

**DANIELA BARBOSA REIS NOGUEIRA**

**LARVICIDA DE PITANGA PRETA NO CONTROLE  
DO *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**

Trabalho Final do Mestrado Profissional,  
apresentado à Universidade do Vale do Sapucaí,  
para obtenção do título de Mestre em Ciências  
Aplicadas à Saúde.

**POUSO ALEGRE - MG**

**2018**

**DANIELA BARBOSA REIS NOGUEIRA**

**LARVICIDA DE PITANGA PRETA NO CONTROLE  
DO *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**

Trabalho Final do Mestrado Profissional,  
apresentado à Universidade do Vale do Sapucaí,  
para obtenção do título de Mestre em Ciências  
Aplicadas à Saúde.

Orientador: Prof. Dra. Adriana Rodrigues dos Anjos Mendonça

Coorientador: Prof. Dr. Valter Henrique Marinho dos Santos

**POUSO ALEGRE - MG**

**2018**

Nogueira, Daniela Barbosa Reis.

Larvicida de Pitanga Preta para o controle do *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) / Daniela Barbosa Reis Nogueira. – 2018.  
29f.

Trabalho Final do Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas à Saúde, Universidade do Vale do Sapucaí 2018.

Título em inglês: Larvicide of “Pitanga Preta” for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Orientador: Prof. Dra. Adriana Rodrigues dos Anjos Mendonça  
Coorientador: Prof. Dr. Valter Henrique Marinho dos Santos

1. Atividade larvicida 2. *Eugenia* 3. Larvas. 4. Lesões. 5. Mosquito.

**UNIVERSIDADE DO VALE DO SAPUCAÍ**

**MESTRADO PROFISSIONAL EM CIÊNCIAS APLICADAS  
À SAÚDE**

**COORDENADOR: Prof. Dr. José Dias da Silva Neto**

Linha de Atuação Científico / Tecnológica: Fitoterapia e Plantas Medicinais em  
Lesões Teciduais

## DEDICATÓRIA

*Não creio que seja necessário saber exatamente quem sou. O principal na vida e no trabalho consiste em chegar a ser alguém diferente do inicial. Se, ao começar um livro, você souber o que vai dizer no final, acredita que teria valor escrevê-lo?*

Foucault (1990)

Dedico este trabalho a minha família.

Aos meus pais, **CARLOS GABRIEL DOS REIS** e **HELENA MARIA BARBOSA REIS**, minhas bases, por tanto amor, por tudo o que sou, por cada oração, por terem me proporcionado educação, e apesar das minhas inúmeras dificuldades, por sempre me estimularem a continuar. Eles que não tiveram a oportunidade de realizar uma faculdade, mas são os meus verdadeiros “Mestres do saber”. Ficam aqui minha imensa gratidão e amor por vocês.

Ao meu amado esposo, **RODOLFO HENRIQUE DOS SANTOS NOGUEIRA**, pela sua força, por sua dedicação, pela espera paciente nos momentos de ausência, por toda a sua capacidade de compreensão, por sua confiança em mim, enfim, pela sua presença em minha vida.

A minha irmã **GABRIELA BARBOSA REIS**, minha inspiração e minha luz, mora tão longe mais fica tão perto de mim, me proporcionou o amor pelos estudos e me incentivou em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS e a NOSSA SENHORA APARECIDA, por terem me dado o privilégio de chegar até aqui, por toda a força concedida na concretização desse sonho. Além disso, agradeço a Eles por todas as pessoas que cruzaram meu caminho ao longo dessa trajetória.

A minha querida orientadora, **PROFESSORA DOUTORA ADRIANA RODRIGUES DOS ANJOS MENDONÇA**, PROFESSORA DOCENTE DO MESTRADO PROFISSIONAL EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DA UNIVERSIDADE DO VALE DO SAPUCAÍ, só tenho a agradecer aos seus ensinamentos, orientações, palavras de incentivo, paciência e dedicação. Você é uma pessoa ímpar, onde busco inspirações para me tornar melhor em tudo faço e irei fazer daqui para frente. Tenho orgulho em dizer que um dia fui sua orientada.

Ao meu coorientador, **DOUTOR VALTER HENRIQUE MARINHO DOS SANTOS**, mestre e doutor em Botânica, que direta e indiretamente contribuiu para enriquecer este trabalho, que abriu meus olhos e transformou minha maneira de ver a pesquisa, à você o meu reconhecimento e gratidão.

Ao entomologista da Secretaria Estadual de Saúde de Pouso Alegre, **GIOVANI ADILSON GRANDE**, referência técnica em saúde ambiental, agradeço muito pela disponibilidade e parceria a este trabalho.

Aos colaboradores do Laboratório de Fitoterapia e Laboratório de Botânica da Universidade Vale do Sapucaí, **DONIZETE, HELLEN e RENAN**, que contribuíram para realização dessa pesquisa.

A minha prima, **PROFESSORA DOUTORA CYNTHIA DE OLIVEIRA**, PROFESSORA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, obrigada pela presteza e cumplicidade.

**ÀOS COORDENADORES DO MESTRADO PROFISSIONAL EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE, PROFESSOR DOUTOR JOSÉ DIAS DA SILVA NETO e PROFESSORA DOUTORA DANIELA FRANCESCATO VEIGA e DEMAIS PROFESSORES**, obrigada por todos os ensinamentos e agradável convivência.

Aos meus **AMIGOS DISCENTES DO MESTRADO**, em especial, a **FERNANDA MARQUES, FERNANDA VALADÃO, FRANCISCO, TARISE, MAÍSA, DANIELLE, BRUNO, KASSANDRA e VIVIANE** pelos momentos compartilhados, amizades construídas, conhecimentos compartilhados e os “happy-hours”. Sentirei muitas saudades.

As companheiras de estrada que aos poucos se tornaram mais que companheiras, se tornaram amigas, levarei para sempre em meu coração **FERNANDA MARQUES, TARISE e IAURA**, obrigada por tantos diálogos ao longo das viagens, obrigada por dividir os finais de semana comigo. Foi muito bom poder contar com vocês.

Com vocês, queridos, divido a alegria desta experiência. O meu muito obrigada.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.*

*(Charles Chaplin)*

*“Tenho em mim todos os sonhos do mundo”.*

*(Fernando Pessoa)*



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
°C	Grau Celsius
CG-MS	Cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas
CL50	Concentração Letal Média
<i>et al.</i>	e outros
GDWQ	Guias para avaliação da água potável
°GL	Grau Gay Lussac
g	Gramas(s)
IPCS	Programa Internacional de Segurança Química
log	Logaritmo
mg/ L	Miligrama por Litro
mg/ mL	Miligrama por mililitro
mm	Milimetro
ml	Mililitro
OMS	Organização Mundial de Saúde
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
UFPA	Universidade Federal de Lavras
UNIVÁS	Universidade do Vale do Sapucaí
USP	Universidade de São Paulo
WHO	World Health Organization
WHOPES	Pesticide Evaluation Schemme
$\mu\text{g mL}^{-1}$	Microgramas por mililitro
$\mu\text{L}$	Microlitro
%	Por cento
<	Menor

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Extração etanólica utilizando-se “Soxhlet” .....	11
Figura 2 – Extração glicólica no evaporador rotatório .....	12
Figura 3 – Larvas de <i>Aedes aegypti</i> em 3º estágio de desenvolvimento.....	13
Figura 4 – Experimento do teste de toxicidade em triplicata.....	14
Figura 5 - Taxa de mortalidade (%) das larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> expostas por 24 horas a seis log doses diferentes do extrato glicólico da <i>Eugenia sulcata</i> .....	17
Figura 6 - Estimativa da CL50 do extrato glicólico da <i>Eugenia sulcata</i> pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada. A CL50 é o ponto de intersecção das duas curvas.....	18
Figura 7 – Larvicida biológico de <i>Eugenia sulcata</i> frente ao <i>Aedes aegypti</i> .....	20

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Mortalidade das larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> após 24 horas de exposição em várias concentrações do extrato glicólico da <i>Eugenia sulcata</i> .....	17
<b>Tabela 2</b> - Constituintes do extrato etanólico da <i>Eugenia sulcata</i> .....	19

## SUMÁRIO

1 CONTEXTO .....	01
2 OBJETIVO .....	10
3 MÉTODOS .....	11
3.1 Coleta do material vegetal .....	11
3.2 Preparação do extrato etanólico .....	11
3.3 Desenvolvimento do produto .....	12
3.4 Delineamento do estudo .....	12
3.5 Teste de toxicidade .....	12
3.5 Análises Químicas.....	14
3.6 Análise estatística .....	14
4 RESULTADOS/PRODUTO .....	16
4.1 Teor e rendimento do extrato .....	16
4.2 Avaliação do teste de toxicidade .....	16
4.3 Avaliação das características químicas do extrato obtidas por Cromatografia Gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-MS).....	18
4.4 Produto .....	19
4.4.1 Pedido de patente.....	20
5 DISCUSSÃO .....	21
5.1 Aplicabilidade.....	22
5.2 Impacto para a sociedade.....	23
6 CONCLUSÃO .....	25
7 REFERÊNCIAS .....	26

