



**Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da
Saúde**

Waldemir Pereira Lima

**Toxicidade do óleo essencial de
Tagetes minuta L (Asteraceae) em
larvas de *Aedes aegypti* (Diptera:
Culicidae) e protocolo de alimentação
em Camundongos Swiss Calb/C**

**São José do Rio Preto
2010**

Waldemir Pereira Lima

**Toxicidade do óleo essencial de
Tagetes minuta L (Asteraceae) em
larvas de *Aedes aegypti* (Diptera:
Culicidae) e protocolo de
alimentação em Camundongos
Swiss Calb/C**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto
para obtenção do Título de Doutor no
Curso de Pós-graduação em Ciências
da Saúde, Eixo Temático: Medicina e
Ciências Correlatas.

Orientadora: Profa. Dra. Margareth Regina Dibo

São José do Rio Preto
2010

Lima, Waldemir Pereira.

Toxicidade do óleo essencial de *Tagetes minuta* L (Asteraceae) em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e protocolo de alimentação em Camundongos Swiss Calb/C, 2010.

São José do Rio Preto, 2010

51p.

Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Eixo temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Margareth Regina Dibo

1. Metodologia em alimentação; 2. *Aedes aegypti*; 3. *Tagetes minuta*; 4. Camundongos swiss.

WALDEMIR PEREIRA LIMA

Toxicidade do óleo essencial de *Tagetes minuta* L (Asteraceae) em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e protocolo de alimentação em Camundongos Swiss Calb/C.

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Dr^a Margareth Regina Dibo

2º Examinador: Prof. Dr^a Denise de Cerqueira Rossa Feres

3º Examinador: Prof. Dr Francisco Chiaravalloti Neto

4º Examinador: Prof. Dr João Carlos Bonfanti-Almeida

5º Examinador: Prof. Dr^a Débora Ap. Pires de Campos Zuccari

Suplentes: Dr^a Eleni Gomes, Dr Ricardo Luiz Dantas Machado,

Dr^a Marluci Monteiro Guirado, Dr Maurício Lacerda Nogueira,

Dr Carlos Eugênio Cavasini

São José do Rio Preto, 18/02/2010.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Lista de tabelas.....	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
1- INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Objetivos	07
2- MATERIAL E MÉTODOS	08
2.1. Procedimento para alimentação das fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	09
2.2. Criação e obtenção das larvas de <i>Aedes aegypti</i>	09
2.3. O produto natural vegetal e a avaliação de sua atividade inseticida.....	10
2.4. Avaliação do período residual.....	11
3- RESULTADOS.....	12
4- DISCUSSÃO.....	16
5- CONCLUSÃO.....	22
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
7- APÊNCIDE:	
Artigo aceito pela Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.....	31
8- ANEXO.....	49
8.1- Comissão de Ética em Experimentação Animal. Protocolo FAMERP nº 574107.....	50
8.2- Carta da Revista “ <i>Sociedade Brasileira de Medicina Tropical</i>” informando a aceitação de artigo apresentado no Apêndice para publicação.....	51

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família por se constituírem enquanto pessoas, igualmente belas e admiráveis em essência, estímulos que me impulsionaram a buscar vida nova a cada dia, meus agradecimentos por terem aceito se privar de minha companhia pelos estudos, concedendo a mim a oportunidade de me realizar ainda mais.

AGRADECIMENTOS

Aos Orientadores Dr^a Margareth Regina Dibo e Prof. Dr. Francisco Chiaravalloti Neto pelo incentivo, simpatia e presteza no auxílio às atividades e discussões sobre o andamento e normatização desta Tese de Conclusão de Curso; que se demonstraram como só o fazem os mestres. Acreditando no meu trabalho, oferecendo-me a liberdade necessária e dividindo comigo as expectativas, conduziu-me assim a maiores reflexões e desta forma enriquecendo-me. Minha especial admiração e gratidão.

Aos demais idealizadores, coordenadores e funcionários da FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

A todos os professores e seus convidados pelo carinho, dedicação e entusiasmo demonstrado ao longo do curso.

Aos colegas de classe pela espontaneidade e alegria na troca de informações e materiais numa rara demonstração de amizade e solidariedade.

Ao pessoal do Laboratório de Vetores da FAMERP em especial: Aline M. S. Pagliotto, Beatriz A.C. Belini, Daniela R. Benetti, Nathália Zini, Neuza F. A. Santana e Perpétua M. M. Sereno, pela eficiência, dedicação e simpatia. Meu muito obrigado.

A minha amiga Dra. Rita Karina Santana, pela sua contribuição e interesse carinhoso, desde o início deste estudo. Não fosse por ela nem teria começado. Meu respeito, admiração e carinho. É com emoção que lhe agradeço.

Maria de Lourdes da Graça Macoris, Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN – Marília-SP, pelas contribuições que muito enriqueceram este trabalho. Meu muito obrigado.

Aos amigos Cátia Rezende, Eloni Fontana, Valter Brighetti, Jéssica Laira, Karla Adriana, Christiane Jordão, por sempre me ajudarem pacientemente nas horas difíceis. Meus agradecimentos com carinho.

A todos os colegas de trabalho, sem distinção. Sou-lhes bastante grato.

E, finalmente, a DEUS pela oportunidade e pelo privilégio que me foi dado em compartilhar tamanha experiência e, ao frequentar este curso, perceber e atentar para a relevância de temas que não faziam parte, em profundidade, de minha vida.

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Percentual médio de mortalidade e Desvio Padrão (DP) para diferentes concentrações do óleo essencial de *T. minuta L* e controle, contra 100 larvas (3º estágio) de *A. aegypti* procedentes de Rockefeller (EUA), Bauru (SP) e São José do Rio Preto (SP), após 24 horas de contato.....47

Tabela 2 – Concentrações letais do óleo essencial de *T. minuta L*, contra 100 larvas (3º estágio) de *A. aegypti*, procedentes de Rockefeller (EUA), Bauru (SP) e São José do Rio Preto (SP), após 24 horas de contato.....48

RESUMO

Introdução: As doenças tropicais têm sido um fenômeno de preocupação mundial, e entre elas a dengue, uma vez que o mosquito transmissor dos vírus, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), tornou-se fora de controle, e novos focos têm sido descobertos a cada dia. Vários meios já foram utilizados na tentativa de controlar o ciclo de vida inseto. Entretanto, o uso indiscriminado de muitos agentes levou o inseto a desenvolver certa resistência aos mesmos. Novas perspectivas estão surgindo já que podemos encontrar na própria natureza meios de controlar esses Culicídeos. É o caso do óleo essencial de *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) que, de acordo com estudos recentes, desempenha importante papel no controle de insetos, inclusive do *Aedes aegypti*.

Objetivos: Desenvolver um procedimento de alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* que não cause estresse em camundongo Swiss Balb/C; avaliar a toxicidade e o efeito residual do óleo essencial de *Tagetes minuta* L (Asteraceae) em populações de *Aedes aegypti*. **Material e métodos:** Camundongos Swiss Balb/C anestesiados e sedados foram dispostos em gaiola para alimentação de fêmeas do mosquito por um período de uma hora três vezes por semana. O óleo essencial, foi utilizado nas concentrações de 0,2mL L⁻¹; 0,225mL L⁻¹; 0,25mL L⁻¹; 0,275mL L⁻¹ e 0,3mL L⁻¹ partindo-se de uma diluição inicial de 200mL L⁻¹ em Acetona, em cem larvas de terceiro estágio procedentes de Bauru-SP e São José do Rio Preto-SP, respectivamente, sensíveis e resistentes ao temephos, e, em larvas de Rockefeller-EUA. Os testes foram realizados em quadruplicata, com três repetições, por três dias consecutivos. **Resultados:** Não foi observado dor ou estresse dos camundongos durante hematofagia pelas fêmeas de *Ae aegypti*. Não houve diferença entre as populações quanto à susceptibilidade a *Tagetes minuta* e os ensaios demonstraram CL₅₀ de 0,24, 0,25 e 0,21mL L⁻¹ e CL_{99,9} em 0,35,

0,39 e 0,42mL L⁻¹, respectivamente, para Rockefeller, Bauru e São José do Rio Preto. Não foi observado efeito residual do óleo. **Conclusões:** A anestesia do camundongo Swiss Balb/C propiciou que este servisse como fonte alimentar para fêmeas de *Aedes aegypti* sem sofrer dor ou estresse, podendo este ensaio ser utilizado por como modelo, uma vez que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA). As CL₅₀ de *Tagetes minuta* L. foram iguais, respectivamente, para larvas da cepa Rockefeller, Bauru e São José do Rio Preto, assim como as CL_{99,9} que foram iguais, respectivamente, para larvas de da cepa Rockefeller, Bauru e São José do Rio Preto. A resistência das larvas do Culicideo ao temephos, não interferiu na ação letal exercida pelo óleo essencial de *Tagetes minuta* L. Os testes para avaliação do período residual do óleo após uma semana de contato, apresentaram mortalidade zero. O óleo essencial de *Tagetes minuta* L pode ser utilizado como larvicida alternativo contra *Aedes aegypti*, entretanto novos estudos devem ser desenvolvidos com o objetivo de isolar a fração larvicida do óleo e incorporar outros componentes visando aumentar sua estabilidade, de maneira que o produto tenha efeito residual.

Palavras-chaves: 1- Protocolo de alimentação, 2- *Aedes aegypti*, 3- *Tagetes minuta* L, 4- Óleo essencial, 5- Camundongos Swiss Balb/C.

