

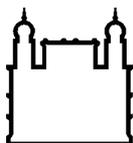
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

MICHELE TEIXEIRA SERDEIRO

ESTRATÉGIA DE CONTROLE DA POPULAÇÃO DE *Aedes aegypti*  
ATRAVÉS DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DE  
PRODUTOS NATURAIS ORIUNDOS DE PLANTAS ASSOCIADA A  
AÇÕES DE EDUCAÇÃO EM SAÚDE NO ESTADO DO RIO DE  
JANEIRO

Rio de Janeiro  
Dezembro de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

*MICHELE TEIXEIRA SERDEIRO*

ESTRATÉGIA DE CONTROLE DA POPULAÇÃO DE *Aedes aegypti* ATRAVÉS DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DE PRODUTOS NATURAIS ORIUNDOS DE PLANTAS ASSOCIADA A AÇÕES DE EDUCAÇÃO EM SAÚDE NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título  
de Doutora em Ciências.

**Orientadoras:** Profa. Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet  
Profa. Dra. Marise Maleck

**RIO DE JANEIRO**

Dezembro de 2017

Serdeiro, Michele Teixeira.

Estratégia de controle da população de *Aedes aegypti* através da avaliação da atividade larvicida de produtos naturais oriundos de plantas associadas à ações de educação em saúde no Estado do Rio de Janeiro / Michele Teixeira Serdeiro. - Rio de Janeiro, 2017.

164 f.; il.

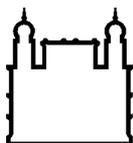
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2017.

Orientadora: Jacenir Reis dos Santos-Mallet.

Co-orientadora: Marise Maleck.

Bibliografia: f. 137-150

1. *Aedes aegypti*. 2. Atividade larvicida. 3. Produtos naturais. 4. Educação em saúde. 5. Brasil sem Miséria. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

***AUTORA: MICHELE TEIXEIRA SERDEIRO***

**ESTRATÉGIA DE CONTROLE DA POPULAÇÃO DE *Aedes aegypti* ATRAVÉS  
DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DE PRODUTOS NATURAIS  
ORIUNDOS DE PLANTAS ASSOCIADA A AÇÕES DE EDUCAÇÃO EM SAÚDE  
NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

**ORIENTADORAS: Profa. Dra. Jacenir Reis dos Santos-Mallet**

**Profa. Dra. Marise Maleck**

**Aprovada em: 18/12/2017**

### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Helcio Reinaldo Gil Santana - Presidente (IOC/FIOCRUZ)**

**Profa. Dra. Georgia Atella (UFRJ/RJ)**

**Prof. Dr. José Mario D'Almeida (UFF/RJ)**

**Prof. Dr. Ronaldo Figueiró Portella Pereira (UEZO/RJ)**

**Prof. Dr. Carlos Manuel Dutok Sánchez (UNIFAP/AP)**

**Profa. Dra. Paloma Martins Mendonça (USS/RJ)**

**Prof. Dr. Ademir de Jesus Martins Junior (IOC/FIOCRUZ)**

Rio de Janeiro, 18 de dezembro de 2017

Dedico este trabalho a população de  
Vassouras, RJ.

## AGRADECIMENTOS

Aqui deixo os meus sinceros agradecimentos:

A meu pai, Luiz Cláudio (*in memoriam*). Sei que ele está feliz por mim e iluminando o meu caminho;

A minha mãe, Neila, exemplo de coragem e determinação, e ao Francisco, um “padrinho” de verdade, pela preocupação, pelo amor e apoio incondicionais, que me fortaleceu para esta caminhada, e principalmente, por todo o sacrifício que fizeram por nós e me fez chegar até aqui;

A meu irmão Daniel e cunhada Camile pelo apoio, torcida e amizade eterna;

Aos meus avós paternos Vanderlei e Vanda e meus avós maternos Jorge e Neuza, principalmente a elas que são os nossos alicerces, pela compreensão da minha ausência, pelas orações, pelo amor incondicional e por terem me passado toda a sabedoria de vida. Senti muitas saudades!;

Aos meus tios Jairo, Jonas e Anderson e minhas tias Jane e Bete pelas orações, pela torcida e por sempre participarem das nossas vidas com muito amor, preocupação e amizade;

Aos meus primos Felipe, Rafa, Ley, Gabriel, João, Manuel, Igor e Arthur e minha prima Lívia pelo grande carinho que sempre vi em seus semblantes;

Àqueles com os quais passei a maior parte do meu tempo durante os anos de dedicação a pesquisa, meus amigos do LIV/USS Simone, Thiago e Igor pela amizade, pelos momentos divertidos que passamos e pela valiosa ajuda nos projetos de pesquisa. Não sei o que seria de mim sem vocês! Obrigada, pessoal!!  
#nesf!;

À minha orientadora Profa. Dra. Jacenir Mallet pela oportunidade, dedicação, confiança, amizade, incentivo e, acima de tudo, pelo carinho e respeito. Ela não tem ideia o quanto foi importante nesta etapa! Muito obrigada!;

À minha orientadora Profa. Dra. Marise Maleck pela oportunidade, dedicação, confiança e amizade. Afinal, foram dez anos de convivência que se iniciou quando eu ainda era aluna de Iniciação Científica, e nada sabia da vida acadêmica e científica. Serei grata para sempre!

Ao Professor Dr Hélcio Gil Santana pela importante contribuição com suas valiosas sugestões que enriqueceram a redação final da tese;

À família LIV/USS pela amizade, apoio, companheirismo e por todo o tempo que passamos juntos;

Aos amigos do LIVEDH/IOC Nathanielly, William, Wagner, Cristina, Maria Luíza, Simone Teves, Amanda, Simone Costa, Alice e Daniele pelos momentos divertidos que passamos no laboratório;

À família LIVEDH/IOC pela carinhosa acolhida e apoio durante a jornada;

À Professora Dra. Simone Freitas pela ajuda no processamento do meu material da microscopia eletrônica de transmissão;

À Coordenação da Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ pelo incentivo e oportunidade de realização do curso;

Aos professores da Pós-graduação em Medicina Tropical que durante os quatro anos de curso contribuíram para a minha formação, em especial a coordenadora do curso, Dra Martha Suárez;

À Lívia Villar que sempre se mostrou paciente, presente e prestativa em todos os momentos do decorrer do curso;

Ao Professor Eduardo Leal pela orientação no estágio à docência na disciplina Zoologia dos Invertebrados no curso de Ciências Biológicas/UERJ;

À população de Vassouras/RJ que abraçou o projeto Educação Antidengue com muito carinho e empolgação. Obrigada pela brilhante participação!;

À FAPERJ pelo apoio financeiro e científico através dos projetos Rede Zika#1, Educação Antidengue e Educação Antidengue na Rota do Mosquito;

À CAPES-Brasil sem Miséria pela bolsa de doutorado concedida durante os quatro anos de trabalho;

Ao amigo Diego Luiz pela ilustração do ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*;

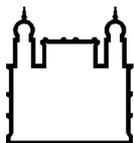
Aos professores José Maria Barbosa-Filho, André Marques e Cláudia Gontijo pela parceria durante toda a minha jornada acadêmica;

Ao CENABIO/UFRJ pelo uso microscópio eletrônico de transmissão;

À Plataforma de Microscopia Eletrônica do IOC pelos cortes histológicos das larvas de *Aedes aegypti*;

Ao meu amor Alexandre, que tem toda a minha admiração, pela paciência nas minhas maluquices (risos), companheirismo, dedicação e por sempre cuidar de mim;

Enfim, a todos aqueles que participaram direta e indiretamente de mais uma etapa da minha vida. Só tenho a agradecer!!!.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

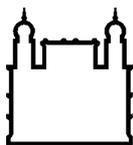
## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### ESTRATÉGIA DE CONTROLE DA POPULAÇÃO DE *Aedes aegypti* ATRAVÉS DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DE PRODUTOS NATURAIS ORIUNDOS DE PLANTAS ASSOCIADA A AÇÕES DE EDUCAÇÃO EM SAÚDE NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

#### TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Michele Teixeira Serdeiro

*Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) é reconhecido como transmissor de arboviroses de importância na saúde pública, como a Dengue, Zika, Chikungunya que são responsáveis pelo elevado número de morbidade, mortalidade e consequências severas à saúde da população brasileira. Tem-se reforçado a busca por uma estratégia no controle do mosquito vetor. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade larvicida de produtos naturais de plantas sobre as larvas de *Ae. aegypti* na busca de novas alternativas para o seu controle, conciliando ações educativas no controle de *Ae. aegypti* como ação concreta de apoio ao Plano Brasil sem Miséria. Na busca de um fitolarvicida, utilizou-se como ferramenta de estudo as espécies vegetais *Cecropia catharinensis* Cuatrec (Urticaceae), *Ottonia anisum* Sprengel (Piperaceae), *Podophyllum hexandrum* Royale (Berberidaceae) e óleos essenciais terpenóides. Os resultados demonstraram o potencial larvicida dessas espécies sobre *Ae. aegypti*. No que tange à proposta de promover a educação para o controle de *Ae. aegypti*, este trabalho foi desenvolvido através de atividades lúdicas e didáticas nas escolas públicas e particulares do Centro-Sul Fluminense e em centros culturais e espaços públicos do Estado do Rio de Janeiro. Nas ações participaram 2.500 pessoas e os resultados apontaram respostas positivas acima de 80% sobre o tema *Aedes*-dengue-controle. A proposta de “educar com diversão” forneceu subsídios importantes para o conhecimento sobre o mosquito vetor da dengue e para mudanças de comportamento. Também foi desenvolvido material informativo como livro de atividades “O mosquito Dengoso” destinado ao público infantil e o “Cordel do Dr. Mosquitão”.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

*Aedes aegypti* POPULATION CONTROL STRATEGY THROUGH THE EVALUATION OF THE LARVICIDA ACTIVITY OF NATURAL PRODUCTS FROM PLANTAS ASSOCIATED WITH HEALTH EDUCATION ACTIONS IN THE STATE OF RIO DE JANEIRO

### ABSTRACT

#### PHD THESIS IN MEDICINA TROPICAL

**Michele Teixeira Serdeiro**

*Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) is recognized as a transmitter of several arboviruses of public health importance, such as dengue, zika, chikungunya, which are responsible for the high number of morbidity, mortality and severe health consequences of the Brazilian population. It has been reinforced the search for a strategy in the control of the mosquito vector. The present study aimed to evaluate the larvicidal activity of natural plant products on the larvae of *Ae. aegypti* in the search for new alternatives for its control, conciliating educational actions in the control of *Ae. aegypti* as concrete action in support of the Plano Brasil sem Miséria. *Cecropia catharinensis* Cuatrec (Urticaceae), *Ottonia anisum* Sprengel (Piperaceae), *Podophyllum hexandrum* Royale (Berberidaceae) and terpenoid essential oils were used as a study tool. The results showed the larvicidal potential of these species on *Ae. aegypti*. With regard to the proposal to promote education for the control of *Ae. aegypti*, In order to promote education for the control of the dengue virus mosquito vector, this work was developed through recreational and educational activities in Central-South Rio de Janeiro state public and private schools, cities, cultural centers and public spaces. The results showed positive responses above 80% of the *Aedes*-dengue control issue. The project had 2500 participants. The proposal of "educating with fun" provided important subsidies for the knowledge about the mosquito vector of dengue and for changes in behavior. Also, as part of educational practices were developed information materials as a book of activities "O mosquito Dengoso" destined to the children's public and "O Cordel do Dr. Mosquitão".

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>X</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Culicídeos</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> .....	1
1.1.1.1 Distribuição .....	2
1.1.1.2 Ciclo de vida .....	2
1.1.1.3 Importância Epidemiológica.....	6
1.1.1.3.1 Febre amarela .....	6
1.1.1.3.2 Dengue .....	8
1.1.1.3.3 Chikungunya.....	9
1.1.1.3.4 Zika.....	9
1.1.5 Controle do mosquito <i>Ae. aegypti</i> .....	10
1.1.5.1 Métodos de controle vetorial.....	10
<b>1.2 Produtos naturais de origem vegetal</b> .....	<b>11</b>
1.2.1 Plantas com atividade biológica sobre insetos .....	12
1.2.1.1 Atividade biológica sobre <i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i> .....	13
<b>1.3 O Plano Brasil sem Miséria</b> .....	<b>14</b>
1.3.1 Dengue e o Plano Brasil sem Miséria .....	15
1.3.2 Educação em Saúde para o controle da Dengue .....	16
<b>1.4 Justificativa</b> .....	<b>19</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>21</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS; RESULTADOS</b>	<b>22</b>
<b>CAPÍTULO I- PRODUTOS NATURAIS DE PLANTAS COM ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE <i>Aedes aegypti</i> E <i>Aedes albopictus</i></b>	<b>23</b>
<b>Artigo 1 (Publicado): <i>Aedes aegypti</i>: modelo experimental de atividade biológica de fitoprodutos</b> .....	<b>24</b>

<b>Artigo 2 (Publicado):</b> Larvicidal activity of <i>Ottonia anisum</i> metabolites against <i>Aedes aegypti</i> : a potencial natural alternative source for mosquito vector control in Brazil .....	30
<b>Artigo 3 (Publicado):</b> Toxicity and larvicidal activity of Podophyllum-Based lignans against <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae) .....	39
<b>Artigo 4 (Publicado):</b> Larvicidal activity of lignan desoxypodophyllotoxin against <i>Aedes albopictus</i> .....	48
<b>Artigo 5:</b> Atividade larvica de óleos essenciais (terpenoides) sobre <i>Aedes aegypti</i> . (Manuscrito em preparação) .....	53
<b>CAPÍTULO II- Ações de educação e saúde no controle de <i>Aedes aegypti</i> em consonância com o Brasil sem Miséria.....</b>	<b>95</b>
<b>Livro de atividades: O mosquito dengoso .....</b>	<b>96</b>
<b>Cordel do Dr Mosquitão .....</b>	<b>112</b>
<b>Artigo 41 (Publicado):</b> Educação Antidengue: um relato de experiência .....	<b>119</b>
<b>4 DISCUSSÃO</b>	<b>129</b>
<b>5 CONCLUSÕES</b>	<b>134</b>
<b>6 REFERÊNCIAS</b>	<b>136</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1-</b> Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	<b>4</b>
<b>FIGURA 2-</b> Ovos de <i>Aedes aegypti</i>	<b>4</b>
<b>FIGURA 3-</b> Larva de <i>Aedes aegypti</i>	<b>4</b>
<b>FIGURA 4-</b> Pupa de <i>Aedes aegypti</i>	<b>5</b>
<b>FIGURA 5-</b> Pupas de <i>Aedes aegypti</i>	<b>5</b>

## LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: Artigo 5: Atividade larvicida de óleos essenciais sobre *Aedes aegypti*. (Manuscrito em preparação).

**Tabela 1-** Desenvolvimento (A), viabilidade (B) e mortalidade (C) de *Aedes aegypti* em larvas L3 tratadas com dihydrojasnone nas concentrações de 1-100 µg/mL. **60**

**Tabela 2-** Desenvolvimento (A), viabilidade (B) e mortalidade (C) de *Aedes aegypti* em larvas L3 tratadas no meio de criação com farnesol nas concentrações 1-90 µg/mL. **62**

**Tabela 3-** Desenvolvimento (A), viabilidade (B) e mortalidade (C) de *Aedes aegypti* em larvas L3 tratadas no meio de criação com thymol nas concentrações 1-80 µg/mL. **64**

**Tabela 4-** Duração do desenvolvimento (A), viabilidade (B) e mortalidade (C) de *Aedes aegypti* em larvas L3 tratadas no meio de criação com P-cymene nas concentrações de 1-80 µg/mL. **66**

**Tabela 5-** Desenvolvimento (A), viabilidade (B) e mortalidade (C) de *Aedes aegypti* em larvas L3 tratadas no meio de criação com óleo essencial nerolidol nas concentrações de 1-60 µg/mL. **68**

**Tabela 6-** Desenvolvimento (A), viabilidade (B) e mortalidade (C) de *Aedes aegypti* em larvas L3 tratadas no meio de criação com óleo essencial carvacrol nas concentrações de 1-60 µg/mL. **70**

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACE	Agente de Combate a Endemias
ACS	Agente Comunitário de Saúde
BSM	Brasil sem Miséria
°C	grau Celsius
CL <sub>50</sub>	Concentração Letal Média
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DENV-1	Dengue Vírus Tipo 1
DENV-2	Dengue Vírus Tipo 2
DENV-3	Dengue Vírus Tipo 3
DENV-4	Dengue Vírus Tipo 4
DMSO	Dimetilsulfóxido
µg/mL	Micrograma por mililitro
PNCD	Programa Nacional de Controle da Dengue
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-americana da Saúde
WHO	World Health Organization

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CULICÍDEOS

Os culicídeos são insetos pertencentes à ordem Diptera, Subordem Nematocera, família Culicidae. Distribuem-se aproximadamente 113 gêneros, incluídos em duas subfamílias: Anophelinae e Culicinae (HARBACH, 2008a). Apresentam-se disseminados por todas as regiões do globo, sendo a área neotropical a que detém o maior nível de endemidade (WARD, 1982). Esses insetos, popularmente conhecidos como mosquitos, pernilongos, muriçocas e carapanãs são alados e terrestres na fase adulta, enquanto as formas imaturas são aquáticas. As fêmeas da grande maioria das espécies são hematófagas. Desde a antiguidade vêm sendo apontados como transmissores de agentes etiológicos causadores de doenças ao homem e/ou a outros animais, representando por isso, ameaça à saúde pública global (FORATTINI, 2002).

Na subfamília Anophelinae encontramos os anofelinos, mosquitos responsáveis pela transmissão de patógenos causadores da Malária. A subfamília Anophelinae reúne três gêneros: *Anopheles* Meigen, cosmopolita; *Chagasia* Cruz, restrito à região Neotropical e *Bironella* Theobald, existente apenas na região Australiana (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Já os culicíneos são incriminados como vetores dos patógenos causadores das seguintes doenças: Filariose Bancroftiana, Dengue, Febre Amarela, assim como mais de 150 arboviroses (LUZ e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1996). Culicinae abrange 3076 espécies, distribuídas em 11 tribos, constituídas por 110 gêneros (HARBACH, 2008b). A Tribo Aedini inclui três gêneros que ocorrem no Brasil: *Aedes* Meigen, 1818, *Psorophora* Robineau-Desvoidy, 1827 e *Haemagogus* Willisto, 1896 (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). O gênero *Aedes* Meigen, 1818 apresenta uma grande diversidade, compreendendo mais de 900 espécies distribuídas em 78 subgêneros (HARBACH, 2008c).

### 1.1.1 *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*

*Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) pertencem ao Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Diptera, Família Culicidae, Subfamília Culicinae, Tribo Aedini, Gênero *Aedes*, Subgênero *Stegomyia* (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2015).

#### 1.1.1.1 Distribuição

*Aedes aegypti* é originário da África e chegou às Américas provavelmente durante a colonização, por meio das embarcações vindas do continente africano (PONTES e RUFINO, 1994). É uma espécie sinantrópica que apresenta íntima associação com os seres humanos (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). As fêmeas de *Ae. aegypti* são encontradas principalmente no ambiente urbano, sempre próximas ao peridomicílio e ao domicílio humano (BRAGA e VALLE, 2007). A espécie está disseminada em regiões tropicais e subtropicais da África, das Américas, da Ásia e Oceania. No Brasil, é encontrada em todo território nacional.

*Aedes albopictus* é uma espécie originária do Sudeste Asiático que expandiu drasticamente sua distribuição geográfica mundial nos últimos 30 anos facilitada pelas atividades humanas, em particular o comércio de pneus usados que continham ovos (PAUPY et al., 2009). *Ae. albopictus* é exofágico, sendo encontrado em ambiente silvestre, rural, periurbano e urbano (EIRAS, 2011). A espécie está disseminada em áreas tropicais, subtropicais e temperadas da Ásia, dos oceanos Índico e Pacífico, Europa mediterrânea, Austrália e Américas. Foi relatado pela primeira vez no território brasileiro em 1986 nos Estados do Rio de Janeiro (RJ) e Minas Gerais (MG) (FORATTINI, 1986). Desde então, espalhou-se pelo Brasil, sendo encontrado em todo território brasileiro (CARVALHO, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA e BRAGA, 2014).

#### 1.1.1.2 Ciclo de vida

Os mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* apresentam ciclo de vida com metamorfose completa, passando pelos seguintes estágios de desenvolvimento: ovo, quatro estádios larvais, pupa e mosquito adulto, sendo as formas imaturas aquáticas e a forma adulta terrestre e alada (BRASIL, 2001; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2015). Esse ciclo pode se completar entre 7 a 10 dias (BRASIL, 2001) e está descrito resumidamente na figura 1.