## RESUMO

**Contexto:** Um dos vetores mais conhecidos na atualidade é o *Aedes aegypti*, responsável por doenças como a Dengue, a Chikungunya e a Zika. **Objetivo:** Desenvolver um produto com ação larvicida extraído da *Eugenia sulcata*, conhecida popularmente como Pitanga Preta, com o propósito de controlar as larvas do mosquito *Aedes aegypti*. **Métodos:** Foi realizada uma extração glicólica da *Eugenia sulcata*. O estudo foi experimental, analítico e transversal. Para a realização do teste de toxicidade, foram utilizadas larvas de *Aedes aegypti* no terceiro estágio em desenvolvimento, as quais foram subdivididas em nove grupos. Seis deles foram grupos experimentais em que a avaliação da atividade larvicida foi aplicada nas doses de 25, 100, 150, 200, 350 e 500  $\mu\text{L}$  do produto desenvolvido. Os outros três grupos foram controles. Todo o experimento foi realizado em triplicata para cada um dos grupos, contendo 10 larvas de *Aedes aegypti*. As larvas foram monitoradas durante 24 horas. A cada hora foi realizada uma contagem do número de larvas vivas e larvas mortas. A concentração letal 50% (CL50) para o extrato foi calculada através da intersecção das curvas de larvas acumuladas mortas e larvas acumuladas vivas. **Resultados:** Houve 100% de mortalidade das larvas a Log dose 2,7000 (dose 500  $\mu\text{L}$ ). A CL50 foi obtida com a concentração aproximada 0,68  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . **Conclusão:** O produto larvicida biológico desenvolvido demonstrou-se potencialmente promissor ao controle de larvas de *Aedes aegypti*.

**Palavras-chave:** *Aedes aegypti*; *Eugenia*; Larva; Controle de Mosquitos; Arboviroses.

## ABSTRACT

**Context:** Nowadays, one of the most well-known vectors is *Aedes aegypti* that is responsible for diseases such as Dengue, Chikungunya and Zika. **Objective:** Development of a product with larvicidal action extracted from *Eugenia sulcata*, commonly known as “Pitanga Preta”, purposing the control of the mosquito *Aedes aegypti*. **Methods:** A glycolic extraction of *Eugenia sulcata* was accomplished. The study was experimental, analytical and cross-sectional. To perform the toxicity test was used *Aedes aegypti* larvae in the third stage in development, which were subdivided into nine groups. Six of them were experimental groups that larvicidal activity evaluation was applied in concentrations of 25, 100, 150, 200, 350 and 500  $\mu\text{L}$  of product developed. The other three groups were controls. The whole experiment was performed in triplicate for each of the groups, containing 10 *Aedes aegypti* larvae. The larvae were monitored during 24 hours. An hourly count of live larvae and dead larvae was performed. The 50% lethal concentration (LC50) for the extract was calculated through the curves intersection of dead accumulated individuals and living accumulated individuals. **Results:** There was 100% mortality of larvae at Log dose 2,7000 (dose 500  $\mu\text{L}$ ). The LC50 was obtained through the approximated concentration of 0.68  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . **Conclusion:** The biological larvicidal product developed demonstrated to be potentially promising to reduce *Aedes aegypti* larvae.

**Keywords:** *Aedes aegypti*; *Eugenia*; Larva; Mosquito Control; Arbovirus infections

## 1 CONTEXTO

As arboviroses são apontadas como um grupo de doenças virais, que podem ser transmitidas por vetores, denominadas também de *Arthropod-borne* vírus. São reconhecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um problema global e um assunto de saúde pública, considerando sua crescente dispersão territorial e necessidade de ações de prevenção e controle cada vez mais difíceis (WHO, 2009).

As veiculações dos arbovírus não estão somente ligadas aos artrópodes, mas principalmente pelo fato de seu ciclo replicativo ocorrer em insetos, ou seja, ao classificar um artrópode como veiculador de um arbovírus é preciso que o mesmo tenha a capacidade de infectar vertebrados e invertebrados, além de iniciar uma viremia em um hospedeiro vertebrado por tempo suficiente permitindo a infecção do vetor invertebrado. A partir daí ocorre ainda uma infecção produtiva, presente na glândula salivar do invertebrado, fornecendo vírus para infecção de outros hospedeiros vertebrados (CASSEB *et al.*, 2013).

Um dos vetores mais conhecidos na atualidade é o *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), responsável por doenças como a Dengue, a Chikungunya e a Zika. Consideradas doenças de grande relevância para a medicina, tornou-se imprescindível o controle da densidade populacional desse mosquito, evitando proporções de uma epidemia. Vale pontuar ainda que existe uma vacina contra o vírus da Dengue, mas a principal forma de combatê-las ainda é atacando o vetor, eliminando de forma drástica os locais onde ocorre a oviposição e o desenvolvimento das larvas do mosquito (BRASIL, 2015b).

A primeira vacina contra dengue no Brasil é denominada Dengvaxia®, produzida pelo laboratório Sanofi Pasteur. No entanto, a vacina foi aprovada apenas no México, Costa Rica, El Salvador (onde começou a ser oferecida no sistema privado) e nas Filipinas, onde já está disponível no sistema público e privado. No Brasil, passou a ser oferecida apenas pela rede privada (TABAKMAN, 2016).

A vacina contra a dengue já possui registro concedido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A Dengvaxia® foi registrada como produto biológico novo, de acordo com a Resolução - RDC nº 55, de 16 de dezembro de 2010. O presente registro permite que a vacina seja utilizada no combate à dengue, no entanto, é preciso destacar que a vacina não protege contra os vírus Chikungunya e Zika (BRASIL, 2016).

A dengue é uma das primeiras doenças descobertas e transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti*, sendo infecciosa e de natureza viral, além de ser considerada uma doença reemergente. Ocorreu primeiramente na África, onde o mosquito se mostrou dotado de grande capacidade de adaptação, dispersando-se para outros locais à partir do século XVII, quando vários casos foram documentados em todos os continentes, com exceção da Antártida, chegando a ocorrer vários episódios epidêmicos (GARCEZ *et al.*, 2013).

No Brasil existem relatos de surtos de dengue desde meados do século XIX, porém, a primeira epidemia registrada ocorreu na década de 1980, na cidade de Boa Vista, em Roraima, avançando ainda para as Américas. Na região sudeste, a doença ocorreu de maneira significativa no Estado do Rio de Janeiro, em 1986, e à partir daí, começou a se disseminar de forma descontrolada para o resto do país (GARCEZ *et al.*, 2013).

A dengue é na atualidade a doença viral mais importante transmitida por artrópodes em seres humanos, sendo uma doença que se manifesta de diversas formas, o que pode variar de uma síndrome viral não-diferenciada até febre hemorrágica e choque grave. Pode ser considerada uma enfermidade autolimitada, não específica, apresentando como principais sintomas: febre, cefaleia, mialgia. Em suas formas mais graves, pode apresentar febre hemorrágica e síndrome do choque, podendo levar a um comprometimento multissistêmico e ao óbito. Por isso, é preciso buscar um diagnóstico precoce e um acompanhamento contínuo do agravamento, para um acompanhamento da resposta ao tratamento, que podem se diferenciar em cada caso específico (SINGHI *et al.*, 2007).

A Dengue é transmitida pela picada do mosquito *Aedes aegypti* contaminado; ocorre através da fêmea do mosquito por sugar o sangue de um indivíduo contaminado com o vírus da dengue. Depois de um período de oito a dez dias de incubação, o mosquito contaminado transmite a infecção através da picada e injetando saliva contaminada na ferida de outra pessoa. A fêmea infectada do mosquito é capaz de transmitir o vírus da dengue verticalmente à geração seguinte, o que se mostra um fato importante para a conservação do vírus (SINGHI *et al.*, 2007).

A picada do *Aedes aegypti* pode provocar erupções cutâneas, podendo ocorrer em cerca de 50 a 80% dos pacientes com dengue clássica, frequência essa que pode variar de acordo com o sorotipo do vírus e do surto (LUPI *et al.*, 2007).

É necessário um exame físico cuidadoso onde se detecta lesões cutâneas que podem ser evanescentes e de difícil localização em pacientes com alto fototipo de pele. Podem ocorrer através de eritema ou erupção eritematosa mosqueada, mais comum em face, pescoço



e tórax que podem ser observados logo antes ou coincidente com o início da febre. Logo após um ou dois dias o eritema pode desaparecer ou mesclar-se à erupção maculopapulosa que se desenvolve em algum momento do segundo ao sexto dia da doença, sendo que, o início da erupção maculopapulosa aparece no tronco, podendo espalhar-se para as extremidades ou para a face (LUPI *et al.*, 2007).