ABSTRACT

Introduction: Tropical diseases have been a phenomenon of global concern, and among them the Dengue, because the mosquito that transmits the virus, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), became out of control, and new outbreaks have been discovered each day. Several means have been used in an attempt to control the insect life cycle. However, the indiscriminate use of many agents took the insect to develop some resistance to them. New perspectives are emerging as we find in nature means to control these mosquitoes. Is the case of essential oil of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) which, according to recent studies, plays an important role in the control of insects, including the *Aedes aegypti*. **Objectives:** develop a procedure for feeding female *Aedes aegypti* that does not cause stress in Swiss Balb/C mice, evaluate the toxicity and residual effect of essential oil of *Tagetes minuta* L (Asteraceae) on populations of *Aedes aegypti*. **Methods:** Swiss Balb/C mice were anesthetized arranged in the cage for feeding female mosquitoes for a period of one hour, three times a week. The essential oil was used in concentrations of 0,2 mL L⁻¹; 0,225 mL L⁻¹; 0,25 mL L⁻¹; 0,275 mL L⁻¹ and 0,3 mL L⁻¹ starting from an initial dilution of 200mL L⁻¹ in acetone, in one hundred third-stage larvae coming from Bauru-SP, São José do Rio Preto-SP, respectively, sensitive and resistant to temephos, and one hundred larvae of Rockefeller-USA. The tests were performed in four times, with three replicates for three consecutive days. **Results:** There was no pain or stress observed in mice during blood feeding by *Ae aegypti*. There was no difference between populations for susceptibility to *Tagetes minuta* L. and tests showed LC₅₀ of 0,24; 0,25 and 0,21 mL L⁻¹ and CL_{99,9} at 0,35; 0,39 and 0,42 mL L⁻¹, respectively, for Rockefeller, Bauru and São José do Rio Preto. There was no residual effect of the oil. **Conclusions:** Sedation of Swiss Balb/C mice has provided it serve as a

food source for female *Aedes aegypti* without pain or stress, and can be used by other researchers, since it was approved by the Ethics Committee of Animal Experiments (CEEA) of this institution. The LC_{50} of *Tagetes minuta* L. were equal, respectively, for larvae of the Rockefeller strain, Bauru, São José do Rio Preto, and the $CL_{99,9}$ were equal, respectively, for larvae of the Rockefeller strain, Bauru, São José do Rio Preto. The resistance of larvae to temephos had no effect on lethal action exerted by the essential oil of *Tagetes minuta* L. Tests for evaluation of a residual oil after a week of contact, had zero mortality. The essential oil of *Tagetes minuta* L can be used as an alternative larvicide against *Aedes aegypti*, however new studies are needed in order to isolate the fraction of larvicidal oil and incorporate other ingredients to increase their stability so that the product can have the residual effect.

Keywords: 1- Protocol in food, 2- *Aedes aegypti*, 3- *Tagetes minuta* L., 4- Essential oil, 5- swiss mice

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O *Aedes aegypti* é um díptero da família Culicidae, subfamília Culicinae. Com hábitos diurnos e hematofágicos, as fêmeas (antropofílicas) deste vetor são responsáveis pela transmissão do vírus do dengue e da febre amarela urbana. ^(1, 2, 3)

As fêmeas férteis de *Aedes aegypti* necessitam sugar o sangue para que haja a maturação dos ovos. Em condições normais, as fêmeas deste culicídeo vivem aproximadamente dois meses e, em temperatura acima dos 23°C, podem fazer até doze repastos sangüíneos em um mês. Este hábito é de grande importância para a transmissão do vírus do dengue. As fêmeas colocam seus ovos principalmente próximos à superfície de pequenas coleções de água em recipientes artificiais como vasos e pneus ou naturais como bromélias. Quando a água se evapora, os ovos aderem às paredes do recipiente em que estão e podem resistir por vários meses. Com nova reposição de água, há a eclosão dos ovos. O embrionamento ocorre em 72 horas, em temperatura entre 25 e 30°C. O desenvolvimento larvário e pupal, em condições favoráveis, tarda pelo menos uma semana e a 28°C, o ciclo de ovo a ovo varia de 11 a 18 dias. ^(4, 5) Estes fatos explicam a fácil e rápida disseminação da espécie e a grande ocorrência de casos de dengue.

Desde o século IX, várias substâncias foram utilizadas como inseticida na tentativa de se eliminar as populações de insetos considerados “pragas”. Os primeiros inseticidas usados eram inorgânicos (arsênico, mercúrio, enxofre), porém, esta medida logo caiu em desuso devido sua alta toxicidade. Em seguida, observamos um grande avanço nos trabalhos entomológicos que, através de estudos biológicos e ecológicos dos insetos, propiciou novas técnicas de controle e contribuiu, em 1943, para a descoberta do DDT. Posteriormente, com o desenvolvimento de outros inseticidas de

efeito residual prolongado, houve uma verdadeira revolução nos conceitos de luta contra os insetos. ⁽⁶⁻⁹⁾

A partir da década dos 40, passou-se a utilizar produtos químicos sintéticos organoclorados no combate ao *Aedes aegypti* (DDT, BHC, Aldrin, Heptacloro, Lindane, Dodecacloro, etc.) que desenvolvem ação letal muito rápida e têm período residual muito longo. Contudo, sua alta toxicidade e sua capacidade de se acumular na cadeia alimentar fizeram com que passassem a ser proibidos. ^(7, 10- 13)

Outra razão que levou ao desuso do DDT foi a alta resistência desenvolvida pelos insetos. ^(14, 15)

Assim, os organoclorados foram substituídos pelos organofosforados que também possuem alta toxicidade, porém são biodegradáveis e não se acumulam na cadeia alimentar. ^(9,16-19) Mais recentemente os carbamatos, que agem como os organofosforados inibindo a ação da enzima acetilcolinesterase e têm período residual mais curto que aqueles, passaram a ser usados. ^(20, 21, 22)

Desde 1970, têm sido usados os piretróides ^(23,24) que foram desenvolvidos a partir de piretrinas naturais que são extraídas de plantas como, por exemplo, *Chrysantemum cinerariaefolium* (Asteraceae). Possuem boas propriedades inseticidas e baixa toxicidade aos mamíferos e, por estas razões, podem ser usados com regularidade e frequência. ^(25, 26)

Vinte anos depois da introdução destes inseticidas sintéticos, das 204 espécies de pragas então conhecidas, 137 já apresentavam algum tipo de resistência, ineficiência desta modalidade de controle, já vislumbrada por alguns poucos entomólogos no final dos anos 40. Além do aspecto da resistência, foi verificado que, a

partir do momento em que se utilizava um inseticida, ficava-se dependente de seu uso contínuo. ^(27-29, 30, 31)

A interação química inseto-planta é de grande importância para o equilíbrio ecológico de um determinado habitat. Apesar das plantas serem a principal fonte de alimentos para os insetos, por seus metabólitos primários, é através dos metabólitos secundários que ocorre esta interação. ⁽³²⁻³⁵⁾

Assim, após analisar quimicamente as folhas verdes de grande número de plantas, concluiu-se que todas apresentavam os nutrientes necessários para o desenvolvimento dos insetos, desde que eles as ingerissem em quantidades suficientes. ^(34, 36-38) Desta forma, comprovou-se a idéia de que outros fatores, que não os nutrientes, governariam a seleção do hospedeiro, caso contrário todos os insetos seriam polípagos ou oligófagos. Comprovou-se, então, que a maioria, se não todas as espécies botânicas, parece ter um sistema imunológico rudimentar ⁽³⁹⁾ e desenvolveu meios de defesa química contra o ataque de bactérias, fungos, protozoários, insetos, pássaros e outros animais. ^(40, 41) Esta teoria das substâncias secundárias segundo a qual a seleção de plantas hospedeiras pelos insetos era regulada por substâncias secundárias foi defendida por inúmeros autores. ^(32, 35, 36, 42-47)

Posteriormente, trabalhos com afídeos, demonstraram a teoria da discriminação dualística, sugerindo que a seleção do hospedeiro é governada por dois tipos de estímulos: um "estímulo exótico" fornecido pelas substâncias secundárias, e um "estímulo nutritivo" fornecido por nutrientes essenciais ou não. ^(30, 33, 48)

Mais tarde, demonstrou-se definitivamente a influência das substâncias nutritivas, observando seus efeitos sobre a alimentação dos pulgões. De acordo com o efeito sobre os insetos, as substâncias, quer sejam secundárias ou

nutritivas, enquadram-se na classificação de estímulos de natureza química proposta. ⁽⁴⁹⁻

⁵¹⁾ Essas substâncias conferem resistência a uma planta, quais sejam: presença de repelente olfativo ou gustativo; ausência de atraente ou arrestante; presença de supressor; ausência de incitante; presença de deterrente; ausência de estimulante e balanço relativo de substâncias repelentes e atraentes. ^(21, 24, 52, 53)

Ainda, a respeito de substâncias atraente-repelentes, foi testado o efeito atrativo e repulsivo de inúmeros óleos essenciais, constando-se que eles podem ser classificados em diversos grupos de acordo com a resposta obtida ^(52, 54-56): atraente em baixa concentração e repelente em alta; sem resposta significativa; sem resposta significativa em baixa concentração, mas repelente em alta; e repelente.