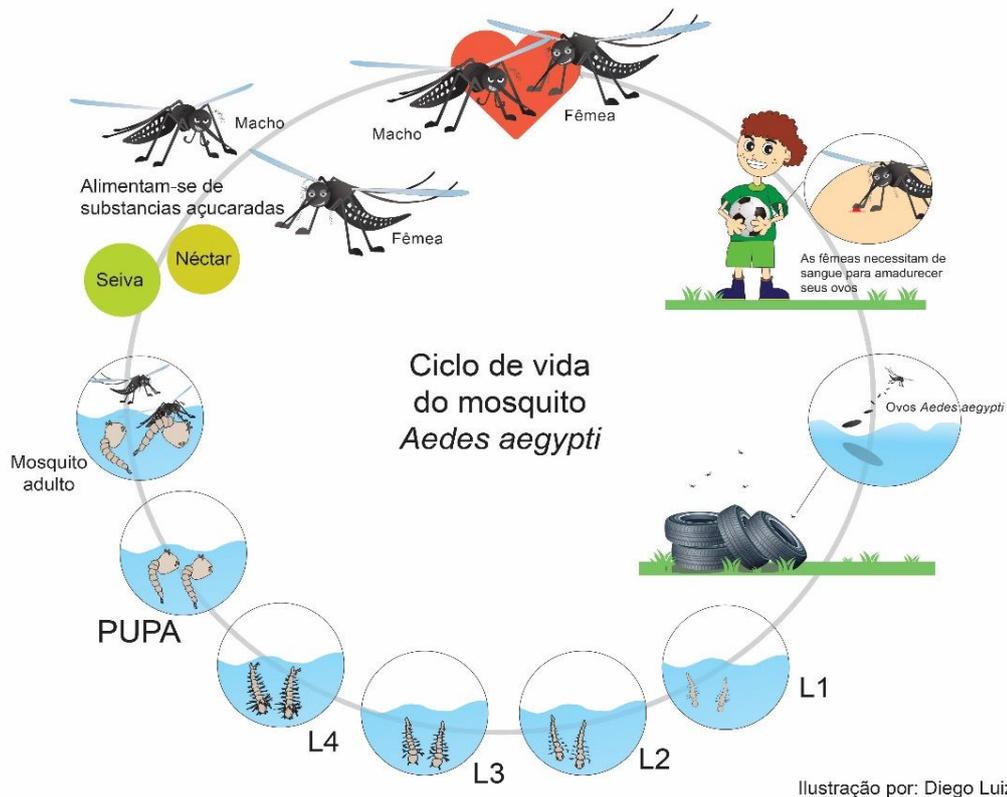


Figura 1. Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. Serdeiro MT e Cruz DLS.

As fêmeas e os machos adultos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* alimentam-se de substâncias açucaradas encontradas na natureza. Enquanto o macho é fitófago, as fêmeas necessitam ingerir sangue para a maturação de seus ovos e buscam uma fonte sanguínea para se alimentar. Elas sugam o sangue de mamíferos, sendo, no entanto, os humanos as fontes sanguíneas mais procuradas, em especial pelas fêmeas de *Ae. aegypti*, reconhecidamente antropofílicas (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2015). As fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* podem picar a qualquer hora do dia, porém, o pico de atividade hematofágica ocorre durante o crepúsculo matutino e vespertino (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Após realizarem o repasto sanguíneo, procuram recipientes contendo, preferencialmente, água limpa e parada para oviposição. Como espécie urbana, *Ae. aegypti* utiliza recipientes artificiais que podem ser desde caixa d'água, toneis e piscinas até pneus, latas, vasos de plantas, ralos, lixos, ou qualquer outro que possa acumular água enquanto que *Ae. albopictus* ovipõe nos criadouros mencionados para *Ae. aegypti*, além de recipientes naturais como bambus e troncos de árvores (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2015). Os ovos são depositados individualmente (Figura 2), aderidos à parede interna dos criadouros, logo acima da superfície da água. Uma vez completado o desenvolvimento embrionário, os ovos são capazes de

permanecerem viáveis por semanas ou meses em locais secos aguardando o contato com a água para ocorrer a eclosão (BRASIL,2001). Essa condição permite que sejam transportados a grandes distâncias (EIRAS, 2011). Quando os ovos entram em contato com a água, as larvas podem eclodir em minutos (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2015).



Figura 2. Ovos de *Aedes aegypti*. A- vistos a olho nu (ponta de lápis para comparação de tamanho); B- visualizados em lupa estereoscópica aumento 10X. Serdeiro MT.

As larvas (Figura 3) são aquáticas e se alimentam de matéria orgânica. Durante o seu crescimento, passam por quatro fases chamadas de L1 (1º estágio), L2 (2º estágio), L3 (3º estágio) e L4 (4º estágio). O tempo de desenvolvimento larval é influenciado por diversos fatores, como temperatura, disponibilidade de alimentos e densidade larvária no criadouro (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2015).



Figura 3. Larva de *Aedes aegypti* visualizada em lupa estereoscópica aumento 10X. Serdeiro MT.

Após o estágio L4, a larva se transforma em pupa (Figura 4). A pupa não se alimenta e normalmente fica parada respirando próximo à superfície da água (Figura 5). Quando é perturbada, move-se com agilidade. O estágio pupal dura cerca de dois dias a temperatura de 26-28 °C. No momento da emergência do adulto, a pupa

mantém-se parada próximo à superfície da água e distende o abdômen (LOURENÇO- DE-OLIVEIRA, 2015).



Figura 4. Pupa de *Aedes aegypti* visualizada em lupa estereoscópica aumento 10X. Serdeiro MT.



Figura 5. Pupas de *Aedes aegypti*. Serdeiro MT.

O adulto emerge por uma fenda no cefalotórax pupal e permanece em repouso por alguns minutos para o enrijecimento da quitina e dos músculos permitindo ao inseto forças para voar e andar (EIRAS, 2011). Em seguida, voa em busca de abrigos, geralmente próximos, aos criadouros (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2015).

Os mosquitos adultos são reconhecidos pela cor, em geral escura com pernas marcadas com faixas pretas e brancas. *Ae. aegypti* distingue-se por apresentar uma faixa curta, branco-prateada, de cada lado do tórax e outra mais fina, retas longitudinais, centrais, as quais formam a figura de uma lira enquanto que em *Ae. albopictus* essa faixa é curta (EIRAS, 2011).

### 1.1.1.3 Importância Epidemiológica

*Aedes aegypti* é vetor primário da dengue, doença viral que se destaca por ser um dos mais graves problemas de saúde pública mundial. No Brasil, a espécie é também a transmissora dos vírus chikungunya, zika e foi um importante vetor da febre amarela urbana, todas doenças que podem apresentar formas graves.

*Aedes albopictus* é um importante vetor do vírus dengue na Ásia e causou uma pequena epidemia na Europa. Em nosso país ainda não está comprovada a participação da espécie na transmissão de doenças, no entanto, pesquisas mostraram que populações brasileiras de *Ae. albopictus* são competentes na transmissão dos vírus dengue, febre amarela e chikungunya (MITCHELL e MILLER, 1990, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et al., 2003; VEGA-RUA et al., 2014). A presença desse mosquito em território brasileiro representa um fator de alerta a saúde pública devido ao seu potencial como vetor

#### 1.1.1.3.1 Febre amarela

A febre amarela foi uma das doenças mais devastadoras e importantes que acometeu países da África e das Américas, inclusive no Brasil, nos séculos XVII-XX com epidemias urbanas que envolveram milhares de casos humanos e mortes (BRASIL, 2004).

Trata-se de uma doença infecciosa febril aguda, de curta duração (12 dias) e gravidade variável (BRASIL, 2004; PAHO, 2014). As formas clínicas podem variar de assintomática, leve, moderada e grave. Os sintomas da forma leve estão restritos a febre moderada, acompanhada de cefaleia, mal-estar e tontura (BRASIL, 2004). A evolução é de até dois dias e o paciente se recupera sem sequelas. Na forma moderada, o doente apresenta os sintomas da forma leve, porém mais acentuados, além de náuseas, vômitos, mialgia, calafrios e icterícia (olhos e pele amarelados). A evolução é de 2 a 3 dias com recuperação completa (BRASIL, 2004). A forma grave caracteriza-se clinicamente por manifestações de insuficiência hepática e renal, que podem levar à morte (BRASIL, 2004).

É causada por um arbovírus do gênero *Flavivirus*, da família Flaviviridae. O nome da doença refere-se à icterícia que afeta alguns pacientes (BRASIL, 2004).

A doença é endêmica em áreas tropicais de países da África e da América Latina. Estima-se que em todo mundo a cada ano ocorra 200.000 casos de febre amarela, com 30.000 mortes, sendo que 90 % deles ocorrem na África (PAHO, 2014).

A doença apresenta dois perfis epidemiológicos: febre amarela urbana e febre amarela silvestre. Entre eles não há diferença etiológica, clínica e fisiopatológica, sendo distinguíveis apenas pela cadeia de transmissão, ou seja, hospedeiros e vetores envolvidos na transmissão (BRASIL, 2005).

O ciclo de transmissão silvestre é uma zoonose que ocorre entre primatas não humanos (macacos) e mosquitos. As principais espécies de macacos envolvidos neste ciclo de transmissão pertencem aos gêneros: *Alouatta* Lacépède, 1799 (guariba), *Ateles* E. Geoffroy, 1806 (macaco aranha) e *Callithrix* Erxleben, 1777 (saguis). O homem pode ser infectado acidentalmente ao penetrar no ciclo enzoótico natural quando não imunizado. Na América do Sul, os principais transmissores são mosquitos dos gêneros *Sabethes* Robineau-Desvoidy, 1827 e *Haemagogus* Williston, 1896 (MARCONDES, 2009).

O transmissor da febre amarela urbana é *Ae. aegypti* (BRASIL, 2001). No início do século XX o desenvolvimento de uma vacina eficaz e as campanhas de erradicação do vetor em muitas zonas urbanas da América Latina trouxeram como resultado a eliminação da febre amarela urbana que não ocorre no Brasil desde 1942 (BRASIL, 2004). Apesar de não haver registro de transmissão urbana, o controle de *Ae. aegypti* também se tornou um dos desafios para prevenir a sua reurbanização (TAUIL, 2010). Além da preocupação com *Ae. aegypti*, é necessário conhecer a possibilidade de transição do vírus amarílico entre a mata e zona urbana, onde se inclui a disseminação de *Ae. albopictus*, que ocorre em ambos ambientes (CAVALCANTE e TAUIL, 2016).

A vacina é a principal ferramenta de prevenção e controle da doença. Em nosso país, apesar da elevada quantidade de doses de vacina aplicada regularmente na rotina dos serviços de saúde e durante campanhas de vacinação nas “Áreas Com Recomendação de Vacina”, esporadicamente são registrados casos humanos de transmissão silvestre (BRASIL, 2016). De dezembro de 2016 até 31 de maio de 2017 foram notificados 3.240 casos de febre amarela silvestre em todo território brasileiro. Destes, 792 casos da doença e 274 mortes foram confirmados (BRASIL, 2017a). Estes números ultrapassaram os casos e mortes registrados entre os anos de 2000 a 2012, com 326 casos confirmados e 156 mortes (CAVALCANTE e TAUIL, 2016). De acordo com o Informe Epidemiológico 43/2017

de febre amarela, disponibilizado pelo Ministério da Saúde, o Brasil vive o maior surto da doença observado nas últimas décadas (BRASIL, 2017a). A região Sudeste foi a mais afetada. O Estado de Minas Gerais concentrou a maioria dos casos, seguidos de São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo. Até então, Rio de Janeiro e Espírito Santo não eram considerados como parte das áreas endêmicas (CAVALCANTE e TAUIL, 2017). As autoridades brasileiras implementaram várias medidas para controlar o surto, uma delas foi a intensificação da vacinação em áreas recentemente definidas como “Área com Recomendação Temporária de Vacinação” e em junho de 2017 foi registrado no Espírito Santo o último caso de febre amarela silvestre do recente surto que acometeu nosso país (BRASIL, 2017b).

#### 1.1.1.3.2 Dengue

Os primeiros relatos históricos sobre dengue no mundo mencionam a Ilha de Java, em 1779 (BRASIL, 2001). No Brasil há relatos de epidemias de dengue desde 1846 (BARRETO E TEIXEIRA, 2008). No entanto, a primeira epidemia documentada ocorreu em 1981-1982, em Boa Vista (RO), causada pelos sorotipos DENV-1 e DENV-4 (OSONAI, 1983). Esta epidemia foi controlada até que em 1986 houve a reintrodução do sorotipo DENV-I na cidade de Nova Iguaçu, no Estado do Rio de Janeiro, com epidemias que atingiram o Rio de Janeiro e região Nordeste (BRAGA e MARTIN, 2015). Desde então, a dengue vem ocorrendo no Brasil de forma continuada, intercalando-se com a ocorrência de epidemias, geralmente associadas com a introdução de novos sorotipos anteriormente indenes e/ou alteração do sorotipo predominante (BRASIL, 2009).

Esta é uma doença de amplo espectro clínico, desde a forma oligossintomática até quadros graves, podendo evoluir a óbito (BRASIL, 2013). Os principais sintomas são febre alta acompanhada de dor de cabeça, dores no corpo e articulações, prostração, fraqueza, dor retrocular, erupção exantemática e prurido cutâneos (BRASIL, 2001).

Tem como agente etiológico um arbovírus do gênero *Flavivirus*, da família Flaviviridae, do qual existem 4 sorotipos diferentes: DENV-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 (BRASIL, 2001). A infecção por um deles confere proteção permanente para o mesmo sorotipo e imunidade parcial e temporária contra os outros três (BRASIL, 2001).

A dengue é responsável por elevada taxa de morbidade e mortalidade, constituindo sério problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Estudo realizado em 2012 sobre a prevalência da dengue estimou que 3,9 bilhões de pessoas, em 128 países, estão sob o risco de infecção do vírus DENV. Estima-se que 500.000 pessoas com dengue grave necessitam de hospitalização a cada ano e cerca de 2,5% dos afetados morrem (WHO, 2017a).

A doença é endêmica nas regiões da África, das Américas, do Mediterrâneo Oriental, do Sudeste Asiático e do Pacífico Ocidental, sendo as Américas, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental as regiões mais gravemente afetadas (WHO, 2017a).

#### 1.1.1.3.3 Chikungunya

O vírus Chikungunya (CHKV) é um arbovirus que pertence ao gênero *Alphavirus* e família *Tagoviridae* (BRASIL, 2015a).

Um dos sintomas da febre de Chikungunya é a ocorrência de dores nas articulações (artralgia), tão fortes que fazem o paciente se curvar. Daí o nome Chikungunya, que no dialeto Makonde, povo que vive no sudeste da Tanzânia-África, significa “aqueles que se dobram” (BRASIL, 2015a).

A sintomatologia é muito parecida com a da dengue, com febre alta, dores articulares e musculares, cefaleia, náusea, fadiga e manchas avermelhadas (exantema) pelo corpo. Porém, as dores fortes nas articulações e ocasionalmente a ocorrência de edema são características da Chikungunya. Estes sintomas a tornam uma doença incapacitante, tendo como consequência a redução da produtividade e da qualidade de vida de quem é acometido (BRASIL, 2015a).

Desde que foi isolado pela primeira vez, em meados de 1952, na Tanzânia, o vírus CHIKV vem sendo relatado em mais de 60 países da Ásia, África, Europa e Américas (WHO, 2017b). Em 2013 entrou no continente americano, inicialmente no Caribe até, em 2014, passar a ocorrer a transmissão autóctone no Brasil primeiramente nos Estados do Amapá e Bahia (TEIXEIRA et al., 2015). De acordo com Ministério da Saúde, atualmente o único estado brasileiro sem registro de casos autóctones é o Rio Grande do Sul (BRASIL, 2017c).

#### 1.1.1.3.4 Zika

O vírus Zika (ZIKV) é membro da família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*. ZIKV foi descrito pela primeira vez em 1947, em macaco do gênero *Rhesus* na Floresta

Zika, daí a origem do seu nome, em Uganda-África (DICK et al., 1952). Em 1952 foi detectado o primeiro caso de Zika em humanos no continente africano, na Uganda e Tanzânia (SMITHBURN, 1952), décadas mais tarde, em 2007, foi detectado pela primeira vez fora da África, na ilha de Yap, na Ásia (DUFFY et al., 2009). Em meados de 2013 uma epidemia chegou à Polinésia Francesa (CAO-LORMEAU et al., 2014) e em seguida o vírus se espalhou para outras ilhas do Pacífico (DUPONT-ROUZEYROL et al., 2015). No continente americano, há relatos do ZIKV desde 2014 e no Brasil, a primeira transmissão autóctone ocorreu em 2015 na região Nordeste (ZANLUCA et al., 2015).

Cerca de 80% das pessoas infectadas pelo vírus Zika não desenvolvem manifestações clínicas. Trata-se de uma doença com evolução benigna, cujos sintomas são febre de curta duração dores articulares, erupção cutânea, conjuntivite, mal-estar e dor de cabeça. Embora a doença tenda a evoluir de forma favorável, foi associada a distúrbios neurológicos, como a Síndrome de Guillain-Barré bem como a ocorrência de microcefalia em bebês nascidos de mulheres infectadas com o vírus ZIKV (ZANLUCA et al., 2015; WHO, 2016).

A ocorrência de microcefalia em bebês nascidos de mulheres infectadas com o vírus ZIKV foi sugerida após a detecção de um aumento inesperado nos casos de microcefalia, inicialmente em Pernambuco e posteriormente em outros estados da Região Nordeste em locais com incidência do vírus (BRASIL, 2015b). O Ministério da Saúde confirmou a relação entre a infecção pelo vírus Zika e a ocorrência de microcefalia a partir de amostras de sangue e tecidos corporais de um recém nascido no Ceará com microcefalia e outras malformações congênitas (BRASIL, 2015b).

#### 1.1.5 CONTROLE DO MOSQUITO *Aedes aegypti*

O controle vetorial é a medida mais eficaz para evitar e/ou reduzir o risco de arboviroses transmitidos por *Ae. aegypti* (CARVALHO et al., 2011).

##### 1.1.5.1 Métodos de controle vetorial

###### -Controle mecânico

O controle mecânico consiste em práticas rotineiras de limpeza e remoção de criadouros dentro e fora dos domicílios, isolamento do ambiente doméstico com

telas nas portas e janelas a fim de evitar a presença do mosquito no interior das casas, práticas essas que devem ser implementadas sob a supervisão do Agente de Combate a Endemias (ACE) ou Agente Comunitário de Saúde (ACS), prioritariamente pelo próprio morador/proprietário (BRASIL, 2009).

#### -Controle químico

O controle químico é o método mais amplamente utilizado no controle de vetores em saúde pública (BRAGA e VALLE, 2007). Este consiste no uso de inseticidas no controle do vetor nas fases larvária e adulta, obedecendo às normas técnicas e operacionais elaboradas pela OMS, que preconizam os princípios ativos desses produtos e as doses que devem ser aplicadas (BRASIL, 2009).

#### -Controle biológico

O controle biológico é um método que utiliza meios naturais no controle de insetos. Essa alternativa vem sendo estudada no sentido de diminuir os danos que os inseticidas químicos causam ao ambiente e à saúde da população. Alguns organismos são capazes de parasitar ou predação os mosquitos, temos como exemplo a utilização de espécies predadoras (peixes larvívoros e larvófagos, planárias, microcrustáceos, baratas d'águas), parasitas (nematóides) e patógenos (protozoários microsporídeos, fungos e bactérias) (EIRAS, 2011). Dentre as alternativas disponíveis, o Ministério da Saúde vem adotando o uso da bactéria *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) (BRASIL, 2009).

Outra alternativa eficaz no âmbito do controle biológico é o uso dos produtos botânicos que irão atuar como inseticidas, porém ambientalmente mais seguros no controle dos mosquitos (GHOSH, 2012). De acordo com a WHO (2012) esse método pode ser usado para controlar a dengue e malária.

## 1.2 PRODUTOS NATURAIS DE ORIGEM VEGETAL

As plantas são uma das mais promissoras fontes de substâncias naturais biologicamente ativas, que são sintetizadas pelo seu metabolismo.

Os produtos químicos produzidos pelos vegetais podem ser divididos em dois grupos. O primeiro, essenciais a todos os seres vivos, são os metabólitos primários (von POSER, 2017). Nesse grupo estão incluídos os lipídeos, RNA, DNA, aminoácidos, proteínas e açúcares (KERBAUY, 2004). Os produtos do metabolismo

primário originam o segundo grupo de compostos químicos- os metabólitos secundários, que em geral apresentam estruturas complexas e atividades biológicas marcantes (von POSER, 2017). Os metabólitos secundários têm sua importância relacionada à sobrevivência e propagação das plantas sendo sintetizados em resposta a estímulos ambientais, seja pela proteção contra insetos e animais herbívoros ou contra microorganismos patogênicos; ou ainda para atrair polinizadores e animais dispersantes de sementes, ou atuam como agentes alelopáticos (CROTEAU et al., 2000). A produção de metabólitos secundários também protege o vegetal de fatores abióticos, como temperatura, umidade, raios UV e deficiência de nutrientes minerais. Estudos sobre metabólitos foram iniciados pelos químicos orgânicos do século XIX e início do século XX devido às suas diversas aplicações (TAIZ e ZEIGER, 2009), o que até hoje desperta o interesse da comunidade científica (SANTOS, 2002). Por serem fonte de moléculas potencialmente bioativas, a sua importância mostra a necessidade de mais conhecimentos sobre os metabólitos secundários. Entender a sua atuação pode levar a inúmeras possibilidades de estudos que direcionem a busca pela solução de importantes problemas enfrentados atualmente como os prejuízos causados pelo uso desordenado de pesticidas tanto na saúde pública quanto na agricultura (BEZERRA, 2008).

