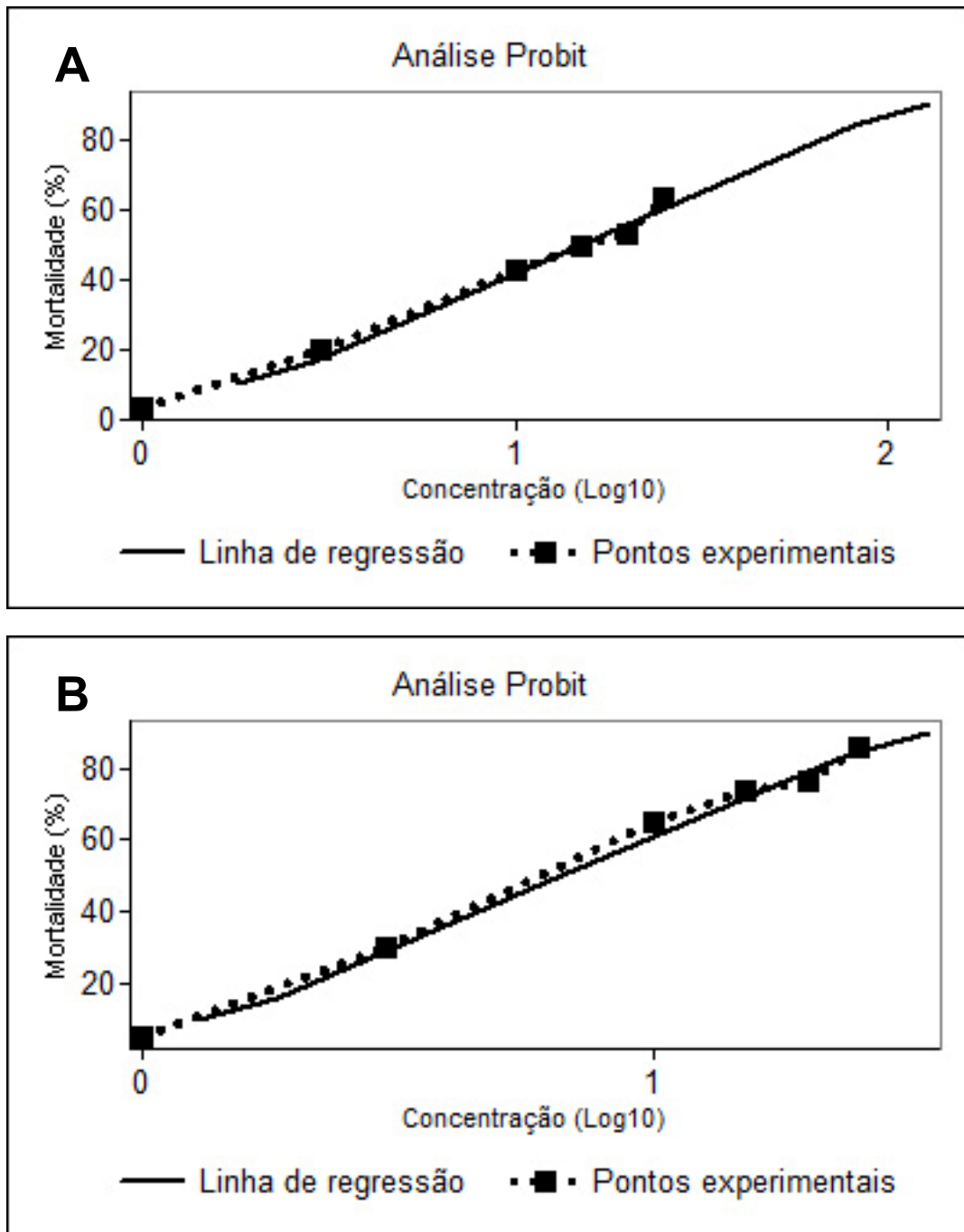


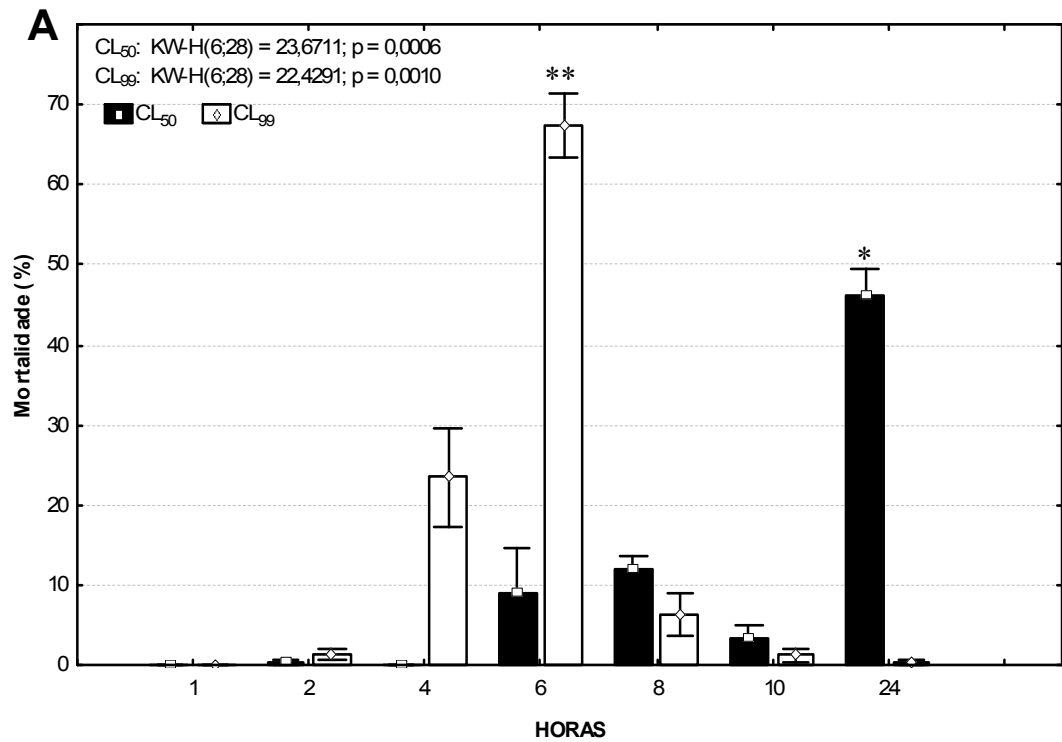
Figura 13: Retas de mortalidade Probit de larvas de *Aedes aegypti* colônia Rockefeller pelo logaritmo da concentração do extrato hexânico de *Annona foetida*. A. 24 horas de exposição ao extrato B. 48 horas de exposição ao extrato.

4.3 Período de Atividade Larvicida

O período de atividade larvicida foi avaliado com as concentrações letais 99 (KW-H (6;28) = 22,4291, $p = 0,0010$), 50 (KW-H (6;28) = 23,6711, $p = 0,0006$), 20 (KW-H (6;28) = 17,2451, $p = 0,0084$) e 10% (KW-H (6;28) = 15,0254, $p = 0,0201$) para o extrato de *Annona foetida* diclorometano e 50 (KW-H (6;28) = 22,5664, $p = 0,0010$) e 10% (KW-H (6;28) = 18,7245, $p = 0,0047$) para o extrato hexânico. O início do efeito letal do extrato diclorometano, exceto para a CL_{20} , dá-se após duas horas de exposição (Figuras 14A e 14B). Para a CL_{20} , o início da mortalidade ocorreu a partir de quatro horas de exposição ao tratamento. Na CL_{99} , 100% das larvas morreram antes de completar 24 horas de exposição ao extrato. Para o extrato hexânico, houve um início de mortalidade a partir de duas horas de exposição ao extrato, entretanto entre quatro e seis horas não houve mortalidade (Figura 15).