Em todo o mundo, pesquisadores analisam vegetais da flora medicinal regional, tentando obter produtos naturais com ação inseticida ou análogos de feromônios sexuais que possam atrair os insetos para armadilhas contendo inseticidas, ou perturbar o encontro dos sexos pela desorientação dos machos na localização das fêmeas ou, ainda, análogos dos hormônios juvenis e seus antagonistas para bloquear o desenvolvimento larvário ou pupal de insetos pragas. ^(57, 58) São exemplos de plantas e os produtos inseticidas mais importantes, desenvolvidos até o momento: *Chrysanthemum cinerariifolium* Bocc. (Asteraceae), *Derris urucu* (Killip et Smith) MacBride (Leguminosae/Papilionaceae), *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae), *Ryania acuminata* Eichl. (Flacourtiaceae), *Azadirachta indica* (A. Juss.) (Meliaceae). ^(6, 26, 38, 42, 59, 60)

Entre estas plantas e produtos ativos destacamos a *Tagetes minuta* Linnaeus (Asteraceae) planta utilizada na medicina popular e conhecida por coarí-bravo, cravinho-de-defunto, erva-fedorenta, vara-de-rojão. É planta anual, ereta,

sublenhosa, pouco ramificada, glabra, medindo 1 a 2 m de altura, com reprodução exclusivamente por semente.^(2, 61) As folhas, opostas ou alternas, são verdes, às vezes verde amareladas, com as margens levemente serrilhadas e com duas fileiras marginais de glândulas oleíferas na face superior. A superfície inferior das folhas sustenta um grande número de glândulas multicelulares, de coloração alaranjada, as quais liberam um aroma agradável quando rompidos. As glândulas também podem ser encontradas no caule e nos quatro ou cinco involúcros das flores.^(61- 64) Planta daninha infestante, de cultivos anuais e perenes, bem como de beira de estradas e terrenos baldios é nativa de regiões temperadas e montanhosas do sudeste da América do Sul, incluindo países como Argentina, Brasil, Bolívia, Peru, e o Chaco no Paraguai.⁽⁶⁵⁾

A *Tagetes minuta* L., popularmente, tem reputação de planta tóxica e medicinal^(65, 66) com propriedades anti-helmíntica, enemagoga, laxativa, sudorífera, calmante da tosse, contra reumatismo articular, cólicas intestinais, dispepsia, resfriado, bronquite e afecções uterinas.^(65, 67-70) As folhas deste vegetal são impregnadas de glândulas translúcidas, que contêm óleo essencial, de cheiro ativo e com ação inseticida, bem pronunciada.⁽⁶¹⁾ A porcentagem deste óleo, em volume e peso, revela-se, no entanto, relativamente pequena, em “comparação com o cheiro que a própria planta, ao mais leve contato, desprende”.^(70, 71)

Héthelyi *et al.*⁽³⁶⁾ demonstraram que a técnica de arraste a vapor era adequada para a extração do óleo essencial de *Tagetes minuta* e, através de métodos cromatográficos, separaram e dosaram alguns componentes que foram identificados por espectrometria de massa. Winoto-Suatmadji⁽⁷⁰⁾ estudaram os efeitos de várias espécies de *Tagetes* contra nematódeos considerados uma séria praga nas plantações.

Alguns autores estudaram e identificaram ação inseticida da *Tagetes minuta* L. sobre o *Aedes aegypti*.⁽⁷²⁻⁷⁴⁾ Uma vez que este vetor já apresenta resistência a alguns dos inseticidas normalmente utilizados nos programas de controle do dengue⁽²⁹⁾, é importante a realização de estudos e testes com produtos alternativos como, por exemplo, com a *Tagetes minuta* L.

Para a realização de testes com inseticidas ou larvicidas utiliza-se um número elevado de exemplares de *Aedes aegypti* (em torno de 800 por teste) os quais devem ter sido criados em condições semelhantes de nutrição e desenvolvimento fisiológico. Para tal padronização é necessária a criação desta espécie em laboratório. Geralmente os testes são realizados com a primeira geração obtida em laboratório (F1) por ser a mais próxima da população natural. Entretanto, não se encontram artigos científicos com procedimentos aprovados por Comitês de Ética em Experimentação Animal referentes à utilização de camundongos como fonte de repasto sanguíneo para fêmeas deste Culicídeo, o que é necessário para postura de ovos e criação em laboratório.

1.1. Objetivos

Desenvolver um procedimento de alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* que não cause estresse ou sofrimento ao camundongo Swiss Balb/C; avaliar a toxicidade do óleo essencial de *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) em diferentes populações de *Aedes aegypti* e avaliar efeito residual do óleo essencial de *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) em diferentes populações de *Aedes aegypti*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2 . MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Procedimento para alimentação das fêmeas de *Aedes aegypti*

Foram administrados por via intramuscular, através de uma seringa hipodérmica 0,05 mL de Ketamina e 0,05 mL de Xilazina, respectivamente, em volume total de 0,1 mL da solução em camundongo Swiss Balb/C. O animal foi deixado em repouso em recipiente próprio, forrado de serragem e observado o tempo de sedação. Outro camundongo sedado foi exposto a 40 fêmeas do mosquito *Aedes aegypti* em gaiola apropriada. As reações dos animais durante estes procedimentos foram observadas e anotadas.

Foi realizado rodízio entre os indivíduos de um grupo composto de 4 a 5 animais, e o retorno não ocorria antes de três semanas, e não ultrapassava dois meses.

2.2. Criação e obtenção das larvas de *Aedes aegypti*

Larvas de *Aedes aegypti* foram coletadas durante visitas às residências pelos agentes municipais do Programa de Controle da Dengue, em diferentes bairros de São José do Rio Preto, as quais foram encaminhadas ao laboratório e alimentadas com ração para peixe até atingir a fase adulta. Mosquitos fêmeas e machos foram colocados em uma gaiola de criação. Para estes, foi oferecida solução açucarada a 10% alternada com a exposição a camundongos Swiss Balb/C durante uma hora em três dias da semana, visando a hematofagia pelas fêmeas e oviposição.

Os ovos obtidos foram colocados para secar a temperatura ambiente, em seguida contados e armazenados. Os ovos de *Aedes aegypti* de Bauru e cepa Rockefeller (originária dos Estados Unidos e cedida pelo Centers of Disease Control de Porto Rico), também necessários para realização dos testes, foram fornecidos pelo Laboratório da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) de Marília.

Os ovos obtidos de cada população foram colocados em vasilhas contendo água e fermento e as larvas foram alimentadas com ração para peixe, até atingir o terceiro estágio de desenvolvimento.

2.3. O produto natural vegetal e a avaliação de sua atividade inseticida

O óleo essencial de *Tagetes minuta* L. foi adquirido junto à empresa SAT Group (Índia). Este óleo essencial foi diluído e testado nas concentrações de 0,2mL L⁻¹; 0,225mL L⁻¹; 0,25mL L⁻¹; 0,275mL L⁻¹ e 0,3mL L⁻¹ partindo-se de uma diluição inicial de 200mL L⁻¹ em Acetona, conforme procedimento recomendado pela Organização Mundial da Saúde.

A partir da solução inicial, foram preparadas para cada diluição, quatro recipientes com volume final de 150mL cada um, uma vez que todos os testes foram realizados em quadruplicata. Os recipientes testemunha foram preparados também em quadriplata contendo 0,3mL de Acetona, em volume final de 150mL L⁻¹. Todos os testes foram realizados em três repetições, por três dias consecutivos, sendo que cada bateria de testes foi realizada no mesmo dia para cada população do inseto.

Em cada um dos recipientes teste e testemunha, foram distribuídas 25 larvas do mosquito das diferentes procedências onde foi observada a porcentagem de mortalidade após período de contato de 24 horas. A porcentagem de mortalidade foi

calculada totalizando-se o número de larvas expostas e mortas por dose em cada teste realizado. Esta foi corrigida pela fórmula de Abbott, caso a mortalidade no controle fosse entre 05 e 20%.⁽⁷⁵⁾:

$$\frac{\% \text{ mortalidade (teste)} - \% \text{ mortalidade (controle)}}{100 - \% \text{ mortalidade (controle)}} \times 100$$

A partir dos dados de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* por dose, foram estimadas por análise de Probit as concentrações letais CL₅₀, CL₉₅, CL₉₉, e CL_{99,9}.

2.4. Avaliação do período residual

A partir da CL₉₉ foram realizados testes para verificação do período residual do óleo, utilizando-se três concentrações (CL₉₉, o dobro e o triplo), dois controles (ambos em quadriplicata) e três repetições, as quais foram expostas pelo período de uma semana, em laboratório, e posteriormente adicionadas 25 larvas de terceiro estágio em cada recipiente e observada a mortalidade após 24 horas.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

O primeiro camundongo swiss anestesiado permaneceu totalmente imóvel por duas horas, após o procedimento anestésico. Não houve qualquer indício de que o animal tenha passado por dor ou estresse.

Administrou-se a mesma quantidade de anestésico em outro animal e em cerca de cinco minutos o camundongo já se encontrava anestesiado. Este foi exposto às fêmeas de *Aedes aegypti*, para realizarem a hematofagia, sendo que o animal permaneceu imóvel por uma hora. Após este período, o camundongo foi retirado da gaiola e encaminhado ao Biotério da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. Cerca de três horas após a administração do anestésico, o animal voltou a apresentar movimentos. Estas informações foram apresentadas ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, que aprovou o procedimento adotado através do Processo nº5741/07 (anexo 1).

Os resultados da avaliação da ação do óleo essencial de *Tagetes minuta* L contra larvas em 3^o estágio de Rockefeller (EUA), Bauru (SP) e São José do Rio Preto (SP) são apresentados na Tabela 1. As Concentrações letais do óleo essencial de *Tagetes minuta* L para larvas de *Aedes aegypti* estão demonstrados na Tabela 2. Os testes para avaliação do período residual do óleo essencial de *Tagetes minuta* L realizados com o dobro e o triplo da CL₉₉ demonstraram mortalidade zero, após uma semana de contato, bem como em todos os controles.

Os resultados da avaliação da ação do óleo essencial de *T. minuta* L contra larvas em 3^o estágio de Rockefeller (EUA), Bauru (SP) e São José do Rio Preto (SP) estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 – Percentual médio de mortalidade e Desvio Padrão (DP) para diferentes concentrações do óleo essencial de *T. minuta* L e controle, contra 100 larvas (3º estágio) de *A. aegypti* procedentes de Rockefeller (EUA), Bauru (SP) e São José do Rio Preto (SP), após 24 horas de contato^a.