### **1.2.1 Plantas com atividade biológica sobre insetos**

Relativamente ao potencial inseticida de determinadas espécies vegetais podemos afirmar que uma vasta gama de extratos, óleos essenciais e substâncias puras vêm apresentando ação sobre os insetos (SUKUMAR et al., 1991; CABRAL et al., 1999; TUNC et al., 2000; CORRÊA e SALGADO, 2011; JEYASANKAR, PREMALATHA E ELUMALAI, 2014; RAWANI et al., 2017).

A utilização de produtos naturais no controle de insetos é uma prática bem antiga. Existem relatos de gregos e romanos, ainda no início da agricultura, utilizando a nicotina, um alcalóide extraído das folhas de *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) e *Nicotiana rustica* L. (Solanaceae) no combate aos insetos fitófagos (FERREIRA et al., 2001). Outra substância natural utilizada como inseticida foi a rotenona, isolada de raízes de *Derris elliptica* Benth (Fabaceae), planta comumente encontrada na Malásia e na Indonésia, e de espécies do gênero *Lonchocarpus* (Fabaceae), existentes na África e América do Sul (BRAIBANTE e ZAPPE, 2012).

A utilização de produtos naturais no controle de insetos de uma maneira geral declinou na década de 50 do século XX devido ao surgimento dos inseticidas químicos sintéticos, tais como o DDT, que foram desenvolvidos a partir da 2ª Guerra Mundial substituindo os produtos naturais por serem mais potentes e mais baratos (VIEGAS-JÚNIOR, 2003).

A retomada dos produtos botânicos no controle de insetos foi uma resposta à necessidade de buscar substâncias que não acarretem danos ao ambiente e à saúde humana (VENDRAMIM e CASTIGLIONI, 2000).

A vantagem da utilização dos produtos botânicos em relação aos inseticidas químicos sintéticos vem da possibilidade de serem mais rapidamente biodegradados, e conseqüentemente menos danosos ao ambiente, apresentando ainda características mais específicas e seletivas, com curto efeito residual. Além disso, muitas apresentam baixa toxicidade a mamíferos (VENDRAMIN e CASTIGLIONI, 2000). Além do mais, os produtos naturais revelam mecanismos defensivos contra os insetos, que incluem repelência, inibição de oviposição, inibição do crescimento, alterações no sistema hormonal e no comportamento, infertilidade e mortalidade (MENEZES, 2005).

#### 1.2.1.1 Atividade biológica sobre *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*

Muitas substâncias vegetais vêm recebendo atenção especial no controle de mosquitos, como a lignana grandisina, isolada de *Piper solmsianum* C. DC. (Piperaceae) (CABRAL et al. 2009; LEITE et al. 2012).

Garcez et al. (2013) publicaram uma extensa revisão de substâncias de origem vegetal, tais como várias classes de metabólitos secundários, lactonas, amidas, quinonas, flavonoides, diterpenos, triterpenos e saponinas que demonstraram atividade contra as larvas de *Ae. aegypti*.

Guimarães et al. (2013) avaliaram a toxicidade de extratos brutos das espécies de bromélias *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker e *Neoregelia compacta* (Mez) LB Smith frente as larvas de *Ae. aegypti*. Os resultados dos bioensaios apontaram para a alta toxicidade dos extratos de acetato de etila de *A. fasciata* (CL<sub>50</sub> = 39,4 µg/mL) e de *N. compacta* (CL<sub>50</sub> = 23 µg/mL). Os dados sugeriram essas bromeliáceas como fonte de bioprodutos ativos na busca de um fitolarvicida no controle do mosquito vetor da dengue (GUIMARÃES et al., 2013).

Souza et al. (2011) avaliaram o extrato etanólico de sementes de *Myracrodruon urundeuva* Fr All (Anacardiaceae) que apresentou atividade contra as larvas de *Ae. aegypti*. Em um trabalho posterior, os pesquisadores isolaram o composto m-pentadecadienil-fenol que apresentou atividade larvicida e pupicida com CL<sub>50</sub> de 10,16 e 99,06 µg/mL, respectivamente. Além disso, m-pentadecadienil-fenol mostrou uma potente atividade ovicida com CL<sub>50</sub> de 49,79 µg/mL (SOUZA et al., 2012).

*Ocotea cymbarum* Kunth (Lauraceae), uma planta da região amazônica, foi avaliada quanto à atividade larvicida da neolignana burchellina contra larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti*. Essa neolignana apresentou interferência sobre o ciclo de desenvolvimento do mosquito, onde o seu maior efeito tóxico foi de 100% de mortalidade das larvas (L3) em concentração maior ou igual a 30 ppm (NARCISO et al., 2014). Uma furanocromona isolada de *Ammi visnaga* (L.) Lamarck (Umbelliferae), planta da região do Mediterrâneo, apresentou CL<sub>50</sub>=50 µg/mL de mortalidade larval de *Ae. aegypti* (MALECK et al., 2013). O óleo essencial de citronela, *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (Gramineae), apresentou repelência para *Ae. albopictus* (BUENO e ANDRADE, 2010). Ensaio foram realizados por Kempraj e Bhat (2008) para verificar a ação dos óleos essenciais extraídos de *Cyperus giganteus* Vahl (Cyperaceae) e *Cyperus rotundus* Linnaeus (Cyperaceae) sobre ovos e larvas de *Ae. albopictus*. Os resultados mostraram a potencial atividade ovicida e larvicida dos óleos essenciais de ambas espécies vegetais.

Portanto, metabólitos secundários, extratos de plantas e óleos essenciais podem proporcionar oportunidades ilimitadas para a descoberta de novos inseticidas/larvicidas que podem ser utilizados como mais uma ferramenta no controle dos mosquitos vetores da dengue.

### 1.3 O PLANO BRASIL SEM MISÉRIA

Em 2011, o Governo Federal criou o Plano Brasil sem Miséria (BSM) objetivando combater a extrema pobreza no país. O plano implementado a partir de mais de 100 programas e ações integradas visa proporcionar melhoria nas condições alimentar, de saúde, infraestrutura, educação e cidadania à população que sobrevive abaixo da linha da pobreza para abrandar as desigualdades socioeconômicas do país, relativas à acessibilidade, à transferência de renda e à inclusão produtiva. Para identificar essa parcela da população, foi considerada a

renda familiar *per capita* mensal de até R\$70 como indicador da condição de miserabilidade do indivíduo, posteriormente atualizada em 2014, para R\$77 *per capita* (BRASIL, 2014).

Mas, não só a renda familiar serviu de base para que o governo traçasse as ações do BSM em direção à população de baixa renda. A insegurança alimentar e nutricional, baixa escolaridade, pouca qualificação profissional, fragilidade de inserção no mundo do trabalho, acesso precário à água, energia elétrica, saúde e moradia também foram considerados determinantes da condição de pobreza. Superar a extrema pobreza requeria, portanto, a ação intersetorial do Estado, assim, o BSM conta com o envolvimento de ministérios, estados, municípios, com a parceria do setor privado e do terceiro setor (BRASIL, 2014).

Nos municípios, o Cadastro Único para Programas Sociais registra as informações de cada família de baixa renda, identificando todos os seus membros e suas condições econômicas e sociais: o endereço, as condições de moradia, a situação escolar e de trabalho de cada pessoa da família, entre outras informações (BRASIL, 2014). Os dados contidos no cadastro permitem que essas famílias sejam incluídas nas iniciativas nos programas sociais implementados pelo governo. Em 2014, 14,1 milhões de famílias, quase 50 milhões de pessoas, foram atendidas pelo Programa Bolsa Família (BRASIL, 2014).

De acordo com os registros de fevereiro de 2016 do Cadastro Único e com a folha de pagamentos de abril de 2016 do Programa Bolsa Família, o município de Vassouras, RJ registrou 3.394 famílias no Cadastro Único, sendo que dessas famílias 1.703 foram beneficiárias do Programa Bolsa Família, que correspondia 18,79% da população do município (BRASIL, 2016).

### **1.3.1 Dengue e o Plano Brasil sem Miséria**

A partir da criação do Plano Brasil sem Miséria pelo governo federal, com o objetivo de romper barreiras sociais, políticas, econômicas e culturais que segregam pessoas e regiões, e dentro da perspectiva deste plano, o Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, através da Nota Técnica N.º 1/2011/IOC-FIOCRUZ/Diretoria, recomendou: “Ciente dos esforços do Ministério do Desenvolvimento Social para elaborar um Programa de Erradicação da Pobreza Extrema, o Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), enquanto instituição pública dedicada à pesquisa científica, comprometida com a saúde pública nacional e reconhecida como Referência

Nacional para o Ministério da Saúde (Portaria nº 75 da Secretaria de Vigilância em Saúde, de 29 de agosto de 2008), cumpre com seu dever e vem, nesta Nota Técnica, recomendar que o tema das “doenças da pobreza” seja contemplado na elaboração deste documento e que a educação popular seja inserida nas ações do Programa, objetivando contribuir para prevenir e controlar estas doenças e promover a saúde da população a quem se dirigem tais ações”(IOC, 2011).

As chamadas “doenças da pobreza” se relacionam, em grande parte, com as chamadas “doenças tropicais”, também conhecidas como “doenças negligenciadas”, e atualmente referidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Organização Pan-americana da Saúde (OPAS) como “doenças infecciosas relacionadas à pobreza”, ou simplesmente “doenças infecciosas da pobreza”, tais como malária, doença de Chagas, leptospirose, hanseníase, tuberculose, leishmaniose, dengue, febre reumática, esquistossomose e diversas outras parasitoses intestinais (helmintoses, amebíases e giardíase) (IOC, 2011).

Estas são doenças que não só prevalecem em condições de pobreza, como também são estimuladoras da mesma, pois retiram dos indivíduos seu poder, sua força e seu tempo de trabalho, muitas vezes conferem incapacidades físicas e de aprendizado, diminuindo as chances de desenvolvimento humano (BRASIL, 2010; IOC 2011).

O Ministério da Saúde por meio de dados epidemiológicos, demográficos e o impacto de cada doença definiu entre as doenças consideradas negligenciadas, sete prioridades de atuação que compõem o programa em doenças negligenciadas: dengue, doença de Chagas, leishmaniose, hanseníase, malária, esquistossomose e tuberculose (BRASIL, 2010)

Os efeitos da dengue na sociedade não ficam somente na área da saúde. O cidadão acometido pela dengue, além de precisar de atendimento do sistema de saúde, fica temporariamente incapacitado para o trabalho ou para frequentar escola, o que atinge também o sistema econômico e social (BRAGA e VALLE, 2007; BRASIL, 2009). Estudo realizado em oito países do continente americano e asiático, incluindo o Brasil, demonstrou que o custo das epidemias ocorridas nesses países foi de cerca de U\$ 1,8 bilhão, somente com despesas ambulatoriais e hospitalares, sem incluir os custos com as atividades de vigilância, controle de vetores e mobilização da população (BRASIL, 2009).

### **1.3.2. Educação em Saúde para o controle da dengue**

De acordo com Vasconcelos (2001) “A Educação em Saúde é o campo de prática e conhecimento do setor Saúde que tem se ocupado mais diretamente com a criação de vínculos entre a ação médica e o pensar e fazer cotidiano da população”. Constitui-se numa proposta de envolvimento da população na responsabilidade de preservação do estado saudável individual e comunitário.

De acordo com o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), a educação em saúde, a comunicação e a mobilização social no controle do mosquito *Ae. aegypti* devem se aliar às atividades implementadas pela área da saúde (BRASIL, 2002). O esforço aplicado em conjunto nessas áreas, com o engajamento da população possibilita o alcance do objetivo do Programa, que é prevenção e controle (CHIARAVALLOTI-NETO et al., 1998)

Dessa forma, a implementação de políticas educativas relacionadas à sensibilização em temáticas prioritárias de saúde pública constitui-se em um importante instrumento para progresso social e econômico do país.

Diante do exposto, com a finalidade de agregar esforços no combate à dengue, o presente estudo foi estruturado para estudar a bioatividade de produtos vegetais na busca de novas moléculas ativas para controle de mosquitos vetores além de ações de interação com a população de Vassouras-RJ através da educação em saúde estando assim alinhado às metas do Plano Brasil sem Miséria (BSM).

Estas abordagens foram agrupadas em dois capítulos, onde estão inseridos os artigos oriundos do estudo:

## CAPÍTULO 1

### **PRODUTOS NATURAIS DE PLANTAS COM ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE *Aedes aegypti* E *Aedes albopictus***

Artigo 1: *Aedes aegypti*: modelo experimental de atividade biológica de fitoprodutos (Artigo publicado).

Artigo 2: Larvicidal activity of *Ottonia anisum* metabolites against *Aedes aegypti*: a potential natural alternative source for mosquito vector control in Brazil (Artigo publicado).

Artigo 3: Toxicity and larvicidal activity of Podophyllum-Based lignans against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (Artigo publicado).

Artigo 4: Larvicidal activity of lignan desoxypodophyllotoxin against *Aedes albopictus* (Artigo publicado).

Artigo 5: Atividade larvicida de óleos essenciais sobre *Aedes aegypti*. (Manuscrito em preparação).

## **CAPÍTULO 2**

### **AÇÕES DE EDUCAÇÃO EM SAÚDE NO CONTROLE DE *Aedes aegypti* EM CONSONÂNCIA COM O PLANO BRASIL SEM MISÉRIA**

Artigo 1: Educação Antidengue: um relato de experiência (publicado).

Livro de atividades O mosquito dengoso.

Cordel do Dr Mosquitão.

## 1.4 Justificativa

O uso de inseticidas sintéticos, como organoclorados e organofosforados, é uma das principais técnicas utilizadas no controle de pragas e vetores e seu uso foi o que permitiu alguns dos principais avanços na agricultura e no controle de doenças como a malária, tifo e a febre amarela urbana (van EMDEN e PEAKALL, 1996).

Por outro lado, o uso excessivo desses tipos de inseticidas resultou em uma progressiva resistência das pragas a esses químicos, diminuindo sua efetividade e gerando consequências negativas, como o aumento da frequência de uso, da dose e de misturas com compostos mais tóxicos (HEMINGWAY e RANSON, 2000). A baixa especificidade, o impacto ambiental, a elevada toxicidade para vertebrados e o alto custo e eficiência questionável dos inseticidas sintéticos de última geração demonstraram que o controle de vetores com o uso exclusivo desse tipo de inseticida não garantiria sua eficiência. Como resposta a esses fatores limitantes, a OMS tem incentivado, nos últimos anos, a busca de novas estratégias de controle de insetos vetores de agentes etiológicos causadores de doenças humanas, dos animais domésticos e silvestres (MORNER et al., 2002).

Uma opção para diminuir os efeitos negativos desses inseticidas químicos sintéticos e garantir a sustentabilidade das práticas de controle populacional seriam os bioinseticidas elaborados a partir de compostos naturais extraídos de plantas. Esses produtos naturais revelam mecanismos defensivos contra os insetos, que incluem os repelentes, inibidores da alimentação, hormônios e anti-hormônios que podem ser úteis à proteção de plantas agrícolas de pragas e controle de vetores causadores de doenças (BOWERS, 1984). Esses inseticidas possuem diversas vantagens em sua aplicação e utilização como alta volatilidade e rápida degradação, ação quase imediata, baixa toxicidade em mamíferos, baixa fitotoxicidade e alta seletividade (CLOYD, 2004).

Em conformidade com a nota técnica divulgada pela Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ (IOC 2011) em que recomenda que a educação popular seja inserida ao programa de Erradicação da Pobreza Extrema no que diz respeito às doenças negligenciadas, paralelamente às ações voltadas ao controle do *Ae. aegypti* através de produtos naturais de plantas, e buscando agregar esforços no combate à dengue e outras doenças transmitidas pelo mosquito *Ae. aegypti*, foi incorporada ao projeto ações educativas de modo sensibilizar a população. Com

essas ações, pretendeu-se continuar as atividades educativas que vêm sendo desenvolvidas desde 2009 nos municípios da região Centro Sul Fluminense, principalmente no município de Vassouras por meio da parceria com a prefeitura. As atividades são realizadas em escolas e praças públicas, sensibilizando alunos e a população local através de oficinas, palestras, jogos lúdicos como caça palavras, história em quadrinhos, peça teatral, etc. enfatizando temas relacionados a biologia, medidas de prevenção e a importância da vigilância entomológica na saúde pública do vetor da dengue.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolver alternativas para o controle do mosquito *Aedes aegypti* mediante a avaliação da atividade larvicida de produtos naturais vegetais na busca de novas alternativas para o controle desse vetor e a realização de ações educativas no controle como ação concreta de apoio ao Plano Brasil sem Miséria.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar o efeito larvicida das espécies vegetais *Cecropia catharinensis*, *Podophyllum hexandrum*, *Ottonia anisum* e óleos essenciais sobre as larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* determinando em cada caso a concentração letal;
2. Verificar possíveis alterações morfológicas no sistema digestório das larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* resultantes dos ensaios larvicidas com os óleos essenciais através de microscopia eletrônica de transmissão;
3. Transmitir saberes à comunidade escolar do município de Vassouras, RJ quanto à importância de um estado de vigilância para *Aedes aegypti*, com intuito de que sejam incluídos novos parceiros no processo de prevenção da dengue através de ações educativas
4. Desenvolver junto aos alunos das escolas da região Centro Sul Fluminense produtos aplicáveis em diferentes setores como cartilhas educativas com textos e jogos ilustrativos e cartazes informativos, sobre o tema principal: *Ae. aegypti* e seu controle que permitam a realização de eventos de educação em saúde nos municípios do Estado do Rio de Janeiro.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS; RESULTADOS**

A metodologia e os resultados obtidos na presente tese estão apresentados sob a forma de capítulos.

## **CAPITULO 1**

### **PRODUTOS NATURAIS DE PLANTAS COM ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus***

## **Artigo 1**

***Aedes aegypti*: modelo experimental de atividade biológica de fitoprodutos**

# *Aedes aegypti*: modelo experimental de atividade biológica de fitoprodutos

*Aedes aegypti*: experimental model of biological activity of plant products

Michele Teixeira Serdeiro<sup>†\*</sup>; Jacenir Reis dos Santos Mallet<sup>‡</sup>, Nildimar Alves Honório<sup>§</sup>; Marise Maleck<sup>¶</sup>

## Resumo

Como citar esse artigo. Serdeiro MT; Mallet JRS; Honório MA; Maleck M. *Aedes aegypti*: modelo experimental de atividade biológica de fitoprodutos. 2017 Jan./Jun.; 08 (1): 28-32.

*Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) é reconhecido como o transmissor de várias arboviroses de importância na saúde pública, como a dengue, zika, chikungunya e febre amarela urbana. O principal método de prevenir a transmissão desses vírus ainda é o controle do mosquito vetor. Produtos naturais de origem vegetal vêm sendo investigados, como mais uma ferramenta no controle de vetores, e compostos menos impactantes ao meio ambiente e a saúde humana. Devido à importância deste culicídeo, buscou-se extrato e frações de *Cecropia catharinensis* com atividade larvicida sobre *Ae. aegypti*. O extrato bruto metanólico (EBM) e sua fração (EBM1) obtidos da embaúba foram aplicados no meio de criação das larvas (L3) nas concentrações de 10, 30 e 50 µg/mL. O tratamento com *C. catharinensis* resultou na alteração do período de desenvolvimento larval, pupal e de L3-adulto do mosquito. A mortalidade pupal (25%) foi obtida pela fração EBM1. Este estudo demonstrou a eficácia de *C. catharinensis* sobre o período de desenvolvimento de *Ae. aegypti*.

**Palavras-chave:** *Aedes aegypti*; Produtos Naturais; *Cecropia catharinensis*; Embaúba; Atividade larvicida.

## Abstract

*Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) is recognized as a transmitter of several arboviruses of public health importance, such as dengue, zika, chikungunya and urban yellow fever. The main method of preventing transmission of these viruses is still vector mosquito control. Natural products of plant origin have been investigated, as another tool in vector control, and as less impacting compounds for the environment and human health. Due to the importance of *Ae. aegypti*, larvicidal activity of extract and fractions of *Cecropia catharinensis* on this culicidae were sought. The crude methanolic extract (CME) and its fraction (CME1) obtained from the embaúba plant were applied to the larvae breeding environment (L3) at concentrations of 10, 30 and 50 µg/mL. Treatment with *C. catharinensis* resulted in alteration of the larval, pupal and L3-adult mosquito development period. Pupal mortality (25%) was obtained by the CME1 fraction. This study demonstrated the efficacy of *C. catharinensis* on *Ae. aegypti* developmental period.

**Keywords:** *Aedes aegypti*; Natural Products; *Cecropia catharinensis*; Embaúba; Larvicidal activity.

## Introdução

Diante da situação epidemiológica do Brasil, já consolidada pelo vírus dengue, a introdução dos vírus chikungunya (CHIKV) e zika (ZIKV) aumentam a preocupação à saúde pública brasileira pela presença do mosquito cosmopolita *Aedes aegypti* (*Stegomyia*) (Linnaeus, 1762), o principal vetor destas arboviroses<sup>1-4</sup>.

