

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE *Annona coriacea* (ANNONACEAE) SOBRE PUPAS E ADULTOS DE *Aedes aegypti* (DIPTERA:CULICIDAE) EM LABORATÓRIO

Josdemar Muniz De Moraes¹, Mônica Josene Barbosa Pereira², Marilza da Silva Costa², Carla Galbiati³, Elaine Maria Loureiro²

¹ Vigilância em Saúde, Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso. Mato Grosso, MT, Brasil.

² Universidade do Estado de Mato Grosso. Cáceres, MT, Brasil - Rodovia MT 358, Km 7, Caixa Postal: 287, Tangará da Serra, MT, CEP 78300-000, Brasil. monica@unemat.br

³ Programa CETApis – Arranjo Produtivo Local em Apicultura da Região Sudoeste do Mato Grosso, Universidade do Estado de Mato Grosso, Cáceres, MT, Brasil.

RESUMO

A presente pesquisa teve por objetivo verificar a atividade do extrato etanólico de *Annona coriacea*, sobre pupas e adultos de *Aedes aegypti*. Para o teste pupicida foram utilizadas dez pupas para cada repetição dos tratamentos (0, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 ppm). Estas foram distribuídas em copos de polietileno, contendo 25 mL da solução-teste, em quatro repetições, por 48 horas de exposição. Para o teste com adultos, 20 fêmeas foram expostas a papel filtro tratado com 2 mL das concentrações de 0, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000, 10000 ppm. Foram realizadas três réplicas e a mortalidade foi avaliada após 24 horas. O extrato de *A. coriacea* apresentou atividade pupicida com 62,5% de mortalidade na concentração de 500 ppm. O extrato não apresentou ação adulticida. Diante dos resultados, a ação pupicida do extrato de *A. coriacea* sobre *A. aegypti* poderá viabilizar novas pesquisas para o controle do mosquito transmissor da dengue.

Palavras-chave: Annonaceae, pupas, adultos, dengue

EVALUATION OF *Annona coriacea* (ANNONACEAE) ACTIVITY ON PUPAE AND ADULTS OF *Aedes aegypti* (DIPTERA:CULICIDAE) IN LABORATORY

ABSTRACT

Here we aim to study the activity of the ethanolic extract of *Annona coriacea* on pupae and adults of *Aedes aegypti*. For the pupicide experiment, we used ten pupae for replication of each concentration (0, 50, 100, 200, 300, 400 and 500 ppm). Pupae were immersed in 25 ml of the test solution with four replicates for 48 hours of exposition. For the test with adults, 20 females were exposed to 2 ml of the same solution at concentrations of 0, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000, 10000 ppm on a filter paper. We used three replicates and the mortality was evaluated 24 hours after exposure. The extract of *A. coriacea* showed lethal activity against pupae with 62.5% of mortality at the concentration of 500 ppm. The extract did not show lethal action against adults of *A. aegypti*. These results show that the lethal action of the extract of *A. coriacea* on *A. aegypti* may uncover a promising future of researches for the control of this dengue vector.

Key words: Annonaceae, pupae, adult, dengue

INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença infecciosa, de origem viral, transmitida ao homem por meio da saliva de fêmeas contaminadas de *Aedes*, sendo *Aedes aegypti* (L., 1762) o principal vetor da dengue nas Américas (Ministério da Saúde 2005).

A Saúde Pública utiliza grande quantidade de inseticidas piretróides sintéticos e organofosforados no controle de *A. aegypti*. A aplicação desses produtos tem aumentado a contaminação ambiental, afetando os ecossistemas e a saúde humana (Aguilera *et al.* 2003). Além disso, favorece a seleção de população de mosquitos resistentes aos inseticidas (Glasser & Donalisio 2002), conforme registros no Rio de Janeiro, Sergipe e Alagoas (Braga *et al.* 2004), Distrito Federal (Carvalho *et al.* 2004) e São Paulo (Luna *et al.* 2004).