Segundo Castro *et al.*, 2016 é preciso destacar que o *Aedes aegypti* pode ainda transmitir outras doenças, como a Chikungunya, que trata-se de uma doença febril aguda associada a dor intensa e frequente poliartralgia debilitante. O Chikungunya é um alfavírus que pertence à família *Togaviridae*, transmitido por meio da picada da fêmea infectada do mosquito *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Sabe-se que o vírus da Chikungunya é capaz de acometer células endoteliais humanas, fibroblastos, dendritos, macrófagos e células B, assim como células musculares, apresentando diferentes apresentações clínicas.

Os mesmos autores citam ainda que os principais sinais e sintomas clínicos são muito parecidos com os da dengue, como a febre de início agudo, dores articulares e musculares, cefaleia, náusea, fadiga e exantema. A principal manifestação clínica que a difere da Dengue são as fortes dores nas articulações. Após a fase inicial, a doença pode evoluir em duas etapas subsequentes: fase subaguda e crônica. Embora a Chikungunya não seja uma doença de alta letalidade, pode apresentar uma elevada taxa de morbidade associada à artralgia persistente, tendo como consequência a redução da produtividade e da qualidade de vida (CASTRO *et al.*, 2016)

Outra doença importante na atualidade e causada pela picada do *Aedes aegypti* é a Zika, causada pelo vírus de mesmo nome. O Zika vírus é um arbovírus emergente, constituído de fita simples de RNA, que compartilha a mesma família (*Flaviviridae*) e gênero (*Flavivirus*) da Dengue, sendo de grande relevância em saúde pública no país. Os sintomas da doença causada pelo Zika vírus aparecem entre três e doze dias após a picada do *Aedes aegypti* infectado, correspondendo ao seu período de incubação. São em geral sintomas leves, que duram de dois e sete dias, sendo que, cerca de 80% das pessoas podem não apresentar sintomas (BRASIL, 2015a).

O Zika ainda é uma doença pouco descrita na literatura, sendo que, sua caracterização clínica e história natural fundamentam-se em um número limitado de relatos de casos e investigações de surto. Estima-se que somente 18% das infecções humanas resultam em manifestações clínicas, sendo, portanto, mais frequente a infecção assintomática. O vírus Zika pode causar febre aguda, autolimitada, que, em sua maioria, não se associa a complicações

graves, sem registro de mortes, resultando em uma baixa taxa de hospitalização (BRASIL, 2014a).

Em relação aos principais sintomas, o vírus Zika pode causar febre baixa, exantema maculopapular, artralgia, mialgia, cefaleia, hiperemia conjuntival e, menos frequentemente, edema, odinofagia, tosse seca e alterações gastrointestinais, principalmente vômitos. Em geral, o desaparecimento dos sintomas pode ocorrer entre três e sete dias após seu início. No entanto, em alguns pacientes a artralgia pode persistir por cerca de um mês (BRASIL, 2015b).

Uma das principais complicações do Zika vírus é a Síndrome de Guillain-Barré, que se trata de uma reação a agentes infecciosos, como vírus e bactérias, e tem como sintoma a fraqueza muscular e a paralisia dos músculos. Os sintomas começam pelas pernas, podendo, em seguida, irradiar para o tronco, braços e face. Além disso, a síndrome pode apresentar diferentes graus de agressividade, provocando leve fraqueza muscular em alguns pacientes ou casos de paralisia total dos quatro membros. O principal risco provocado por esta síndrome é quando ocorre o acometimento dos músculos respiratórios, resultando na dificuldade para respirar, o que pode levar à morte, caso não sejam adotadas as medidas de suporte respiratório (VIANA, 2016).

A microcefalia também pode ser considerada uma possível complicação causada pelo Zika vírus, e trata-se de uma malformação congênita, onde o cérebro não se desenvolve de maneira adequada. Neste caso específico, os bebês nascem com perímetro cefálico menor que o normal, ou seja, igual ou inferior a 32 cm. É um tipo de malformação congênita que pode ser resultado de uma série de fatores de diferentes origens, como substâncias químicas e agentes biológicos (infecciosos), como bactérias, vírus e radiação. Alguns casos relatados até o momento, apontam que as gestantes cujos bebês desenvolveram a microcefalia tiveram sintomas do vírus Zika no primeiro trimestre da gravidez. Vale pontuar, que o cuidado para não entrar em contato com o mosquito *Aedes aegypti* é para todo o período da gestação. Assim como todas as possíveis consequências do vírus Zika, a ocorrência da Guillain-Barré e Microcefalia relacionada ao Zika vírus continua sendo investigada (VIANA, 2016).

Existe uma incidência significativa das arboviroses, o que é cada vez maior em todo território brasileiro, onde os dados epidemiológicos apontam casos graves e, o número de óbitos têm sido alarmantes. Existem ainda as associações do Zika com a síndrome de Guillain-Barré e, ainda, com a transmissão vertical, o que pode resultar em casos de microcefalia, que apontou dados alarmantes nos últimos anos em todo o território nacional e também internacional (BRASIL 2015a).

Em relação a picada do *Aedes aegypti*, as fêmeas precisam de sangue para garantir o desenvolvimento dos ovos, e ainda, se alimentam através dos vasos sanguíneos de seus hospedeiros vertebrados. Nesse processo, o primeiro desafio do mosquito é a ruptura física da pele, que é chamada de hemostasia, que nada mais é que um processo fisiológico onde ocorre a coagulação sanguínea e vasoconstrição, que acabam por estancar a hemorragia depois de uma picada, o que não deixa de provocar um ferimento (BARROS, 2012).

Diante disso é preciso seguir as recomendações preconizadas pelo Ministério da Saúde, que se resumem em especial, a ações de combate aos vetores intradomiciliares, o que ajuda a eliminar os possíveis criadouros. É preciso ressaltar o uso de roupas adequadas que podem minimizar a exposição da pele durante o dia, período onde os mosquitos são mais ativos, proporcionando proteção às picadas. E ainda, durante o período onde os surtos são mais intensos, é preciso o uso de repelentes, seguindo as instruções do fabricante, e ainda, fazer uso dos mosquiteiros, que proporcionam proteção, especialmente para os bebês que dormem durante o dia, e também redobrar a atenção para as pessoas acamadas e trabalhadores noturnos (BRASIL, 2015b).

Os casos de Dengue, Chikungunya e Zika sofreram queda nos três primeiros meses de 2017, comparado ao mesmo período do ano anterior. De acordo com o boletim do Ministério da Saúde, as notificações de Dengue tiveram redução de 89,8%, enquanto o Chikungunya, 76,3%, e o Zika, 97,6%. Os dados fazem parte da pesquisa realizada desde o início do ano de 2016, e segundo o Ministério da Saúde, também houve queda expressiva no número de óbitos com dengue, passando de 221, no primeiro trimestre em 2016, para 5 no mesmo período em 2017 (BRASIL, 2017).

A OMS vem estabelecendo várias estratégias para o controle de populações de *Aedes Aegypti*, e uma das principais estratégias é a utilização de produtos químicos e biológicos integrados a programas de manejo ambiental capazes de eliminar formas larvais e insetos adultos, assim como a conscientização de toda a população, através de intervenções em suas casas, terrenos, e etc (TORRES *et al.*, 2014).

Na atualidade o Ministério da Saúde recomenda vários larvicidas para controle de *Aedes aegypti* em substituição ao Temephos que não será mais utilizado, considerando a resistência do vetor a este inseticida na maioria dos municípios do país. Um dos larvicidas recomendados é o Piriproxifen, com indicação feita pela *World Health Organization* (WHO) e o *Pesticide Evaluation Schemme* (WHOPES) para uso como larvicida, através da avaliação do Guia para avaliação da água potável (GDWQ/OMS), grupo de estudo no âmbito do

Programa Internacional de Segurança Química – IPCS que, dentre outras atividades, autorizando o produto para uso em água potável (BRASIL, 2014b).

O Piriproxifen atua sobre o inseto de forma análoga ao hormônio juvenil, inibe o desenvolvimento das características adultas do inseto, como por exemplo, asas, maturação dos órgãos reprodutivos e genitália externa, mantendo-o com aspecto "imaturo", ou seja, ninfa ou larva. O Piriproxifen possui eficácia e efetividade avaliada durante os estudos coordenados pela Secretaria de Vigilância em Saúde nos período de 2005 a 2007, e mais atualmente em estudos realizados em 2013/2014, onde os estudos, apontam que o produto teve uma persistência média em criadouros de oito semanas (BRASIL, 2014b).