O principal método de prevenir a transmissão desses vírus ainda é o controle do mosquito vetor, que pode ser realizado através da aplicação de inseticidas químicos sintéticos, tais como os organofosforados e organoclorados, sendo estes considerados tóxicos para os seres humanos e para organismos não-alvo<sup>5</sup>.

O controle do *Ae. aegypti* através de produtos

naturais de origem vegetal vêm sendo investigados<sup>5-9</sup>, como mais uma ferramenta a ser utilizada e com compostos menos impactantes ao meio ambiente e a saúde humana<sup>5</sup>.

A natureza é uma das mais promissoras fontes de novas moléculas biologicamente ativas. As plantas são reconhecidas por sua diversidade química e pela sua aplicação em diferentes áreas, desde o seu uso na medicina popular até seus diversos modos de ação sobre os insetos, principalmente os de importância na saúde pública e na agricultura<sup>10-16</sup>.

*Cecropia catharinensis* Cuatrec 1959 pertence ao gênero *Cecropia* e família Urticaceae. Espécies deste gênero são popularmente conhecidas como embaúba, imbaúba, umbaúba e embaúva, e são encontradas nas regiões tropicais e subtropicais da América Central e América do Sul<sup>17,18</sup>. Na medicina

Afiliação dos autores: † Laboratório de Insetos Vetores, Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ, Brasil;

‡ Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemiptera, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

§ Laboratório de Transmissores de Hematozoários e Núcleo Operacional Sentinela de Mosquitos Vetores, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

¶ Mestrado Profissional em Ciências Ambientais, Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ, Brasil; Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas em Saúde, Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ, Brasil; Laboratório de Entomologia Médica e Forense, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

\* mserdeiro@gmail.com

Recebido em: 05/05/17. Aceito em: 31/05/17.

popular, *C. catharinensis* é utilizada no tratamento da asma, bronquite e doenças cardiovasculares<sup>19</sup> e também vem demonstrando toxicidade sobre insetos sugadores de grãos<sup>20</sup>.

Este estudo teve como objetivo avaliar ação larvicida de extratos e frações das folhas de *C. catharinensis*, sobre *Ae. aegypti*, modelo de estudo, devido a sua importância na saúde pública.

## Materiais e métodos

### Extração e Fracionamento de Folhas de *C. catharinensis*

O extrato bruto metanólico (EBM) foi obtido por extração exaustiva das folhas secas de *C. catharinensis* e a fração EBM1 foi obtida a partir de EBM pelo tratamento com diclorometano, metodologias descritas por Serdeiro (2013)<sup>21</sup> e Almeida et al. (2016)<sup>22</sup>.

### *Ae. aegypti*

Os ovos de *Ae. aegypti* foram obtidos a partir do Núcleo Operacional Sentinela de Mosquitos Vetores (Nosmove), Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil. Para a realização dos testes, os ovos foram analisados quanto à viabilidade e colocados para eclosão em recipientes contendo água mineral previamente aquecida a 28 °C e foi adicionado ração para peixe (Alcon Guppy®). Os recipientes contendo os ovos foram mantidos em câmara climatizada BOD a 27 ± 1 °C e 70 ± 10 % UR. Após a eclosão as larvas de terceiro estágio (L3) foram separadas para os bioensaios.

### Bioensaios

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Insetos Vetores, Universidade Severino Sombra, Vassouras-RJ.

O extrato EBM e a fração EBM1 foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 10, 30 e 50 µg/mL e as soluções aplicadas no meio de criação das larvas, em recipientes de vidro contendo água mineral (20 mL).

Foram utilizadas 20 larvas de terceiro estágio (L3) de *Ae. aegypti* por grupo teste, controle (sem substância e sem DMSO) e controle testemunho (sem substância e com DMSO). Os experimentos foram realizados em triplicatas (R1, R2 e R3), totalizando 60 larvas/grupo, e três repetições. Após o tratamento, os insetos foram mantidos em dieta normal (ração de peixe na proporção de 0,3 mg para cada larva)

em câmara climatizada - BOD a 27 ± 1 °C e 70 ± 10%. Foram avaliadas a viabilidade larval, pupal, emergência e a mortalidade das formas imaturas do mosquito. Os bioensaios foram realizados conforme metodologia adaptada de WHO (2005)<sup>23</sup> e de Maleck et al. (2017)<sup>9</sup>.

### Análise estatística

Os resultados obtidos dos ensaios biológicos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey com nível de significância de 5% através do programa Graphpad- Prism<sup>24, 25</sup>.

### Resultados e discussão

Espécies vegetais do gênero *Cecropia* vem sendo estudadas quanto a avaliação de suas atividades biológicas e o isolamento de seus metabólitos secundários<sup>18</sup>. No presente trabalho, o tratamento sobre as larvas (L3) de *Ae. aegypti* com o extrato bruto (EBM) de *C. catharinensis* na concentração de 10 µg/mL interferiu na duração do desenvolvimento nas fases de pupa (dias) (4,5 ± 1,4; p ≤ 0,001) e L3-adulto (dias) (10 ± 1,6; p ≤ 0,1) (Tabela 1A), enquanto que na concentração de 50 µg/mL apenas interferiu na fase pupal (4,7 ± 1,2; p ≤ 0,001) (Tabela 1A). Quanto à viabilidade o extrato EBM apresentou de 90 a 98 % de emergência (10 a 50 µg/mL) (Tabela 1B), apresentando baixa toxicidade, de 2-7 % de mortalidade larval e 3-8% de mortalidade de pupas nas concentrações testadas (Tabela 1C). Semelhante a este resultado, aplicação do extrato bruto metanólico das folhas de *Cecropia pachystachya*, sobre a dieta de *Atta sexdens rubropilosa* não apresentou toxicidade sobre esta espécie de formiga<sup>26</sup>. Estudos com *C. catharinensis* sobre o Hemiptera *Oncopeltus fasciatus*, por aplicação oral do extrato EBM, resultou em 30 % de mortalidade de ninfas de 5º estágio na concentração de 100 µg/mL e quando aplicados diretamente sobre os ovos de *O. fasciatus* inibiu em 100 % a sua eclosão<sup>20</sup>. Estes dados mostraram a interferência do extrato EBM principalmente sobre a inibição da eclosão. Os bioensaios com a fração EBM1, no meio de criação das larvas (L3) de *Ae. aegypti*, demonstrou alteração do período de desenvolvimento da fase larval (dias) nas concentrações de 10 (3,6 ± 1,3; p ≤ 0,001), 30 (4,5 ± 2,1; p ≤ 0,001) e 50 µg/mL (4 ± 1,3; p ≤ 0,001), respectivamente (Tabela 2A). Esta interferência também foi significativa na fase pupal nas mesmas concentrações 10 (7,3 ± 1,9; p ≤ 0,001), 30 (8,5 ± 2,4; p ≤ 0,001) e 50 µg/mL (7,3 ± 2,9; p ≤ 0,001) e também nas fases L3-adulto nas concentrações de 10 (9,8 ± 1,7; p ≤ 0,01), 30 (11,5 ± 2,7; p ≤ 0,01) e 50 µg/mL (10,1 ± 2,4; p ≤ 0,01) (Tabela 2A). Quanto

a mortalidade a fração EBM1 apresentou 25 % de mortalidade pupal (Tabela 2C), na concentração de 50 µg/mL, consequentemente resultando em 72 % de adultos (Tabela 2B). O tratamento com EBM1 não mostrou mortalidade larval (Tabela 2C). Almeida et al. (2016)<sup>22</sup>, com estudos de atividade citotóxica em

3 linhagens de células tumorais humanas, utilizando extrato bruto metanólico (EBM) e as frações semipurificadas (EBM1 e EBM2) das folhas de *C. catharinensis* demonstraram que a fração EBM1 inibiu o crescimento celular das 3 linhagens utilizadas nos ensaios biológicos, embora o extrato metanólico, similar

**Tabela 1. Duração do desenvolvimento (A), viabilidade (B) e mortalidade (C) de *Aedes aegypti* em larvas L3 tratadas no meio de criação, com EBM de *Cecropia catharinensis*.**

Aplicação	Larval (dias)		Pupal (dias)		L3-adulto (dias)	
A	X ± DP	IV	X ± DP	IV	X ± DP	IV
Controle	1,5 ± 0,9 <sup>a</sup>	1-4	4,7 ± 1,4 <sup>a</sup>	3-9	7,2 ± 1,7 <sup>a</sup>	5-13
DMSO	1,6 ± 0,9 <sup>a</sup>	1-4	6,2 ± 2,1 <sup>b</sup>	4-12	7,9 ± 2,1 <sup>a</sup>	5-15
10 µg/mL	1,8 ± 1 <sup>a</sup>	1-4	4,5 ± 1,4 <sup>b***</sup>	3-8	6,9 ± 1,6 <sup>b*</sup>	5-10
30 µg/mL	1,9 ± 0,8 <sup>a</sup>	1-4	5,5 ± 1,8 <sup>c</sup>	3-10	7,8 ± 2,3 <sup>a</sup>	4-15
50 µg/mL	1,8 ± 1,4 <sup>a</sup>	1-6	4,7 ± 1,2 <sup>ab***</sup>	3-8	7,3 ± 1,6 <sup>a</sup>	5-12

Aplicação	L3-L4		L4-pupa		Pupa-adulto		L3-adulto	
B	X ± DP	%	X ± DP	%	X ± DP	%	X ± DP	%
Controle	20 ± 0 <sup>a</sup>	100	20 ± 0 <sup>a</sup>	100	20 ± 0 <sup>a</sup>	100	20 ± 0 <sup>a</sup>	100
DMSO	20 ± 0 <sup>a</sup>	100	20 ± 0 <sup>a</sup>	100	20 ± 0 <sup>a</sup>	100	20 ± 0 <sup>a</sup>	100
10 µg/mL	20 ± 0 <sup>a</sup>	98	19,6 ± 0,6 <sup>a</sup>	100	19,6 ± 0,6 <sup>a</sup>	100	19,6 ± 0,6 <sup>a</sup>	98
30 µg/mL	20 ± 0 <sup>a</sup>	100	20 ± 0 <sup>a</sup>	93	19,3 ± 1,1 <sup>a</sup>	97	19,3 ± 1,1 <sup>a</sup>	90
50 µg/mL	20 ± 0 <sup>a</sup>	98	19,6 ± 0,6 <sup>a</sup>	100	19,3 ± 0,6 <sup>a</sup>	92	18 ± 0 <sup>a</sup>	90

Aplicação	L3		L4		Pupa	
C	X ± DP	%	X ± DP	%	X ± DP	%
Controle	0	0	0	0	0	0
DMSO	0	0	0	0	0	0
10 µg/mL	0,3 ± 0,6 <sup>a</sup>	2	0	0	1 ± 1 <sup>a</sup>	5
30 µg/mL	0	0	1,3 ± 1,1 <sup>a</sup>	7	0,6 ± 1,1 <sup>a</sup>	3
50 µg/mL	0,3 ± 0,6 <sup>a</sup>	2	0	0	1,6 ± 0,6 <sup>a</sup>	8

Experimentos com 20 larvas (L3) de *Ae. aegypti*, para cada grupo teste e controle, em triplicatas e com 3 repetições. Média e desvio padrão (X ± DP). Intervalo de Variação (IV). Valores seguidos da mesma letra não possuem diferenças significativas. Níveis de significância por teste de Tukey, representados como \*\*\* P≤0,001; \*P≤0,1 vs controle DMSO.

**Tabela 2. Duração do desenvolvimento (A), viabilidade (B) e mortalidade (C) de *Aedes aegypti* em larvas L3 tratadas no meio de criação, com EBM1 de *Cecropia catharinensis*.**

Aplicação	Larval (dias)		Pupal (dias)		L3-adulto (dias)	
A	X ± DP	IV	X ± DP	IV	X ± DP	IV
Controle	2 ± 1,2 <sup>a</sup>	1-5	6 ± 1,8 <sup>a</sup>	2-8	8,7 ± 2,3 <sup>a</sup>	4-13
DMSO	1,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	1-2	3,1 ± 1,3 <sup>b</sup>	2-7	5,4 ± 1,3 <sup>b</sup>	4-9
10 µg/mL	3,6 ± 1,3 <sup>b***</sup>	1-8	7,3 ± 1,9 <sup>bc***</sup>	4-12	9,8 ± 1,7 <sup>b**</sup>	8-15
30 µg/mL	4,5 ± 2,1 <sup>bc***</sup>	2-11	8,5 ± 2,4 <sup>b***</sup>	4-13	11,5 ± 2,7 <sup>b**</sup>	6-16
50 µg/mL	4 ± 1,3 <sup>b***</sup>	2-6	7,3 ± 2,9 <sup>b***</sup>	4-14	10,1 ± 2,4 <sup>bc**</sup>	5-15

Aplicação	L3-L4		L4-pupa		Pupa-adulto		L3-adulto	
B	X ± DP	%	X ± DP	%	X ± DP	%	X ± DP	%
Controle	20 ± 0 <sup>a</sup>	100	20 ± 0 <sup>a</sup>	100	20 ± 0 <sup>a</sup>	100	20 ± 0 <sup>a</sup>	100
DMSO	20 ± 0 <sup>a</sup>	100	20 ± 0 <sup>a</sup>	100	20 ± 0 <sup>a</sup>	100	20 ± 0 <sup>a</sup>	100
10 µg/mL	20 ± 0 <sup>a</sup>	100	20 ± 0 <sup>a</sup>	98	19,6 ± 0,5 <sup>a</sup>	95	19,3 ± 1,1 <sup>a</sup>	93
30 µg/mL	20 ± 0 <sup>a</sup>	100	20 ± 0 <sup>a</sup>	93	18,6 ± 1,1 <sup>a</sup>	97	18 ± 2 <sup>a</sup>	90
50 µg/mL	20 ± 0 <sup>a</sup>	98	19,6 ± 0,5 <sup>a</sup>	98	19,3 ± 0,6 <sup>a</sup>	75	14,3 ± 4,5 <sup>a</sup>	72

Aplicação	L3		L4		Pupa	
C	X ± DP	%	X ± DP	%	X ± DP	%
Controle	0	0	0	0	0	0
DMSO	0	0	0	0	0	0
10 µg/mL	0	0	0,3 ± 0,5 <sup>a</sup>	2	1 ± 1 <sup>a</sup>	5
30 µg/mL	0	0	1,3 ± 1,1 <sup>a</sup>	7	0,6 ± 1,1 <sup>a</sup>	3
50 µg/mL	0,3 ± 0,6	2	0,3 ± 0,5 <sup>a</sup>	2	5 ± 4 <sup>a</sup>	25

Experimentos com 20 larvas (L3) de *Ae. aegypti*, para cada grupo teste e controle, em triplicatas e com 3 repetições. Média e desvio padrão (X ± DP). Intervalo de Variação (IV). Valores seguidos da mesma letra não possuem diferenças significativas. Níveis de significância por teste de Tukey, representados como \*\*\*P<0,001; \*\*P<0,01 vs controle DMSO.

aos resultados apresentados neste estudo, também não apresentou toxicidade no modelo utilizado.

## Conclusão

Os resultados demonstraram que a fração obtida

das folhas de *C. catharinensis* alterou o período de desenvolvimento de *Ae. aegypti*. Sugere-se a purificação desta fração ativa e maiores estudos da sua atividade biológica sobre os ovos e fisiologia de *Ae. aegypti*.

## Declarações

Os autores declaram não possuírem conflitos de interesse diretos ou indiretos.

## Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ); à FUSVE/USS; à FIOCRUZ/ CAPES-Brasil Sem Miséria.

## Fontes de Financiamento

FAPERJ e FUSVE/USS.

## Referências

- Fares RCG, Souza KPR, Añez G, Rios M. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. *Biomed Res Int*. 2015; Article ID 321873.
- Pinto Junior VL. Zika virus na bofeia da globalização. *Rev Med Saude Brasilia*. 2014; 4(2):142-43.
- Zanluca C, Melo VC, Mosimann AL, Santos GI, Santos CN, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015; 110: 569-72.
- Lima-Camara TN. Arboviroses emergentes e novos desafios para saúde pública no Brasil. *Rev Saude Publica*. 2016; 50:36.
- Ghosh A, Chowdhury N, Chandra G. Plant extracts as potential mosquito larvicides. *Indian J Med Res*. 2012; 135(5): 581-98.
- Guimarães MGA, Martins KS, Carvalho MA, Kersten VA, Vieira RBT, Maleck M. Bioatividade de Bromélias sobre *Aedes aegypti*. *Rev Fitos*. 2013; 8(2): 73-160.
- Dias CN, Moraes DFC. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. *Parasitol Res*. 2014; 113(2): 565-92.
- Marques AM, Velozo LS, Carvalho MA, Serdeiro MT, Honório NA, Kaplan MAC, Maleck M. Larvicidal activity of *Ottonia anisum* metabolites against *Aedes aegypti*: a potencial natural alternative source for mosquito vector control in Brazil. *J Vector Dis*. 2017; 54: 61-8.
- Maleck M, Hollanda PO, Serdeiro MT, Soares RO, Honório NA, Silva CG. Toxicity and larvicidal activity of Podophyllum-Based Lignans against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2017; 54(1): 159-66.
- Holez FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97(7): 1027-31.
- Penido C, Costa KA, Pennaforte RJ, Costa MFS, Pereira JFG, Siani AC, Henriques MGMO. Anti-allergic effects of natural tetranotriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergen induced vascular permeability and hyperalgesia. *Inflamm Res*. 2005; 54: 295-303.
- Isman MB. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*. 2006; 51: 45-56.
- Cabral MMO, Mendonça PM, Gomes CMS, Barbosa-Filho JM, Queiroz MMC, Mello RP. Biological activity of neolignans on the post-embryonic development of *Chrysomya megacephala*. *Fitoterapia*. 2007; 78: 20-24.
- Kirst HA. The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research. *J Antibiot*. 2010; 63:101-11.
- Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*. 2012; 75 (3): 311-35.
- Maleck M, Santos FCC, Serdeiro MT, Guimarães AE, Ferreira B, Gunaydin K, Almeida AP. Khellin: a furochromone with toxicity against *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera) and *Aedes aegypti* (Diptera). *J Nat Pharm*. 2013; 4(1): 32-36.
- Consolini AE, Migliori GN. Cardiovascular effects of the South American medicinal plant *Cecropia pachystachya* (ambay) on rats. *J Ethnopharmacol*. 2005; 96:417- 22.
- Costa GM, Schenkel EP, Reginatto FH. Chemical and pharmacological aspects of the genus *Cecropia*. *Nat Prod Commun*. 2011; 6 (6): 913-29.
- Machado EC, Yunes RA, Malheiros A, Gomez EC, Delle Monache F. Two new 11a, 12a-epoxy-ursan-28, 13β-olides and other triterpenes from *Cecropia catharinensis*. *Nat Prod Res*. 22(15): 1310-16.
- Maleck M, Serdeiro MT, Santos FCC, Braun AMO, Chaves DSA, Faria AR, Almeida AP. Bioactivity of Brazilian plant extracts on *Oncopeltus fasciatus*. *Int J Fauna Biol Stud*. 2014; 1 (6): 114-20.
- Serdeiro MT. Fracionamento de extratos de *Cecropia catharinensis*, Cuatrec, 1959 e avaliação de atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* L. (*Stegomyia*), Linnaeus, 1762 [dissertação]. Vassouras: Universidade Severino Sombra; 2013. 66p.
- Almeida AP, Quintela JC, Chaves DAS, Barbosa JF, Pinto M, Pedro M. The cytotoxic effect of extracts obtained from *Cecropia catharinensis* Cuatrec (Urticaceae). *Rev Virtual Quim*. 2016; 8(1): 27-34.
- World Health Organization. 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69101/1/>
- Motulsky HJ. Analyzing data Graph Pad Prism. San Diego, CA: Graph Pad Software Inc.; 2000.
- Sokal RR, Rohlf. FJ. Principios y Metodos Estadísticos em La Investigación Biológica. H. Blume Ed., Madri, Espanã. 1979. 223.
- Torres AF, Lasma O, Carvalho GA, Santa-Cecilia LUC, Fanetti R, Oliveira D. Atividade inseticida de extratos de plantas no controle de formiga cortadeira, em cafeeiro. *Coffee Science, Lavras*. 2013; 8(3): 371-78.