Produto	ml L⁻¹	Rockefeller	Bauru	S. J. Rio Preto
		% ± DP	% ± DP	% ± DP
<i>T. minuta</i>	0,200	11,0 ± 1,7	45,3 ± 25,5	32,6 ± 17,0
	0,225	27,0 ± 1,0	43,0 ± 25,2	57,3 ± 4,00
	0,250	39,3 ± 1,1	62,0 ± 26,0	67,0 ± 5,20
	0,275	85,3 ± 1,1	73,6 ± 5,7	69,0 ± 8,70
	0,300	99,0 ± 1,0	93,6 ± 1,5	93,0 ± 4,30
Acetona (controle)	0,300	0	0	0

^a Não houve necessidade de correção da mortalidade

As Concentrações Letais do óleo essencial de *T. minuta* L para larvas de *A. aegypti* estão apresentadas na Tabela 2, notando-se semelhanças dos valores obtidos para as três populações estudadas.

Tabela 2 – Concentrações letais e intervalos de confiança (95%), do óleo essencial de *T. minuta* L, contra 100 larvas (3º estágio) de *A. aegypti*, procedentes de Rockefeller (EUA), Bauru (SP) e São José do Rio Preto (SP), após 24 horas de contato.

Procedência das larvas	CL₅₀ ml L⁻¹	CL₉₅ ml L⁻¹	CL₉₉ ml L⁻¹	CL_{99,9} ml L⁻¹
Rockefeller	0,2400 (0,22-0,26)	0,2900 (0,27-0,36)	0,3200 (0,29-0,43)	0,3500 (0,34-0,38)
Bauru	0,2500 (0,23-0,26)	0,3200 (0,29-0,39)	0,3500 (0,32-0,47)	0,3900 (0,37-0,43)
São J. do Rio Preto	0,2100 (0,21-0,22)	0,3100 (0,3-0,33)	0,3600 (0,34-0,38)	0,4200 (0,39-0,46)

Os testes para avaliação do período residual do óleo essencial de *T. minuta* L realizado com o dobro e o triplo da CL₉₉ demonstraram mortalidade zero, após uma semana de contato, bem como em todos os controles.

4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

Durante a elaboração do projeto de pesquisa observou-se que não havia descrição de procedimento de alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* em camundongos, na bibliografia nacional, que tivessem sido aprovados por Comitês de Ética em Experimentação Animal, embora estes sejam exigidos para submissão de projetos. A aplicação de anestésicos em um camundongo Swiss Balb/C, com subsequente avaliação de sua situação, e a posterior oferta de outro camundongo anestesiado para alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* visou testar e normatizar procedimentos de utilização destes animais de laboratório, para que eles não sejam submetidos a situações de estresse e dor. O procedimento desenvolvido no presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, e está de acordo com as normas destes Comitês podendo ser adotado por outros pesquisadores que necessitem de alimentação dos insetos no laboratório.

Neste trabalho, a utilização de anestésicos em camundongos mostrou diminuir seu desconforto e ansiedade, na total impossibilidade dos animais em responderem a estímulos, pois a sensibilidade do animal é similar à humana no que se refere a dor, memória, angústia, instinto de sobrevivência. Desta maneira, foi garantida, aos animais utilizados no experimento, sedação, analgesia ou anestesia, não configurando a possível ocorrência de dor ou angústia em concordância com ensaios realizados por Lopes ⁽⁷⁶⁾ onde figuram os princípios éticos na experimentação animal.

O uso do larvicida temephos, um organofosforado, no Brasil teve início na década de 80 e atualmente há registro de desenvolvimento de resistência do

vetor *Aedes aegypti* a este produto em várias regiões do país. No Estado de São Paulo há diferentes perfis de susceptibilidade a este produto havendo populações deste culicídeo ainda sensíveis (Bauru) e outras já resistentes (São José do Rio Preto). Há, portanto, necessidade de manejo da resistência do *Aedes aegypti* a este larvicida. Além da recomendação de restrição do uso de produto químico, há necessidade de realizar o controle do inseto com um produto substituto, visando prevenir a ocorrência de resistência do vetor ao larvicida.⁽²⁹⁾

Embora haja no mercado disponibilidade de vários grupos de larvicidas, é importante buscar alternativas como o uso de produtos naturais para o controle do *Aedes aegypti*. Assim, estudos futuros devem ser desenvolvidos sobre outros produtos que possam atuar como forma alternativa no combate ao vetor.

Extratos de plantas têm sido avaliados como uma alternativa ao controle químico por apresentarem efeito larvicida e, tendo como vantagem não serem tóxicos ao ambiente e não se acumularem na cadeia alimentar, como o óleo essencial de *Tagetes minuta* L.

Maradufu *et al.*⁽⁵⁹⁾, utilizando concentração inferior do óleo essencial de *Tagetes minuta* L (10ppm) em 24 horas de contato, obtiveram menor mortalidade (69%±26) do que as obtidas neste trabalho em larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* provenientes de Rockfeller (EUA), Bauru (SP) e São José do Rio Preto (SP). Entretanto, quando o tempo de contato foi aumentado para 48 horas, Maradufu *et al.*⁽⁷²⁾ obtiveram mortalidade de larvas próximas a 100%.

Neste trabalho, as concentrações letais CL₅₀ e CL₉₀ para larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* provenientes de Rockfeller (EUA), Bauru (SP) e São José do Rio Preto (SP) foram inferiores aos valores obtidos por Furtado *et al.*⁽⁷⁷⁾ utilizando óleo

essencial de *Tagetes minuta* L contra as larvas de 3º estágio das regiões de Caucaia e Quixeramobim-CE, onde foram obtidas, respectivamente, CL₅₀ e CL₉₀ de 72,85 e 104,17mg/L. Os diferentes resultados do presente trabalho em relação aqueles obtidos por Maradufu *et al.*⁽⁷²⁾ e Furtado *et al.*⁽⁷⁷⁾, que utilizaram extrato da mesma espécie de planta, devem-se a diferenças na composição do extrato. Segundo Vitti *et al.*⁽⁷⁸⁾ e Tavares *et al.*⁽⁷⁹⁾, vários fatores atuam na composição química dos óleos essenciais por exercerem uma influência direta sobre as estruturas histológicas de estocagem do óleo na planta: a variabilidade genética; a idade das folhas; as condições ambientais; o tipo de manejo florestal; os processos de extração do óleo; o ambiente no qual o vegetal se desenvolve; a temperatura, a umidade relativa, a duração da exposição ao sol e a intensidade dos ventos.

A semelhança dos valores das concentrações letais para larvas Rockefeller, não resistentes ao temephos, quando comparados com os resultados das larvas de São José do Rio Preto e Bauru, sugere que a resistência ao temephos destas duas espécies não interfere na ação da *Tagetes minuta* L. e demonstra que este óleo pode ser um larvicida alternativo contra larvas de *Aedes aegypti* resistente aos temephos.

Os ensaios para obtenção do período residual do óleo essencial de *Tagetes minuta* L apresentaram porcentagem zero de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti*, após uma semana de contato com este óleo, no presente estudo. Porém Maradufu *et al.*⁽⁷²⁾ obtiveram estabilidade do óleo por um período de 72 horas. Green *et al.*⁽⁷¹⁾ demonstraram que a propriedade larvicida do óleo na concentração de 10ppm disperso em água persistiu no mínimo por 9 dias. Em todos os testes realizados, a avaliação da toxicidade do óleo essencial para larvas de *Aedes aegypti* foi por contato,

uma vez que o óleo é capaz de transpor estruturas da larva promovendo destruição total ou parcial de células com elevada vacuolização citoplasmática, aumento do espaço intercelular, levando à liberação de secreções celulares, alterações nos nervos periféricos, nas microvilosidades, no núcleo, nucléolo e no epitélio que sofre pavimentação e estratificação, desempenhando assim ação inseticida mesmo em pequenas concentrações.⁽⁷⁶⁾

Grainge & Ahmed⁽²¹⁾ determinaram a presença de tiofenos nas raízes da *Tagetes minuta* L. Okoth⁽⁷³⁾ estudou as propriedades inseticidas de folhas e flores da planta para exemplares adultos de *Aedes aegypti* e demonstrou que as flores desenvolveram maior atividade inseticida para esta espécie. Perich *et al.*⁽⁷⁴⁾ demonstraram a atividade biocida dos componentes de *Tagetes minuta* L. contra larvas e adultos de *Aedes aegypti*. Segundo Perich *et al.*⁽⁷⁴⁾, os tiofenos obtidos de extratos das flores, denominados de 5-(but-3-ene-1-inil)-2,2'-bitiofeno, 5-(but-3-ene-1-inil)-5'-metil-2,2'-bitiofeno, 2,2',5',2'-tertiofeno e 5-metil-2,2',5',2'-tertiofeno, isolados da fração hidrogenada, obtido extrato das flores, promoveram de 20 a 30 vezes mais toxicidade que outras partes do vegetal contra formas adultas de *Aedes aegypti*.

Porém, Maradufu *et al.*⁽⁷²⁾ avaliaram a ação de *Tagetes minuta* L sobre *Aedes aegypti* e determinaram que o componente 5-(E)-ocimenona era uns dos responsáveis pela atividade larvicida do vegetal. Green *et al.*⁽⁷¹⁾ demonstraram que, além da Ocimenona, outros componentes, não identificados quimicamente, eram os responsáveis pela toxicidade às larvas de *Aedes aegypti*.

Outros estudos deverão ser realizados, visando a ampliação do conhecimento sobre os componentes existentes na *Tagetes minuta* L., possibilitando o

isolamento dos componentes principais, visando maior estabilidade dos componentes e aumento do efeito residual do produto para larvas de *Aedes aegypti*.

Finalmente é importante salientar a busca por técnicas alternativas que venham a substituir a utilização de animais em experimentos científicos, tanto na busca de novos fármacos e vacinas como nos procedimentos de cura de doenças.