É válido pontuar que as doenças causadas pela picada do *Aedes aegypti* podem estar associadas principalmente a população de baixo poder aquisitivo, assolando grande parte da população de todo o planeta, alertando para o fato de algumas epidemias poder se tornar descontroladas, se medidas efetivas não forem tomadas para evitá-las. Diante disto, as medidas socioeducativas são imprescindíveis para o controle e erradicação da doença, porém, outros produtos precisam ser utilizados para auxiliar no controle da população do principal mosquito transmissor como os inseticidas, que são usados há algum tempo para o combate ao mosquito (GARCEZ *et al.*, 2013).

Os inseticidas químicos convencionais ainda são utilizados no controle de *Aedes aegypti*, o que muitas vezes requer a aplicação de dosagens cada vez mais crescentes, ocasionando efeitos tóxicos com acúmulo nos tecidos de animais e humanos, além de uma importante contaminação ambiental (TORRES *et al.*, 2014).

Os inseticidas mais usados são os organofosforados e piretroides, no entanto, a aplicação frequente e em doses cada vez maiores desses produtos tem evidenciado o aparecimento de populações resistentes de mosquitos a estes produtos, agravando os danos ambientais por seu uso intensivo (GOMES *et al.*, 2016).

Diante desse impasse, percebe-se a necessidade de mudanças nas ações de controle e manejo destes produtos e, nesse contexto, apontam-se diversas espécies de plantas com potencial inseticida, que podem contribuir de maneira significativa para o controle do *Aedes aegypti*. No entanto, não basta apresentar toxicidade sobre o *Aedes aegypti*, esses inseticidas precisam apresentar baixa toxicidade para os mamíferos, além de serem biodegradáveis, reduzindo, principalmente o impacto sobre a biodiversidade (GARCEZ *et al.*, 2013).

Os inseticidas convencionais não podem deixar de ser considerados, pois foram usados muitas vezes e mostraram favoráveis no combate a estes vetores, mas também provocaram

outros efeitos indesejáveis, tais como poluição ambiental e toxicidade para seres humanos e outros organismos que são alvos (GARCEZ *et al.*, 2013).

Dessa maneira, a busca por novas alternativas que se mostrem ambientalmente seguras, potencialmente adequadas e mais eficazes para uso em programas de combate à larva *Aedes aegypti* precisa ser considerada, como o uso de produtos naturais de origem vegetal com propriedades larvicidas (GARCEZ *et al.*, 2013).

Na busca por controle químico alternativo contra *Aedes aegypti*, vários estudos estão sendo desenvolvidos e incentivados a fim de encontrar novas substâncias inseticidas de origem vegetal e, neste contexto os óleos essenciais têm se mostrado muito promissor, com resultados positivos. Os compostos oriundos de plantas são apontados como as principais fontes de novas moléculas com potencial para interações com sistemas biológicos. Com isso, os inseticidas naturais podem suprir as necessidades de alternativas ao controle de populações resistentes de *Aedes aegypti*, que se apresenta como vetor de várias viroses (TORRES *et al.*, 2014).

Algumas pessoas picadas pelo mosquito podem apresentar manifestações como falência hepática, miocardiopatia, manifestações e síndromes neurológicas, como delírio, depressão, sonolência, irritabilidade, coma, psicose, encefalite, convulsões, mononeuropatias, polineuropatias, que podem surgir no decorrer do período febril ou mais tardiamente, na convalescença (DIAS *et al.*, 2010).

O mesmo autor cita ainda que o período entre a aquisição do vírus por meio da picada do *Aedes aegypti* e o aparecimento de alguns sintomas podem variar entre três a doze dias, onde apenas uma em quatro pessoas irão desenvolver sintomas da doença, que podem ser febre baixa, dores musculares, dor de cabeça, inflamação nos olhos e manchas na pele, chamadas de exantema, quadros muito comuns em casos de Dengue, o Chikungunya e o Zika, e ainda confundir com outras muitas doenças existentes e que podem acometer o ser humano (DIAS *et al.*, 2010).

Pesquisas nessa área são de grande valia, considerando que as doenças transmitidas pelo *Aedes aegypti* vêm causando a morte de muitas pessoas todos os anos ou até mesmo causando a incapacidade de trabalho por um período de aproximadamente dez dias devido aos sintomas geralmente severos (GOMES *et al.*, 2016).

Considerando-se a enorme diversidade da flora brasileira, estudos com substâncias de origem vegetal podem ser desenvolvidos para o controle deste vetor, promovendo uma baixa toxicidade ao homem e a outros organismos vivos (GARCEZ *et al.*, 2013).

Diante dessa grande diversidade, está presente a *Eugenia sulcata*, popularmente conhecida como Pitanga Preta. Essa espécie correspondente a aproximadamente um terço das espécies de *Myrtaceae*. Apresenta ampla distribuição, com maior ocorrência no México e Argentina e em diferentes regiões do Brasil, sendo composta por óleos essenciais e taninos, que na medicina popular são utilizados como antireumático, adstringente, diurético, hipoglicemiante, cicatrizante, antipirético, entre outros (RODRIGUES & NAVE, 2000).

A espécie *Eugenia sulcata* possui a sinonímia botânica *Stenocalyx sulcatus*, que é popularmente conhecida como “murtinha” ou “pitanguinha”, sendo uma espécie que desenvolve-se bem nas planícies arenosas do litoral, ocorrendo naturalmente desde o Estado do Rio de Janeiro até o Estado de Santa Catarina. Seu arbusto possui um porte de aproximadamente três metros de altura, apresentando ramos pubérulos, esfoliantes, pardacentos, sendo que os mais jovens crescem lateralmente (ROMAGNOLLO & SOUZA, 2006).

As folhas da *Eugenia sulcata* possuem lâminas de 15-45×10-15 mm, com razão foliar 1,2-2,0, oblongas, cartáceas, concolores a discolores, glabras, pontos translúcidos mais evidentes adaxialmente, limbinérveas, base obtusa a aguda, ápice retuso, que às vezes se mostra agudo, com margem pouco revoluta. Possui ainda uma nervura central adaxialmente sulcada, abaxialmente proeminente, pilosa, com nervuras secundárias de 6 a 8 pares, assim como um ângulo de divergência de 45° -55°. Apresenta ainda nervuras intersecundárias tênues e nervuras marginais até 2 mm da borda, pouco visíveis, além de pecíolos 5-7 mm de comprimento. Possui também flores de setembro a novembro e frutos subglobosos, 15-30 mm de diâmetro, multicostados, pilosos, arroxeados quando maduros (ROMAGNOLLO & SOUZA, 2006).

Desde muito tempo as flores, folhas, cascas, rizomas e frutos são matérias-primas para a produção de óleos essenciais, com grande aplicação na perfumaria, cosmética, alimentos e como coadjuvantes em medicamentos. São utilizados principalmente como aromas, fragrâncias, fixadores de fragrâncias, em composições farmacêutica e comercializados na sua forma bruta ou beneficiada, fornecendo substâncias purificadas como, por exemplo, o limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol (BIZZO *et al.*, 2009).

A pitanga possui óleos essenciais, entre eles, os fenilpropanoides, substância aromática com uma cadeia lateral de 3 átomos de carbono ligada ao anel aromático, que na maioria das vezes compreendem os ácidos e seus derivados. Os ácidos cinâmicos servem

como precursores da maioria das substâncias classificadas como fenilpropanoides (SIMÕES *et al.*, 2004).

Outro componente são os terpenóides com origem biossintética, derivados de unidades de isopreno. A unidade isoprênica por sua vez origina-se a partir do ácido mevalônico. Os terpenóides são formados pela condensação de um número variável de unidades isoprênica, e nos óleos essenciais predominam através dos monoterpenos e sesquiterpenos (SIMÕES *et al.*, 2004).

Em estudos realizados por Fernandes *et al.* 2011, é indicado que o óleo essencial de *Eugenia sulcata* é capaz de aumentar significativamente a mortalidade de ninfas e adultos de *Oncopeltus fasciatus* e *Dysdercus peruvianus* por cerca de quatorze e dez dias, respectivamente, após o tratamento.

No entanto, muitos detalhes do modo de ação do óleo ainda são desconhecidos, sendo que, em outros estudos, indicou-se que o óleo essencial das folhas de *Eugenia sulcata* inibe a acetilcolinesterase, a inibição desta enzima é reconhecida como um modo de ação de vários inseticidas, incluindo os de origem natural, como cita também López *et al.* (2010). Vale pontuar que conhecer os modos de ação dos inseticidas já disponíveis pode ajudar a determinar as propriedades químicas de novos compostos que podem ser eficazes para a modificação do desenvolvimento e comportamento dos insetos, usados em doses que podem ser utilizadas com segurança e economia, sem ser prejudicial para o ser humano.

O uso do óleo essencial de *Eugenia sulcata* indica que seus componentes químicos são candidatos promissores para estudos de atividade inseticida, assim como para uso de controle biológico de populações de insetos de peste na agricultura. Sua utilização ainda necessita de muitos estudos, considerando que seja provável que existam muitos compostos presente no óleo (FERNANDES *et al.*, 2011).