## Artigo 2

**Larvicidal activity of *Ottonia anisum* metabolites against *Aedes aegypti*: a potencial natural alternative source for mosquito vector control in Brazil**

## Larvicidal activity of *Ottonia anisum* metabolites against *Aedes aegypti*: A potential natural alternative source for mosquito vector control in Brazil

André M. Marques<sup>1</sup>, Leosvaldo S. Velozo<sup>1</sup>, Michelle A. Carvalho<sup>2</sup>, Michele T. Serdeiro<sup>2-3</sup>, Nildimar A. Honório<sup>4-5</sup>, Maria Auxiliadora C. Kaplan<sup>1</sup> & Marise Maleck<sup>2, 6-7</sup>

<sup>1</sup>Walter Mors Institute for Research on Natural Products (IPPN), Health Sciences Center, Universidade Federal do Rio de Janeiro; <sup>2</sup>Vector Insect Laboratory, Universidade Severino Sombra, Av. Expedicionário Oswaldo de Almeida Ramos, Rio de Janeiro; <sup>3</sup>Interdisciplinary Laboratory for Entomological Surveillance of Diptera and Hemiptera; <sup>4</sup>Sentinel Operational Center for Vector Mosquitoes; <sup>5</sup>Hematoczoa Transmission Mosquitoes Laboratory (LATHEMA), Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz; <sup>6</sup>Professional Master's Course on Environmental Sciences and Professional Master's Course on Health Sciences, Universidade Severino Sombra, Av. Expedicionário Oswaldo de Almeida Ramos, Vassouras; <sup>7</sup>Laboratório de Entomologia Médica e Forense, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

### ABSTRACT

**Background & objectives:** *Aedes aegypti* mosquito is the principal vector of the viruses responsible for urban yellow fever, dengue, dengue haemorrhagic fever, as well as Zika and chikungunya in Brazil. The present study was aimed to investigate the insecticidal potential of the extract and fractions of *Ottonia anisum*, along with special metabolites isolated from it, as natural alternatives against larvae (L3) of *Ae. aegypti*, vector of potentially deadly tropical infections in Brazil.

**Methods:** The plant species *O. anisum* was collected in March 2015, at Xerém area, in Rio de Janeiro City, Brazil. Crude extracts and the isolated pure compounds were screened for toxicity against *Ae. aegypti* larvae (L3). Bioassays were performed on 20 larvae (L3) of *Ae. aegypti* in triplicate. The samples were dissolved in a mixture of acetone and DMSO at final concentrations of 1–200 µg/ml. The toxicity of the solutions was evaluated towards the growth and development of *Ae. aegypti* larvae till emergence of adults.

**Results:** The crude hexane extract showed 100% larval mortality 24 h after treatment at a concentration of 200 µg/ml. The bioassays using 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene revealed 100% mortality among L3 larvae, 24 h after the treatment at a concentration of 30 µg/ml, the LC<sub>50</sub> recorded was 1.6 µg/ml. At concentration of 10 µg/ml, the L3 larval mortality recorded was 92%.

**Interpretation & conclusion:** The metabolite 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene showed potent toxicity against *Ae. aegypti* larvae. This arylbutanoid agent could be used as a natural alternative adjuvant pesticide, in new compositions that would be environmentally safer.

**Key words** 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene; *Aedes aegypti*; dengue; larvicidal activity; *Ottonia anisum*; Piper

### INTRODUCTION

Dengue is currently the most common mosquito-borne viral infection affecting humans. More than 2.5 billion people are at risk of infection and an estimated 390 million dengue infections occur annually in around 125 countries in tropical and subtropical regions worldwide<sup>1</sup>. Major factors facilitating such expansion include climatic changes, increase in urbanization and international travels. Unfortunately, the non-availability of an efficacious antiviral drug or vaccine and lack of effective vector control strategies make dengue a serious public health concern in tropical and subtropical regions<sup>2</sup>. The mosquito vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* are responsible for the majority of dengue transmissions. Dengue virus is widely distributed in tropical and subtropical zones of the

world and several outbreaks have been reported in past years in Asian and Latin American countries. The Southern Cone countries (Argentina, Brazil, Chile, Paraguay and Uruguay) are contributing for majority of the dengue cases in Latin America, with Brazil accounting for almost 98.5% of the fatalities<sup>3</sup>.

The Zika virus disease is also transmitted by *Ae. aegypti* and it has spread rapidly within the Americas after an outbreak in Brazil in 2014. In 2015, an increasing number of infants with small head circumference, “microcephaly”, was observed in Brazil’s Northeast region<sup>4</sup>. In the year 2016, the estimated cases of Zika ranged between 4,40,000 and 13,00,000 in the country. Brazil accounts for 94% of confirmed cases of Zika in the Americas, according to the Pan American Health Organization (2016)<sup>5</sup>. With regard to chikungunya virus, the first case

in Brazil was identified in 2014. Initially restricted to a few municipalities in Northeast region, the virus spread across the country. About 2,63,598 suspected cases were reported nationwide in 2015<sup>5</sup>. The effects of the virus are considered worrisome, causing chronic joints pain that can last for months.

In January 2017, the Brazil Ministry of Health reported 12 suspected cases of yellow fever, another viral disease transmitted by *Ae. aegypti*, from six municipalities in rural areas in the State of Minas Gerais. Later, after an update, a total of 110 suspected cases, including 30 deaths, had been reported from 15 municipalities of Minas Gerais. The serological tests for 19 suspected cases were positive for yellow fever which included 10 deaths<sup>6</sup>.

The emergence of a great number of fatal mosquito-borne viral infections and insecticide-resistant mosquitoes has increased the interest in exploring new effective products against adult *Ae. aegypti* mosquitoes as well as its larvae. The synthetic chemical products continue to lose their efficacy against the mosquitoes, compelling the use of higher dosage or different kinds of pesticides to control the mosquito vectors<sup>3</sup>. Because no vaccine has been effective in preventing dengue, the best control measure is to control the adult mosquitoes and eliminate their larval population. Many strategies have been used to control *Ae. aegypti* mosquitoes and their immatures, as well as for the improvement of basic sanitation<sup>7</sup>. However, the indiscriminate use of synthetic insecticides has led to the emergence of resistant strains of mosquitoes and resulting in an uncontrolled increase in the mosquito population.

In this context, many plant products have been evaluated for their toxic properties against different pests, especially in the form of essential oils (EOs). The EOs possess acute contact and fumigant toxicity to insects, repellent activity, antifeedant activity, as well as development and growth inhibitory activity<sup>8</sup>. The alternative use of EOs has two advantages over other natural pesticides. The first benefit is its low toxicity on mammals, birds and fish. The second advantage is its great structural diversity as a pathway to a potential source of bioactive molecules<sup>9</sup>.

*Ottonia anisum* Sprengel is a shrub commonly found in Southeastern Brazil. This species is sold in open-air markets in the State of Rio de Janeiro and is used in traditional medicine and religious rituals in Northern Brazil due to its anesthetic properties for relieving oral pain and toothache<sup>10-11</sup>. Studies on the chemistry and biological activity of *O. anisum* are sparse and rare. So far, no studies on its insecticidal activity have been conducted. Literature survey showed the isolation and identification of 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene as the major me-

tabolite found in the leaves and the roots from the plant species<sup>12-13</sup>. The six aristolactams including, aristolactam BII, piperolactam C, goniothalactam, stigmalactam, aristolactam AII and aristolactam BIII have been also isolated from roots of this species<sup>14</sup>. Recently, Lopez *et al*<sup>15</sup> reported the isolation and characterization of three amides (pipercollosidine, piperine and valeramide), as well as a mixture of seven amides (valeramide, 4,5-dihydro-piperlonguminine, N-isobutyl-6-piperonyl-2-hexenamide, piperovatine, dihydropipercollosidine, pipercollosidine and pipercollosine) with anesthetic properties from the roots of *O. anisum*.

The present study was aimed to investigate the insecticidal potential of the crude root extract of *O. anisum*, along with special metabolites isolated from it, as natural alternatives against larvae (L3) of *Ae. aegypti*, the vector of dengue, Zika, urban yellow fever and chikungunya viruses that are potentially deadly tropical infections in Brazil.

## MATERIAL & METHODS

### Plant material

The plant material was collected in Xerém, Duque de Caxias, state of Rio de Janeiro (RJ), Brazil, in March 2015. The botanical voucher was identified by Dr Elsie Franklin Guimarães from Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, as *O. anisum* Sprengel, and a sample was deposited at the herbarium of the Rio de Janeiro Botanical Garden (JBRJ), with registration under number RB 393494.

### General procedure

Silica gel (Merck, 60-200 mesh) was used for column chromatography separations, while analytical TLC was performed using silica gel in 60 PF254 layers (Merck). The solvents for column chromatography separation and for GC-MS and NMR analysis were from Tedia (Brazil).

### Phytochemical investigation

*Extract preparation and isolation of pure compound 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene:* Dried and powdered leaves (300 g) of *O. anisum* were extracted by means of static maceration with *n*-hexane, followed by adding methanol at room temperature. The resulting solutions were filtered separately and the solvent was evaporated under reduced pressure, thereby yielding 11.7 g of *n*-hexane extract and 43.5 g of methanol extract. About 20 g of methanol extract was suspended in a mixture of water and methanol (7:3) and was successively partitioned with

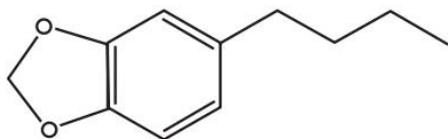


Fig 1. Chemical structure of the major isolated compound 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene isolated from the stem of *O. anisum* Sprengel.

*n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol. The *n*-hexane extract of *O. anisum* was subjected to chromatographic column over silica gel, with a gradient of *n*-hexane, ethyl acetate and methanol as the mobile phase, at increasing polarities. In total, 120 fractions were obtained. Fractions 5–9 were analyzed using thin-layer chromatographic plates and GC-MS, thus enabling characterization of the pure compound 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene. An amount of 1.36 g of the pure compound was obtained through this process. The structure of the pure compound was established through its MS fragmentation pattern (GC-MS analysis), and through  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  RMN analysis, and the data were compared with the records in the literature<sup>13</sup>. The structure of the compound identified is shown in Fig. 1.

#### GC-MS analysis

Qualitative analyses were carried out in a Shimadzu GC-QP2010 PLUS machine equipped with a ZB-5MS fused silica capillary column (30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25 mm film thickness). The operating temperatures used were: injector 270°C, detector 290°C and column oven from 60 to 290°C (10°C min<sup>-1</sup>). Helium at 1 ml min<sup>-1</sup> was used as a carrier gas. The pure compound was identified through comparison of its mass spectra and fragmentation pattern with published data<sup>13</sup> and through computer matching with the WILEY 275 and the National Institute of Standards and Technology (NIST 3.0) libraries that were provided with the computer, controlling the GC-MS system.

#### Nuclear magnetic resonance spectroscopy

The pure compound obtained from stems of *O. anisum* was analyzed using  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR and the data were recorded on a Varian VNMR5 500 spectrometer. The chemical shifts were determined through DMSO- $d_6$ , using tetramethylsilane (TMS) as the internal standard. The signals of the NMR analyses were compared with the data available in literature<sup>13</sup>.

#### Bioassays

*Aedes aegypti* eggs were obtained from the Sentinel Operational Center for Vector Mosquitoes of the Oswaldo

Cruz Institute, Fiocruz, RJ, and the bioassays were done in the Insect Vector Laboratory, Severino Sombra University, Vassouras, RJ. The bioassays were carried out using eggs that were placed in a receptacle containing mineral water with fish food (0.3 mg/larva) (Alcon Guppy® Alcon, Camboriú, SC, Brazil) for hatching<sup>16–17</sup>. All the experiments to determine the effects of 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene from *O. anisum* and its methanol and hexane extracts were carried out on III instar (L3) larvae, according to methodology by WHO<sup>18</sup>. The isolated compound 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene and the extracts were dissolved in DMSO and acetone (1:1) at a final concentrations of 1–200  $\mu\text{g/ml}$ . In the larval treatment groups, with 20 larvae per group, extracts were added to glass containers (4  $\times$  4.5 cm) containing mineral water (20 ml) at final concentrations of 10, 100 and 200  $\mu\text{g/ml}$ . The larval treatments consisted of adding the substance to glass containers (2  $\times$  4 cm) containing mineral water (20 ml) at final concentrations of 1, 10, and 30  $\mu\text{g/ml}$ . The *Ae. aegypti* larval groups (L3) were evaluated in triplicate with three repetitions, as described elsewhere<sup>16–20</sup> and adopted from WHO<sup>21</sup>. Two control groups were included: One with a DMSO and acetone solution (without extracts or substance) (Testimony) and another with untreated solution. The bioassays were performed in a climate-controlled chamber at  $28 \pm 1$  °C temperature and  $70 \pm 10\%$  relative humidity, with 12 h photoperiods throughout the experiments, and the toxicity against *Ae. aegypti* larvae and their growth and development was evaluated till adult emergence<sup>18–21</sup>.

#### Statistics

The data were analyzed using the ANOVA F-test<sup>22</sup> and the  $\chi^2$ -test, in which  $p \leq 0.05$  and  $p \leq 0.01$  were considered significant, respectively. Standard deviations were calculated using the averages from the experiments using GraphPad InStat 3.05<sup>23</sup> and trimmed Spearman-Kärber analysis, in order to determine the  $\text{LC}_{50}$ <sup>24</sup>.

## RESULTS

The phytochemical investigation confirmed that *O. anisum*, isolated as the major constituent from the methanol extract (>1 g from *n*-hexane leaves fraction) is a valuable source of the arylbutanoid compound 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene, present in almost all the organs of this plant species. The bioassays performed using the crude methanol extract showed that this interfered with the duration of development in the pupal stage ( $9.3 \pm 2.1$  days;  $p < 0.001$ ) and the L3-adult stage ( $12.3 \pm 3.2$  days;  $p < 0.001$ ), at the concentration of 200  $\mu\text{g/ml}$  (Table 1a).

Table 1. Duration of development (a), viability (b) and mortality (c) among *Aedes aegypti* larvae (L3) treated through culturing with a methanol extract (mg/ml) of *Ottonia anisum*

(a)	Larvae (Days)		Pupae (Days)		Emergence (Days)	
	$\bar{X} \pm SD$	VI	$\bar{X} \pm SD$	VI	$\bar{X} \pm SD$	VI
Control	3 ± 0.7a	2–5	12.5 ± 3.6a	8–19	16.2 ± 3.7a	9–20
Testimony	3.2 ± 0.6a	2–6	12.1 ± 3a	7–17	15.7 ± 3.3a	9–19
10	3.1 ± 1.7a	2–13	10.1 ± 2.3c	7–16	15.1 ± 3.3b	9–18
100	3.4 ± 1.9a	2–8	10.3 ± 2.2c	7–13	12.7 ± 3c**	8–16
200	3.1 ± 1a	2–8	9.3 ± 2.1d***	6–14	12.3 ± 3.2c***	8–17

(b)	L3–L4		L4–Pupae		Pupae		L3–Adult	
	$\bar{X} \pm SD$	%	$\bar{X} \pm SD$	%	$\bar{X} \pm SD$	%	$\bar{X} \pm SD$	%
Control	20 ± 0a	100	20 ± 0a	100	20 ± 0	98	19.7 ± 0.6a	98
Testimony	20 ± 0a	98	19.7 ± 0.7a	98	19 ± 1	91	17.6 ± 2.5a	88
10	20 ± 0a	92	18.7 ± 2.3a	55	9.7 ± 4.1b	100	9.7 ± 4.1b	47
100	20 ± 0a	87	17.3 ± 2.1a	52	9 ± 1bc*	82	7.3 ± 3.8b*	37
200	20 ± 0a	97	19.3 ± 0.6a	78	15 ± 4.5ac*	98	14.7 ± 5.1a	73

(c)	L3			L4			Pupae		
	$\bar{X} \pm SD$	VI	%	$\bar{X} \pm SD$	VI	%	$\bar{X} \pm SD$	VI	%
Control	0	0	0	0	0	0	0.3 ± 0.7a	17–17	2
Testimony	0.7 ± 1.1a	3–3	2	0.3 ± 0.7a	16–16	2	1.3 ± 2.3a	17–18	9
10	1.7 ± 2.8a	3–5	8	8.3 ± 6.1a	7–16	45	0	0	0
100	2.6 ± 2.1a	3–5	13	8.3 ± 1.5a	14–15	48	1.7 ± 0.7a	14–14	18
200	0.3 ± 0.7a	3–5	3	4.3 ± 4.1a	5–16	22	0.3 ± 0.7a	14–14	2

Experiments with 20 larvae (L3) of *Ae. aegypti*, for each test group and control, in triplicate (n = 60); Mean and standard deviation ( $\bar{X} \pm SD$ ); Range of variation (VI); Values followed by the same letter (a = a, b = b, c = c) did not present any significant difference; Significance level according to the Tukey's test is represented as \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \* $p < 0.1$  vs DMSO and acetone control (1:1) (Testimony).

Regarding viability, the results from the same extract at a concentration of 100 µg/ml showed that 52% of the fourth-stage (L4) larvae and 82% of the pupae were viable, and that 37% of the L3 larvae reached adult stage (Table 1b). From the crude methanol extract at the concentrations of 10 and 100 µg/ml, respectively, the larval mortality rates (L3 + L4) were 53 and 61%, respectively (Table 1c). At the concentration of 100 µg/ml, pupal mortality recorded was 18% (Table 1c).

The hexane extract of *O. anisum* interfered with larval development ( $4.1 \pm 2.8$  days;  $p < 0.1$ ) and L3-adult development/emergence ( $9 \pm 0$  days;  $p < 0.1$ ) of *Ae. aegypti*, at the concentration of 100 µg/ml (Table 2a). At the same concentration, the larval viability was 12% ( $2 \pm 3.5$  days;  $p < 0.001$ ), and only 3% of these emerged as adult (Table 2b). The same extract at a concentration of 100 µg/ml caused third-stage larval mortality of 72% after 48 h and fourth-stage larval mortality of 25%. This extract at a concentration of 200 µg/ml, caused 100% larval mortality 24 h after the treatment (Table 2c).

The bioassays performed using 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene at the concentration of 10 µg/ml showed that this interfered with the duration of development in the larvae ( $2 \pm 0$  days;  $p < 0.001$ ); pupae ( $7.2 \pm 0.5$  days;  $p < 0.001$ ); and the L3-Adult stages ( $9 \pm 0$  days;  $p < 0.001$ )

(Table 3a). The larvae of *Ae. aegypti* treated with 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene at a concentration of 10 µg/ml showed 8% viability at the larval stage (L3) and 60% at the pupal stage, and 5% of the L3 larvae reached adult stage (L3-adult) (Table 3b). Treatment with the isolate 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene at a concentration of 1 µg/ml resulted in 44% larval mortality (L3 + L4) (Table 3c). At a concentration of 10 µg/ml, the third-stage larval and pupal mortality was 92 and 40%, respectively (Table 3c). At the highest concentration tested (30 µg/ml), the L3 larval mortality was 100%, 24 h after the treatment. This treatment showed  $LC_{50} = 1.6$  µg/ml (lower 95% confidence limit = 0.7 µg/ml and upper limit = 3.3 µg/ml) (Table 3c).

## DISCUSSION

Several species of the genus *Piper* have been investigated regarding their insecticidal activity<sup>3</sup>. In India, species like *Piper longum*, *P. betle* and *P. cubeba* have shown insecticidal activity against mosquitoes and flies<sup>25</sup>. Phytochemical studies on *Piper* species have shown the presence of a variety of bioactive metabolites, including alkaloids, chromenes, amides, flavonoids and terpenoids<sup>26</sup>. These compounds have several modes of action, including contact toxicity, synergism, repellent and antifeedant properties<sup>27</sup>.

Table 2. Duration of development (a), viability (b) and mortality (c) among *Ae. aegypti* larvae (L3) treated through culturing with *n*-hexane extract (mg/ml) of *O. anisum*

(a)	Larvae (Days)		Pupae (Days)		Emergence (Days)	
	$\bar{X} \pm SD$	VI	$\bar{X} \pm SD$	VI	$\bar{X} \pm SD$	VI
Control	2.9 ± 0.7a	2–5	12.5 ± 3.5a	8–19	16.2 ± 3.7a	9–20
Testimony	3 ± 0.6a	2–6	12 ± 3a	7–17	15.7 ± 3.3a	9–19
10	2.7 ± 1a	2–6	16.1 ± 3.7b***	8–20	18.2 ± 3.8a	9–21
100	4.1 ± 2.8b*	2–9	8 ± 0a	8–8	9 ± 0b*	9–9
200	0	0	0	0	0	0

(b)	L3–L4		L4–Pupae		Pupae		L3–Adult	
	$\bar{X} \pm SD$	%	$\bar{X} \pm SD$	%	$\bar{X} \pm SD$	%	$\bar{X} \pm SD$	%
Control	20 ± 0a	100	20 ± 0a	100	20 ± 0a	98	19.7 ± 0.6a	98
Testimony	20 ± 0a	98	19.7 ± 0.7a	98	19 ± 1a	91	17.6 ± 2.5a	88
10	20 ± 0a	92	19.7 ± 0.6a	11	5.3 ± 4.5b***	17	2.7 ± 2.1b***	2
100	20 ± 0a	28	2 ± 3.5b***	12	0.7 ± 1.1c***	100	0.7 ± 1.1b***	3
200	20 ± 0a	0	0	0	0	0	0	0

(c)	L3			L4			Pupae		
	$\bar{X} \pm SD$	VI	%	$\bar{X} \pm SD$	VI	%	$\bar{X} \pm SD$	VI	%
Control	0	0	0	0	0	0	0.3 ± 0.7a	17–17	2
Testimony	0.7 ± 1.1a	3–3	2	0.3 ± 0.7a	16–16	2	1.3 ± 2.3a	17–18	9
10	0.3 ± 0.7a	3–5	8	14.7 ± 3.5b***	7–14	8	0	0	0
100	18 ± 3.5b***	2–3	72	1.3 ± 2.3a	2–14	25	0	0	0
200	20 ± 0b***	1–1	100	0	0	0	0	0	0

Experiments with 20 larvae (L3) of *Ae. aegypti*, for each test group and control, in triplicate (n = 60); Mean and standard deviation ( $\bar{X} \pm SD$ ); Range of variation (VI); Values followed by the same letter (a = a, b = b, c = c) did not present any significant difference; Significance level according to the Tukey's test is represented as \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \* $p < 0.1$  vs DMSO and acetone control (1:1) (Testimony).