Trabalhos recentes têm avaliado o uso de inseticidas botânicos, microbianos, reguladores de crescimento, bem como a combinação de diferentes produtos em programas de manejo integrado do vetor da dengue (Lima *et al.* 2005, Geris *et al.* 2008, Ferreira *et al.* 2009, Sá *et al.* 2009). Murugan *et al.* (2007) demonstraram a ação pupicida sobre *A. aegypti* com *Albizia amara* (Boivin, 1834) e *Ocimum basilicum* (L., 1753). A atividade adulticida sobre *A. aegypti* foi estudada por Hidayatulfathi *et al.* (2004) com *Acorus calamus* (L., 1753), *Litsea elliptica* (Blume, 1825) e *Piper aduncum* (L., 1753), por Choochote *et al.* (2006) com *Piper sarmentosum* (Roxb., 1820), *Piper ribesioides* (Wall, 1953) e *Piper longum* (L., 1753), por Chaiyasit *et al.* (2006) com *Apium graveolens* (L., 1753), *Carum carvi* (L., 1753), *Curcuma zedoaria* (Roscoe, 1807), *Piper longum* e *Illicium verum* (Hook. F., 1888) e por Dua *et al.* (2008) com *Valeriana jatamansi* (Jones, 1790).

Existem poucos trabalhos que testam a ação pupicida e adulticida com extratos de Annonaceae no controle do *A. aegypti*. Assim sendo, este estudo teve por objetivo verificar a atividade inseticida de extratos de araticum, *Annona coriacea* (Mart., 1841), sobre pupas e adultos de *A. aegypti*, em condições de laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação dos extratos

Os frutos maduros da *A. coriacea* foram coletados em áreas de Cerrado no município de Tangará da Serra-MT e transportados ao Laboratório de Entomologia da Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT - Campus Tangará da Serra. As sementes foram separadas e mantidas em estufa de ventilação forçada à temperatura de 40°C, até a estabilização da matéria seca. Em seguida, as sementes foram moídas em moinho elétrico de facas até atingirem baixa granulometria. Para 500g de sementes moídas de *A. coriacea* foram adicionados 1.500 mL de solvente etanol e, por percolação permaneceu durante 72 horas em temperatura ambiente. A suspensão foi filtrada em funil Büchner. O solvente foi evaporado em evaporador rotativo a vácuo (rotavapor) para que desta forma se obtivesse o extrato bruto etanólico de *A. coriacea*. O processo de extração de *A. coriacea* com etanol resultou em 51,5 g de extrato bruto.

Colônia de Mosquito *Aedes aegypti*

A criação do *A. aegypti* originou-se de ovos doados pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPTSP, da Universidade Federal de Goiás – UFG. As larvas para os bioensaios foram criadas no Laboratório de Entomologia da UNEMAT, Campus Cáceres-MT.

A metodologia de criação de *A. aegypti* foi adaptada de SILVA *et al.* (1998). Os adultos foram mantidos numa gaiola de

criação, contendo em seu interior um chumaço de algodão, embebido em solução açucarada a 10%. As fêmeas foram alimentadas com camundongos presos numa tela, em dias alternados durante 6 horas. No interior da gaiola de criação, colocou-se papel filtro em forma de cone, para postura, sendo este trocado diariamente.

Para obtenção das larvas, o papel filtro contendo ovos foi colocado em um recipiente plástico com água. Após a eclosão, as larvas foram alimentadas até o pupamento com ração para gatos previamente triturada. As pupas foram colocadas em copos tipo âmbar recobertos com tecido de organza até a emergência dos adultos, que em seguida eram transferidos para a gaiola de criação. Ovos, larvas e pupas do mosquito foram mantidas em câmara climatizada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $80 \pm 5\%$ e fotofase de 12 horas.

Os bioensaios foram conduzidos sob temperatura de $28,5 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

Bioensaios

Os testes foram baseados na metodologia da Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION 2005, 2006), com adequações para pupas e adultos. Para os bioensaios preparou-se uma solução-mãe solubilizada em 0,2% de dimetilsulfóxido (DMSO), sendo as concentrações testadas dissolvidas em água.

No bioensaio de ação pupicida as concentrações testadas foram de 50, 100, 200, 300, 400 e 500 ppm. Foram utilizadas dez pupas com no máximo 24 horas de idade, para cada repetição dos diferentes tratamentos, sendo dispostas em copos de polietileno (50 mL) com 25 mL da solução teste. Esses copos foram fixados no fundo de potes de polietileno (500 mL), contendo uma tampa recoberta com tecido do tipo organza para avaliar a emergência de adultos. O

bioensaio foi realizado em quadriplicada e avaliado 48 horas após o início da exposição.