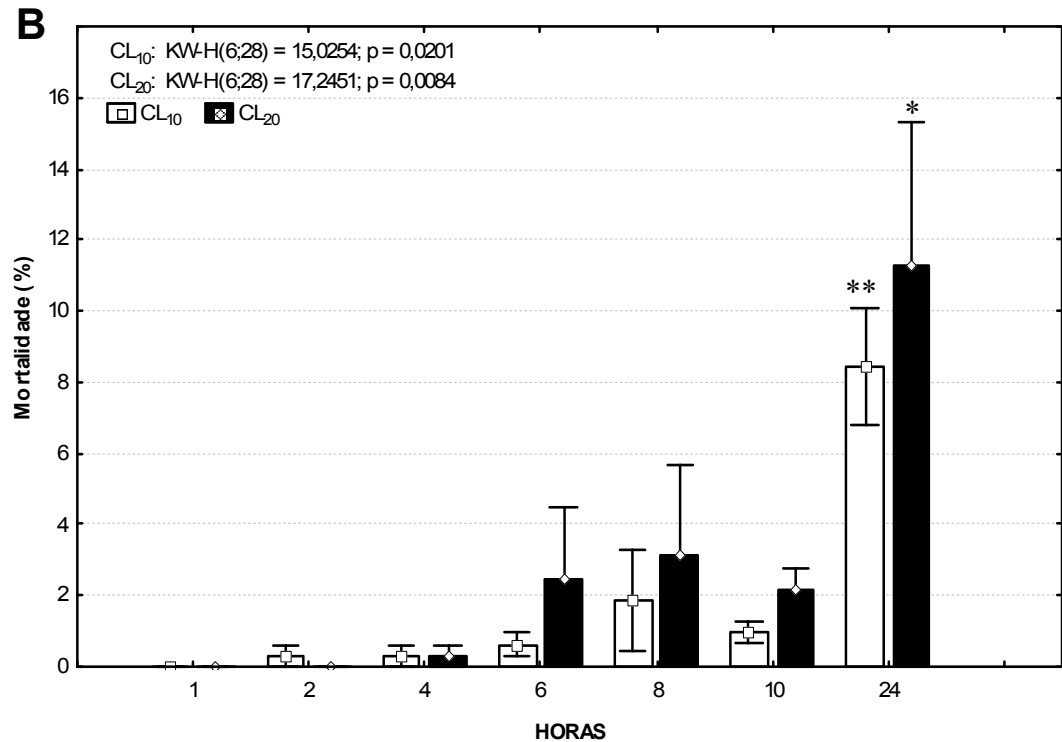
No extrato diclorometano, nas concentrações que ocasionam 10, 20 e 50% de mortalidade das larvas em 24 horas de exposição, o pico de mortalidade das larvas ocorreu primeiramente no intervalo de 6-8 horas, entretanto a maior mortalidade ocorreu no intervalo entre 10-24 horas (Figura 14A e 14B). Já na concentração 99% o pico ocorreu entre 4-6 horas (Figura 14A). Nos intervalos de tempo anteriores as larvas apresentaram-se lentas, permaneciam na superfície da água, mas respondiam a estímulos.

Já no extrato hexânico para ambas as concentrações, o pico de mortalidade ocorreu no intervalo entre 10-24 horas (Figura 15).



* Difere dos intervalos 1, 2, 4, 6, 8 e 10 na CL₅₀ pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, p<0,05

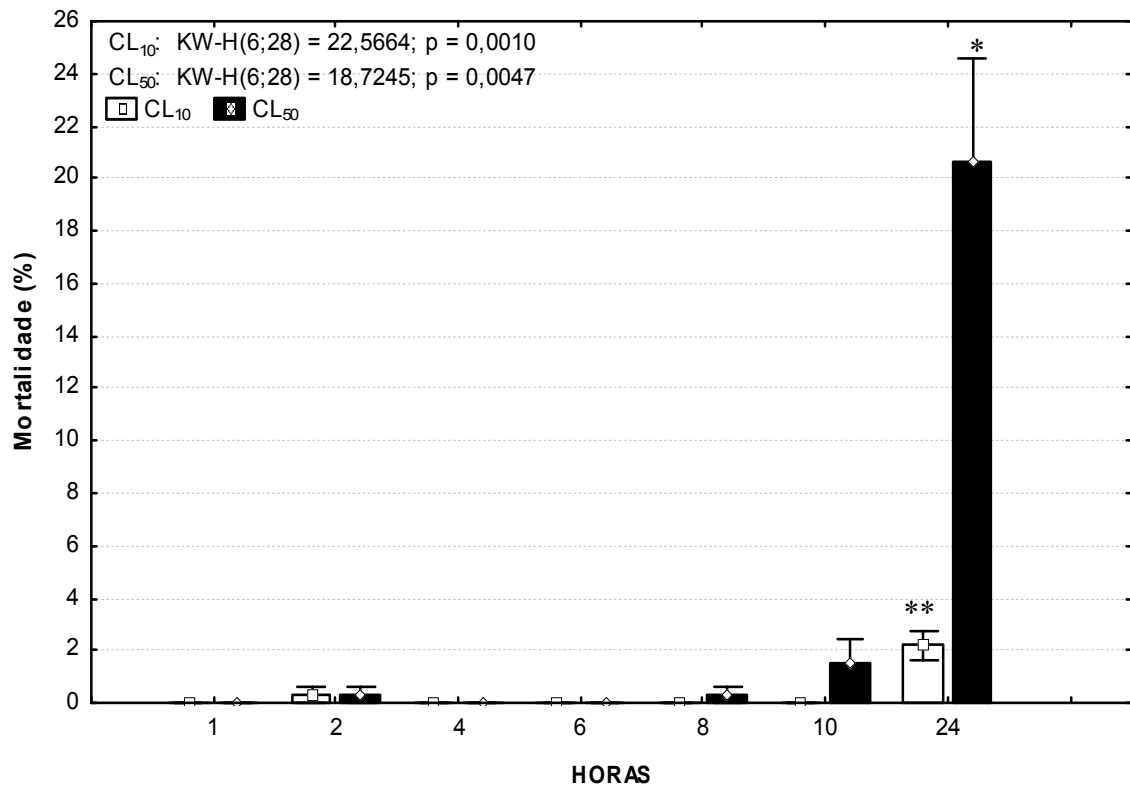
** Difere dos intervalos 1, 2, 4, 8, 10 e 24 na CL₉₉ pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, p<0,05



* Difere dos intervalos 1, 2, 4, 6, 8 e 10 na CL₂₀ pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, p<0,05

** Difere dos intervalos 1, 2, 4, 6, 8 e 10 na CL₁₀ pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, p<0,05

Figura 14: Período de atividade larvicida do extrato diclorometano de *Annona foetida* em horas e em porcentagem não acumulada nas concentrações letais 10, 20, 50 e 99% de mortalidade. A: CL₅₀ e CL₉₉. B: CL₁₀ e CL₂₀.



* Difere dos intervalos 1, 2, 4, 6, 8 e 10 na CL₂₀ pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, p<0,05

** Difere dos intervalos 1, 2, 4, 6, 8 e 10 na CL₁₀ pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, p<0,05

Figura 15: Período de atividade larvicida do extrato hexânico de *Annona foetida* em horas e em porcentagem não acumulada nas concentrações letais 10 e 50% de mortalidade.

4.4 Efeito Residual do Extrato Diclorometano

O efeito residual do extrato diclorometano de *Annona foetida* sobre larvas de *Aedes aegypti* da colônia Rockefeller, avaliado para a concentração letal 99% (47,22 ppm) a temperatura de 25°C em condições controladas, permaneceu, com eficácia total, isto é, com 100% de mortalidade das larvas até o 12º dia após o preparo da solução, chegando a menos de 70% após o 18º dia. A partir do 25º dia não foi mais observada mortalidade das larvas (Figura 16).