Table 3. Duration of development (a), viability (b) and mortality (c) among *Ae. aegypti* larvae (L3) treated through culturing with 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene (mg/ml), isolated from the hexane fraction of stems of *O. anisum*

(a)	Larvae (days)		Pupae (days)		Emergence (days)	
	$\bar{X} \pm SD$	VI	$\bar{X} \pm SD$	VI	$\bar{X} \pm SD$	VI
Control	6.2 ± 2.8a	4–11	15.3 ± 3.3a	8–19	17.3 ± 2.7a	10–23
Testimony	8.6 ± 1.9b	4–12	17.1 ± 2.4b	7–17	20 ± 2.8b	9–24
1	8.1 ± 2.6b	4–11	11.4 ± 2.9c***	8–20	15.4 ± 1.6c***	9–16
10	2 ± 0c***	2–2	7.2 ± 0.5c***	7–8	9 ± 0d***	9–9
30	0	0	0	0	0	0

(b)	L3–L4		L4–Pupae		Pupae		L3–Adult	
	$\bar{X} \pm SD$	%	$\bar{X} \pm SD$	%	$\bar{X} \pm SD$	%	$\bar{X} \pm SD$	%
Control	20 ± 0a	95	19.3 ± 1.1a	98	19 ± 0a	100	18.6 ± 1.5a	93
Testimony	20 ± 0a	97	19.3 ± 1.1a	100	19.3 ± 1.1a	100	19.3 ± 1.1a	97
1	20 ± 0a	83	16.7 ± 3.5a	38	6.3 ± 1.5b***	100	6.3 ± 1.5b***	32
10	20 ± 0a	8	1.7 ± 1.5b***	100	1.7 ± 1.5c***	60	1 ± 1c***	5
30	20 ± 0a	0	0	0	0	0	0	0

(c)	L3			L4			Pupae		
	$\bar{X} \pm SD$	VI	%	$\bar{X} \pm SD$	VI	%	$\bar{X} \pm SD$	VI	%
Control	1 ± 1a	7–7	5	0.3 ± 0.6	8–8	2	0	0	0
Testimony	0.6 ± 1.1a	7–7	3	1 ± 1	16–16	0	0	0	0
1	3.3 ± 3.5a	11–11	17	5.3 ± 5.5	7–14	27	0	0	0
10	18.3 ± 1.5b***	1–1	92	0	0	0	0.7 ± 0.6b*	8–9	40
30	20 ± 0c***	1–1	100	0	0	0	0	0	0

Experiments with 20 larvae (L3) of *Ae. aegypti*, for each test group and control, in triplicate (n = 60); Mean and standard deviation ( $\bar{X} \pm SD$ ); Range of variation (VI); Values followed by the same letter (a = a, b = b, c = c) did not present any significant difference; Significance level according to the Tukey's test is represented as \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \* $p < 0.1$  vs DMSO and acetone control (1:1) (Testimony).

Marques and Kaplan<sup>3</sup> reported that most of the studies on *Piper* and *Ae. aegypti* refer to the active extract, essential oil and/or pure isolated secondary metabolites of *P. nigrum*. With reference to essential oils, the literature on the genus *Piper* shows a great variety of species with active essential oils. *Piper aduncum* is the species with essential oil showing significant larvicidal properties against *Ae. aegypti*, that has been extensively studied. The arylpropanoid dillapiole-rich chemotype species has been shown to be very efficient against L3 larvae of *Ae. aegypti*<sup>28</sup>.

The previous studies by Marques *et al*<sup>13-14</sup>, have reported about the isolation and characterization of methylenedioxybenzene derivatives (1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene) from the leaves and roots of *O. anisum* Sprengel. This arylbutanoid compound was characterized as the major compound present in this species, especially in the leaves and stems, with yield of > 1 g (w/w). Moreira *et al*<sup>12</sup> also reported that the 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene was the main constituent of the essential oil from *O. anisum* leaves, accounting for up to 95% of the volatile components.

The larvicidal activity of 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene isolated from *O. anisum* is in agreement with Nascimento *et al*<sup>29</sup> who reported results from chemical and insecticidal investigations on the essential oils from *P. klotzschianum*. The major chemical constituent identified from this plant species was again the metabolite 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene, which accounted for 96.19% of the essential oil from the roots; 84.75% from the stems; 81.04% from the leaves and 36.92% from the seeds. The LC<sub>50</sub> of the crude essential oil against IV-instar *Ae. aegypti* larvae was observed for the seeds (LC<sub>50</sub> = 13.27 µg/ml) and for the roots (LC<sub>50</sub> = 10 µg/ml).

The evident pronounced biosynthesis of this substance can be related to the defense mechanisms of the plant against pathogens and to a large variety of aggression from natural external agents<sup>30</sup>. Phenylpropanoids and their derivatives are known to contribute to plant mechanism responses towards biotic and abiotic factors such as ozone exposure, low nutrient levels, pathogen attacks (fungal, bacterial, and viral) and herbivore attack<sup>31</sup>. Many of these compounds have been shown to be active against the vector of dengue virus. Dias and Moraes<sup>32</sup> described many simple pure phenylpropanoids that were active against *Ae. aegypti*. The C6–C1 benzyl salicylate was found to be an active phenolic compound with a low LC<sub>50</sub> of 6.8 µg/ml, followed by the C6–C1 compound (*E*)-cinnamaldehyde (LC<sub>50</sub> = 24.4 µg/ml) and the isomers (*E*)-asarone with LC<sub>50</sub> = 27 µg/ml and (*Z*)-asarone,

which were more active, with LC<sub>50</sub> = 16 µg/ml. Simple methylenedioxy phenylpropanoids such as safrole, the chemical marker of *P. hispidinervum*, were active with LC<sub>50</sub> = 9.88 µg/ml. Similar structural methylenedioxy phenylpropanoids such as eugenol and methyl eugenol were also active, with LC<sub>50</sub> of 44.5 µg/ml and 57.65 µg/ml, respectively. The presence of a methylenedioxy moiety in phenylpropanoids contributes towards increasing the activity of safrole, in comparison with similar structural compounds such as eugenol and methyl eugenol. The methylenedioxy phenyl (MDP) moiety is a structural feature found in many natural occurring special metabolites, especially in the alkaloids, amides and phenylpropanoids found in *Piper* species. This MDP moiety is present in 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene and also in all aristolactams isolated from the roots of *O. anisum*. The insects are the preferential target species for these plant allelochemicals. Murray<sup>31</sup> described a possible mechanism of action for these metabolites in insects consisting of modulation of the insect cytochrome P-450 (CYP) pathways to enhance or synergize the toxicity of the primary allelochemical deterrent, thereby avoiding concomitant plant damage. Many studies have shown that the compounds such as *Piper* amides and methylenedioxybenzene derivatives undergo oxidative biotransformation through CYP insect enzymes, thus leading to formation of an intermediate inhibitory metabolite complex. The toxic effect of these metabolites is mediated through modulation of the processes of inhibition and induction of the insect CYP<sup>31</sup>. The phenylpropanoid methysticin (isolated from *P. methysticum*), the amide piperine (isolated from *P. nigrum*) and the more complex MDP-substituted agents podophyllotoxin and tetrahydroberberine have been shown to enhance the toxicity of pyrethroids and carbamates in several insect species<sup>25, 33</sup>. Many studies have described the toxic effect of lignans, aristolochic acid and amides containing the MDP moiety<sup>34-36</sup>. Recent studies by Cabral *et al*<sup>16</sup> and Leite *et al*<sup>19</sup> on the neolignan grandisin (isolated from *P. solmsianum*) showed similar toxicity against *Ae. aegypti* at concentrations of 150 and 200 µg/ml. Maleck *et al*<sup>20</sup> confirmed that piperamides isolated from *P. tuberculatum* and *P. scutifolium* presented larvicidal activity, with LD<sub>50</sub> of 155.5 and 50 µg/ml, respectively. In the present study the phenylpropanoid derivative *i.e.* 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene was shown to be a potential natural alternative pesticide since it is a volatile compound that is less persistent on surfaces and is degraded more rapidly. The major active compound, 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene, is responsible for more than 10% of *n*-hexane extract and easily isolated in high purity level. Due to these facts, the economical use

of this natural source could be viable and the sustainable cultivation of this native Brazilian species by the communities may be encouraged.

### CONCLUSION

The study findings suggest that the metabolite, 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene could be used as a natural alternative adjuvant pesticide, in new compositions that would be environmentally safer than some synthetic insecticides. The bioassays using this metabolite and enriched fractions revealed significant toxicity among L3 larvae after 24 h after the treatment at low concentrations.

In addition, the extraction of this natural active compound from Brazilian native shrub species may be a sustainable economic alternative against the tropical viruses such as: dengue, zika, urban yellow fever and chikungunya vector, and may contribute towards reducing the extensive use of toxic pesticides in developing countries with high rates of these viral infections.

### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank to CAPES, FAPERJ and CNPq for financially supporting the study.

### Conflict of interest

The authors report no conflict of interest.

### REFERENCES

- Global strategy for dengue prevention and control 2012–20. Geneva: World Health Organization 2012. Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75303/1/9789241504034\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75303/1/9789241504034_eng.pdf) (Accessed on January 17, 2017).
- Gyawali N, Bradbury RS, Taylor-Robinson AW. The epidemiology of dengue infection: Harnessing past experience and current knowledge to support implementation of future control strategies. *J Vector Borne Dis* 2016; 53(4): 293–304.
- Marques AM, Kaplan MAC. Active metabolites of the genus *Piper* against *Aedes aegypti*: Natural alternative sources for dengue vector control. *Univ Sci (Bogota)* 2015; 20(1): 61–82.
- Marinho F, Araújo VEM, Porto DL, Ferreira HL, Coelho MRS *et al.* Microcephaly in Brazil: Prevalence and characterization of cases from the Information System on Live Births (Sinasc), 2000–2015. *Epidemiol Serv Saúde* 2016; 25(4): 1–11.
- Pan American Health Organization (PAHO), *Zika–Epidemiological Report Brazil (2016)*. Available from: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=docview&gid=35221&Itemid=270](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=docview&gid=35221&Itemid=270) (Accessed on January 17, 2017).
- Emergencies preparedness, response. Yellow fever–Brazil: Disease outbreak news*. Geneva: World Health Organization 2017. Available from: <http://www.who.int/csr/don/13-january-2017-yellow-fever-brazil/en/> (Accessed on January 17, 2017).
- Garcez WS, Garcez FR, Silva LMGE, Sarmiento UC. Naturally occurring plant compounds with larvicidal activity against *Aedes aegypti*. *Rev Virtual Quím* 2013; 5(3): 363–93.
- Lambrano RH, Castro NP, Gallardo KC, Stashenko E, Verbel JO. Essential oils from plants of the genus *Cymbopogon* as natural insecticides to control stored product pests. *J Stored Prod Res* 2015; 62: 81–3.
- Herrera JM, Zunino MP, Dambolena JS, Pizzolitto RP, Ganan NA, Lucini EI, *et al.* Terpene ketones as natural insecticides against *Sitophilus zeamais*. *Ind Crops Prod* 2015; 70: 435–42.
- Colvard MD, Cordell GA, Villalobos R, Sancho G, Soejarto DD, Pestle W, *et al.* Survey of medical ethnobotanicals for dental and oral medicine conditions and pathologies. *J Ethnopharmacol* 2006; 107: 134–42.
- Leitão F, Leitão SG, Fonseca-Kruel VS, Silva IM, Martins K. Medicinal plants traded in the open-air markets in the State of Rio de Janeiro, Brazil: An overview on their botanical diversity and toxicological potential. *Rev Bras Farmacogn* 2014; 24: 225–47.
- Moreira DL, Guimarães EF, Kaplan MAC. Butyl-3,4-methylenedioxybenzene as the major constituent of the essential oil from *Ottonia anisum*. *J Essent Oil Res* 1997; 9: 565–8.
- Marques AM, Velozo LSM, Guimarães EF, Kaplan MAC. Caracterização de derivado arilbutanoidico em folhas e raízes de *Ottonia anisum* Sprengel. *Rev Bras Farmacogn* 2008; 18: 709–12.
- Marques AM, Velozo LS, de Moreira DL, Guimarães EF, Kaplan MA. Aristolactams from roots of *Ottonia anisum* (Piperaceae). *Nat Prod Commun* 2011; 6: 939–42.
- Lopez KE, Marques AM, Moreira DL, Velozo RS, Sudo R, Sudo GZ, *et al.* Local anesthetic activity from extracts, fractions and pure compounds from the roots of *Ottonia anisum* Spreng. (Piperaceae). *An Acad Bras Cienc* 2016; 88(4): 2229–37.
- Cabral MMO, Alencar JA, Guimarães AE, Kato MJ. Larvicidal activity of grandisin against *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc* 2009; 25:103–5.
- Narciso JOA, Soares ROA, Mallet JRS, Guimarães AE, Barbosa-Filho JM, Maleck M, *et al.* Burchellin: Study of bioactivity against *Aedes aegypti*. *Parasit Vectors* 2014; 7: 172.
- Maleck M, Hollanda PO, Serdeiro MT, Soares ROA, Honório NA, Silva CG. Toxicity and larvicidal activity of *Podophyllum*-based lignans against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 2017; 54(1): 159–66.
- Leite ACCF, Kato MK, Soares ROA, Guimarães AE, Mallet JRS, Cabral MMO. Grandisin caused morphological changes larval and toxicity on *Aedes aegypti*. *Rev Bras Farmacogn*. 2012; 22(3): 517–21.
- Maleck M, Ferreira B, Mallet JRS, Guimarães AE, Kato M. Citotoxicity of Piramides Towards *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 2014; 51: 458–63.
- Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvae*. Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69101/1/WHO\\_CDS\\_WHOPES\\_GCDPP\\_2005.13.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69101/1/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf) (Accessed on July 14, 2016).
- Sokal RR, Rohlf FJ. *Biometria: Principios y metodos estadísticos em la investigación biológica*. Madri, España: H. Blume 1979; p. 832.
- Motulsky HJ. *Analyzing data with Graphpad Prism*. San Diego, CA: GraphPad Software Inc 2002.
- Hamilton MA, Russo RV. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in bioassays. *Environ Sci Technol* 1978; 12: 417–22.

25. Lee HS. Pesticidal constituents derived from Piperaceae fruits. *Agri Chem Biotechnol* 2005; 48(2): 65-74.
26. Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, et al. Phytochemistry of Genus *Piper*. *Phytochemistry* 1997; 46(4): 597-673.
27. Scott IM, Jensen HR, Philogène BJR, Arnason JT. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochem Rev* 2008; 7: 65-75.
28. Almeida RRP, Souto RNP, Bastos CN, da Silva MHL, Maia JGS. Chemical variation in *Piper aduncum* and biological properties of its dillapiole-rich essential oil. *Chem Biodivers* 2009; 6(9): 1427-34.
29. Nascimento JC, David JM, Barbosa LC, de Paula VF, Demuner AJ, Guimarães EF, et al. Larvicidal activities and chemical composition of essential oils from *Piper klotzschianum* (Kunth) C. DC. (Piperaceae). *Pest Manag Sci* 2013; 69(11): 1267-71.
30. Vogt T. Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol Plant* 2010; 3: 2-20.
31. Murray M. Toxicological actions of plant-derived and anthropogenic methylenedioxyphenyl-substituted chemicals in mammals and insects. *J Toxicol Environ Health (Part B)* 2012; 15: 365-95.
32. Dias CN, Moraes DFC. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: Review. *Parasitol Res* 2014; 113: 565-92.
33. Jensen HR, Scott IM, Sims SR, Trudeau VL, Arnason JT. The effect of a synergistic concentration of a *Piper nigrum* extract used in conjunction with pyrethrum upon gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol Biol* 2006; 15: 329-39.
34. Harmatha J, Nawrot J. Insect feeding deterrent activity of lignans and related phenylpropanoids with a methylenedioxyphenyl (piperonyl) structure moiety. *Entomol Exp Appl* 2002; 104: 51-60.
35. Navickiene HM, Miranda JE, Bortoli SA, Kato MJ, Bolzani VS, Furlan M. Toxicity of extracts and isobutyl amides from *Piper tuberculatum*: Potent compounds with potential for the control of the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *Pest Manag Sci* 2007; 63: 399-403.
36. Park IK, Shin SC, Kim CS, Lee HJ, Choi WS, Ahn YJ. Larvicidal activity of lignans identified in *Phryma leptostachya* var. *asiatica* roots against three mosquito species. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 969-72.

*Correspondence to:* Dr André M. Marques, Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais Walter Mors (IPPN), Centro de Ciências da Saúde, Bloco H - 1º andar, Universidade Federal do Rio de Janeiro. CEP 21.941-590 - Rio de Janeiro, Brazil.  
E-mail: andrefarmaciarj@yahoo.com.br

*Received:* 7 July 2016

*Accepted in revised form:* 18 January 2017

### **Artigo 3**

**Toxicity and larvicidal activity of Podophyllum-Based lignans against *Aedes aegypti*  
(Diptera: Culicidae)**

Vector Control, Pest Management, Resistance, Repellents

## Toxicity and Larvicidal Activity of Podophyllum-Based Lignans Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Marise Maleck,<sup>1,2,3,4</sup> Priscila de Oliveira Hollanda,<sup>1,2</sup> Michele Teixeira Serdeiro,<sup>1,3</sup> Renata Oliveira de Araújo Soares,<sup>5</sup> Nildimar Alves Honório,<sup>6</sup> and Cláudia Gontijo Silva<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Insetos Vetores, Universidade Severino Sombra, Rua Antenor Caravana, 677, Barreiro, 27700-000 Vassouras, RJ, Brazil (marise.maleck@gmail.com; priscilahollanda@yahoo.com.br; mserdeiro@gmail.com), <sup>2</sup>Pró-Reitoria das Ciências da Saúde e Humanas, Universidade Severino Sombra, Av. Expedicionário Oswaldo Almeida Ramos, 280, 27700-000 Vassouras, RJ, Brazil, <sup>3</sup>Mestrado Profissional em Ciências Ambientais, Universidade Severino Sombra, Av. Expedicionário Oswaldo Almeida Ramos, 280, 27700-000 Vassouras, RJ, Brazil, <sup>4</sup>Corresponding author, e-mail: marise.maleck@gmail.com, <sup>5</sup>Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brazil, 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil (soaresroa@gmail.com), <sup>6</sup>Laboratório de Transmissores de Hematozoários e Núcleo Operacional Sentinela de Mosquitos Vetores, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brazil, 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil (nahonorio1@gmail.com), and <sup>7</sup>Serviço de Biotecnologia Vegetal, Fundação Ezequiel Dias, Rua Conde Pereira Carneiro, 80, 30510-010 Belo Horizonte, MG, Brazil (claudia.gontijo@funed.mg.gov.br)

Received 6 April 2016; Accepted 29 July 2016

### Abstract

*Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) is a mosquito species that has adapted to urban environments and is the main vector of dengue viruses. Because of the increasing incidence of dengue, a more environmentally acceptable insecticide needs to be found. Natural products have been and continue to be an important source of leading compounds that can be modified in order to develop new drugs. The lignan family of natural products includes compounds with a diverse spectrum of biological activity. Podophyllotoxin and its related lignans represent an exciting class of natural products that can be targeted at different types of biological activity and are therefore worth exploring further. This study had the aim of evaluating the larvicidal activity of an ethanolic extract from the rhizomes and roots of *Podophyllum hexandrum* (PM-3) and its isolated lignans, podophyllotoxone (1) and desoxypodophyllotoxin (2), on the larvae of the mosquito vector *Ae. aegypti*. The PM-3 extract and the compounds (1) and (2) were dissolved in a mixture of acetone and dimethylsulfoxide at final concentrations of 1, 10, 30, 50, 100, and 200 µg/ml. After dilution, the solutions were applied (µg/ml) to the larvae-rearing medium. Overall, the ethanolic extract from the rhizomes and roots of *P. hexandrum* and the compounds (1) and (2) showed larvicidal activity against the larvae of *Ae. aegypti*. According to the results from this study, it can be concluded that podophyllotoxone (1) and desoxypodophyllotoxin (2) exhibited significant toxicity toward *Ae. aegypti* larvae.

**Key words:** *Aedes aegypti*, larvicidal activity, lignans, *Podophyllum hexandrum*

*Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) is a cosmopolitan mosquito found in tropical and subtropical regions around the world (Consoli and Lourenço-de-Oliveira 1994) and is considered to be the principal vector of the dengue virus (Valotto et al. 2011) while *Ae. albopictus* is the second (Naish et al. 2014). Dengue is a neglected disease that is considered to be the most important arbovirolosis worldwide and a severe public health problem (World Health Organization [WHO] 2012) on the populations of endemic areas. This arbovirolosis is endemic in >125 countries, and it has been estimated that between 2.5 and 3.6 billion people around the world are at risk (Ferreira 2012). In Brazil alone, in 2015, 1,350,406 probable dengue cases were notified (30th

epidemiological week). Within this total, 614 deaths were notified (Brasil 2015).