Assim, diante do crescimento da doença e os prejuízos causados por esse grupo de doenças virais no país, é de suma importância a descoberta de novos materiais e desenvolvimento de métodos de combate ao seu vetor, através de pesquisas voltadas para os óleos essenciais e extratos de origem vegetal, que podem representar uma saída eficiente para esse problema (GOMES *et al.*, 2016).

## **2 OBJETIVO**

Desenvolver um produto com ação larvicida, à partir da espécie *Eugenia sulcata*, conhecida popularmente como Pitanga Preta, para o controle das larvas do *Aedes aegypti*.



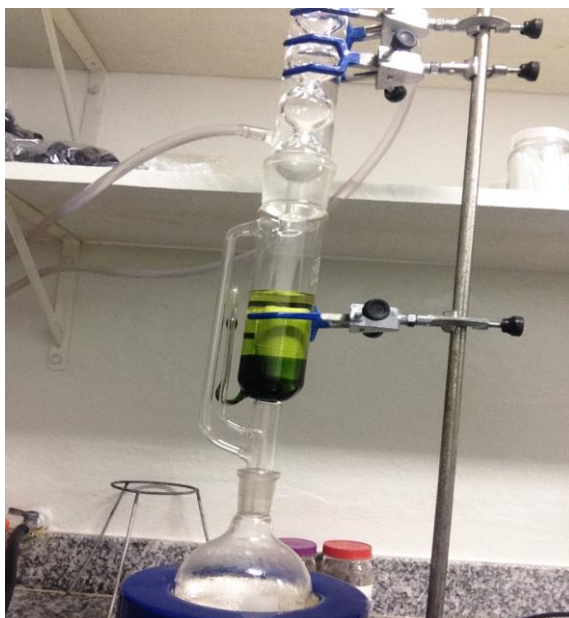
## 3 MÉTODOS

### 3.1 Coleta do material vegetal

As folhas da *Eugenia sulcata* foram coletadas em uma fazenda particular no município Três Corações durante o mês de novembro de 2016, em seu período reprodutivo. Os materiais obtidos foram acondicionados em sacos plásticos e transportados para o Laboratório de Fitoterapia e Laboratório de Botânica da Universidade Vale do Sapucaí – UNIVÁS em Pouso Alegre. As folhas foram submetidas a secagem em estufa com temperatura de 65°C, por 48 horas, trituradas e acondicionadas em frascos hermeticamente fechados.

### 3.2 Preparação do extrato etanólico

A preparação foi realizada com 20 g da folha triturada acondicionadas em cartucho de celulose e submetidos a extração com etanol 96°GL em aparelho de “soxhlet” durante 3 horas. Em seguida o extrato foi armazenado em frasco âmbar, sob uma temperatura de 10 °C (GALVANI & MARTINS, 2015). (Figura 1).



**Figura 1** – Extração etanólica utilizando-se “Soxlet”

Após o preparo do extrato, fez-se determinação de teor de sólidos depositando 10 g de extrato etanólico a ser analisado pesado (triplicata) em placa de Petri, levando a estufa 105°C

até o peso constante e procedendo aos cálculos aonde o rendimento é apresentado em quantidade de sólidos em 10 g e porcentagem em peso do teor de sólidos em relação ao material vegetal.

### 3.3 Desenvolvimento do produto

Após pesagem de 156 g do extrato etanólico, foram adicionados 20 g de glicerina. Esta mistura foi submetida em evaporador rotatório com pressão reduzida à temperatura de 85°C e 90 rpm por 2 horas com a finalidade de substituir o solvente etanol pela glicerina. O método da extração glicólica foi adaptado (ARGENTA *et al.*, 2012). (Figura 2).



**Figura 2** – Extração glicólica no evaporador rotatório

**Fonte:** <http://www.quimis.com.br/produtos/detalhes/evaporador-rotativo-microprocessado>

### 3.4 Delineamento do estudo

O estudo foi experimental, analítico e transversal. As larvas foram obtidas e identificadas por um entomologista G.A.G., da Secretaria Estadual de Saúde de Pouso Alegre.

### 3.5 Teste de toxicidade

O ciclo de vida do *Aedes aegypti* compreende quatro fases: ovo, larva (quatro estágios larvários), pupa e adulto. Para a realização do teste de toxicidade, foram utilizadas larvas de *Aedes aegypti* no terceiro estágio de desenvolvimento.

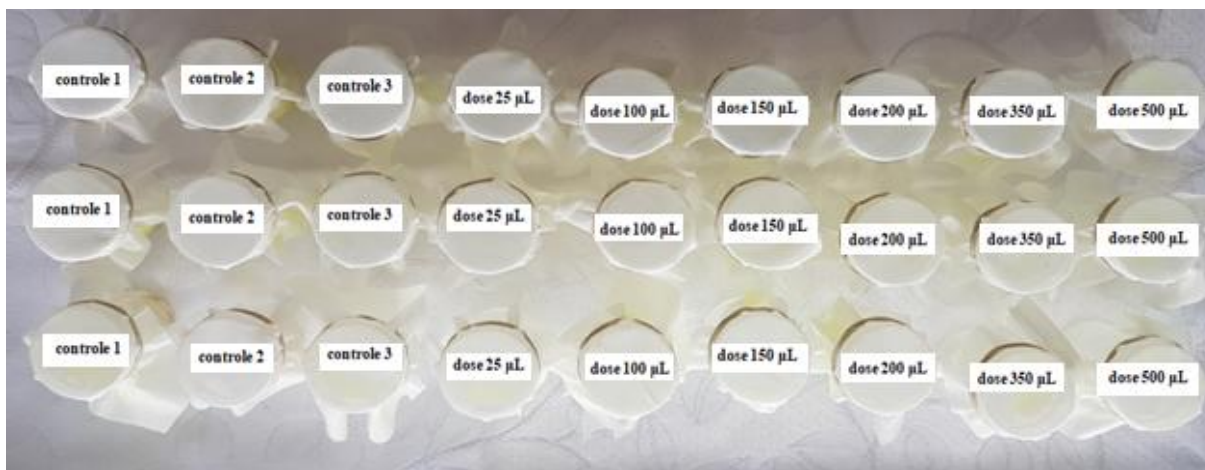
O teste ocorreu com a subdivisão em nove grupos, sendo seis deles, grupos teste. A avaliação da atividade larvicida consistiu na utilização de 25, 100, 150, 200, 350 e 500  $\mu\text{L}$  do produto desenvolvido diluídos em 10 ml de água destilada. Os outros três grupos eram controles: o primeiro com o larvicida Piriproxifen (Controle 1), na concentração de 0,1 g, utilizada pela OMS; o segundo com 10 mL de água destilada (Controle 2) e o terceiro com uma mistura de glicerina e etanol (Controle 3) nas proporções de 90,91% e 3,64% (v/v), respectivamente.

Todo experimento foi realizado em triplicata para cada um dos grupos, contendo 10 larvas de *Aedes aegypti*, em temperatura de 22 a 28°C.

As larvas foram submetidas ao teste por 24 horas. A cada hora foi realizada uma contagem do número de larvas vivas e larvas mortas, sendo consideradas mortas aquelas que não apresentavam movimento ou não respondiam aos estímulos com a pipeta de Pasteur, ficando incapazes de alcançar a superfície. (Fig. 3)



**Figura 3** – Larvas de *Aedes aegypti* em 3º estágio de desenvolvimento



**Figura 4** – Experimento do teste de toxicidade em triplicata

### 3.6 Análises Químicas

O extrato etanólico de *Eugenia sulcata* foi enviado para Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP). Para realização da análise química foi utilizada a técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-MS).

### 3.7 Análise estatística

Após os experimentos, montou-se uma tabela com os valores das seis concentrações utilizadas no teste de toxicidade, logaritmo (log) das mesmas, o número de larvas mortas após 24 horas, número de larvas vivas após 24 horas, o acumulado de mortos (soma das células de mortos abaixo) e o acumulado de vivos (soma das células de vivos acima). A análise estatística dos dados foi realizada de acordo com o método de *Reed & Muench* (1938), o qual parte do princípio de que um animal que sobreviva a certa dose, também irá sobreviver em qualquer outra dose inferior que aquela, conseqüentemente, o animal que morrer com certa dose, também irá morrer em doses superiores que aquela. A partir de uma tabela contendo os dados de mortalidade para cada concentração testada foi construído um gráfico onde se observa uma curva para o acúmulo de animais mortos em cada concentração e outra curva para o acúmulo de sobreviventes. O ponto de intercessão entre as curvas é a Concentração Letal 50% (CL50), calculado nesse ponto a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada.