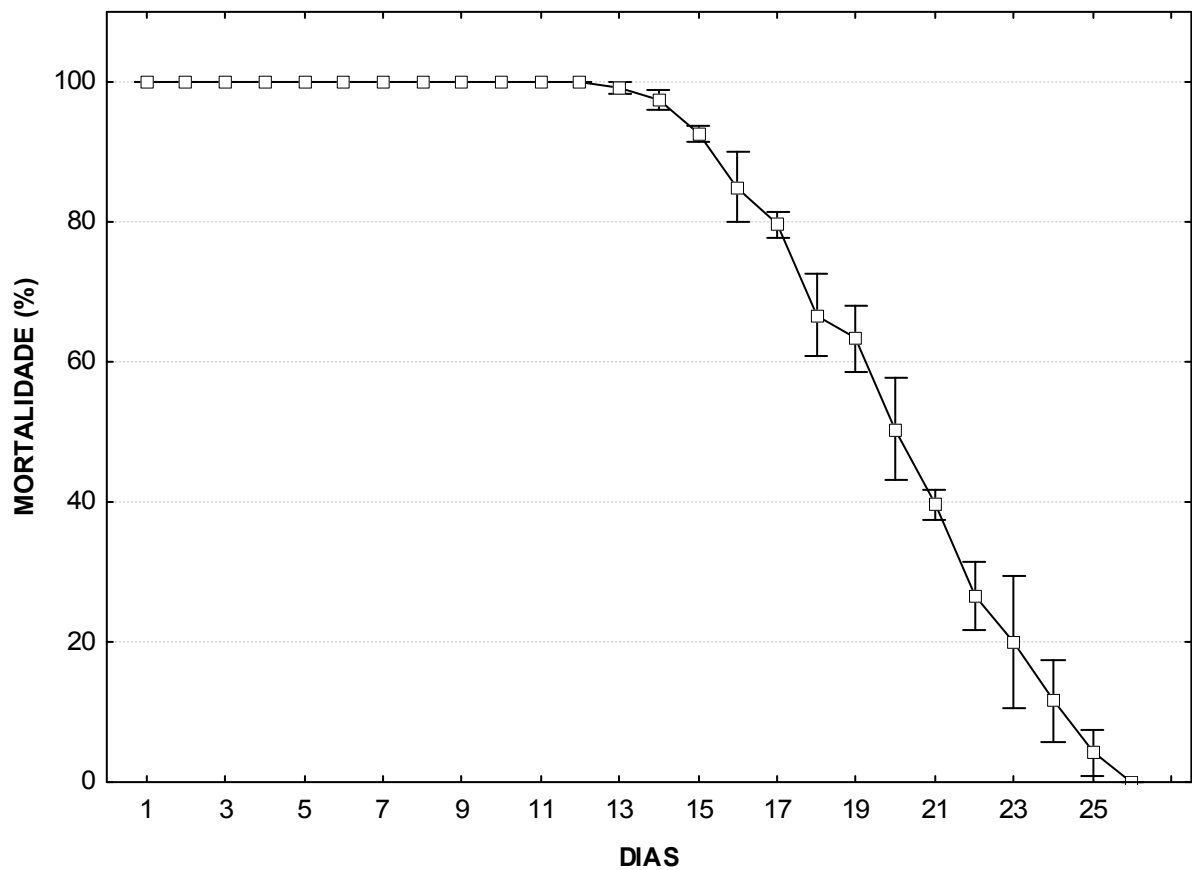


Figura 16: Efeito residual, em dias de atividade larvicida, de solução contendo extrato de diclorometano de *Annona foetida* em populações de *A. aegypti* colônia Rockefeller em condições de laboratório; temperatura de 25°C, 70% U.R. \pm 10 e 12:12 C/E.

4.5 Efeito Sub letal

Para avaliar o efeito sub letal do extrato diclorometano de *Annona foetida*, utilizou-se as concentrações CL₅₀ (0,73 ppm), CL₂₀ (0,16 ppm) e CL₁₀ (0,074 ppm) previamente calculadas para 25°C e para o extrato hexânico as concentrações CL₅₀ (15,17 ppm) e CL₁₀ (1,79 ppm). Ambas as avaliações foram realizadas com larvas de *Aedes aegypti* da colônia Rockefeller.

No experimento com o extrato diclorometano, a concentração letal que ocasiona a mortalidade de 50% das larvas em 24 horas durou em média quatro dias (4±1,73). Ao final deste período, 100% das larvas estavam mortas, sendo que nenhuma chegou ao estágio de pupa. Já para as CL₂₀ e CL₁₀, 10% e 12,9% dos espécimes submetidos ao tratamento alcançaram o estágio adulto, respectivamente. Todos os indivíduos adultos submetidos a essas concentrações não apresentaram alterações morfológicas visíveis. A CL₁₀ ocasionou 84,18% de mortalidade de larvas em 18 dias (± 1,15) de tratamento. Das pupas, 2,92% morreram sem alcançar o estágio adulto. Quando observamos a CL₂₀, verificamos que 85,83% de larvas morreram em 14 dias (± 0,57) de experimento. Das larvas que alcançaram a fase de pupa, 4,17% dessas morreram ainda nessa fase. No grupo controle, contendo somente água e DMSO a 1%, não houve mortalidade, sendo que os indivíduos alcançaram o estágio adulto até no máximo de 21 dias (±1,53) de experimento (Tabela V).

Para o tratamento com o extrato hexânico, foram utilizadas apenas as concentrações letais 50% e 10%. Na CL₅₀, apenas 2% dos indivíduos alcançaram o estágio adulto, todos sem alterações morfológicas aparentes. Nessa concentração, 96,5% dos indivíduos morreram ainda na fase de larva. Dos indivíduos que alcançaram a fase de pupa 1,5% morreram. Já na CL₁₀, 18,3% dos indivíduos alcançaram o estágio adulto, também sem alterações morfológicas visíveis. Em relação à mortalidade de larvas neste experimento, a porcentagem foi 52,2% e os indivíduos que alcançaram a fase de pupa 29,5% morreram ainda nessa fase (Tabela V).

Nas duas concentrações testadas o tempo total de experimento foi menor que no grupo controle. Este durou em média de 16 dias (± 1) e não houve

mortalidade. Na CL₁₀ o experimento prolongou-se em média de 14 dias ($\pm 0,57$) e na CL₅₀ 12 dias ($\pm 0,57$).

Tabela V: Tempo de duração dos experimentos de efeito sub letal dos extratos diclorometano e hexânico nas concentrações letais CL₁₀, CL₂₀ e CL₅₀, apresentando o percentual de mortalidade das larvas, pupas e emergência de adultos.

Extratos		Duração dos Experimentos (Dias)	Mortalidade das Larvas (%)	Mortalidades das Pupas (%)	Emergência de Adultos (%)
Diclorometano	CL ₁₀	18 ($\pm 1,15$)	84,18	2,92	12,9
	CL ₂₀	14 ($\pm 0,57$)	85,83	4,17	10
	CL ₅₀	4 ($\pm 1,73$)	100	-	-
Hexânico	CL ₁₀	14 ($\pm 0,57$)	52,2	29,5	18,3
	CL ₅₀	12 ($\pm 0,57$)	96,5	1,5	2,0

* Não houve mortalidade no grupo controle.

Em ambos os experimentos e em todas as concentrações, observou-se a diminuição na atividade da alimentação larval. Observou-se também, que as larvas apresentaram os mesmos tipos de alterações morfológicas para ambos os extratos. Essas alterações são aqui descritas conforme o estágio em que ocorreram até a emergência dos adultos:

A. Larvas sem alterações morfológicas externas aparentes ocorreram nos dois tratamentos (Figura 18A e 18B).

B. Larvas com alterações morfológicas. Larvas submetidas ao tratamento com o extrato diclorometano apresentaram um alongamento do colar (Figura 18C), que é o conectivo da região cefálica ao tórax e morreram completamente distendidas. No tratamento com extrato hexânico, observou-se também larvas que iniciaram o processo de ecdise, entretanto ficaram presas à exúvia (Figura 19D). Além disso, nos dois tratamentos encontraram-se larvas mortas menores que retraíram seu corpo (Figura 18D e 19C).

C. Pupas incompletamente formadas, com coloração clara, podendo caracterizar pouca melanização, ocorrendo nos dois tratamentos.

D. Pupas completamente formadas, mas com os últimos segmentos presos à exúvia da larva, no tratamento com extrato hexânico (Figura 19A).

E. Pupas que morreram completamente formadas sem nenhuma alteração morfológica visível.

F. Adultos que iniciaram o processo de ecdise, entretanto ficaram presos na exúvia pupal (Figura 19B), ocorrendo com maior frequência nos indivíduos expostos ao tratamento com extrato hexânico.