Para o teste adulticida, foram borrifados em papel filtro ($12 \times 15 \text{ cm}^2$) 2 mL solução nas concentrações de 1000, 2000, 4000, 6000, 8000, 10000 ppm. O papel filtro ficou durante 24 horas em temperatura ambiente para secagem. Posteriormente 20 fêmeas de 2 a 5 dias de idade e não alimentadas com sangue, foram liberadas no interior de tubos de PVC (40 mm x 15 cm) revestido com papel filtro tratado. O bioensaio foi realizado em triplicata e a mortalidade foi avaliada após 24 horas.

Nos grupos controles dos bioensaios para pupa e adulto de *A. aegypti* utilizou-se DMSO a 0,2%.

Análise estatística

Para os bioensaios utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, sendo os valores de mortalidade sob efeito da concentração dos extratos, submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% utilizando o programa STATISTIC 7.0 para análise dos dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A mortalidade de pupas de *A. aegypti* apresentou diferença significativa entre as concentrações de *A. coriacea* testadas após 48 horas de exposição ($p < 0,05$). A ação pupicida foi crescente, de acordo com o aumento da concentração do extrato bruto de *A. coriacea*, apresentando mortalidades de 45,0 e 62,5% sob 400 e 500 ppm, respectivamente. As concentrações abaixo de 300 ppm não causaram mortalidade de pupas (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito das concentrações de extrato bruto etanólico de *Annona coriacea* sobre mortalidade em pupas de *Aedes aegypti* em 48 horas de exposição ($p < 0,05$).

Concentrações	n	¹ Média±EP Mortalidade pupas	%	Média emergência de adulto	% Mortalidade Adultos recém emergidos
0 ppm	10	0,0±0,00c	0,0	10,0	5,0
50 ppm	10	0,7±0,25c	7,5	9,25	43,2
100 ppm	10	0,7±0,25c	7,5	9,25	64,9
200 ppm	10	1,0±0,41c	10,0	9,00	77,8
300 ppm	10	2,2±1,25bc	22,5	7,75	71,0
400 ppm	10	4,5±1,20ab	45,0	5,50	86,4
500 ppm	10	6,2±0,75a	62,5	3,75	93,3

¹Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Na avaliação de adultos recém emergidos, observou-se uma tendência de aumento percentual na mortalidade de *A. aegypti*, a partir da menor concentração, alcançando 93,3% nas pupas tratadas com 500 ppm de extrato bruto de sementes de *A. coriacea* (Tabela 1). Foi possível observar que 92,3% dos adultos morreram logo após a emergência, pois a maioria não conseguia voar para fora do recipiente com extrato, enquanto 4,6% dos adultos morreram presos a exúvia e apenas 3% morreram fora do recipiente com a concentração, reduzindo desta forma, as chances de disseminação do mosquito.

O extrato de *A. coriacea* não apresentou atividade adulticida sobre *A. aegypti* nas diferentes concentrações testadas, pois na maior concentração (10000 ppm) a mortalidade foi de apenas 6,6%, enquanto que nas demais concentrações foi inferior a 5%, indicando que não houve diferença estatística na mortalidade em relação ao controle ($p < 0,05$).

Atualmente são apresentadas várias pesquisas com extratos de plantas para o controle de *A. aegypti*, principalmente com ação larvicida. Novas pesquisas estão sendo desenvolvidas para avaliar o efeito destes

extratos sobre as fases de pupa e adulto do mosquito.

A ação pupicida do extrato de *A. coriacea* sobre *A. aegypti* foi observada nas maiores concentrações, provavelmente isso se deve ao fato das pupas estarem protegidas pela última exúvia larval, dificultando a ação do extrato. Esta barreira possivelmente seria rompida com a utilização de altas concentrações do extrato, como foi observado nas pesquisas desenvolvidas por Murugan *et al.* (2007) com extratos de *A. amara* e *O. basilicum*, que obtiveram ação pupicida nas concentrações de 20.000 a 100.000 ppm.

Trabalhos com atividade pupicida com outros culicídeos foram apresentados por Macchioni *et al.* (2004) com *Codonopsis javanica* (Hook F; Thoms, 1855) sobre *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) com 75% de mortalidade de pupas na concentração de 60.000 ppm. Nathan *et al.* (2006) com extratos de folhas e sementes de *Melia azedarach* (L., 1753) sobre *A. stephensi* alcançaram respectivamente 92,3 e 90,9% de mortalidade em 20.000 ppm. Nathan (2007) testou *Eucalyptus tereticornis* (Sm., 1795) sobre *Anopheles stephensi* (Liston, 1901) e constatou que a 160 ppm matou 88% das pupas.