5-CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

- A sedação do camundongo swiss propiciou que este servisse como fonte alimentar para fêmeas de *Aedes aegypti* sem sofrer dor ou estresse.
- A utilização de camundongos swiss sedados como fonte alimentar para fêmeas de mosquitos é um procedimento aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal e pode ser utilizado por outros profissionais.
- As concentrações letais CL_{50} de *Tagetes minuta* L. foram iguais a 0,24; 0,25 e 0,21 $ml L^{-1}$, respectivamente, para larvas de *Aedes aegypti* das cepas Rockefeller, Bauru e São José do Rio Preto.
- As concentrações letais $CL_{99,9}$ de *Tagetes minuta* L. foram iguais a 0,35; 0,39 e 0,42 $ml L^{-1}$, respectivamente, para larvas de *Aedes aegypti* das cepas Rockefeller, Bauru e São José do Rio Preto.
- A resistência das larvas de *Aedes aegypti* ao temephos, não interferiu na ação letal exercida pelo óleo essencial de *Tagetes minuta* L.
- Os testes para avaliação do período residual do óleo essencial de *Tagetes minuta* L realizados apresentaram, após uma semana de contato, mortalidade zero.
- O óleo essencial de *Tagetes minuta* L pode ser utilizado como larvicida alternativo para *Aedes aegypti*, entretanto novos estudos devem ser desenvolvidos com o objetivo de isolar a fração larvicida do óleo e incorporar outros componentes visando aumentar sua estabilidade, de maneira que o produto tenha efeito residual.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Neves DP. Parasitologia Humana. 12^a ed., Livraria Atheneu; 2006.
- 2- Rees, A. *Tagetes*. IN: The Cyclopedia. London: Rees, 35(1): 57-61, 1817.
- 3- World Health Organization. [On line] disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/> [2008 novembro 18].
- 4- Rey L. Bases da Parasitologia Médica. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 2002.
- 5- Sargent SR. Inseticidas Naturais, bioinseticidas e feromônios: solução para a Dengue? Sociedade Brasileira de Parasitologia 2007; 57:61-8.
- 6- Mariconi FA. Inseticidas e seu emprego no combate às pragas. 6^a ed. Biblioteca Rural, Livraria Nobel. 1988.
- 7- Oga S. Fundamentos de Toxicologia. 2^a Ed. Atheneu. 2003.
- 8- Silva IG, Camargo AF, Silva HHG, Guimarães AL, Elias M, Oliveira AWS. Estudo da eficácia do Cythion no combate ao *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) e ao *Culex quinquefasciatus* (Wiedmann, 1828) (*Diptera, Culicidae*); Rev. Goiana med. 1994; 39:13-6.
- 9- Uribe IJ, Campos GG, Nelson M, Tinker ME, Moquillaza J. Aplicação aérea de Malation ULV contra *Aedes aegypti* em forma experimental, em uma cidade da Colômbia; Bol. Oficina Sanit. Panam. 1983; 94:546-59.
- 10- Campos J, Andrade CFS. Susceptibilidade larval de populações de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* a inseticidas químicos. Revista de Saúde Pública 2003; 37:523-27.
- 11- Larini, L. Toxicologia. 3^a ed. Manole Ltda; 1997.
- 12- Cartier JJ. Factors of host plant specificity and artificial diets. Bull. Entomol. Soc. Amer. 1968; 14:18-21.
- 13- Parodi LR. Enciclopédia Argentina de Agricultura y Jardineria. Editorial Acme S.A.C.I. Buenos Aires 1959; 1:845.
- 14- De Bach P. Biological control by natural enemies. New York, Cambridge University Press; 1974

- 15- Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: Surveillance, Resistance Monitoring, and Control Alternatives in Brazil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 2007; 16:295-2.
- 16- Amdur MO, Doull J, Klaassen AD. Ed. Casaret and doull's Toxicology. The basic science of poisons. 6^a ed. Pergamnon Press. 2001.
- 17- Lima EP, Oliveira Filho AMO, Oliveira Lima JW, Ramos Júnior ANR, Cavalcanti LPG, Pontes RJS. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em municípios do estado do Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2006; 39:259-63.
- 18- Lima JB, Pereira da Cunha M, Carneiro da Silva R, Galardo AKR, Soares SS, Braga IA, Ramos RP, Valle D. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2003; 68:329-33.
- 19- Fantinatti ECS, Duque JEL, Silva AM, Navarro-Silva M A. Abundância e Agregação de Ovos de *Aedes aegypti* L e *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) no Norte e Noroeste do Paraná. *Neotropical Entomology* 2007; 36:960-5.
- 20- Andrade CFS, Modolo M. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to Temophos and *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* in integrated control. *Revista de Saúde Pública* 1991; 25:184-7.
- 21- Grainge M, Ahmed S. Handbook of plants with pest-control properties. Wiley, New York. 1988.
- 22- Luna JD, Martins MF, Anjos AF, Kuwabara EF, Navarro SMA. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. *Revista de Saúde Pública* 2004; 38:842-3.
- 23- Dorta DM, Vasuki V, Rajavel A. Evaluation of organophosphorus and synthetic pyrethroid insecticides against six vector mosquitos' species. *Rev. Saúde Pública* 1993; 26:391-7.
- 24- Dethier V G. Chemical insect's attractants and repellents. Filadelfia, Blakiston; 1947.
- 25- Carvalho AFU, Melo VMM, Craveiro AA, Machado MIL, Bantim MB, Rabelo EF. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2003; 98:569-71.
- 26- Casida JE, Quistad GB. Pyrethrum flowers: Production, Chemistry, Toxicology, and Uses. Oxford University Press, New York; 1995.
- 27- Macoris MLG, Andrigheti MTM, Takaku I, Glasser CN, Garbeloto VC, Cirino VCD. Alteração de resposta de susceptibilidade a inseticidas organofosforados em municípios do estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública* 1999; 33:86-7.

- 28- Macoris MLG, Andrighetti MTM, Otrera VCG, Carvalho LR, Caldas-Júnior AL, Brogdon WG. Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2007; 102:895-900.
- 29- Macoris MLG, Andrighetti MTM, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Bracco JE. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil to organophosphates insecticides. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2003; 98:703-8.
- 30- Rodríguez MM, Bisset JA, Pérez O, Ramos F, Risco G E. Mode of inheritance of temephos (Abate) resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. Revista Cubana Medicina Tropical 2006; 58:32-6.
- 31- Schofielt C, Hemingway J, Balderrama G. Resistência al insecticida del *Aedes aegypti* en Bolivia. Revista Boliviana Científica- CENETROP 1994; 10:22-8.
- 32- Leung AY. Encyclopedia of common natural ingredients.1ª ed. New York: Wiley; 1980.
- 33- Reich C. Estudios criticos sobre la flora de Chile. Anales Univ. Chile 1903; 112:97-179.
- 34- Robbers RJ, Speedie M, Tyler VE. Farmacognosia e Farmacobiocologia. Ed. Premier; 1997.
- 35- Shaalan EAS, Canyon D, Younesc MWF, Wahab HA, Mansour AH. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. Environment Intenational 2005; 31:1149-66.
- 36- Héthelyi E, Tetenyi P, Dabi E, Danos B. The Role of Mass Spectrometry in Medicinal Plant Research. Research Institute for Medicinal Plants. Budakalasz, Hungary 1987; 14:627-32.
- 37- Jogar k, Kuusik A, Metspalu L, Hiiessar K, Luik A, Grishakova. Results of treatments with natural insecticidal substances on the development and physiological states of insects. Agronomy research; 2006. 203-10
- 38- Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JPC, Merntz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. Ed. UFSC. Santa Catarina-RS; 1999
- 39- Fox JL. Immunology complexity yielding to research. Chem. Eng. News 1980; 58:18-22.
- 40- Albuquerque M, Silveira ER, Uchoa DEA, Lemos TLG. Chemical Composition and Larvicidal Activity of the Essential Oils from *Eupatorium betonicaeforme* (D.C.) Baker (Asteraceae). Journal of Agricultural and Food Chemistry 2004; 52:6708-11.

- 41- Camm GFQ, Towers GHN, Mitchell JC. UV-mediated antibiotic activity of some Compositeae species. *Phytochemistry* 1975; 14:2007-11.
- 42- Grahan K, Graham A, Towers GHN. Cercaricidal activity of phenylheptatriyne and alpha-tertienyl, naturally occurring compounds in species of the Asteraceae. *Can.J.Zool.* 1980; 58:1955-58.
- 43- Gilman DA, Rall TW, Nies AS, Taylor RP. *The Pharmacological basis of therapeutics.* MacGraww-Hill, Rio de Janeiro, 2003.
- 44- Hoehne FC. *Plantas e Substâncias Vegetais Tóxicas e Medicinais.* Graphicars 1939; p.355.
- 45- Hudson JB. *Antiviral compounds from plants.* CRC Pres Inc., Vboca Raton. 1990; 5:28-31.
- 46- Grainge M, Ahmed S. *Handbook of plants with pest-control properties.* Wiley, New York. 1988
- 47- Lorenzi H. *Plantas Daninhas do Brasil (terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais).* 2^a Ed., Plantarun Ltda., Nova Odessa; 1991.
- 48- Kennedy JS. Physiological condition of the host-plant and susceptibility to aphid attack. *Entomol. Exp. Appl.* 1958; 1:50-65.
- 49- Beck SD. Resistance of plants to insects. *Ann. Rev. Entomol* 1965; 10:207-2.
- 50- Cavalcanti ESB, Morais SM, Lima MA, Santana EWP. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2004; 99:541-44.
- 51- Herrera FL. *Sinopsis de la flora del Cuzco.* Government of Peru, Lima. 1941.
- 52- Dethier V G. *Some general consideration of insects' responses to the chemicals in food.* Acad. Press. New York; 1970.
- 53- Dethier VG. Host plant perception in phytophagous insects. 9^o Int. Congr. Ent. *Trans.* 1953; 2:81-88.
- 54- Dabrowsky ZT, Rodrigues JG. Studies on resistance of strawberries to mites. Preference and nonpreference responses of *Tetranychus urticae* and *T. turkestanii* to essential oils of foliage. *J. Econ. Entomol.* 1971; 64:387-91.
- 55- HURST E. *The poison plants of new South Wales.* Sydney: N.S.W. poison plants. Comm. Univ. of Sydney 1942; 4:93-97.