G. Em ambos os tratamentos, adultos normais. Adultos que completaram sua emergência sem nenhuma alteração morfológica visível.

Quando comparamos os dois tratamentos (diclorometano e hexânico) e suas concentrações letais com o grupo controle (Figura 17A e 17B), verificamos que ambos ocasionaram efeito larvicida, pupicida e inibição de adultos. Sendo que a maior parte da mortalidade nas concentrações ocorreu na fase larval, após a mudança de estágio.



FIGURA 17: Larva e pupa pertencentes ao grupo controle, observadas em microscópio estereoscópico. A. Pupa, aumento de 25 vezes. B. Larva, aumento de 20 vezes. (Escala 1mm)



Figura 18: Alterações morfológicas em larvas expostas ao extrato de *Annona foetida* de diclorometano, observadas em microscópio estereoscópico. A. Larvas expostas à concentração letal 20%, sem alteração morfológica visível, aumento de 25 vezes. B. Larva exposta à concentração letal 50%, sem alteração morfológica externa visível, aumento de 25 vezes. C. Larva distendida com alongamento da região do colar, concentração letal 50%, aumento de 25 vezes. D. Larva menor que as do grupo controle, retraída, concentração letal 50%, aumento de 32 vezes. (Escala 1mm)

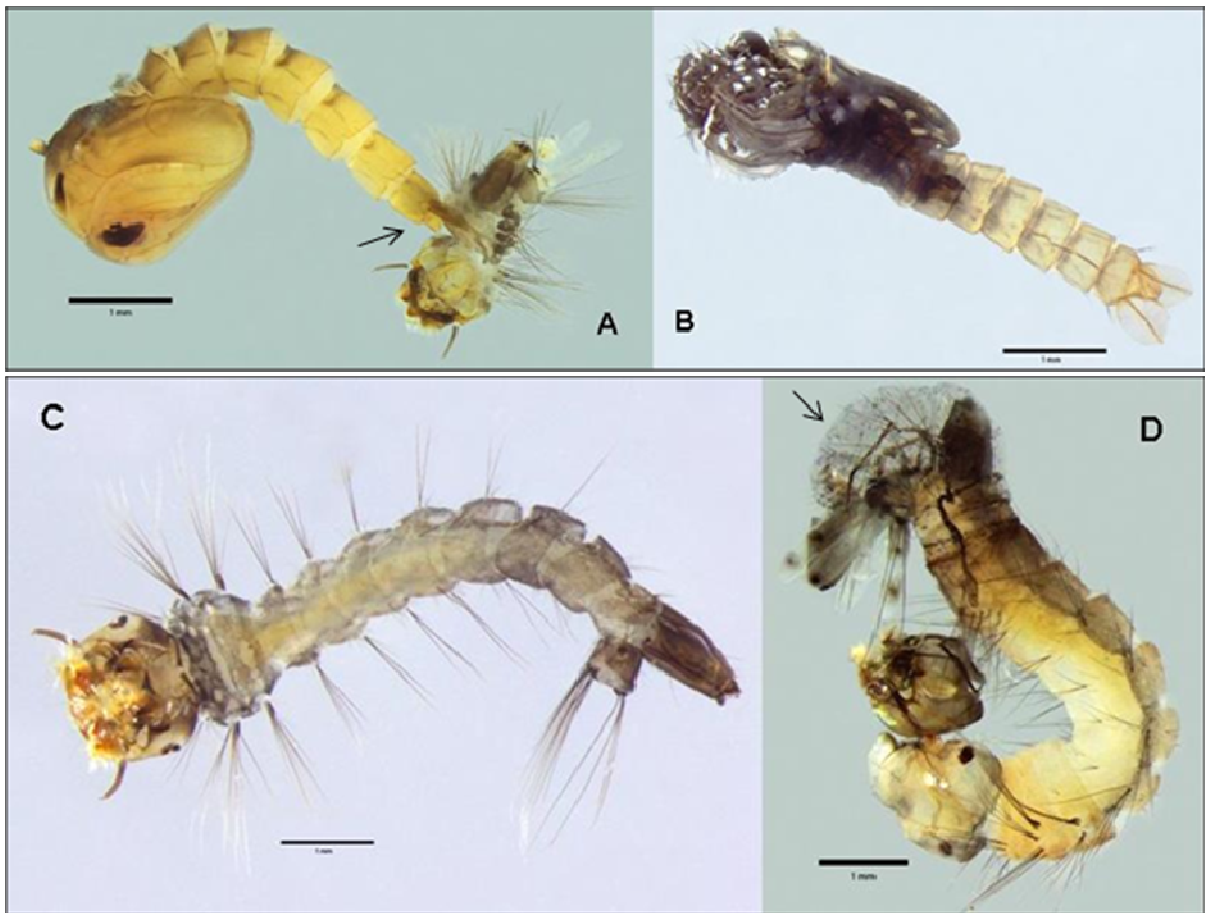


Figura 19: Alterações morfológicas de larvas e pupas expostas ao extrato de *Annona foetida* hexânico, observadas em microscópio estereoscópico. A. Pupa exposta à concentração letal 10% presa a exúvia, aumento de 20 vezes. B. Adulto emergindo preso a exúvia pupal, concentração letal 10%, aumento de 25 vezes. C. Larva exposta à concentração letal 10% menor que as do grupo controle, aumento de 32 vezes. D. Larva exposta à concentração letal 50% presa a exúvia, aumento de 32 vezes. (Escala 1mm)

5. DISCUSSÃO

5.1 Análise Química

O efeito letal do extrato diclorometano de *Annona foetida* contra larvas de *Aedes aegypti* poderia ser atribuída à alta concentração de acetogeninas de anonáceas presentes no extrato, e verificada de acordo com as análises de RMN de ^1H (Figura 9) e ^{13}C (Figuras 10 e 11). Para Zeng *et al.* (1996), dentre os solventes orgânicos, as acetogeninas são mais solúveis em clorofórmio e diclorometano. Segundo, Alali *et al.* (1999) as mesmas seriam facilmente extraídas pela maioria dos solventes orgânicos. Além disso, esses autores ressaltam que a sua separação depende de sua polaridade; essa polaridade é controlada pelos anéis tetrahydrofurânicos e pela presença de outros grupos funcionais como, por exemplo, as ligações duplas, hidroxilas, cetonas, e também pela posição desses anéis e grupos ao longo da cadeia alifática.

A comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C do extrato diclorometano (Tabelas I e II) com os dados de RMN de ^1H e ^{13}C publicados para as acetogeninas muricina A (Tabela I) e muricina F (Tabela II), conduzem a hipótese da presença de ambos os compostos no extrato, sendo estes possivelmente os principais constituintes presentes na mistura. Esta hipótese está sustentada em que ambas as espécies *Annona foetida* e *Annona muricata* pertencem ao mesmo gênero (*Annona*), seção (*Annona*) e série (*Muricata*) (Fries, 1959), o que implica estabelecer também uma relação quimiotaxonômica entre as duas espécies, indicando a possível presença das acetogeninas muricina A e muricina F em *Annona foetida*. Essas acetogeninas também já apresentaram atividade biológica, como atividade citotóxica contra linhagens tumorais de hepatoma humano (Chang & Wu, 2001).

As acetogeninas agem nas mitocôndrias no complexo I inibindo a ubiquinona oxidoreductase, interferindo na produção de ATP, acarretando a morte celular por apoptose (Zeng *et al.*, 1996). Esse mecanismo de ação é diferente da forma como agem os inseticidas sintéticos utilizados atualmente no controle de vetores. Os organofosforados, como o temephos, agem inibindo a acetilcolinesterase, já os

piretróides (cipermetrina) e organoclorados (DDT) agem mantendo abertos os canais de sódio. Essa importante diferença de mecanismo de ação demonstra o potencial das acetogeninas em serem utilizadas como método alternativo no controle de populações já resistentes a esses inseticidas.