O intervalo de confiança foi calculado segundo o método de *Pizzi* (1950) no qual se construiu um gráfico do percentual de mortos *versus* logaritmo (log) da dose. A seguir

determinou-se o valor de “R”, que é o intervalo interquartil dos valores logarítmicos correspondentes as percentagens acumuladas, ou seja, o quartil inferior subtraído do quartil superior. Calculou-se a variável “h” que consistiu no intervalo entre as dosagens, que não foram iguais, porém o autor diz que se os intervalos não forem iguais, são calculadas as médias das diferenças dos intervalos. E “n” representado pelo número de animais por dose. Com esses dados determinou-se o log do erro padrão, através da seguinte fórmula:  $(SE_{CL50})^2 = 0,79 \times R \times h/n$ .

## **4 RESULTADOS / PRODUTO**

### **4.1 Teor e rendimento do extrato**

O teor e rendimento de sólidos das folhas obtidos foram 0,06 g (0,77%).

A extração etanólica e o desenvolvimento do produto foram realizados em 5 horas.

### **4.2 Avaliação do teste de toxicidade**

Conforme mostra a Tabela 1, a dose de 25 µL do extrato não apresentou atividade larvicida. A dose de 100 µL apresentou uma mortalidade de 29,41%. A partir da dose de 150 µL do extrato a atividade larvicida começou a aumentar o número de mortes, até provocar a morte de 100% das larvas testadas na dose de 500 µL.

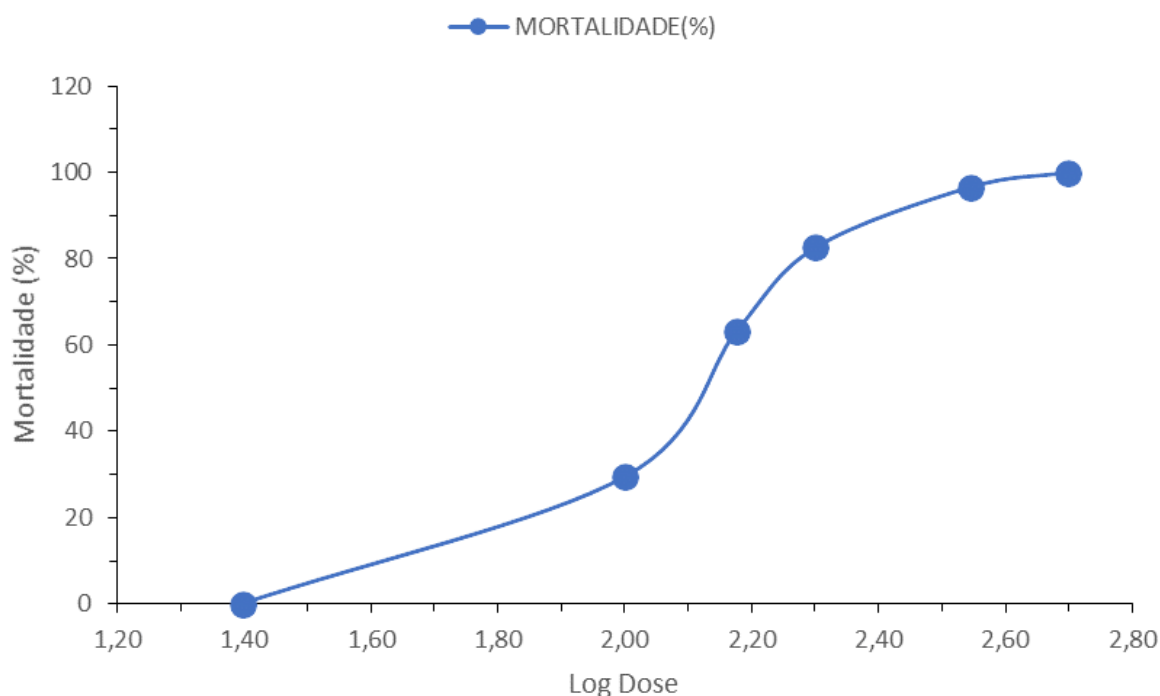
O controle 1 realizado com o produto utilizado pela Vigilância Epidemiológica, o Piriproxifen apresentou 100% das larvas vivas, comprovando que o produto inibe o desenvolvimento das características adultas do inseto, mantendo-as como larvas (BRASIL, 2014b). O controle 2, realizado com água destilada apresentou 100% das larvas vivas. O controle 3 com álcool e glicerina também apresentou 100% das larvas vivas, mostrando que não possuem nenhuma atividade biológica. Para o cálculo da CL50 não utiliza os valores dos controles mas todo o experimento foi realizado com os controles e todas as larvas permaneceram vivas durante as 24 horas.

**Tabela 1** - Mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* após 24 horas de exposição a várias concentrações do extrato glicólico de *Eugenia sulcata*.

DOSE (µL)	LOG DOSE	MORTOS	VIVOS	ACUMULADOS MORTOS	ACUMULADOS VIVOS	MORTALIDADE (%)
Controle 1	-	0	10	-	-	-
Controle 2	-	0	10	-	-	-
Controle 3	-	0	10	-	-	-
500	2,70	10	0	38	0	100
350	2,54	9	1	28	1	96,55
200	2,30	7	3	19	4	82,61
150	2,18	7	3	12	7	63,16
100	2,00	5	5	5	12	29,41
25	1,40	0	10	0	22	0

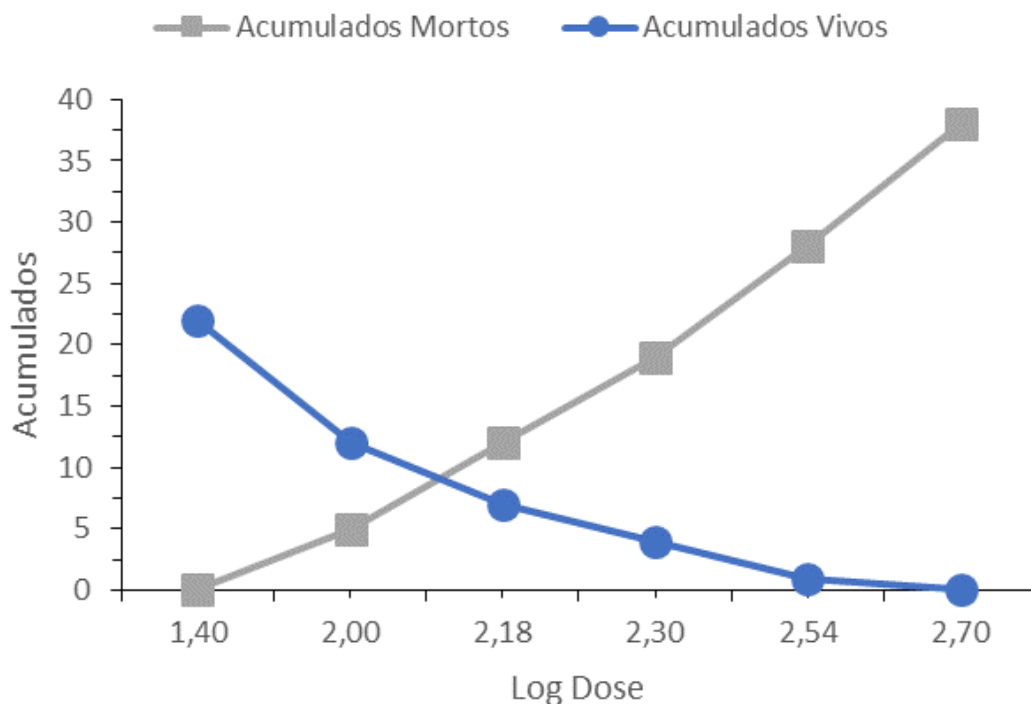
Número de larvas (n=10); Controle 1 – larvicida Piriproxifen; Controle 2 – 10 mL de água destilada; Controle 3 - glicerina e etanol;

O índice de percentagem da mortalidade das larvas diante do extrato é apresentado na Figura 5, mostrando-se o aumento de mortes a partir do Log dose 2,0000 (concentração 100 µL).



**Figura 5** - Taxa de mortalidade (%) das larvas do mosquito *Aedes aegypti* expostas por 24 horas a seis log doses diferentes do extrato glicólico da *Eugenia sulcata*

A CL50 para o extrato foi calculada através da intersecção das curvas de larvas acumuladas mortas e larvas acumuladas vivas da Figura 6, tendo como resultado estimado a log 2,1, com uma concentração aproximada de 105  $\mu\text{L}$  (0,68  $\mu\text{g mL}^{-1}$  extrato bruto) com um intervalo de confiança de 2,013  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .



**Figura 6** - Estimativa da CL50 do extrato glicólico da *Eugenia sulcata* pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada. A CL50 é o ponto de intersecção das duas curvas.