Verificou-se que a mortalidade de adultos recém-emergidos foi expressiva nas concentrações de 100 a 500 ppm (Tabela 1). A mortalidade de adultos recém-emergidos pode estar relacionada com a ação de contato com o extrato de *A. coriacea*, presente na solução-teste, sob o mosquito adulto. Sharma *et al.* (2006) observaram que a mortalidade de adultos de *A. stephensi* ocorreu em altas concentrações de *Azadirachta indica* A. Jussieu.

Nesta pesquisa observou-se que os adultos recém emergidos não conseguiam voar para fora do recipiente com extrato, ou morriam presos a exúvia. Tal resultado pode estar relacionado ao efeito inibidor de emergência causado pelo extrato de *A. coriacea* sobre *A. aegypti*.

O efeito inibidor de emergência de adultos de *A. aegypti* foi observado por Guarido (2009) em extratos de *Annona foetida* onde a mortalidade foi principalmente entre a troca de estágio larval, larval-pupal e pupal-adulto e concluiu que esse tipo de mortalidade ocorre principalmente nos inseticidas que são análogos aos hormônios reguladores de crescimento.

Aguilera *et al.* (2003) e Luna *et al.* (2004) verificaram que o efeito do extrato sobre as diferentes fases de desenvolvimento do mosquito pode estar relacionado com a tolerância da fase biológica de *A. aegypti* aos mecanismos de ação do extrato, além dos métodos e das concentrações utilizadas. No bioensaio adulticida as concentrações utilizadas do extrato de *A. coriacea* não apresentaram mortalidade significativa sobre *A. aegypti*. No entanto, Hidayatulfathi *et al.* (2004) obtiveram resultados de ação adulticida sobre *A. aegypti* com *A. calamus*, *L. elliptica* e *P. aduncum* com concentrações de até 50.000 ppm, enquanto Dua *et al.* (2008) com *V. jatamansi* em 100.000 ppm. Vale ressaltar que, apesar da metodologia de obtenção dos extratos desta pesquisa, ser semelhante aos autores citados acima,

verifica-se que as concentrações testadas nos trabalhos supracitados foram maiores, indicando que, provavelmente seriam necessárias altas doses de extrato de *A. coriacea* para obter ação adulticida significativas.

CONCLUSÃO

Diante do exposto verificou-se que o extrato da *A. coriacea* apresenta atividade pupicida sobre *A. aegypti*, sendo expressiva a mortalidade de adultos logo após a emergência. Nesse sentido, pesquisas devem ser desenvolvidas para verificar o efeito residual deste extrato na água, uma vez que uma única aplicação na fase de larva poderá controlar o vetor nas demais fases de desenvolvimento.

O extrato de *A. coriacea* não apresentou atividade adulticida sobre *A. aegypti* expostos à superfície seca após tratamento com extrato de *A. coriacea*. Todavia, novas pesquisas precisam ser desenvolvidas com concentrações mais elevadas e outras abordagens metodológicas como a aplicação tópica do extrato.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a profª Drª Heloisa Helena Garcia da Silva e a técnica Carmeci Natalina Elias do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILERA, L.; NAVARRO, A.; TACORONTE, J.E.; LEYVA, M.; MARQUETTI, M.C. 2003. Efecto letal de myrtaceas cubanas sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Cubana de Medicina Tropical**. v. 55, p.100-4.