Na literatura não há estudos envolvendo populações de mosquitos resistentes às acetogeninas. Entretanto Alali *et al.* (1998) compararam a atividade e a razão de resistência de seis acetogeninas diferentes (gigantetrocin A, annomontacin, asimicin, parviflorin, sylvaticin, bullatalicin) com os inseticidas sintéticos amidinohidrazona, carbamato, organofosforado e piretróide contra *Blattella germanica*. Os autores encontraram menores valores para a razão de resistência para as acetogeninas que para os inseticidas sintéticos. Concluíram que a mortalidade encontrada e os baixos valores da razão de resistência das acetogeninas sugerem que elas apresentam uma potencial atividade contra as baratas podendo ser incluídas no controle dos mesmos.

5.2 Atividade Larvicida

A calibração de Dimetilsulfóxido (DMSO) demonstrou que a utilização deste a 1% em relação ao volume total de 200 ml utilizados nos bioensaios não auxilia na mortalidade das larvas. Na literatura são encontrados trabalhos utilizando uma concentração mais alta desse produto em diferentes volumes, 2% por exemplo, (Furtado *et al.*, 2005; Prophiro, 2008). Nos bioensaios efetuados no presente estudo, essas concentrações mais altas poderiam ajudar na mortalidade larval, já que a sua CL_{50} foi de 4,70%. Assim, o solvente utilizado juntamente com o produto de plantas deve ser calibrado também, para indicar que sua utilização não está contribuindo com a mortalidade e o resultado encontrado é somente devido aos extratos ou óleos.

A eficácia como larvicida de *Annona foetida* foi verificada para os três extratos testados. As retas de regressão dos extratos hexânico e diclorometano encontraram-se bem ajustadas ao modelo matemático confirmando que os resultados encontrados são previsíveis. Os resultados demonstraram que o extrato

diclorometano é mais eficaz contra larvas de *A. aegypti* do que os extratos hexânico e metanólico. A atividade desse extrato ($CL_{50} = 0,73$ ppm) foi semelhante a atividade do extrato etanólico de raízes de *Annona crassiflora* ($CL_{50} = 0,71$ ppm) contra larvas de *A. aegypti* encontrado por Omena *et al.* (2007) em bioensaios realizados com um volume final de 100 ml, após 24 horas de exposição. Esses autores estudaram 51 plantas medicinais brasileiras, de várias famílias diferentes, dentre todos os 84 extratos etanólicos, os que apresentaram melhor atividade larvicida foram os de *Annona crassiflora* e *Annona glabra* (sementes, $CL_{50} = 0,06$ pm).

Resultados encontrados por Morales *et al.* (2004) e Bobadilla *et al.* (2005) demonstraram atividade larvicida de extratos de *Annona muricata* com presença de acetogeninas contra *A. aegypti* e *Anopheles albimanus*. No primeiro estudo *A. Anopheles* foi mais suscetível do que *A. aegypti* aos extratos.

Bobadilla *et al.* (2002) também demonstraram a atividade de extratos de sementes de *Annona cherimolia* contra *Anopheles* sp., provavelmente, devido a uma interação do efeito sinérgico dos princípios ativos, inclusive com as acetogeninas.

Outros estudos demonstraram a eficiência larvicida de extratos obtidos em diferentes espécies da família Annonaceae contra espécies de mosquitos, não somente devido à presença de acetogeninas, mas também por alcalóides encontrados nos extratos. Saxena *et al.* (1993) demonstraram a atividade larvicida e redutora de fertilidade e fecundidade de alcalóides de *Annona squamosa* contra *Anopheles stephensi* Linston, 1901. Recentemente, Feitosa *et al.* (2009) demonstraram a atividade larvicida do óleo essencial, do extrato metanólico ($CL_{50} = 64,6 \pm 1,5$ ppm) da raiz de *Rollinia leptopetala* e de três alcalóides isolados dessa mesma planta contra larvas de *A. aegypti*, sendo o mais eficaz o alcalóide liriodenina ($CL_{50} = 3,6 \pm 0,4$ ppm). Não há na literatura estudo envolvendo o sinergismo entre esses alcalóides e acetogeninas.

Apesar do aumento do número de estudos químicos e do potencial biológico das diferentes espécies de Annonaceae, nenhum trabalho envolvendo a atividade inseticida de *Annona foetida* bem como a presença de acetogeninas nessa espécie foi descrita na literatura até a data, sendo os resultados obtidos inéditos abrindo perspectivas para aprimoramento dos extratos destas plantas.

Assim, o presente trabalho é o primeiro a reportar tais estudos, abrindo perspectivas para aprimoramento dos extratos destas plantas.

5.3 Período de Atividade Larvicida e Efeito Residual

Poucos estudos com produtos botânicos abordam o período de atividade larvicida desses produtos, em sua maioria apenas sua atividade é reportada e nos trabalhos mais recentes sua composição química. Assim, conhecer o tempo inicial e final de letalidade dos extratos é importante para compreender o comportamento desses extratos nas larvas.

No presente estudo essa letalidade ocorreu a partir de duas horas de exposição ao extrato diclorometano, entretanto o maior número de mortes ocorreu no intervalo entre 10 e 24h. Igualmente para o extrato hexânico, a maior mortalidade ocorreu entre 10 e 24 horas, sendo que a mortalidade também iniciou-se a partir de duas horas de exposição.

O extrato de *Annona foetida* tem ação mais lenta quando comparado aos resultados obtidos para os óleos de *Copaifera* e *Carapa guianensis* (Prophiro, 2008). O autor observou sete intervalos de tempo 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas após a exposição aos óleos de *Copaifera* (Leguminosae) e *Carapa guianensis* (Meliaceae) e o efeito letal desses ocorreram principalmente entre as primeiras 2-3 horas.

Amer & Mehlhorn (2006a) estudaram a atividade larvicida de 41 plantas diferentes, dessas 13 obtiveram efeito sobre *Aedes aegypti*. Os resultados foram semelhantes com o de Prophiro (2008), ou seja, maior mortalidade nas primeiras horas, para os óleos de *Santalum album* (Santalaceae), *Piper nigrum* (Piperaceae), *Lippia citriodora* (Verbenaceae), *Juniperus communis* (Cupressaceae), *Myrtus communis* (Myrtaceae), *Anethum graveolens* (Apiaceae), *Boswellia carteri* (Burseraceae), *Citrus limon* (Rutaceae) e *Cinnamomum camphora* (Lauraceae).

Entretanto, para os óleos *Juniperus virginiana* (Cupressaceae), *Thymus serpyllum* (Lamiaceae), *Helichrysum italicum* (Asteraceae) e *Amyris balsamifera* (Rutaceae) os resultados são semelhantes com o presente estudo, já que a mortalidade não ocorreu principalmente nas primeiras horas.

A diferença no tempo de letalidade pode ocorrer pelos diferentes mecanismos de ação dos óleos vegetais nas larvas e pela forma em que esses extratos penetram por ingestão ou por contato.

O efeito larvicida do extrato diclorometano de *Annona foetida* na CL₉₉ permaneceu com total eficácia, ou seja, 100% de mortalidade das larvas até o 12º

dia após o preparo das soluções. As condições de estocagem dessas soluções podem interferir na persistência da atividade larvicida de óleos e extratos de plantas.

Continuando os estudos com os 13 óleos que se apresentaram tóxicos contra larvas de *A. aegypti*, Amer & Melhorn (2006b) observaram a persistência da atividade larvicida em diferentes condições de estocagem por um mês. Realizaram bioensaios expondo as larvas ao tratamento imediatamente após a primeira, segunda e terceira semanas após o preparo da solução, essa solução preparada a 50 ppm. Os óleos de *Cinnamomum camphora* (Lauraceae), *Thymus serpyllum* (Lamiaceae), *Citrus limon* (Rutaceae) permaneceram com total eficácia após três semanas de preparo das soluções, quando estocados em potes fechados na presença de luz ou no escuro. A maioria dos óleos perdeu sua toxicidade após uma semana de preparo das soluções quando estocados em potes abertos (luz ou no escuro).