- 56- Sukumar K, Perich MJ, Boobar LR. Botanical derivatives in mosquito control: a review. *Journal of the American Mosquito Control Association* 1991; 7:210-237.
- 57- Primavesi A. Manejo ecológico de pragas e doenças. Livraria Nobel S.A; 1987.
- 58- Zhu J, Zeng X, Yanma, Liu T, Qian K, Han Y, Xue S, Tucker B, Schultz G, Coats J, Rowley W, Zhang A. Adult repellency and larvicidal activity of five plant essential oils against mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association* 2006; 22:515-22.
- 59- MCVAUGH R. Botanical collections of the la plata expedition of 1853-1855. *Brittonia* 1943; 5:64-79.
- 60- Wandscheer CB, Duque JE, Silva MAN, Fukuyama Y, Wohlke J L, Adelman J, Fontana JD. Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. *Toxicon* 2004; 44:829-35.
- 61- Neher RT. The ethnobotany of *Tagetes*. *Econ. Bot.* 1968; 22:317-25.
- 62- Chan GFQ, Towers GHN, Mitchell JC. Ultraviolet-mediated antibiotic activity thiophene compounds of *Tagetes*. *Phytochemistry* 1975; 14:2226-2295.
- 63- Espinar LA. Las especies de *Tagetes* (Compositae) de la region central Argentina. *Kurtziana*. 1967; 4:51-71.
- 64- Pio Corrêa M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Imprensa Nacional; 2001.
- 65- Chandhoke N, Ghatak BJR. *In vivo* studies of the effects of *Tagetes* oil. *Indian. J. Med. Res.* 1969; 57:861-64.
- 66- Hethelyi E, Danos EB, Tetenyi P. GC-MS analysis of the essential oils of four *Tagetes* species and the anti-microviral activity of *Tagetes minuta*. *Flav.Fragr. J.* 1986; 1:169-73.
- 67- Garcia DA, Perillo MA, Zygadlo JA, Martijene ID. The essential Oil from *Tagetes minuta* L. Modulates the Binding of [3 H] Flunitrazepam to Crude Membranes from Chick Brain. *Lipids* 1995; 30:12.
- 68- Grover GS, RAO JT. *In vitro* antimicrobial studies of the essential oil of *Tagetes*. *Perfum.Flavor.* 1978; 3:25-28.
- 69- Ickes GR, Fong HHS, Chiff PL, Perdue RE, Farnsworth NR. Antitumor Activity and Preliminary Phytochemical Examination of *Tagetes minuta* (Compositae). *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1973; 62:6.

- 70- Winoto-Suatmadji R. Studies on the effect of *Tagetes* species on plant parasitic nematodes. H.W. Wageningen, Amsterdam; 1969.
- 71- Green MM, Singer JM, Sutherland DJ, Hibben CR. Larvicidal activity of *Tagetes minuta* (marigold) toward *Aedes aegypti*. Journal of American Mosquitoes Control Association 1991; 7:282-6.
- 72- Maradufu AR, Lubeya D, F. Isolation of (5E) Ocimenone, a mosquito larvicide from *Tagetes minuta*. Lloydia 1998; 41:181-3.
- 73- Okoth J. *Tagetes minuta* L, as a repellent and insecticide against adult mosquitoes. East African Medical Journal 1973; 50:317-22.
- 74- Perich JM, Wells C, Bertsch W, Tredway KE. Isolation of the Inseticidal Components of *Tagetes minuta* (Compositae) against Mosquito Larvae and Adults. Journal of the American Mosquito Control Association 1995; 11:307-10.
- 75- World Health Organization. 2004. Dengue bulletin: Situation Dengue/Dengue hemorrhagic fever in SEA countries.
- 76- Lopes HC. Efeito de um Complexo Homeopático no Desempenho e no Comportamento de Camundongos sob Estresse Agudo. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Programa de Mestrado em Ciência Animal. 2008.
- 77- Furtado RF, Lima MGA, Neto, MA, Bezerra JNS, Silva MG. Larvicidal activity of essential oils against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). Neotropical Entomology 2005; 34:843-847.
- 78- Vitti AMS, Brito JO. Óleo essencial de eucalipto. Piracicaba: SALQ: florestais nº 17; 2003.
- 79- Tavares ES, Julião LS, Lopes D, Bizzo HR, Lage CLS, Leitão SG. Analysis of the essential oil from leaves of three *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) chemotypes cultivated on the same conditions. Revista Brasileira de Farmacognosia 2005; 15:1-5.

7. APÊNDICE

Artigo encaminhado e aceito (Anexo 2) pela Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, com previsão de publicação no volume 42, fascículo 6 de 2009.

Estabelecimento de metodologia para alimentação de *Aedes aegypti* (Diptera-Culicidae) em camundongos swiss e avaliação da toxicidade e do efeito residual do óleo essencial de *Tagetes minuta* L (Asteraceae) em populações de *Aedes aegypti*

Establishment of feeding methodology of *Aedes aegypti* (Diptera-Culicidae) in swiss mice and evaluation of toxicity and residual effect of essential oil from *Tagetes minuta* L (Asteraceae) in populations of *Aedes aegypti*

Waldemir Pereira Lima¹, Francisco Chiaravalloti Neto^{1,2}, Maria de Lourdes da Graça Macoris³, Débora Aparecida Pires de Campos Zuccari¹, Margareth Regina Dibo^{1,2}

¹Curso de Ciências da Saúde – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

²Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN – Serviço Regional 08

³Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN – Serviço Regional 11

Endereço para correspondência: Dr^a. Margareth Regina Dibo

Laboratório de Vetores – FAMERP

Tel: 55 (17) 3201-5901; 3201-5900.

Av. Brigadeiro Faria Lima 5416, V. São Pedro, 15090-000, São José do Rio Preto (SP).

e-mail: medibo@famerp.br

RESUMO

Objetivou-se desenvolver um procedimento de alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* que não cause estresse em camundongo swiss e avaliar a toxicidade e o efeito residual do óleo essencial de *Tagetes minuta* L (Asteraceae) em populações de *Aedes aegypti*. Camundongos anestesiados: um observado tempo de sedação e outro colocado em gaiola para alimentação de fêmeas. Óleo essencial, diluído em acetona, foi utilizado em bioensaios para avaliação das concentrações letais em larvas de Bauru, SP e São José do Rio Preto, SP, respectivamente, sensíveis e resistentes ao temephos. Os dados obtidos foram comparados com a cepa Rockefeller-EUA. O procedimento com camundongos foi aprovado. Não houve diferença entre as populações quanto à susceptibilidade a *Tagetes minuta* e os ensaios demonstraram CL_{50} de 0,24, 0,25 e 0,21 mL L⁻¹ e $CL_{99,9}$ em 0,35, 0,39 e 0,42 mL L⁻¹, respectivamente, para Rockefeller, Bauru e São José do Rio Preto. Não foi observado efeito residual da solução.

Palavras-chaves: Metodologia em alimentação. *Aedes aegypti*. *Tagetes minuta*. Óleo essencial. Camundongos swiss.

ABSTRACT

Objectives: to develop a procedure for feeding *Aedes aegypti* females that does not cause stress in Swiss mice; and to evaluate the toxicity and residual effect of the essential oil from *Tagetes minuta* (Asteraceae) on *Aedes aegypti* populations. A total of two Swiss mice were anesthetized: one was used to observe sedation time; the other was placed in a cage to feed the female mosquitoes. Essential oil was dissolved in acetone and used in bioassays to assess the lethal concentrations in larvae from the cities of Bauru (SP) and São José do Rio Preto (SP) that were sensitive and resistant to

temephos, respectively. Data obtained were compared with the American Rockefeller strain. The procedure with mice was approved. There was no difference between the populations regarding susceptibility to *Tagetes minuta*, and assays showed LC₅₀ of 0.24, 0.25, and 0.21 mL L⁻¹ and LC_{99,9} of 0.35, 0.39, and 0.42 mL L⁻¹, for Rockefeller, Bauru, and São José do Rio Preto, respectively. The solution showed no residual effect.

Key-words: methodology in food, *Aedes aegypti*, *Tagetes minuta*, essential oil, Swiss mice.

A dengue, doença considerada problema de saúde pública nos países tropicais subdesenvolvidos e em desenvolvimento, ameaça milhares de pessoas principalmente no Brasil. O mosquito *Aedes aegypti* (Diptera-Culicidae), procedente da África, trazido para a América durante o processo de colonização é o vetor responsável pela transmissão do vírus da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, causador da doença^{5 18}.

Desde o século IX, várias substâncias foram utilizadas como inseticida na tentativa de se eliminar este vetor: arsênico, mercúrio, enxofre, organoclorados, organofosforados. O principal problema que estes agentes apresentam é a alta toxicidade e alguns deles se acumulam na cadeia alimentar⁷.

Os piretróides, substâncias extraídas de vegetais, os quais surgiram na década de 70, possuem baixa toxicidade a mamíferos, sendo o inseticida de escolha pelos órgãos de saúde pública para combate aos vetores de doenças. Porém com o uso indiscriminado destes agentes, muitos culicídeos passaram a desenvolver resistência frente a estes compostos, dentre eles o *Aedes aegypti*^{2 8 10}.

A imensa biodiversidade da flora brasileira e o potencial inseticida de diversas espécies ainda inexploradas surgem como uma fonte de novos agentes químicos para o controle de culicídeos, principalmente o *Aedes aegypti*^{4 5}.

Diversas plantas brasileiras têm sido avaliadas quanto à atividade larvicida contra o *Aedes aegypti*. Dentre elas destacam-se: *Cybistax antisiphilitica*, *Andiroba*, *Cynbopogon citratus*, *Lippia sidoides*, *Ocimum americanum*, *Ocimum gratissimum*, *Melia azedarach*, *Azadirachta indica*, *Eupatorium betonicaeforme*, *Tagetes minuta*, *Senecio brasiliensis*, *Tagetes patula*, *Tagetes erecta*, *Vernonia ammophila*^{4 15}.