- BRAGA, I.A.; LIMA, J.B.P.; SOARES, S.S.; VALLE, D. 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Memoria do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 99, p.199-203.
- CARVALHO, M.S.L.; CALDAS, E.D.; DEGALLIER, N.; VILARINHOS, P.T.R.; SOUZA, L.C.K.R.; YOSHIZAWA, M.A.C.; KNOX, M.B.; OLIVEIRA, C. 2004. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. **Revista de Saúde Pública**. v. 38, p.623-9.
- CHAIYASIT, D.; CHOOCHOTE, W.; RATTANACHANPICHAI, E.; CHAITHONG, U.; CHAIWONG, P.; JITPAKDI, A.; TIPPAWANGKOSOL P.; RIYONG, D.; PITASAWAT, B. 2006. Essential oils as potential adulticides against two populations of *Aedes aegypti*, the laboratory and natural field strains, in Chiang Mai province, northern Thailand. **Parasitology Research**. v. 99, p. 715–21.
- CHOOCHOTE, W.; CHAITHONG, U.; KAMSUK, K.; RATTANACHANPICHAI, E.; JITPAKDI, A.; TIPPAWANGKOSOL, P.; CHAIYASIT, D.; CHAMPAKAEW, D.; TUETUN, B.; PITASAWAT, B. 2006. Adulticidal activity against *Stegomyia aegypti* (Diptera: Culicidae) of three *Piper* spp. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. v. 48, p. 33-7.
- DUA, V.K.; ALAM, M.F.; PANDEY, A.C.; RAI, S.; CHOPRA, A.K.; KAUL, V.K.; DASH, A.P. 2008. Insecticidal activity of *Valeriana jatamansi* (valerianaceae) against mosquitoes. **Journal of the American Mosquito Control Association**. v. 24, p.315–8.
- FERREIRA, P.M.; CARVALHO, A.F.; FARIAS, D.F.; CARIOLANO, N.G.; MELO, V.M.; QUEIROZ, M.G.; MARTINS, A.M.; MACHADO-NETO, J.G. 2009. Larvicidal activity of the water extract of *Moringa oleifera* seeds against *Aedes aegypti* and its toxicity upon laboratory animals. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 81, p. 207-16.
- GUARIDO, M.M. 2009. Atividade inseticida de extratos de *Annona foetida* Mart. (Annonaceae) sobre imaturos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). 2009. 69f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Paraná. Curitiba.
- GERIS, R.; SILVA, I.G.; SILVA, H.H.G.; BARISON, A.; RODRIGUES-FILHO, E.; FERREIRA, A.G. 2008. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. v. 50, p.25-8.
- GLASSER, C.M.; DONALÍSIO, M.R. 2002. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v. 5, p.259-72.
- HIDAYATULFATHI, O.; SALLEH-UDDIN, S.; IBRAHIM, J. 2004. Adulticidal activity of some Malaysian plant extracts against *Aedes aegypti* Linnaeus. **Tropical Biomedica**. v. 21, p.61-7.
- LIMA, J.B.P.; MELO, N.V.; VALLE, D. 2005. Residual effect of two *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* products assayed against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in laboratory and outdoors at Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina tropical**. v. 47, p.125-30.
- LUNA, J.E.D.; MARTINS, M.F.; ANJOS, A.F.; KUWABARA, E.F.; NAVARRO, M.A.S. 2004. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. **Revista de Saúde Publica**. v. 38, p.824-3.

- MACCHIONI, F.; CARUGINI, S.; CECCHI, F.; SICILIANO, T.; BRACA, A.; CIONI, P.; MORELLI, I. 2004. Aqueous extract of *Codonopsis javanica* against larval and pupal stages of *Aedes albopictus*. **Annali della Facoltà di Medicina Veterinária**. v. 57, p.215-20.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde, 2005. Guia de vigilância epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde. p. 231-253.
- MURUGAN, K.; MURUGAN, P.; NOORTHEEN, A.; 2007. Larvicidal and repellent potential of *Albizia amara* Boivin and *Ocimum basilicum* Linn against dengue vector, *Aedes aegypti* (Insecta:Diptera:Culicidae). **Bioresource Technology**. v. 98, p.198-201.
- NATHAN, S.S.; SAVITHA, G.; GEORGE, D.K.; NARMADHA, A.; SUGANYA, L.; CHUNG, P.G. 2006. Efficacy of *Melia azedarach* L. extract on the malarial vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). **Bioresource Technology**. v. 97, p.1316-23.
- NATHAN, S.S. 2007. The use of *Eucalyptus tereticornis* Sm. (Myrtaceae) oil (leaf extract) as a natural larvicidal agent against the malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). **Bioresource Technology**. v. 98, p.1856-60.
- SÁ, R.A.; SANTOS, N.D.L.; SILVA, C.S.B.; NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F.S.; CAVADA, B.S. 2009. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 149, p.300-306.
- SHARMA, P.; MOHAN, L.; SRIVASTAVA, C.N. 2006. Impact analysis of Neem kernel extracts on the developmental profile of *Anopheles stephensi*. **Journal Ásia-Pacific Entomology**. v. 9, p.11-7.
- SILVA, H.H.G.; SILVA, I.G.; LIRA, K.S. 1998. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus,1762) em laboratório. **Revista de Patologia Tropical**. v. 27, p.51-63.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2006. Guidelines for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets. Geneva: World Health Organization. Switzerland, p.1-70.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2005. Guildelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Geneva: World Health Organization. Switzerland, p.1-41.