5.4 Atividade Sub letal

Os extratos de *Annona foetida* em concentrações sub letais apresentaram atividade larvicida, pupicida e inibiram a emergência dos adultos. Utilizou-se as concentrações letais 10, 20 e 50% do extrato diclorometano, nestas apenas 12,9%, 10% e 0,00% de adultos emergiram após o tratamento, respectivamente. Já no extrato hexânico, utilizou-se a CL₁₀ e CL₅₀ sendo que emergiram 18,3% e 2,0% de adultos, respectivamente. As larvas e as pupas apresentaram alterações morfológicas e muitas morreram presas as exúvias. Em muitas houve o alongamento do colar e outras retraíram seu corpo. Os adultos que conseguiram emergir não apresentaram alterações morfológicas visíveis.

Alterações morfológicas externas das larvas como no exosqueleto, nas papilas anais, alongamento do colar, e internas como na membrana peritrófica, causadas pela exposição de derivados botânicos já foram reportados por diversos autores (Arruda *et al.*, 2003; Gusmão *et al.*, 2002; Green *et al.*, 1991; Prophiro, 2008).

Chaitong *et al.* (2006) observaram a atividade larvicida de três extratos etanólicos obtidos em plantas da família Piperaceae, *Piper longum*, *Piper ribesoides* e *Piper sarmentosum* sobre larvas de *A. aegypti*. A exposição a esses extratos não causou alteração morfológica visível a não ser nas papilas anais. A observação dessas papilas através de análise ultra-estrutural demonstrou que sua cutícula foi destruída.

Segundo Shaalan *et al.* (2005) os derivados de plantas podem, além dos efeitos larvicida e pupicida, influir no tempo de duração de larvas e pupas e reduzir a emergência de adultos. Assim, a aplicação de produtos naturais em doses sub letais poderia levar a novas estratégias de controle, relacionados à resistência aos inseticidas sintéticos. O extrato de *Melia volkensii* (Meliaceae) inibiu o crescimento de *A. aegypti* causando deformações em larvas e pupas e reduzindo a emergência de adultos; a maior mortalidade ocorreu no momento da ecdise e da melanização (Mwangi & Rembold, 1988). Wiesman & Chapagain (2006) verificaram que saponinas extraídas do mesocarpo de frutos de *Balanites aegyptiaca* Del. (Zygophyllace) interferiram na emergência de adultos de *A. aegypti*.

Extratos de plantas que induzem a má formação durante intervalos larval-pupal e fazem com que o adulto não consiga terminar a ecdise são muito reportados em estudos (Mwangi & Mukiyama, 1988; Jayaprakasha *et al.*, 1997; Karmegam *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 2006).

No presente estudo, com doses sub letais de extratos de *Annona foetida*, a mortalidade foi principalmente entre a troca de estágio larval, larval-pupal e pupal-adulto. Esse tipo de mortalidade observada ocorre principalmente nos inseticidas que são análogos aos hormônios reguladores do crescimento, os IGRs. Conforme Martins & Silva (2004), os reguladores de crescimento causam modificações fisiológicas e morfológicas, e atuam, interrompendo o desenvolvimento e o crescimento ao invés da intoxicação direta. Estudos com triflumuron, diflubenzuron, que são IGRs considerados a terceira geração de inseticidas, vêm sendo realizados mostrando que esses interferem na emergência de adultos e causam má formação em larvas e em pupas (Batra *et al.* 2005; Mulla *et al.* 2003; Martins *et al.* 2008). Belinato *et al.* (2009) estudaram a atividade de concentrações sub letais de triflumuron em *A. aegypti* e verificaram que o produto alterou a razão sexual, diminuiu a longevidade dos adultos, principalmente para as fêmeas. Além disso, os adultos também diminuíram a habilidade de cópula e as fêmeas reduziram a

quantidade de repasto sanguíneo, resultando em um menor número de ovos viáveis. Aproximadamente 10% das fêmeas morriam após o repasto sanguíneo e 44% morriam após a oviposição.

Resultados semelhantes aos encontrados para os IGRs sintéticos tem sido descritos com substâncias de plantas. Sharma *et al.* (2006) avaliaram a eficácia de *Artemisia annua* (Asteraceae), *Chenopodium album* (Chenopodiaceae) e *Sonchus oleraceus* (Asteraceae) como larvicida sobre *Anopheles stephensi* e observaram que o extrato de *Artemisia annua* interferiu no desenvolvimento desses insetos. Deformações nas larvas foram observadas no exoesqueleto, no canal alimentar, no tecido hemolinfático, no sistema traqueal e no corpo gorduroso; as pupas apresentaram rupturas na parede do corpo, diminuição das cerdas e desorganização do cefalotórax; a mortalidade ocorreu na troca de estágio larval e larval-pupal; além disso, o extrato diminuiu a emergência dos adultos.

Kihampa *et al.* (2009) analisaram a atividade larvicida do extrato bruto de 17 plantas sobre *Anopheles gambiae* Giles, 1902, dessas verificaram que a mais eficaz foi *Annona squamosa* e o extrato etanólico das plantas do gênero *Tessmannia* provocaram deformações nas larvas, como um extravasamento do canal alimentar e os adultos que emergiram após o tratamento ao extrato apesar da aparência normal, as fêmeas não ovipositaram normalmente demonstrando que as deformações encontradas nas larvas interferiram no sistema reprodutor dos adultos.

Muthukrishman & Pushpalatha (2001) avaliaram a atividade e a influência do tratamento de *Calophyllum inophyllum* (Clusiaceae), *Solanum suratense* (Solanaceae), *Samadera indica* (Simaroubaceae) e *Rhinacanthus nasutus* (Acanthaceae) sobre *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi* e *A. aegypti* onde todos os extratos provocaram diminuição da fecundidade e fertilidade desses mosquitos.

Os resultados obtidos nos bioensaios indicam o potencial larvicida e o possível efeito inibidor da emergência de adultos, causados pelos extratos de *Annona foetida* principalmente utilizando o extrato diclorometano. Esses resultados evidenciam que os efeitos desses extratos são causados pela presença das acetogeninas, não descartando a possibilidade de estarem agindo sinergicamente com outros compostos químicos presentes em *Annona foetida*. Costa *et al.* (2008a) identificaram a presença de uma mistura de sesquiterpenos no óleo de *Annona foetida*, sendo que esse óleo apresentou atividade antimicrobiana e leishmanicida.

Além dessas substâncias também foi reportado à presença de alcalóides em extratos de *Annona foetida*, como Pirimidine- β -carboline e oxoaporphine, esses alcalóides também apresentaram atividade antileishmanicida (Costa *et al.*, 2008b). Tanto sesquiterpenos como alcalóides podem apresentar atividade inseticida, assim é importante que outros estudos com extratos dessa planta misturem esses compostos para entender a possível ação sinérgica com as acetogeninas.

Novas investigações são necessárias para identificar a atividade larvicida de *Annona foetida* em outras espécies de mosquitos assim como para outros organismos. O isolamento e identificação das acetogeninas presentes e a possibilidade de descoberta de outros componentes presentes no extrato são importantes para uma possível formulação comercial, capaz de causar letalidade e inibir a emergência de adultos.

6. CONCLUSÕES

1. Através das análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi possível identificar como principal grupo encontrado no extrato diclorometano de *Annona foetida* as acetogeninas, dentre elas provavelmente muricina A e muricina F.

2. Os extratos apresentaram atividade inseticida contra larvas de *A. aegypti*, principalmente o extrato diclorometano, possivelmente sua eficiência foi devida a grande quantidade de acetogeninas presente nesses extratos.

3. A letalidade larval, ocasionada pelos extratos diclorometano e hexânico, ocorreu a partir de duas horas de exposição, exceto para a CL₂₀ do extrato diclorometano onde a letalidade teve início a partir de quatro horas.

4. A persistência larvicida do extrato diclorometano evidencia sua ação por período aproximado de 18 dias.

5. Alterações no desenvolvimento de *Aedes aegypti* e as alterações morfológicas encontradas nos experimentos com extrato hexânico e diclorometano inviabilizaram a emergência dos adultos. Demonstrando, assim, a ação desses extratos no controle desse vetor.

6. O solvente Dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração utilizada de 1%, em relação ao volume total de 200 ml, não auxiliou na mortalidade das larvas nos experimentos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alali, F.Q., X. Liu & J. L. McLaughlin. 1999. Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. **Journal of Natural Products** **62**: 504 - 540.