Dengue viral infection is characterized by a wide spectrum of clinical presentations ranging from a mild fever to a severe hemorrhagic fever, although more unusual manifestations including neurological, hepatic, renal, and other isolated organ involvement are being reported due to a rising disease burden (WHO 2011). The main strategy for preventing dengue has consisted of controlling the vector mosquito as well the multiplication of its larvae even though these strategies are not enough in combating the disease (Marques and Kaplan 2015). At the time of submission of this research paper there was neither antiviral therapy nor a vaccine to protect against

dengue. There is growing concern regarding the changing epidemiology of dengue worldwide, and appropriate medical care would help those who are likely to develop severe disease. Clinical management requires the triage of patients and early diagnosis of cases, trained health care staff, clinical practice guidelines, medicines, equipment, laboratory support, and diagnostic resources. These issues have been reported to reduce the number of hospital admissions and to save the lives of patients at primary and secondary levels (WHO 2011).

It is well known that higher plants have the ability to produce a wide range of natural products. Because of their molecular diversity, they are a source of drugs, oils, flavors, fragrances, food additives, resins, gums, and waxes. In addition to their commercial use as fine chemicals in different industries, they are also involved in the ecological adaptation of plants to the environment (Cotton 1996).

Secondary metabolites are among the large number of chemically diverse compounds produced by plants. They are used for defense against phytophagous insects, mosquitoes, microorganisms, and competing plants (Maia and Moore 2011), and they may aid in the survival of a species. In nature, most pharmacologically active constituents of such species are products of secondary metabolites and their biosynthesis and accumulation have been correlated with plant defense responses to predators and pathogen attack and with wound response (Wu and Chappell 2008). While some of these substances, such as tannins, alkaloids, and terpenoids, have defense functions, others may serve as attractants, such as essential oils and flavonoids; while yet others, including some lignans and terpenoids, act as insect antifeedants. In addition to this, secondary metabolites have an important role in the ecological and phylogenetic relationships of organisms (Harmatha and Dinan 2003). They can also be used as a source of compounds for insect control and natural repellents, as well as templates for developing commercial pesticides (Duke 1990, Maia and Moore 2011).

In many developing countries, some plant-based methods such as the burning of raw material, crude extracts, candles, and oil preparations have shown repellency against mosquitoes and have provided protection for humans against insect disease vectors. For many rural communities, these traditional methods are affordable and easily available, although some do not provide long-lasting protection (Maia and Moore 2011).

Many plant extracts and their isolated compounds have been studied for the control of insects. In this context, Souza and collaborators (Souza et al. 2011) evaluated an ethanolic seed extract of *Myracrodruon urundeuva* which showed larvicidal compounds against *Ae. aegypti* larvae. In a further work, the researchers isolated the compound *m*-pentadecadienyl-phenol that exhibited strong larvicidal and pupicidal activity, with an LC<sub>50</sub> value of 10.16 and 99.06 µg/ml, respectively. In addition, it showed a potent ovicidal activity, with an IC<sub>50</sub> value of 49.79 µg/ml (Souza et al. 2012). In another study, amides and lignans isolated from the extracts of *Piper* species have shown larvicidal activity against *Ae. aegypti* (Marques and Kaplan 2015). Furthermore, plant extracts have been used to target mosquitoes, ectoparasites, and other pests of veterinary and medical importance (George et al. 2014).

Amongst plant phenolic compounds, lignans are a large group of compounds that are widely distributed in almost all parts of many plant species (Ayres and Loike 1990). Chemically, they are formed by oxidative dimerization of two phenylpropanoid units coupled at the central carbon of their side-chains, and a variety of structures occur (Dewick 1989). Lignans show a diverse spectrum of biological activity (MacRae and Towers 1984) that could suggest they have more than one mechanism of action. In particular, lignans of 1-aryl-tetralin type, such as podophyllotoxin, possess a wide range of

biological activity including antitumor, antiviral, antifungal, and insecticidal activity (Charlton 1998, Miyazawa et al. 1999, Lee and Xiao 2003). Because of its antitumor activity, podophyllotoxin has been used as a leading compound for developing drugs (Apers et al. 2003) used in cancer chemotherapy (Gordaliza et al. 2000). Moreover, podophyllotoxin derivatives have shown forms of biological activity other than antineoplastic activity and are therefore worth further exploration (Lee and Xiao 2005).

Lignans and their glycosides have been isolated and identified from the roots and rhizomes of *Podophyllum* species (Jackson and Dewick 1984). Within the family Berberidaceae, the genus *Podophyllum* comprises 14 species (Shaw 2002). The species *Podophyllum hexandrum* L. (syn. *P. emodi* Wall), known as Indian *Podophyllum*, is found in some Asian countries and in the Himalayan areas of Pakistan and India (Rao and Hajra 1993) while *P. peltatum*, the American *Podophyllum*, is widespread in Eastern North America (Meijer 1974). Successful introduction of clinical drugs has led to more attention being given to *Podophyllum*-based lignans. There has been renewed interest in these compounds for addressing a variety of biological targets and their new properties. Within this context, our group has carried out studies on lignans and their effects on insects (Cabral et al. 1995, 2000a, 2007, 2009), and have indicated that these metabolites might act as larvicides against *Ae. aegypti* (Leite et al. 2012).

Therefore, natural products and plant extracts can provide unlimited opportunities for the discovery of new insecticides and larvicides that can further be explored for controlling the dengue mosquito and its larvae.

The present study aimed to evaluate the toxicity of an ethanolic extract from the rhizomes and roots of *P. hexandrum* (PM-3), along with its isolated lignans podophyllotoxone (1) and desoxypodophyllotoxin (2), against the dengue, zika, and chikungunya vector, i.e. the mosquito *Ae. aegypti*. In this work we report on the isolation of the compounds (1) and (2) from the Asian *Podophyllum*, which was used as a source of material even though the American species was an alternative source (Silva 2000). The Asian species was used because there was insufficient American material available. The other isolated lignans could not be evaluated due to a shortage of material. Both podophyllotoxone and desoxypodophyllotoxin were identified by means of comparisons with standards and by using spectroscopic methods. These lignans were previously isolated from *Podophyllum* species by Dewick and collaborators (Dewick and Jackson 1981; Jackson and Dewick 1984, 1985).

## Materials and Methods

### Plant Material

A mixture of dried rhizomes and roots of *P. hexandrum* was purchased from United Chemical and Allied Products, Calcutta, India, and the material was ground into powdered form.

### Extract Preparation

Powdered material of *P. hexandrum* (10g) was stirred with 30 ml of 95% (v/v) hot ethanol for 10 min. The mixture was cooled to room temperature and filtered, and the residue was reextracted with a further aliquot of 95% (v/v) ethanol (3 × 30ml). The filtered extracts were combined and concentrated in a rotatory evaporator, under reduced pressure at 35°C, to give a PM-3 residue, which was redissolved in 3.5 ml of ethanol.

### Isolation of Lignans

The PM-3 extract was applied as bands onto preparative glass plates coated with silica gel (Merck Kieselgel GF<sub>254</sub>, United Kingdom) and was developed in a chloroform–methanol mixture (25:1). Lignan bands were located by means of UV light, or by spraying the plates with a mixture of concentrated nitric acid in acetic acid (3:10), followed by heating to obtain a color reaction (Jackson and Dewick 1985). The two lignans were isolated from band 1 ( $R_f = 0.9$ ), which was scraped from the plates, transferred to a small sintered glass column, and eluted with 30 ml of acetone. Preparative TLC in ether was used to further purify band 1. The two compounds isolated were crystallized from ethanol. The fractions eluted were resuspended in acetone, applied to TLC aluminum sheets in silica gel (Merck Kieselgel GF<sub>254</sub>), and developed in a chloroform–methanol mixture (25:1). The melting points were determined using the Gallenkamp apparatus and were uncorrected. Both compounds were identified by means of <sup>1</sup>H NMR (Bruker AM 400) and EIMS (AEI MS 902), and through comparison with data in the literature (Jackson and Dewick 1984).

### *Aedes aegypti*

*Ae. aegypti* eggs were obtained from the Núcleo Operacional Sentinelas de Mosquitos Vetores, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro. The mosquitoes were field collected with 240 ovitraps installed in FIOCRUZ campus. The bioassays were held in the Laboratório de Insetos Vetores, Universidade Severino Sombra, Rio de Janeiro. All experiments were carried out on third-instar larvae (L3). For the bioassays, eggs were placed in a receptacle containing mineral water, with fish food added daily (0.3 mg), thus providing a diet of fishmeal (Alcon Guppy, Alcon, Camboriu, SC, Brazil) (Maleck et al. 2014, Narciso et al. 2014).

### Bioassays

Solutions of an ethanolic extract of *P. hexandrum* (PM-3), podophyllotoxone (1) and desoxypodophyllotoxin (2) were dissolved in a mixture of acetone and dimethylsulfoxide (DMSO) (1:1). These were applied at final concentrations of 1, 10, 30, 50, 100, and 200 µg/ml to a receptacle (4.0 cm diameter by 4.5 cm high) containing mineral water (20–25 ml) adapted from WHO (2005). After 1 h of treatment, a diet of fishmeal (Alcon Guppy) at a dose of 0.3 mg/larva was added daily to the medium (Maleck et al. 2014, Narciso et al. 2014). *Ae. aegypti* larval groups (L3; 20–25 larvae per group) were evaluated in triplicate with three repetitions. Two control groups were used: one with an acetone–DMSO solution (without substance or crude extract; 1 µl/larvae) and another untreated in mineral water. The development of *Ae. aegypti* larvae was observed until 30 d after the experiments. The larvae were maintained in a climate-controlled chamber at 28 ± 1°C and 70 ± 10% relative humidity (RH). The bioassays followed the methodology of Cabral and collaborators (2009) and Narciso and collaborators (2014), which was adapted from WHO (2005). The data were analyzed by means of one-way ANOVA with means separated using the Tukey test with a significance level of 5% (Sokal and Rohlf 1979). Standard deviations were calculated using the averages from the experiments through Graphpad InStat 3.05 (Motulsky 2002) and Bioestat 5.0 (Ayres et al. 2007). LD<sub>50</sub> was calculated by means of trimmed Spearman–Kärber analysis (Hamilton and Russo 1978).

### Cytotoxicity Assay

Mouse peritoneal macrophages ( $2 \times 10^6$ ) in cold, were plated and maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 1 mmol

liter<sup>-1</sup> HEPES, Penicillin G (10<sup>5</sup> IU liter<sup>-1</sup>), streptomycin sulfate (10 g liter<sup>-1</sup>) at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. One hour later, nonadherent cells were removed, and the remaining adherent cells were subsequently cultured in RPMI medium containing 10% FCS for 24 h. The compounds podophyllotoxone (1) and desoxypodophyllotoxin (2) dissolved in acetone–DMSO (Sigma Chemical Co.) (1:1) were tested within a concentration range of 20–160 µg/ml, such that the final concentration of the solvent in the experiments never exceeded 1.6%. The compounds were added to a 96-well microplate and incubated for 24 h at 37°C in RPMI medium containing 10% fetal calf serum (FCS, Sigma Chemical Co.). The procedure used to observe the drug effects was based on the MTT-dye reduction assay as described by Soares and collaborators (2011). MTT (22 µl at 5 mg/ml) was added to each well, and then the plates were further incubated for 4 h. Thereafter, the formazan crystals formed were dissolved with DMSO (80 µl per well), and the samples were measured in a spectrophotometer at 490 nm. All assays were performed in triplicate. The cells alone were used as a negative control.

### Insecticides Assay

The substance diflubenzuron 25% champion was dissolved in water. It was applied at final concentration of 10 µg/ml to a receptacle containing mineral water (20 ml) (Maleck et al. 2014, Narciso et al. 2014). *Ae. aegypti* larval groups (L3; 20 larvae per group) were used: one with diflubenzuron solution (1 µl/larvae) and another untreated in mineral water (WHO 2005). After 1 h of treatment, a diet of fishmeal (Alcon Guppy) at a dose of 0.3 mg/larva was added daily to the medium (Maleck et al. 2014, Narciso et al. 2014). *Ae. aegypti* larval groups (L3; 20 larvae per group) were evaluated in triplicate with three repetitions. The larvae were maintained in a climate-controlled chamber at 28 ± 1°C and 70 ± 10% RH. The data were analyzed by means of one-way ANOVA with means separated using the Tukey test with a significance level of 5% (Sokal and Rohlf 1979). Standard deviations were calculated using the averages from the experiments through Graphpad InStat 3.05 (Motulsky 2002). The development of *Ae. aegypti* larvae was observed until 20 d after the experiments.

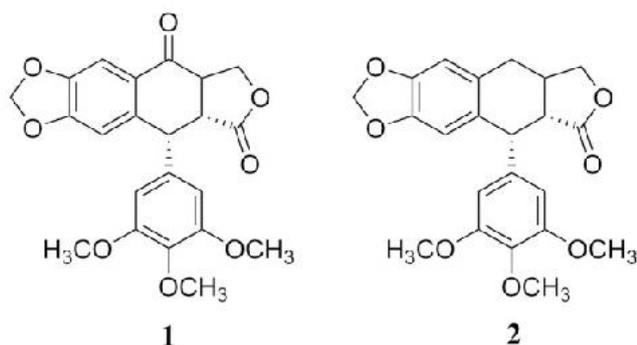
## Results

### Isolation and Identification of Lignans

The ethanolic extract from rhizomes and roots of *P. hexandrum* (PM-3) viewed under UV light showed the presence of eight fluorescent chromatographic zones (bands). In this paper, we report on the isolation of podophyllotoxone (1) and desoxypodophyllotoxin (2) from PM-3.

Band 1 ( $R_f = 0.9$ ) was initially isolated as a mixture of podophyllotoxone and desoxypodophyllotoxin (Dewick and Jackson 1981, Jackson and Dewick 1984), which was successfully separated by means of further chromatographic separation in ether (Broomhead 1989). Based on comparisons with standards on TLC plates, the upper band ( $R_f = 0.8$ ) was identified as podophyllotoxone (1) while the lower band ( $R_f = 0.7$ ) was identified as desoxypodophyllotoxin (2). Both compounds were recrystallized from ethanol, thus yielding 2.2 mg of podophyllotoxone (1) and 1.8 mg of desoxypodophyllotoxin (2). The characteristics of these two lignans are described below.

**Podophyllotoxone (1):** Melting point (mp) 185–187°C; in the literature mp 189–192°C (Dewick and Jackson 1981); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.56 (1H, s, H-5), 6.70 (1H, s, H-8), 6.39 (2H, s, H-2', H-6'), 6.10 (1H, d,  $J = 1.1$  Hz, OCH<sub>2</sub>O), 6.08 (1H, d,  $J = 1.1$  Hz, OCH<sub>2</sub>O), 4.85 (1H, d,  $J = 4.2$  Hz, H-1), 4.56 (1H, dd,  $J = 9.3, 9.2$  Hz, H-3α), 4.36 (1H, dd,  $J = 10.4, 9.3$  Hz, H-3β),



**Fig. 1.** Lignans isolated from the rhizomes and roots of *P. hexandrum* (1) Podophyllotoxone; (2) Desoxy-podophyllotoxin.

3.81 (3H, s, 4'-OMe), 3.74 (6H, s, H-3', H-5'-OMe), 3.54 (1H, ddd,  $J = 15.5, 10.4, 9.3$  Hz, H-3), 3.30 (1H, dd,  $J = 15.5, 4.3$  Hz, H-2); EIMS: 412 ( $M^+$ , 62%), 367 (16), 353 (5), 337 (7), 336 (5), 313 (6), 200 (5), 168 (24), 153 (11), 149 (100), 115 (6).

**Desoxy-podophyllotoxin (2):** mp 140–142°C; in the literature mp 146–152°C (Salako 1996);  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.67 (1H, s, H-5), 6.52 (1H, s, H-8), 6.35 (2H, s, H-2', H-6'), 5.95 (1H, d,  $J = 1.4$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 5.93 (1H, d,  $J = 1.3$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 4.61 (1H, br s, H-1), 3.92 (1H, dd, H-3a $\beta$ ), 3.82 (3H, s, 4'-OMe), 3.75 (6H, s, H-3', H-5'-OMe), 3.06 (1H, m, H-4 $\alpha$ ), 2.75 (1H, m, H-4 $\beta$ ), 2.73 (1H, m, H-3), 2.73 (1H, m, H-2); EIMS: 398 ( $M^+$ , 100%), 230 (11), 185 (20), 181 (35), 173 (27), 168 (12).

All the spectrometric data on the compounds (1) and (2) were in agreement with the values reported in the literature (Dewick and Jackson 1981, Jackson and Dewick 1984, Salako 1996) and both were elucidated (Fig. 1).

### Larvicidal Activity

The larvae (L3) of *Ae. aegypti* treated with the crude ethanolic extract of *P. hexandrum* (PM-3) presented significant delay in larval development at the concentrations of 10  $\mu\text{g/ml}$  (1–15 d), 50  $\mu\text{g/ml}$  (2–15 d), and 100  $\mu\text{g/ml}$  (9–14 d; Table 1A). The treatment with

PM-3 extract showed larval (L3) viability of 72% (50  $\mu\text{g/ml}$ ) and 20% (100  $\mu\text{g/ml}$ ). The L3-adult viability was 75%, 53%, and only 3% at the concentrations of 10, 50, and 100  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. Regarding mortality, effective toxic action was observed with increasing concentrations, such that the mortality of L3+L4 larvae was 15% (10  $\mu\text{g/ml}$ ), 46% (50  $\mu\text{g/ml}$ ), 97% (100  $\mu\text{g/ml}$ ), and 100% (200  $\mu\text{g/ml}$ ) (Table 1B).

The bioassays with podophyllotoxone (1) showed that the L3–L4 larval period was reduced (1–3) at the concentration of 50  $\mu\text{g/ml}$  (Table 2A). The emergence rate was 8% at 50  $\mu\text{g/ml}$  concentration. The compound caused larval mortality of 34% (L3+L4), at the concentration of 30  $\mu\text{g/ml}$  (Table 2B). It showed a larvicidal effect at the concentration of 50  $\mu\text{g/ml}$ , with mortality of 73% (L4) (Table 2B). At the same concentration (50  $\mu\text{g/ml}$ ), podophyllotoxone caused 50% mortality of pupae (Table 2B).

The bioassays using desoxy-podophyllotoxin (2) demonstrated L3–L4 viability of 45% (1  $\mu\text{g/ml}$ ) and 10% (10  $\mu\text{g/ml}$ ). It was observed that there was high mortality among L3 larvae between the 4th and 8th days. The lowest concentration tested (1  $\mu\text{g/ml}$ ) affected 100% of the L3+L4 larvae between the 3rd and 8th days (Table 3B), with 100% larval mortality at all the concentrations tested (1, 10, and 30  $\mu\text{g/ml}$ ; Table 3B). The toxic activity (100%) was observed for the L3 larvae at 30  $\mu\text{g/ml}$  concentration, in 1–4 d (Table 3B). The date showed toxic activity with an  $\text{LD}_{50}$  of around < 1  $\mu\text{g/ml}$  against the larvae of *Ae. aegypti*.

Regarding cytotoxicity, the lignans podophyllotoxone and desoxy-podophyllotoxin did not present toxicity at 160  $\mu\text{g/ml}$ , toward the peritoneal cells of mice in the experiment conducted, under the conditions used (Table 4).

The bioassays using diflubenzuron demonstrated L3–L4 mortality among larval between the 1st and 18th days. The concentration tested (10  $\mu\text{g/ml}$ ) affected 100% of the larvae (Table 5B).

### Discussion

Natural products remain a rich source of leading compounds for developing commercial products for all sectors. Thus, searching for

**Table 1.** Duration of development (A) and mortality (B) among *Ae. aegypti* larvae (L3) treated with an ethanolic extract ( $\mu\text{g/ml}$ ) of rhizomes and roots of *P. hexandrum* (PM-3)

Treatment	L3–L4 (d)		L3–pupae (d)		L3–adult (d)				
	X $\pm$ SD	VI	X $\pm$ SD	VI	X $\pm$ SD	VI			
Control	1.6 $\pm$ 0.7a	1–3	7.1 $\pm$ 2.8a	3–15	8.6 $\pm$ 2.8a	4–18			
Testimony	1.8 $\pm$ 1.1a	1–5	8.7 $\pm$ 3.5a	3–15	10.4 $\pm$ 3.7a	4–18			
10	4.7 $\pm$ 3.3b***	1–15	12.8 $\pm$ 6b***	4–25	14.6 $\pm$ 5.5b***	5–26			
50	6.6 $\pm$ 4.7b***	2–15	12.6 $\pm$ 2.3b***	9–18	14.5 $\pm$ 2.8b***	11–19			
100	11.8 $\pm$ 1.8b***	9–14	14.5 $\pm$ 5a	11–18	16 $\pm$ 4.2a	13–19			
200	0	0	0	0	0	0			
							L3	L4	Pupae
	X $\pm$ SD	VI	%	X $\pm$ SD	VI	%	X $\pm$ SD	VI	%
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Testimony	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1 $\pm$ 1a	9–19	5	2 $\pm$ 1a	19–25	10	0	0	0
50	5.6 $\pm$ 1.5b**	1–13	28.3	3.6 $\pm$ 2.1a	14–25	18.3	0	0	0
100	16 $\pm$ 3c***	1–15	80	3.3 $\pm$ 3a	14–21	16.7	0	0	0
200	20 $\pm$ 0c***	1–18	100	0	0	0	0	0	0

Experiments with 20 larvae (L3) of *Ae. aegypti*, for each test group and control, in triplicate, with three repetitions ( $n = 60$ ). Mean and standard deviation (X  $\pm$  SD). Range of variation (VI). Values followed by the same letter (a = a, b = b, c = c) have no significant differences. Significance levels according to the Tukey test, represented as \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.1$  vs. DMSO and acetone control (1:1) (testimony).