#### 4.3 Avaliação das características químicas do extrato obtidas por Cromatografia Gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-MS)

Conforme a Tabela 2 e Fig. 7, os resultados da Cromatografia Gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-MS) apresentaram em maior área %, os seus principais constituintes, sendo eles: 1,3,6- heptatrieno (1,42%), Benzofurano (14,36%), 9,11-Octadecadiynoic acid (0,37%), Nitrito de isoamilo (1,39%), Triciclo (1,3%), Ciclohexanona (30,56%), 3,8a- Dimetil-5-metileno (1,78%), 1,7,7-Trimetilbiciclo (1,72%), Ácido hexanethioic (0,76%), 3,7- Cyclodecadien (14,6%), 3,5,8a-Trimethy (2,42%), Ácido borínico



(0,89%), Neofitadieno (12,19%), Anidrido crotônico (2,29%), Neofitadieno (2,64%), Neofitadieno (4,44%), beta-Elemene (2,03%), 1,3,6-Heptatrieno (1,5%), Phytol (1,65%), Supraene (1,67%). As características dos componentes dos terpênicos nos constituintes 1,3,6-heptatrieno, Neofitadieno, beta-Elemene, Triciclo, Dimetil-5-metileno e 1,7,7-Trimetilbiciclo apresentaram atividade biológica para o estudo contra o *Aedes aegypti*.

**Tabela 2** – Constituintes do extrato etanólico da *Eugenia sulcata*

CONSTITUINTES	ÁREA (%)
1,3,6- heptatrieno	1,42
Benzofurano	14,36
9,11- Octadecadiynoic acid	0,37
Nitrito de isoamilo	1,39
Triciclo	1,30
Ciclohexanona	30,56
3,8a- Dimetil-5-metileno	1,78
1,7,7-Trimetilbiciclo	1,72
Ácido hexanethioic	0,76
3,7- Cyclodecadien	14,60
3,5,8a-Trimethy	2,42
Ácido borínico	0,89
Neofitadieno	12,19
Anidrido crotônico	2,29
Neofitadieno	2,64
Neofitadieno	4,44
beta-Elemene	2,03
1,3,6-Heptatrieno	1,50
Phytol	1,65
Supraene	1,67

Área (%): baseada na integração do pico

#### 4.4 Produto

Através do resultado significativo da atividade larvicida de *Eugenia sulcata* frente ao *Aedes aegypti* foi desenvolvido o larvicida biológico “Protect Larv” como alternativa para uso doméstico, aplicado em pratos de vasos, bromélias e ralos. Para cada 100 ml de água utiliza-se 5% do produto, o que equivale a 15 gotas em 10 ml de água. (Figura 7).

O produto mata a larva do *Aedes aegypti* em até 24 horas após sua aplicação, evitando que ela se torne um mosquito adulto transmissor dos vírus causadores de doenças como a Dengue, Chikungunya e a Zika.



Figura 7 – Larvicida biológico de *Eugenia sulcata* frente ao *Aedes aegypti*

#### 4.4.1 Pedido de patente



08/03/2018 870180018719  
10:52



29409161802003826

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 004603 9

## 5 DISCUSSÃO

O potencial larvicida da *Eugenia sulcata* foi avaliado sobre larvas do mosquito *Aedes aegypti* com o objetivo de encontrar um produto natural, eficaz e seguro e que no futuro possa substituir os compostos organofosforados ou outros agentes sintéticos.

De acordo com Cheng et al. (2003), os valores de  $CL_{50} < 100 \mu\text{g mL}^{-1}$  são considerados ativos. A dose em que houve uma mortalidade de 50% das larvas foi de aproximadamente 105  $\mu\text{L}$ , que convertendo em  $\mu\text{g}$  e retirando o álcool e a glicerina, os quais não possuem nenhuma atividade biológica, obteve-se a  $CL_{50}$  de aproximadamente  $0,68 \mu\text{g mL}^{-1}$  do extrato bruto, com um intervalo de confiança de  $2,013 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Estudo realizado por Cunha e Silva et al. (2014), aponta que a análise da  $CL_{50}$  do extrato etanólico do caule de *Croton linearifolius* ( $CL_{50} = 17,42 \text{ mg/mL}$ ) e das frações hexânica ( $CL_{50} = 9,58 \text{ mg/mL}$ ) e diclorometânica ( $CL_{50} = 1,13 \text{ mg/mL}$ ) foi capaz de revelar um aumento na efetividade inseticida a medida em que o extrato etanólico foi fracionado, revelando, ainda, a fração diclorometânica como a mais ativa. Vale pontuar ainda que o mesmo estudo mostra que a  $CL_{50}$  do extrato etanólico do caule de *Croton linearifolius* e das frações hexânica e diclorometânica, sobre larvas de terceiro estágio do *Aedes aegypti* se mostrou eficiente após 24 horas de observação.

Segundo Simom (2016), a concentração de  $30 \mu\text{g/mL}$  do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* apresentou a menor atividade larvicida, 22,5% de mortalidade. A concentração de  $100 \mu\text{g/mL}$  do óleo essencial testado apresentou a maior atividade larvicida, provocando a morte de 100% dos indivíduos testados, ou seja, 40 larvas no total em 24 horas. As concentrações intermediárias 74 e  $49 \mu\text{g/mL}$  mataram 17,5 e 10 larvas respectivamente, sendo uma mortalidade que corresponde 87,5 e 50 % respectivamente.

Ensaio realizado por Gomes et al. (2016) mostraram que a concentração de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  do óleo essencial dos rizomas do *Zingiber officinale Roscoe* apresentou a menor atividade larvicida, 10% de mortalidade. Na concentração de  $70 \mu\text{g mL}^{-1}$  houve mortalidade de 50 %. A partir da concentração de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  do óleo essencial a atividade larvicida começou a crescer exponencialmente, provocando a morte de 100% dos indivíduos testados com a concentração de  $160 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Amer; Mehlhorn (2006) citam que a espécie *Cymbopogon winterianus* é conhecida por sua propriedade repelente contra mosquitos e apresentou  $CL_{50}$  de  $54,7 \text{ mg/mL}$  e  $CL_{90}$  de

88,3 mg/mL das larvas, o que se mostra de efeito positivo como potencial larvicida, que causou 60% de mortalidade nas larvas após 24 horas de exposição.

El-Akhal *et al.* (2015) fizeram um estudo comparando vários óleos e foi ressaltado que o óleo essencial de *Citrus aurantium* L. foi o que apresentou a maior eficiência, com os respectivos valores de CL50 de 22,64 mg/L e CL90 de 83,77 mg/L, enquanto que o óleo essencial de *Citrus sinensis* Macfad foi o menos eficaz, com CL50 de 77,55 mg/mL e CL90 de 351,36 mg/mL.

Vale ressaltar que alguns estudos mostram que os componentes terpênicos, álcoois e aldeídos dos óleos essenciais são os principais responsáveis pela atividade inseticida ou larvicida contra o *Aedes aegypti* (Lucia *et al.*, 2007).

Nos estudos realizados por Gomes *et al.* (2016), foram realizadas análises químicas do *Zingiber officinale* Roscoe, através da cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas por impacto de elétrons e analisador íon trap. Foram identificados alguns compostos terpênicos como  $\alpha$ -zingibereno, nerolido, neral, sabineno, canfeno, 1,8-cineol, ar-curcumeno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -mirceno, nerol.

A partir dos resultados obtidos, frente a comparação com a literatura, o produto desenvolvido, “Protect larv”, mostrou-se um larvicida biológico em potencial com eficácia e segurança, ação rápida, quando comparado a outros larvicidas já desenvolvidos, além de custos razoáveis para implantação, possibilidade de uso contínuo e risco mínimo para o meio ambiente e para a população.

## 5.1 Aplicabilidade

A descoberta de larvicidas de compostos biológicos pode ocorrer através de diferentes estratégias, resultando em controle vetoriais compatíveis e eficazes, considerando as tecnologias disponíveis e as características regionais específicas, o que vem se mostrando viável para a redução da infestação dos mosquitos e a incidência das arboviroses transmitidas por eles, considerando que no Brasil, ainda não existe uma solução única para o controle do *Aedes aegypti*.

A pesquisa apresenta uma espécie da família *Myrtaceae*, a *Eugenia sulcata*, sendo uma planta presente em diversos biomas brasileiros. A maioria das plantas deste gênero se apresenta rica em óleos essenciais e taninos, que são comuns na medicina popular, usados

como antireumático, adstringente, diurético, hipoglicemiante, cicatrizante, antipirético, entre outros (RODRIGUES; NAVE, 2000).

A *Eugenia sulcata* mostrou ser uma alternativa à prevenção de baixo custo, podendo ser usada de forma contínua, podendo não oferecer risco ao meio ambiente e para a população, e ser utilizado em locais como pratos de vasos, bromélias, ralos, garrafas e pneus. Além disto, é preciso pontuar sua rápida ação, o que impede que as larvas prossigam seu desenvolvimento.

Vale ressaltar ainda, que atualmente existe uma evolução das pesquisas que tratam das alternativas de controle sobre o mosquito *Aedes aegypti*, abrindo espaço para a busca de maiores informações referente aos larvicidas e inseticidas botânicos, garantindo maior conhecimento sobre os compostos vegetais e sua melhor forma de utilização, sendo que, a partir dos resultados positivos apresentados, outros estudos podem ser desenvolvidos.