Para a realização de testes com larvicidas utiliza-se um número elevado de exemplares (em torno de 800 por teste) os quais devem ter sido criados em condições semelhantes de nutrição e desenvolvimento fisiológico. Para tal padronização é necessária a criação desta espécie em laboratório. Geralmente os testes são realizados com a primeira geração obtida em laboratório (F1) por ser a mais próxima da população natural. Entretanto, não se encontram artigos científicos com procedimentos aprovados por Comitês de Ética em Experimentação Animal referentes à utilização de camundongos como fonte de repasto sanguíneo para fêmeas deste Culicídeo, o que é necessário para postura de ovos e criação em laboratório. Assim, o primeiro objetivo deste estudo é desenvolver um procedimento de alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* que não cause estresse ou sofrimento para o camundongo e que esteja em acordo com as normas estabelecidas pelos Comitês de Ética em Experimentação Animal. O segundo objetivo é avaliar a toxicidade e o efeito residual do óleo essencial de *Tagetes minuta* L (Asteraceae) em populações de *Aedes aegypti* com diferentes perfis

de susceptibilidade ao organofosforado temephos, larvicida intensamente utilizado no Programa de Controle de Dengue, desde a década de 80.

MATERIAL E MÉTODOS

O procedimento de contenção de camundongos por um período determinado para alimentação de mosquitos, anteriormente utilizado em insetários, provoca um efeito estressante no comportamento dos indivíduos, reduzindo sua movimentação (Lopes 2008). Como alternativa a este procedimento, buscou-se o desenvolvimento de metodologia de alimentação sangüínea das fêmeas de *Aedes aegypti* que não causasse estresse a camundongos swiss e que estivesse de acordo com os princípios éticos na experimentação animal. Para isso, dois experimentos foram realizados, sob supervisão de um dos autores que é Médico Veterinário (DAPCZ). Em ambos os experimentos foram administrados por via intramuscular, através de uma seringa hipodérmica 0,05 mL de Ketamina e 0,05 mL de Xilasina, respectivamente, em volume total de 0,1 mL de anestésicos em camundongo swiss. A utilização de anestésicos para diminuir o desconforto e a ansiedade na total impossibilidade dos animais em responder ao estímulo, tem apoio nos princípios éticos na experimentação animal, pois a sensibilidade do animal é similar à humana no que se refere a dor, memória, angústia, instinto de sobrevivência. Desta maneira, deve ser garantida, aos animais utilizados em experimentos, sedação, analgesia ou anestesia, quando se configurar a possível ocorrência de dor ou angústia, rejeitando, sob qualquer argumento ou justificativa, o uso de agentes químicos e/ou físicos paralisantes e não anestésicos.

No primeiro experimento, um animal foi deixado em repouso em recipiente próprio, forrado de serragem e observado o tempo de sedação. No segundo

procedimento, um animal sedado foi exposto a 40 fêmeas do mosquito *Aedes aegypti* em gaiola apropriada e observado. Uma vez estabelecidos os parâmetros de criação dos mosquitos, isto é, número de mosquitos fêmea por gaiola e duração e frequência de alimentação no camundongo, esta metodologia foi utilizada para obtenção de ovos de *Aedes aegypti* de São José do Rio Preto, a serem utilizados nos testes com *Tagetes minuta* L. Por este experimento, larvas de *Aedes aegypti* foram coletadas durante visitas às residências pelos agentes municipais do Programa de Controle da Dengue, em diferentes bairros de São José do Rio Preto, as quais foram encaminhadas ao laboratório e alimentadas com ração para peixe até atingir a fase adulta. Fêmeas e machos foram colocados em uma gaiola de criação de mosquitos. Para estes, foram oferecidas solução açucarada a 10% alternada com a exposição de camundongos swiss durante três dias da semana, visando a hematofagia pelas fêmeas e oviposição. Os ovos obtidos foram colocados para secar a temperatura ambiente, em seguida contados e armazenados. Os ovos de *Aedes aegypti* de Bauru e cepa Rockefeller (originária dos Estados Unidos e cedida pelo Centers of Disease Control de Porto Rico), também necessários para realização dos testes, foram fornecidos pelo Laboratório da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) de Marília.

Os ovos de cada população foram colocados em vasilhas contendo água e fermento e as larvas foram alimentadas com ração para peixe, até atingir o terceiro estágio de desenvolvimento. Para estabelecimento de curva de dose-resposta, foi utilizada metodologia da Organização Mundial da Saúde para bioensaios com larvas, isto é, ensaio com dose diagnóstica, que é a exposição de larvas ao dobro da CL 99 da cepa susceptível de referência e ensaio de estimativa de razão de resistência para ambos os ensaios e a cepa referência foi Rockefeller. O óleo essencial de *Tagetes minuta* L foi

adquirido junto à empresa SAT Group (Índia) que o extrai através da metodologia de arraste a vapor conforme descrito por Alencar et al¹, utilizando-se um aparelho de Clevenger; o hidrolato é recolhido e as fases aquosa e orgânica são separadas por centrifugação, em centrífuga de cruzeta horizontal a 965 g a 25°C por 5 minutos, sendo o material coletado após a floração. Este óleo foi diluído e testado nas concentrações de 0,2mL L⁻¹; 0,225mL L⁻¹; 0,25mL L⁻¹; 0,275mL L⁻¹ e 0,3mL L⁻¹ partindo-se de uma diluição inicial de 200mL L⁻¹ em Acetona.

A partir da solução inicial, foram preparadas para cada diluição, quatro recipientes com volume final de 150mL cada um, uma vez que todos os testes foram realizados em quadriplicata. Os recipientes testemunha foram preparados também em quadriplata contendo 0,3mL de Acetona, em volume final de 150mL L⁻¹. Todos os testes foram realizados em três repetições, por três dias consecutivos, sendo que cada bateria de testes foi realizada no mesmo dia para cada população do inseto.

Em cada um dos recipientes teste e testemunha, foram distribuídas 25 larvas do mosquito das diferentes procedências onde foi observada a porcentagem de mortalidade após período de contato de 24 horas. A porcentagem de mortalidade foi calculada totalizando-se o número de larvas expostas e mortas por dose em cada teste realizado. Esta foi corrigida pela fórmula de Abbott, caso a mortalidade no controle fosse entre 05 e 20%¹⁷:

$$\frac{\% \text{ mortalidade (teste)} - \% \text{ mortalidade (controle)}}{100 - \% \text{ mortalidade (controle)}} \times 100$$

A partir dos dados de mortalidade por dose foram estimadas, por análise de Probit, as CL₅₀, CL₉₅, CL₉₉, e CL_{99,9}. A partir da CL₉₉ foram realizados testes

para verificação do período residual do óleo, utilizando-se três concentrações (CL₉₉, o dobro e o triplo) , dois controles (ambos em quaduplicata) e três repetições, as quais foram expostas pelo período de uma semana, em laboratório, e posteriormente adicionadas as larvas de terceiro estágio em cada recipiente e observada a mortalidade após 24 horas.

RESULTADOS

No primeiro experimento, para avaliação do procedimento de alimentação das fêmeas de *Aedes aegypti*, o camundongo swiss permaneceu totalmente imóvel por uma hora e sedado por igual período, ou seja, duas horas após o procedimento anestésico, tempo suficiente para a alimentação dos mosquitos, que não ultrapassa uma hora. Não houve qualquer indício de que o animal passou por dor ou estresse.

No segundo experimento com camundongo, cerca de cinco minutos após a administração da mesma quantidade de anestésicos, o animal já se encontrava sedado e foi exposto às fêmeas de *Aedes aegypti*, para realizarem a hematofagia, sendo que o animal permaneceu imóvel por uma hora. Após este período, o camundongo foi retirado da gaiola e encaminhado ao Biotério da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. Cerca de três horas após a administração do anestésico, o animal passou a apresentar movimentos, quando o período de sedação do anestésico começou a cessar. Pode-se notar que o tempo de exposição foi suficiente para alimentação das fêmeas de *Aedes aegypti*, que não ultrapassa uma hora. Estas informações foram apresentadas ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, o qual aprovou o procedimento adotado através do Processo nº5741/07.

Os resultados da avaliação da ação do óleo essencial de *Tagetes minuta* L contra larvas em 3^o estágio de Rockefeller (EUA), Bauru (SP) e São José do Rio Preto (SP) são apresentados na Tabela 1. As Concentrações letais do óleo essencial de *Tagetes minuta* L para larvas de *Aedes aegypti* estão demonstrados na Tabela 2. Os testes para avaliação do período residual do óleo essencial de *Tagetes minuta* L realizados com o dobro e o triplo da CL₉₉ demonstraram mortalidade zero, após uma semana de contato, bem como em todos os controles.

DISCUSSÃO

Durante a elaboração do projeto de pesquisa observou-se que procedimentos com camundongos que sejam aprovados por Comitês de Ética em Experimentação Animal não são encontrados em bibliografia nacional, muito embora sejam exigidos para submissão de projetos. Estes procedimentos visam elaborar e normatizar protocolos de utilização destes animais de laboratório, para que eles não sejam submetidos a situações de estresse e dor. O procedimento desenvolvido no presente trabalho é um protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em experimentação Animal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, está de acordo com as normas destes Comitês e pode ser utilizado por outros pesquisadores que necessitem utilizar camundongos swiss.

O uso de temephos no Brasil teve início na década de 80 e atualmente há registro de desenvolvimento de resistência a este produto em várias regiões do país. No Estado de São Paulo há diferentes perfis de susceptibilidade a este produto havendo populações ainda sensíveis (Bauru) e outras já resistentes (São José do Rio Preto). Há, portanto, necessidade de manejo da resistência ao larvicida organofosforado. Além da

recomendação de restrição do uso de produto químico, há necessidade de manejo com substituição de produtos.