Alali, F. Q., W. Kaakeh, G.W. Bennett & J.L. McLaughlin. 1998. Annonaceous acetogenins as natural Pesticides: Potent toxicity against insecticides-susceptible and resistant german cockroaches (Diptera: Blattellidae). **Journal of Economic Entomology** **91(3)**: 641-649.

Amer, A. & H. Mehlhorn. 2006a. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). **Parasitology Research** **99**: 466-472.

Amer, A. & H. Mehlhorn. 2006b. Persistency of larvicidal effects of plant oil extracts under different storage conditions. **Parasitology Research** **99**: 473-477.

Arruda, W., G.M.C. Oliveira, & E.G. da Silva. 2003. Toxicity of the ethanol extract of *Magonia pubescens* on larvae *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **36**: 17-25.

Barreto, C. F. 2005. *Aedes aegypti*: Resistência aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle. **Revista eletrônica Faculdade Montes Belos** **1**: 62-73.

Batra, C. P., P.K. Mittal, T. Adak & M.A. Ansari. 2005. Efficacy of IGR compound Starycide 480 SC (Triflumuron) against mosquito larvae in clear and polluted water. **Journal of Vector Borne Diseases** **42**: 109- 116.

Belinato, T. A., A.J. Martins, J.B.P. Lima, T.N. de Lima-Camara, A.A. Peixoto & D. Valle. 2009. Effect of the chitin synthesis inhibitor triflumuron on the development, viability and reproduction of *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz****104(1)**: 43-47.

Bisset, J.A. 2002. Uso correcto de insecticidas: Control de la resistencia. **Revista Cubana de Medicina Tropical** **54**: 202-219.

Bobadilla, A. M., G. Z. Espejo, F. G. Franco, L. P. Velásquez & M. S. Gonzales. 2002. Efecto bioinsecticida del extracto etanólico de las semillas de *Annona cherimolia* Miller “cherimoya” Y *A. muricata* Linnaeus “guanábana” sobre larvas del IV estadio de *Anopheles* sp. **Revista Peruana de Biología** **9(2)**: .64-73.

Bobadilla, A. M., F. Zavala, M. Sisniegas, G. Zavaleta, J. Mostacero & L. Taramona. 2005. Evaluación larvicida de suspensiones acuosas de *Annona muricata* Linnaeus “guanábana” sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae). **Revista Peruana de Biología** **12(1)**: 145-152.

Braga, I.A. & D. Valle. 2007. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde** **16**: 279-293.

Brown, A.W. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. **Journal of the American Mosquito Control Association** **2**: 123-140.

Cavalcanti, E. S. B., Morais, S. M. de Morais, M. A. A. Lima & E.W.P. Santana. 2004. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **99(5)**: 541-544.

Chaithong, U., W. Choochote, K. Kamsuk, A. Jitpakdi, P. Tippawangkosol, D. Chaiyasit, D. Champakaew, B. Tuetun, & B. Pitasawat. 2006. Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector Ecology** **31**: 138-144.

Chang, F & Y. Wu. 2001. Novel Cytotoxic Annonaceous Acetogenins from *Annona muricata*. **Journal of Natural Products** **64**: 925-931.

Chang, F. & W. Yang-Chang, 2001. Novel cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Journal of Natural Products** **64 (7)**: 925-931.

Consoli, R.A.G.B. & Lourenço-de-Oliveira, R. 1994. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil, 228p.

Coura, J.R. 2005. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**, vol.2. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 2025p.

D'Amato, C., J. P. M. Torres & O. Malm. 2002. DDT (Dicloro Difetil Tricloroetano): Toxicidade e Contaminação Ambiental – Uma Revisão. **Química Nova** **25(6)**: 995-1002.

Farnesi, L. C., A. J. Martins, D. Valle & G. L. Rezende. 2009. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **104(1)**: 124-126.

Feitosa, E. M. A., A. M. C. Arriaga, G. M. P. Santiago, T. L. G. de Lemos, M. C. F. de Oliveira, J. N. e Vasconcelos, J. Q. Lima, G. T. Malcher, R. F. do Nascimento & R. Braz-Filho. 2009. Chemical composition and larvicidal activity of *Rollinia leptopetala* (Annonaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society** **20(2)**: 375-378.

Figueiredo, L. T. M. 2003. Dengue in Brazil: Past, Present and Future Perspective. **Dengue Bulletin** **27**: 25-33.

Finney, D.J. 1971. **Probit Analysis**. Cambridge University Press, 3rd Edition.

Forattini, O.P. 2002. **Culicidologia Médica**, vol.2. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 864p.

Fries, R. E. 1959. **Annonaceae**. in: Engler, A. & Prantl, K. (eds.), **Die natürlichen Pflanzenfamilien**, 2nd ed., vol. 17a II. Duncker & Humblot, Berlin, 1959, 171p.

Furtado, R. F., M. G. A. de Lima, M. A. Neto, J. N. S. Bezerra & M. G. de V. Silva. 2005. Atividade Larvicida de Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology** **34(5)**: 843-847.

Gadelha, D.P. & Toda, A.T. 1985. Biologia e Comportamento do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Malariologia** **37**: 29-36.

Georghiou, G.P & Taylor, C. E. 1986. **Pesticide resistance: strategies and tactics for management**. Ed. **National Research Council**. National Academy Press, Washington DC. 157-169 pp.

González-Coloma, A., A. Guadño, C. de Inés, R. Martínez-Díaz & D. Cortes. 2002. Selective Action of Acetogenin Mitochondrial Complex I Inhibitors. **Zeitschrift für Naturforschung** **57(11-12)**: 1028-1034.

Gottlieb, O. R. & M. R. de MB. Borin. 2000. Medicinal Products: Regulation of Biosynthesis in Space and Time. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **95(1)**: 115-120.

Green M.M., J.M. Singer, D.J. Sutherland & C.R. Hibben. 1991. Larvicidal activity of *Tagetes minuta* (Marigold) toward *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association** **7**: 282-286.

Gubler, D.J. 1998. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Reviews**: 480-496.

Gusmão, D.S., V. Páscoa, L. Mathias, I.J.C. Vieira, R. Braz-Filho & F.J.A. Lemos. 2002. *Derris (Lonchocarpus) urucu* (Leguminosae) extract modifies the peritrophic matrix structure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **97**: 371-375.

Hanslick J.L., K. Lau, K.K. Noguchi, J.W. Olney, C.F. Zorumski, S. Mennerick & N.B. Farber. 2009. Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. **Neurobiology of Disease** **34**: 1-10.

Hombach, J. 2007. Vaccines against dengue: a review of current candidate vaccines at advanced development stages. **Revista Panamericana de Salud Pública** **21(4)**: 254-260.

Jayaprakasha, G.K, R.P. Singh, J. Pereira & K.K. Sakariah. 1997. Limonoids from *Citrus reticulata* and their moult inhibiting activity in mosquito *Culex quinquefasciatus* larvae. **Phytochemistry** **44**: 843-846.

Karmegam, N., M., Sakthivadivel, V. Anuradha, and T. Daniel. 1997. Indigenous plant extracts as larvicidal agents against *Culex quinquefasciatus* Say. **Bioresource Technology** **59**: 137-140.

Kihampa, C., C. C. Joseph, M.H.H. Nkunya, S.M. Magesa, A. Hassanali, M. Heydenreich & E. Kleinpeter. 2009. Larvicidal and IGR activity of extract of

Tanzanian plants against malaria vector mosquitoes. **Journal of Vector Borne Diseases** **46**: 145-152.

Kim S.J., Y.S. Jung, M.Y. Yoon & Y.C. Kim. 2007. Comparative effects of dimethylsulfoxide on metabolism and toxicity of carbon tetrachloride and dichloromethane. **Journal of Applied Toxicology** **27**: 25-31.

Leekumjorn S. & A.K. Sum. 2006. Molecular study of the diffusional process of DMSO in double lipid bilayers. **Biochimica et Biophysica Acta** **1758**: 1751-1758.

Li, J. 1994. Egg chorion tanning in *Aedes aegypti* mosquito. **Comparative Biochemistry and Physiology** **109(4)**: 835-843.