## **5.2 Impacto para a sociedade**

A utilização de compostos vegetais no controle de vetores é um campo promissor na atualidade, apresentando inúmeras vantagens e impactos. Aponta-se como impacto ambiental sua rápida degradação, diminuindo as chances de permanência no ambiente e intoxicação aos outros organismos que não são alvos, assim como o menor índice de desenvolvimento de resistência pelos vetores.

Novos produtos de origem vegetal, tal como este, podem auxiliar os Programas de Vigilância Epidemiológica a direcionar medidas no combate aos vetores, principalmente diante do cenário de epidemias de Dengue, Zika e Chikungunya no qual o Brasil se encontra.

Outro impacto de suma importância diz respeito à economia, pois a utilização de compostos vegetais apresenta alta disponibilidade de material vegetal, o que envolve ainda, em sua grande maioria, um baixo custo de fabricação. Em contrapartida, o larvicida mais utilizado hoje no Brasil, o Pyriproxyfen, é um produto importado, que gera altos custos para o governo.

Diante disso, o larvicida a base de *Eugenia sulcata* pode ser útil no controle vetorial, com custos reduzidos e oferecendo ainda um risco mínimo para o meio ambiente e para a população.

Todas as pesquisas envolvidas na descoberta e padronização de novos meios para o combate de doenças como a Dengue, Chikungunya e a Zika são de suma importância na

atualidade, considerando o impacto negativo para a população, que já mostrou números alarmantes com mortes e sequelas.

## 6 CONCLUSÃO

O produto larvicida biológico desenvolvido demonstrou-se potencialmente promissor ao controle de larvas de *Aedes aegypti* a partir da dose de 500 µL.

## 7 REFERÊNCIAS

Amer U.; Mehlhorn H. Efeitos larvicidas de vários óleos essenciais contra as larvas de *Aedes*, *Anopheles* e *Culex*. *Parasitol Res.* 2006 Sep; 99(4): 466-72.

Argenta JA *et al.* Efeito do extrato de romã (*Punica granatum*) sobre bactérias cariogênicas: estudo *in vitro* e *in vivo*. *Arq Odontol*, Belo Horizonte. 2012;48(4): 218-226.

Barros MS. Padronização de modelo de inflamação alérgica pela exposição a picadas de mosquitos *Aedes Aegypti*. Dissertação. Pós Graduação em Imunologia. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo-SP, 2012.

Bizzo HR, Hovell AMC, Rezende C M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova.* 2009; 32, 588-594.

Brasil. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Preparação e resposta da vigilância em saúde para a Copa do Mundo da FIFA Brasil 2014™. *Bol Epidemiol.* 2014a; 45(8):1-12.

Brasil. Orientações técnica para utilização do larvicida pyriproxyfen (0,5 G) no controle de *Aedes aegypti*, 2014b.

Disponível em: <http://u.saude.gov.br/index.php/portarias-esclarecimentos/632-o-ministerio/o-ministerio-principal/secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/control-de-vetores-inseticidas-e-larvicidas> Acesso em 08 jan 2018.

Brasil. Boletim epidemiológico, Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde, 2015a; vol 46, n36.

Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Febre de chikungunya: manejo clínico / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015b.

Brasil. Saiba mais informações sobre a vacina contra a dengue. Portal Brasil, 2016.

Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2016/01/saiba-mais-informacoes-sobre-a-vacina-da-dengue-1> Acesso em 05.01.2018.

Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portal Brasil, 2017.



Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2017/03/pais-registra-queda-nos-casos-de-dengue-chikungunya-e-zika> Acesso em 12 set 2017.

Casseb AR *et al.* Arbovírus: importante zoonose na Amazônia Brasileira. Veterinária e Zootecnia. São Paulo. 2013; 20(3) p. 391-403.

Castro APCR, Lima RA, Nascimento JS. Chikungunya: a visão do clínico de dor. Rev Dor. São Paulo, 2016 out-dez;17(4):299-302.

Cheng, SS, Chang HT, Chang ST, Tsai KH, Chen WJ. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. Bioresource. Technology. 2003; 89, p.99-102.

Cheng SS *et al.* Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. Bioresour Technol. 2009; 100(1): 452-456.

Cunha e Silva SL *et al.* Avaliação da atividade larvicida de extratos obtidos do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). Biotemas. 2014; 2 (2): 79-85.

Dias LBA, Almeida SCL, Haes TM, Mota LM, Roriz-Filho JS. Dengue: transmissão, aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento. Medicina (Ribeirão Preto) 2010;43(2): 143-52.

El-Akhal F *et al.* Atividade larvicida de *Nerium oleander* contra larvas do vetor do Nilo Ocidental Mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). J Parasitol Res. 2015.

Fernandes CP. Estudo fitoquímico e biológico da espécie vegetal *Manilkara subsericea* (Mart.) Dubard. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde, Universidade Federal Fluminense, 2011).

Galvani DB, Martins TP. Determinação de Extrato Etéreo em Amostras Vegetais com uso de Solvente sob Alta Pressão: Avaliação do Equipamento Semiautomático ANKOM XT15. Comunicado Técnico (on line). Sobral-CE, 2015.

Disponível em: <https://www.embrapa.br/caprinos-e-ovinos/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1016849/determinacao-de-extrato-etereo-em-amostras-vegetais-com-uso-de-solvente-sob-alta-pressao-avaliacao-do-equipamento-semiautomatico-ankom-xt15>  
Acesso em: 12 dez 2017.

Garcez WS, Garcez FR, Silva LMG, Sarmiento UC. Substâncias de Origem Vegetal com Atividade Larvicida Contra *Aedes aegypti*. Revista Virtual de Química. 2013; 5(3).

Gomes PRB, Silva ALS, Pinheiro HA, Carvalho LL, Lima HS, Silva EF, Silva RP, Louzeiro CH, Oliveira, MB, Filho VEM. Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial do *Zingiber officinale Roscoe* (gengibre) frente ao mosquito *Aedes aegypti*. Rev. Bras. Pl. Med., Campinas. 2016; 18(2), supl. I, p.597-604.

López S, Bastida J, Viladomat F, Codina C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts Life Sciences. 2010; 71: 2521–2529.

Lucia, A., Gonzales A. P., Seccacini E., Licastro S., Zerba E., Masuh H. Larvicidal effect of Eucalyptus grandis essential oil and turpentine and their major components on Ae. aegypti larvae. Journal of the American Mosquito Control Association, 2007.

Lupi O, Carneiro CG, Coelho, ICB. Manifestações mucocutâneas da dengue. An Bras Dermatol. 2007; 82(4):291-305.

Pizzi M. SAMPLING VARIATION OF THE FIFTY PER CENT END-POINT, DETERMINED BY THE REEDMUENCH (BEHRENS) METHOD. Human Biology, Vol. 22, No. 3 (September, 1950), pp. 151-190.

Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/41447976> Acesso em: 02 dez 2017.

Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. THE AMERICAN JOURNAL OF HYGIENE. 1938; 27(3) MAY, 1938.

Rodrigues RR, Nave AG. Heterogeneidade florística das matas ciliares. Pp. 45-71. In: R.R. Rodrigues & H.F. Leitão Filho (eds.). Matas ciliares: conservação e recuperação. São Paulo, Edusp/Fapesp., 2000.

Romagnolo MB, Souza MC. O gênero Eugenia L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto RioParaná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. Acta Botânica Brasilica. 2006; 20(3), 529-548.

Simões CMO, Guerra, MP *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5º Ed. rev. ampl. Porto Alegre, Florianópolis, Editora da UFRGS/UFSC, 2004.

Simom YG. Avaliação do potencial larvicida e mecanismos de toxicidade do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* contra o mosquito *Aedes aegypti*. Tese. Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química. Florianópolis, 2016.

Singhi S, Kisson N, Arun Bansal A. Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit. *J Pediatr (Rio J)*. 2007;83(2 Suppl):S22-35.

Tabakman R. Dengue: o que é preciso saber sobre a vacina disponível no Brasil. *Medscape. Notícias e Perspectivas em Educação Médica*, 2016.

Torres SM, Nad Cruz NLN, Rolim VPM, Cavalcanti MIA, Alves LC, Silva Júnior VAS. Mortalidade acumulativa de larvas de *Aedes aegypti* tratadas com compostos. *Rev Saúde Pública* 2014;48(3):445-450.

Viana JA. Análise da correlação entre arboviroses epidêmicas no Brasil (dengue, chikungunya e zika) e a síndrome de Guillain-Barré. 2016.

World Health Organization (WHO). Dengue: Guidelines for treatment, prevention and control. Geneva: World Health Organization. WHO Library Cataloguing-in-Publication *Data*. New Edititon, 2009.

Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>. Acesso em: 28 de ago 2017.