Embora haja no mercado disponibilidade de outros grupos de larvicidas, como os inibidores de crescimento, por exemplo, é importante buscar alternativas mais naturais para o controle. Assim, estudos futuros devem ser desenvolvidos sobre outros produtos que possam atuar como forma alternativa no combate ao vetor. Extratos de plantas têm sido avaliados como uma alternativa ao controle químico por apresentarem efeito larvicida tendo como vantagem não serem tóxicos ao ambiente, como o óleo essencial de *Tagetes minuta* L.

Maradufu et al ¹¹, utilizando concentração inferior do óleo essencial de *Tagetes minuta* L (10ppm) em 24 horas de contato, obtiveram menor mortalidade (69%±26) do que as obtidas neste trabalho em larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* provenientes de Rockfeller (EUA), Bauru (SP) e São José do Rio Preto (SP). Entretanto, quando o tempo de contato foi aumentado para 48 horas, Maradufu et al¹¹ obtiveram mortalidade de larvas próximas a 100%.

Neste trabalho, as CL₅₀ e CL₉₀ para larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* provenientes de Rockfeller (EUA), Bauru (SP) e São José do Rio Preto (SP) foram inferiores aos valores obtidos por Furtado et al⁵ utilizando óleo essencial de *Tagetes minuta* L contra as larvas de 3º estágio das regiões de Caucaia e Quixeramobim-CE, onde ocorreram respectivamente CL₅₀ e CL₉₀ de 72,85 e 104,17mg/L. A explicação das diferenças encontradas nos resultados obtidos no presente trabalho em relação aqueles obtidos por Maradufu et al¹¹ e Furtado et al⁵, que utilizaram extrato da mesma espécie de planta, podem ser observadas em trabalhos realizados por Vitti et al¹⁶ e Tavares et al¹⁵, pois segundo estes autores são vários os

fatores que exercerem influência na composição química dos óleos essenciais: a variabilidade genética, a idade das folhas, as condições ambientais, o tipo de manejo florestal, os processos de extração e de análise do óleo, assim como o ambiente no qual o vegetal se desenvolve. A temperatura, a umidade relativa, a duração da exposição ao sol e o regime de ventos exercem uma influência direta, sobretudo nas estruturas histológicas das espécies de estocagem de óleo na superfície da folha.

O encontro de mortalidade nula das larvas de *Aedes aegypti*, após uma semana de contato com o óleo essencial de *Tagetes minuta* L, não foi concordante com outros estudos. Green *et al*⁷ demonstraram que a propriedade larvicida do óleo na concentração de 10ppm disperso em água persistiu no mínimo por 9 dias; porém, Maradufu *et al*¹¹ obtiveram estabilidade do óleo por um período mais curto, ou seja, 72 horas.

Em todos os testes realizados, a avaliação da ação do óleo essencial foi por contato, podendo-se supor que o óleo é capaz de transpor estruturas da larva, desempenhando ação inseticida letal mesmo em pequenas concentrações, mecanismo sugerido por Perich *et al*¹² no qual os tiofenos denominados de 5-(but-3-ene-1-inil)-2,2'-bitiofeno, 5-(but-3-ene-1-inil)-5'-metil-2,2'-bitiofeno, 2,2',5',2'-tertiofeno e 5-metil-2,2',5',2'-tertiofeno, isolados da fração hidrogenada, obtido extrato das flores, promoveram de 20-30 vezes mais toxicidade que outras partes do vegetal contra formas adultas de *Aedes aegypti*, porém Maradufu *et al*¹¹ demonstraram que a ação larvicida ocorre por ação do componente 5-(E)-ocimenona.

Os resultados indicam que o óleo essencial de *Tagetes minuta* L é potencialmente útil no controle de *Aedes aegypti*. Os valores de concentrações letais das larvas Rockefeller comparado com as de campo são muito semelhantes, o que sugere

que a resistência ao temephos não interfere na ação da *Tagetes minuta* L e demonstra que o referido óleo pode ser um larvicida alternativo contra larvas resistentes ao temephos. Entretanto, outros estudos devem ser realizados na tentativa de isolar a fração larvicida do óleo para incorporar componentes visando manter maior estabilidade, aumentando assim o efeito residual do produto.

AGRADECIMENTOS

Para Aline M.S. Pagliotto, Beatriz A.C. Belini, Daniela R. Benetti, Nathália Zini, Neuza F.A. Santana e Perpétua M.M. Sereno.

REFERÊNCIAS

1. Alencar JW, Craveiro AA, Matos FJA. Kovats indices as a presentation routine in mass espectro searches of volatities. *Journal of Nature Proceduce*. 47:890-892,1984.
2. Beserra EB, Ferdandes CRM, Queiroga MFC, Castro FPJ. Resistance of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) populations to organophosphates temephos in the Paraíba State, Brazil. *Neotropical Entomology* 36:303-307, 2007.
3. Cavalcanti ESB, Morais SM, Lima MA, Santana EWP. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99:541-544, 2004.
4. Fantinatti ECS, Duque JEL, Silva AM, Navarro-Silva MA. Abundância e Agregação de Ovos de *Aedes aegypti* L e *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) no Norte e Noroeste do Paraná. *Neotropical Entomology* 36:960-965, 2007.

5. Furtado RF, Lima MGA, Neto MA, Bezerra JNS, Silva MG. Larvicidal activity of essential oils against *Aedes aegypti* L (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology* 34:843-847, 2005.
6. Gilman DA, Rall TW, Nies, AS, Taylor, RP. *The Pharmacological basis of therapeutics*. Editora MacGraww-Hill, Rio de Janeiro, 2003.
7. Green MM, Singer JM, Sutherland DJ, Hibben CR. Larvicidal activity of *Tagetes minuta* (marigold) toward *Aedes aegypti*. *Journal of American Mosquitoes Control Association*. 7:282-286, 1991.
8. Lima EP, Oliveira Filho AMO, Oliveira Lima JW, Ramos Júnior ANR, Cavalcanti LPG, Pontes RJS. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em municípios do estado do Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39:259-263, 2006.
9. Lopes HC. Efeito de um Complexo Homeopático no Desempenho e no Comportamento de Camundongos sob Estresse Agudo. 2008. 48 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campo Grande. 2008.
10. Macoris MLG, Andrighetti MTM, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Bracco JE. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil to organophosphates insecticides. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98:703-708, 2003.
11. Maradufu AR, Lubeya DF. Isolation of (5E) Ocimenone, a mosquito larvicide from *Tagetes minuta*. *Lloydia* 41:181-183, 1998.

12. Perich MJ, Wells C, Bersch W, Tredway KE. Isolation of the insecticidal components of *Tagetes minuta* (Compositae) against mosquito larvae and adults. *Journal of the American Mosquito Control Association* 11:307-310, 1995.
13. Sargent SR. Inseticidas Naturais, bioinseticidas e feromônios: solução para a Dengue? *Sociedade Brasileira de Parasitologia* 57:61-68, 2007.
14. Shaalan EAS, Canyon D, Younesc MWF, Wahab HA, Mansour AH. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. *Environment Intenational* 31:1149-1166, 2005.
15. Tavares ES, Julião LS, Lopes D, Bizzo HR, Lage CLS, Leitão SG. Analysis of the essential oil from leaves of three *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) chemotypes cultivated on the same conditions. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 15:1-5, 2005.
16. Vitti AMS, Brito JO. Óleo essencial de eucalipto. (documentos florestais nº 17). ESALQ Piracicaba: 2003.
17. World Health Organization. [on line] disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/> [2008 novembro 18].2008.
18. World Health Organization. Dengue bulletin: Situation Dengue/Dengue hemorrhagic fever in SEA countries. 2004.

Tabela 1 – Percentual médio de mortalidade e Desvio Padrão (DP) para diferentes concentrações do óleo essencial de *T. minuta* L e controle, contra 100 larvas (3º estágio) de *A. aegypti* procedentes de Rockefeller (EUA), Bauru (SP) e São José do Rio Preto (SP), após 24 horas de contato^a.

Produto	mL L ⁻¹	Rockefeller	Bauru	S. J. Rio Preto
		% ± DP	% ± DP	% ± DP
<i>T. minuta</i>	0,200	11,0 ± 1,7	45,3 ± 25,5	32,6 ± 17,0
	0,225	27,0 ± 1,0	43,0 ± 25,2	57,3 ± 4,00
	0,250	39,3 ± 1,1	62,0 ± 26,0	67,0 ± 5,20
	0,275	85,3 ± 1,1	73,6 ± 5,7	69,0 ± 8,70
	0,300	99,0 ± 1,0	93,6 ± 1,5	93,0 ± 4,30
Acetona (controle)	0,300	0	0	0

^a Não houve necessidade de correção da mortalidade

Tabela 2 – Concentrações letais do óleo essencial de *T. minuta* L, contra 100 larvas (3º estágio) de *A. aegypti*, procedentes de Rockefeller (EUA), Bauru (SP) e São José do Rio Preto (SP), após 24 horas de contato.

Procedência das larvas	CL₅₀ mL L⁻¹	CL₉₅ mL L⁻¹	CL₉₉ mL L⁻¹	CL_{99,9} mL L⁻¹
Rockefeller	0,2400(0,2 2-0,26)	0,2900 (0,27-0,36)	0,3200 (0,29-0,43)	0,3500 (0,34-0,38)
Bauru	0,2500 (0,23-0,26)	0,3200 (0,29-0,39)	0,3500 (0,32-0,47)	0,3900 (0,37-0,43)
São J. do Rio Preto	0,2100 (0,21-0,22)	0,3100 (0,3-0,33)	0,3600 (0,34-0,38)	0,4200 (0,39-0,46)

8. ANEXOS

8.1. ANEXO 1

Comissão de Ética em Experimentação Animal. Protocolo FAMERP nº 574107.

8.2. ANEXO 2

Carta de Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical informando a aceitação do artigo apresentado no Apêndice para publicação.