Li, J.S. & J. Li. 2006. Major chorion proteins and their crosslinking during chorion hardening in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** **36**: 954-964.

Lima, J. T. F. 1985. Risco de urbanização da febre amarela no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública** **1 (3)**: 377-384.

Lopes, J., M. A. N. da Silva, A. M. Borsato, V. D. R. B. de Oliveira & F. J. de A. Oliveira. 1993. *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. e a culicideofauna associada em área urbana da região sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública** **27(5)**: 326-333.

Maas, P.J.M., H. Maas & J. M. S. Miralha. 2007. Flora da reserve Ducke, Amazonas, Brasil: Annonaceae. **Rodriguésia** **58**: 617-662.

Maciel, M. A. M., Pinto, A. C., V. F. Veiga-Junior, N. F. Grynberg & A. Echevarria. 2002. Plantas Mediciniais: A Necessidade De Estudos Multidisciplinares. **Química Nova** **25(3)**: 429-438.

Martins, A. J., T.A. Belinato, J.B. P. Lima & D. Valle. 2008. Chitin synthesis inhibitor effect on *Aedes aegypti* populations susceptible and resistant to organophosphate temephos. **Pest Management Science** **64**: 676-680.

Martins, F. & I. G. da Silva. 2004. Avaliação da atividade inibidora do diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **37(2)**: 135- 138.

Morales, C.A.; González, R. & Aragón, R. 2004. Evaluación de la actividad larvicida de extractos polares y no polares de acetogeninas de *Annona muricata* sobre larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). **Revista Colombiana de Entomología** **30(2)**: 187-192.

Mulla, M. S., U. Thavara, A. Tawatsin, J. Chompoonsri, M. Zaim & T. Su. 2003. laboratory and field evaluation of novaluron, a new acylurea insect growth regulator; against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Journal of Vector Ecology** **28(2)**: 241-254.

Muthukrishnan, J. & E. Pushpalatha. 2001. Effects of plant extracts on fecundity of mosquitoes. **Journal of Applied Entomology** **125**: 31-35.

Mwangi, R.W & H. Rembold. 1988. Growth-inhibiting and larvicidal effects of *Melia volkensii* extract on *Aedes aegypti* larvae. **Entomologia Experimentalis et Applicata** **46(2)**:103-108.

Mwangi, R.W & T.K. Mukiama. 1988. Evaluation of *Melia volkensii* extract fractions as mosquito larvicides. **Journal of the American Mosquito Control Association** **4**: 442-447.

Nelson MJ. 1986. ***Aedes aegypti: biologia y ecologia***. Organización Panamericana de la Salud. Washington, DC, 50p.

Omena, M. C., D. M. A. F. Navarro, J. E. de Paula, J. S. Luna, M. R. Ferreira de Lima & A. E. G. Sant'Ana. 2007. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource Technology** **98**: 2549- 2556.

Prajapati, V., A. K. Tripathi, K. K. Aggarwal & S. P. S. Khanuja. 2005. Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Bioresource Technology** **96**: 1749-1757.

Prophiro, J. S. 2008. **Análise de susceptibilidade de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) a organofosforado e alternativa de controle de imaturos do vetor de *Aedes aegypti* utilizando produtos de origem botânica**. Dissertação de Mestrado. Paraná, Brasil, 120p.

Rahuman, A.A., G. Gopalakrishnan, P. Venkatesan & K. Geetha. 2008. Larvicidal activity of some Euphorbiaceae plant extracts against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research** **102**: 867-873.

Regnault-Roger, C. 1997. The potencial of botanical essential oils for insect pest control. **Integrated Pest Management Reviews** **2**: 25-34.

Rezende, G. L., A. J. Martins, C. Gentile, L. C. Farnesi, M. Pelajo-Machado, A. A. Peixoto & D. Valle. 2008. Embryonic dessication resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized Serosal Cuticle. **BMC Developmental Biology** **8**: 82.

Robertson, J. L. & Preisler, H. K. 1992. **Pesticide bioassays with Arthropods**. 127p.

Rupprecht, J. K., Y. Hui & McLaughlin. 1990. Annonaceous Acetogenins: A Review. **Journal of Natural Products** **53(2)**: 237-278.

Sanches, J. L. 1981. Carlos J. Finlay and the conception of contagion. **Indian Journal of History of Science** **16(2)**: 156-168.

Santos, L. P., M. A. D. Boaventura & A.B. Oliveira.1994. Crassiflorina, uma acetogenina tetra-hidrofurânica citotóxica de *Annona crassiflora* (Araticum). **Química Nova** **17**: 387-391.

Santos, N.C., J. Figueira-Coelho, J. Martins-Silva & C. Saldanha. 2003. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular and molecular aspects. **Biochemical Pharmacology** **65**: 1035-1041.

Saxena, R. C., V. Harshan, A. Saxena, P. Sukumaran, M. C. Sharma & M. Lakshamana Kumar.1993. Larvicidal and chemosterilant activity of *Annona squamosa* alkaloids against *Anopheles stephensi*. **Journal of the American Mosquito Control Association** **9**(1): 84-87.

Siddique, B. S., T. Gulzar, A. Mahmood, S. Begum, B. Khan & F. Afshan. 2004. New Insecticidal Amides from Petroleum Ether Extract of Dried *Piper nigrum* L. Whole Fruits. **Chemical & Pharmacological Bulletin** **52**(11): 1349-1352.

Sharma, P., L. Mohan & C.N. Srivastava. 2006. Phytoextract-induced developmental deformities in malaria vector. **Bioresource Technology** **97**: 1599 -1604.

Silva H. H. G da, I. G. da Silva, R. M. G dos Santos, E. R. Filho & C. N. Elias. 2004. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **37**(5): 396-399.

Sivagnaname, N. & Kalyanasundaram. 2004. Laboratory Evaluation of Methanolic Extract of *Atlantia monophylla* (Family: Rutaceae) against Immature Stages of Mosquitoes and Non-target Organisms. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **99**(1): 115-118.

Shalan, E.A.S., D.V. Canyon, M.W.F. Younes, H.A. Wahab & A.H. Mansour. 2005. Effects of sub-lethal concentrations of synthetic insecticides and *Callitris glaucophylla* extracts on the development of *Aedes aegypti*. **Journal of Vector Ecology** **30**: 295-298.

Sukumar, K., M.J. Perich & L.R. Boobar. 1991. Botanical derivatives in mosquito control: a review. **Journal of the American Mosquito Control Association** **7**: 210-237.

Vilaça-Costa, E. L., M.L.B. Pinheiro, J.R. A. Silva, B.H.L.N.S. Maia, M.C.T. Duarte, A.C.F. Amaral, G.M.C. Machado & L.L. Leon. 2008a. Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). **Química Nova** **15**: 1-4.

Vilaça-Costa, E. L., M.L.B. Pinheiro, C.M. Xavier, J.R. A. Silva, A.C.F. Amaral, A.D.L. Souza, A. Barison, F.R. Campos, A.G. Ferreira, G.M.C. Machado & L.L. Leon. 2008b. A Pyrimidine β -carboline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity. **Journal of Natural Products** **69**: 292-294.

Zeng, L., Q. Ye, N. H. Oberlies, G. Shi, Z. Gu, K. He & J. L. McLaughlin. 1996. Recent Advances in Annonaceous Acetogenins. **Natural product Reports**: 275 - 306.

Wandscheer, C.B., J.E.L. Duque, M.A. Navarro-Silva, Y. Fukuyama, J.L. Wohlke, J. Adelmann & J. D. Fontana. 2004. Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. **Toxicon** **44**: 829-35.

Wiesman, Z. & B.P. Chapagain, 2006. Larvicidal activity of saponin containing extracts and fractions of fruit mesocarp of *Balanites aegyptiaca*. **Fitoterapica** **77**: 420-424.

WHO. 1981a. **Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides**. Geneva.

WHO. 1981b. **Criteria and Meaning of Tests for Determining the Susceptibility or Resistance of Insects to Insecticides**. Geneva.

WHO. 2009. **Dengue Fact sheet**. Geneva; 2009. Acessado em 27/6/2009. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>