**Table 2.** Duration of development (A) and mortality (B) among *Ae. aegypti* larvae (L3) treated with podophyllotoxone (1) ( $\mu\text{g/ml}$ )

Treatment	L3–L4 (d)		L3–pupae (d)		L3–adult (d)				
	X $\pm$ SD	VI	X $\pm$ SD	VI	X $\pm$ SD	VI			
Control	2.1 $\pm$ 0.9a	1–5	8 $\pm$ 3.6a	2–15	10.5 $\pm$ 3.6a	5–20			
Testimony	2.2 $\pm$ 1.2a	1–6	8.2 $\pm$ 3.3a	3–14	11.3 $\pm$ 3.7a	5–20			
1	1.9 $\pm$ 1.1a	1–3	7.3 $\pm$ 2.6a	3–14	10.7 $\pm$ 3.2a	5–16			
10	2.6 $\pm$ 3a	1–4	7.4 $\pm$ 3.4a	3–15	10.8 $\pm$ 3.8a	5–20			
30	2.1 $\pm$ 1.9a	1–8	6 $\pm$ 2.4b*	2–15	9.1 $\pm$ 3.4b*	5–17			
50	0.3b***	1–3	5.2 $\pm$ 1.1ac*	4–7	7.1 $\pm$ 0.4a	7–8			
	L3			L4			Pupae		
B	X $\pm$ SD	VI	%	X $\pm$ SD	VI	%	X $\pm$ SD	VI	%
Control	0	0	0	0	0	0	0.3 $\pm$ 0.6	6–6	1.3
Testimony	0	0	0	0.3 $\pm$ 0.6a	15–15	1.3	0.3 $\pm$ 0.6	14–14	2.7
1	0	0	0	0.3 $\pm$ 0.6a	1–1	1.3	0.3 $\pm$ 0.6	11–11	1.3
10	0	0	0	2 $\pm$ 2.7a	5–16	8	1.7 $\pm$ 0.6	9–20	7.2
30	0.7 $\pm$ 0.6b*	2–3	2.7	7.6 $\pm$ 6.6a	6–13	31.5	0.7 $\pm$ 1.1	5–16	4
50	0	0	0	18.3 $\pm$ 7.6b**	1–8	73.3	2.3 $\pm$ 2.1	6–7	50

Experiments with 25 larvae (L3) of *Ae. aegypti*, for each test group and control, in triplicate, with three repetitions ( $n=75$ ). Mean and standard deviation (X  $\pm$  SD). Range of variation (VI). Values followed by the same letter (a = a, b = b, c = c) have no significant differences. Significance levels according to the Tukey test, represented as \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \* $P < 0.1$  vs. DMSO and acetone control (1:1) (testimony).

new natural insecticides may contribute toward reducing the population of mosquitoes at the larval stage. In addition, they can play a role in preventing tropical parasitic diseases, like malaria and dengue, which are transmitted by mosquitoes. Plant-derived lignans have been targeted by our group with the aim of helping to meet this challenge (Cabral et al. 2009, Leite et al. 2012, Narciso et al. 2014).

There is still considerable interest in exploring new biological activities of other lignans that are related to podophyllotoxin. The latter and its related lignans are an exciting class of natural products that can be studied with regard to different biological activities such as larvicidal action. However, one of the challenges in carrying out more work on these compounds is their limited availability from natural sources. Efforts still need to be made toward facilitating in vitro propagation of *P. hexandrum* plants (Silva 2000, Chakraborty

et al. 2010) and producing podophyllotoxin using different biotechnological approaches (Majumder and Jha 2009) so as to provide alternative sources for its commercial supply in the future.

From the data obtained in the present study, larvicidal activity of the PM-3 extract against *Ae. aegypti* was observed when it was tested at the highest concentrations (100  $\mu\text{g/ml}$  and 200  $\mu\text{g/ml}$ ), with 96.7% and 100% larval mortality, respectively. These results indicate that the chemical constituents of the extract of PM-3 are potentially active against the vector mosquito for dengue, thus justifying the tests for larvicidal activity of the compounds (1) and (2), which were isolated from the PM-3 extract. Podophyllotoxone (1) presented larval mortality of 73% (L4) and pupal mortality of 50%, both at the concentration of 50  $\mu\text{g/ml}$ . At the same concentration, only 8% of the L3 larvae reached the adult phase. In addition, 33%

**Table 3.** Duration of development (A) and mortality (B) among *Ae. aegypti* larvae (L3) treated with desoxypodophyllotoxin (2) ( $\mu\text{g/ml}$ )

Treatment	L3–L4 (d)		L3–pupae (d)		L3–adult (d)				
	X $\pm$ SD	VI	X $\pm$ SD	VI	X $\pm$ SD	VI			
Control	2.8 $\pm$ 2.2	1–10	15.5 $\pm$ 4.8	6–24	17.8 $\pm$ 4.7	10–26			
Testimony	3.6 $\pm$ 2	1–11	14.7 $\pm$ 5.2	7–24	17.4 $\pm$ 4.8	10–26			
1	3.3 $\pm$ 1.1	2–6	0	0	0	0			
10	2.1 $\pm$ 0.4	2–3	0	0	0	0			
30	0	0	0	0	0	0			
	L3			L4			Pupae		
B	X $\pm$ SD	VI	%	X $\pm$ SD	VI	%	X $\pm$ SD	VI	%
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Testimony	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	11 $\pm$ 3.4b***	2–8	55	9 $\pm$ 3.4b***	3–8	45	0	0	0
10	17.6 $\pm$ 0.6b***	1–8	88.3	2.3 $\pm$ 0.6a	3–4	11.7	0	0	0
30	20 $\pm$ 0b***	1–4	100	0	0	0	0	0	0

Experiments with 20 larvae (L3) of *Ae. aegypti*, for each test group and control, in triplicate, with three repetitions ( $n=60$ ). Mean and standard deviation (X  $\pm$  SD). Range of variation (VI). Values followed by the same letter (a = a, b = b, c = c) have no significant differences. Significance level according to the Tukey test, represented as \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \* $P < 0.1$  vs. DMSO and acetone control (1:1) (testimony).

**Table 4.** Podophyllotoxone and desoxypodophyllotoxin cytotoxicity bioassays in vitro (%) in mouse macrophage cells ( $2 \times 10^5$ /ml) from BALB/c mice

Substances	Concentration	Macrophage toxicity X $\pm$ SD
Positive control	160	1 $\pm$ 0.002
Negative control	-	1 $\pm$ 0.002
Podophyllotoxone	160	26 $\pm$ 5
Desoxypodophyllotoxin	160	16 $\pm$ 6

Mean and standard deviation (X  $\pm$  SD); positive control—acetone—DMSO; negative control—cells alone.

of mortality at 30  $\mu$ g/ml and a delay in the larval development (L3 to L4) can possibly suggest an interference of podophyllotoxone at the moulting hormone.

According to Saguez et al. (2013) the activity of lignans and neolignans can cause an impact on the growth and fertility of *Myzus persicae* because these metabolites may interfere on the hormonal system of this insect.

The bioguided assay resulted on the isolation of the lignan (+)-epimagnolin A from the plant species *Magnolia fargesii*. The isolated compound showed an inhibitory activity on the growth of the larvae of *Drosophila melanogaster* (Miyazawa et al. 1994).

In *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus*, which are the vectors of Chagas disease, podophyllotoxin has showed a high moulting inhibition and ecdysis when applied either orally and topically (Cabral et al. 2000b).

Further tests are needed in order to evaluate the effects of podophyllotoxone on the mosquito physiology and development.

The compound desoxypodophyllotoxin (2) was more effective against *Ae. aegypti*, as confirmed by the larval mortality of 100% at the concentration of 1  $\mu$ g/ml within 8 d after the treatment. This result shows that the larvicidal activity of desoxypodophyllotoxin was more effective when compared with the insecticide diflubenzuron (10  $\mu$ g/ml), which had larvicidal activity (100%) at 18 d after the treatment on *Ae. aegypti* larvae.

Over the past few years, our research group has been working on the insecticidal potential of many plant extracts and the compounds isolated from them. Within this context, *Podophyllum*-based lignans have been the subject of some our studies focusing on finding new natural larvicidal compounds. To our knowledge, there are no other reports of the insecticidal and larvicidal activity of

podophyllotoxone and desoxypodophyllotoxin against *Ae. aegypti*. The present study also provide some basic knowledge that might have some application to the larval control, which play a role in the prevention of dengue and other diseases transmitted through this vector.

Lignans have a proven efficacy for controlling insects. From the dichloromethane extract of the roots of *P. hexandrum*, the lignan podophyllotoxin was isolated through biomonitoring, using *Drosophila melanogaster* as the experimental insect. Bioassays using podophyllotoxin on *D. melanogaster* showed larval mortality of 100% when the larvae were fed on a diet containing 2.0  $\mu$ mol/ml of the substance (Miyazawa et al. 1999). Desoxypodophyllotoxin has been seen to have insecticidal activity against adult females of the species *Culex pipiens pallens*, *Musca domestica*, *Blatella germanica*, and *Periplaneta fuliginosa* (Inamori et al. 1986).

In *Ae. aegypti*, the lignan burchellin was found to cause larval mortality of 100% at the concentration of 30  $\mu$ g/ml, between 24 and 78 h after application of the substance (Narciso et al. 2014). Studies conducted by Cabral and collaborators (2009) and Leite and collaborators (2012) using grandisin and tetrahydrofuran lignan demonstrated larvicidal activity (200  $\mu$ g/ml and 150  $\mu$ g/ml) toward *Ae. aegypti*. The lignan 7' episartemin, isolated from the leaves of *Piper fimbriatum*, showed larvicidal activity toward the dengue vector, with LC<sub>100</sub> of 17.60  $\mu$ g/ml, 24 h after the treatment (Solis et al. 2005).

The results of this study demonstrated that an ethanolic extract from the rhizomes and roots of *P. hexandrum* (PM-3) and the lignans podophyllotoxone (1) and desoxypodophyllotoxin (2) showed larvicidal activity and did not demonstrate toxicity toward the peritoneal macrophage cells of BALB/c mice. Further studies are required to elucidate the mechanism of action for both lignans aiming their use for controlling the population of *Ae. aegypti*.

In conclusion, according to the results from this study, it can be concluded that podophyllotoxone (1) and desoxypodophyllotoxin (2) isolated from the ethanolic extract (PM-3) of rhizomes and roots of *P. hexandrum*, exhibited significant toxicity toward *Ae. aegypti* larvae, thus confirming their efficacy as larvicidal compounds. In addition, the toxic activity and the resulting reduced number of adults give these lignans a potential that needs to be further investigated in the search for active compounds that can interfere with the growth and development of insects, particularly the mosquito *Ae. aegypti*, the dengue vector.

**Table 5.** Duration of development (A) and mortality (B) among *Ae. aegypti* larvae (L3) treated with the insecticide diflubenzuron ( $\mu$ g/ml)

Treatment	L3+L4 (d)		L3-pupae (d)		L3-adult (d)	
	X $\pm$ SD	VI	X $\pm$ SD	VI	X $\pm$ SD	VI
Control	2 $\pm$ 1.2a	1–5	6 $\pm$ 2	2–8	7.2 $\pm$ 1.5	4–13
10	3.3 $\pm$ 1.6a	1–4	0	0	0	0
	L3+L4			Pupae		
B	X $\pm$ SD	VI	%	X $\pm$ SD	VI	%
Control	0	0	0			0
10	20 $\pm$ 0b***	1–18	100	0	0	0

Experiments with 20 larvae (L3) of *Ae. aegypti*, for test group and control, in triplicate, with three repetitions ( $n = 60$ ). Mean and standard deviation (X  $\pm$  SD). Range of variation (VI). The data were analyzed by means of one-way ANOVA. Standard deviations were calculated using the averages from the experiments through Graphpad Instat 3.05. Mineral water (control).

## Acknowledgments

This research was supported by grants E-26/201329/2016 from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Fundação Educacional Severino Sombra (FUSVE/USS). C.G.S. is particularly grateful to Dr Paul M Dewick (University of Nottingham, United Kingdom) for providing plant material and laboratory facilities at the Pharmaceutical Sciences Department.

## References

- Apers, S., A. Vlietinck, and L. Pieters. 2003. Lignans and neolignans as lead compounds. *Phytochem. Rev.* 2: 201–217.
- Ayres, D. C., and J. D. Loike. 1990. Lignans: chemical, biological and clinical properties, p. 402. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ayres, M., M. Ayres Júnior, D. L. Ayres, and A. A. S. dos Santos. 2007. BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá. 364. p.
- Brasil. 2015. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. 46. (<http://portal.saude.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/18/2015-029-Dengue-SE-30-publicacao.pdf>) (accessed 2 September 2015).
- Broomhead, A. J. 1989. Chemical and biochemical studies of tumour inhibitory aryl tetralin lignans. PhD Thesis, University of Nottingham, United Kingdom, 172p.
- Cabral, M.M.O., E. S. Garcia, and A. Kelecom. 1995. Lignanes from the Brazilian *Melia azedarach* and their activity in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 90: 759–763.
- Cabral, M.M.O., A. Kollien, T. Kleffmann, P. Azambuja, O. R. Gottlieb, E. S. Garcia, and G. A. Schaub. 2000a. *Rhodnius prolixus*: effects of the neolignan burchellin on *in vivo* and *in vitro* diuresis. *Parasitol. Res.* 86: 710–706.
- Cabral, M.M.O., P. M. Mendonça, C.M.S. Gomes, F.J.M. Barbosa, M.M.C. Queiroz, and R. P. Mello. 2007. Biological activity of neolignans on the post-embryonic development of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). *Fitoterapia* 78: 20–24.
- Cabral, M. M. O., J. A. Alencar, A. E. Guimarães, and M. J. Kato. 2009. Larvicidal activity of grandisin against *Aedes aegypti*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 25: 103–105.
- Cabral, M.M.O., P. Azambuja, O. R. Gottlieb, and E. S. Garcia. 2000b. Effects of some lignans and neolignans on the development and excretion of *Rhodnius prolixus*. *Fitoterapia* 71: 1–9.
- Chakraborty, A., D. Bhattacharya, S. Ghanta, and S. Chattopadhyaya. 2010. An endangered protocol for *in vitro* regeneration of *Podophyllum hexandrum*, a critically endangered medicinal plant. *Indian J. Biotechnol.* 9: 217–220.
- Charlton, J. L. 1998. Antiviral activity of lignans. *J. Nat. Prod.* 61: 1447–1451.
- Consoli, R.A.G.B., and R. Lourenço-de-Oliveira. 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil, 20th ed. Fiocruz, Rio de Janeiro.
- Cotton, C. M. 1996. Ethnobotany: principles and applications. John Wiley and Sons, Chichester.
- Dewick, P. M. 1989. Biosynthesis of lignans, pp. 459–503. In A. Rahmann. (Ed.), *Studies in natural products chemistry*, vol. 5. Structure elucidation (Part B). Elsevier, Amsterdam.
- Dewick, P. M., and D. E. Jackson. 1981. Cytotoxic lignans from *Podophyllum*, and the nomenclature of aryltetralin lignans. *Phytochemistry* 20: 2277–2280.
- Duke, S. O. 1990. Natural pesticides from plants, pp. 511–517. In J. Janick and J. E. Simon (Eds.), *Advances in new crops*. Timber Press, Portland, OR.
- Ferreira, G.L.C. 2012. Global dengue epidemiology trends. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 54: 55–56.
- George, D. R., R. D. Finn, K. M. Graham, and O.A.E. Sparagano. 2014. Present and future potential of plant-derived products to control arthropods of veterinary and medical significance. *Parasit Vectors* 7: 28.
- Gordaliza, M., M. A. Castro, J. M. M. del Corral, and A. San Feliciano. 2000. Antitumour properties of podophyllotoxin and related compounds. *Curr. Pharm. Des.* 6: 1811–1139.
- Hamilton, M. A., and R. V. Russo. 1978. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in bioassays. *Thurston Environ. Sci. Technol.* 12: 417.
- Harmatha, J., and L. Dinan. 2003. Biological activities of lignans and stilbenoids associated with plant-insect chemical interactions. *Phytochem. Rev.* 2: 321–330.
- Inamori, Y., H. Tsujibo, S. Oki, Y. Kodama, and K. Ogawa. 1986. Mechanism of action of deoxypodophyllotoxin (Anthracin). III. The mode of delayed insecticidal action of deoxypodophyllotoxin. *Chem. Pharm. Bull.* 34: 2247–2250.
- Jackson, D. E., and P. M. Dewick. 1985. Tumour-inhibitory aryltetralin lignans from *Podophyllum pleianthum*. *Phytochemistry* 24: 2407–2409.
- Jackson, D. E., and P. M. Dewick. 1984. Aryltetralin lignans from *Podophyllum hexandrum* and *Podophyllum peltatum*. *Phytochemistry* 23: 1147–1152.
- Lee, K. -H., and Z. Xiao. 2003. Lignans in treatment of cancer and other diseases. *Phytochem. Rev.* 2: 341–362.
- Lee, K. -H., and Z. Xiao. 2005. Podophyllotoxins and analogs, pp.71–87. In G. M. Cragg, D.G.I. Kingston and D. J. Newman (Eds.), *Anticancer agents from natural products*. Taylor & Francis, Boca Raton, FL.
- Leite, A.C.C.F., M. K. Kato, R. O. A. Soares, A. E. Guimarães, J.R.S. Mallet, and M.M.O. Cabral. 2012. Grandisin caused morphological changes larval and toxicity on *Aedes aegypti*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 22: 517–521.
- MacRae, W. D., and G.H.N. Towers. 1984. Biological activities of lignans. *Phytochemistry* 23: 1207–1220.
- Maia, M. F., and S. J. Moore. 2011. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. *Malar. J.* 10: S11.
- Majumder, A., and S. Jha. 2009. Biotechnological approaches for the production of potential anticancer leads podophyllotoxin and paclitaxel: an overview. *e J. Biol. Sci.* 1: 46–69.
- Maleck, M., B. Ferreira, J.R.S. Mallet, A. E. Guimarães, and M. Kato. 2014. Citotoxicity of Piramides towards *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 51: 458–463.
- Marques, A. M., and M.A.C. Kaplan. 2015. Active metabolites of the genus *Piper* against *Aedes aegypti*: natural alternative sources for dengue vector control. *Univ. Sci.* 20: 61–82.
- McEijer, W. 1974. *Podophyllum peltatum* – May Apple, a potential new cash-crop plant of eastern North America. *Eco Bot.* 28: 68–72.
- Miyazawa, M., Y. H. Shikawa, H. Yamanaka, and H. Kameoka. 1994. An insect growth inhibitory lignin from flower buds of *Magnoli fargesii*. *Phytochemistry* 35: 611–613.
- Miyazawa, M., M. Fukuyama, K. Yoshio, T. Kato, and Y. Ishikawa. 1999. Biologically active components against *Drosophila melanogaster* from *Podophyllum hexandrum*. *J. Agric. Food Chem.* 47: 5108–5110.
- Motulsky, H. J. 2002. Analyzing data with Graphpad Prism, GraphPad Software Inc, San Diego, CA.
- Naish, S., P. Dale, J. S. Mackenzie, J. McBride, K. Mengersen, and S. Tong. 2014. Climate change and dengue: a critical and systematic review of quantitative modelling approaches. *BMC Infect. Dis.* 14: 167.
- Narciso, J.O.A., R.O.A. Soares, J.R.S. Mallet, A. E. Guimarães, C.O.M. Chaves, J. M. Barbosa-Filho, and M. Maleck. 2014. Burchellin: study of bioactivity against *Aedes aegypti*. *Parasit Vectors* 7: 172.
- Rao, R. R., and P. K. Hajra. 1993. *Podophyllum*, pp. 414–416. In B. D. Sharma and N. P. Balakrishnan (Eds.), *Flora of India*, vol. 1. Botanical Survey of India, Calcutta.
- Salako, A. A. 1996. Inhibitors based on podophyllotoxins. PhD thesis, University of Nottingham, United Kingdom, 244p.
- Saguez, J., J. Attoumbre, P. Giordanengo, and S. Baltora-Rosset. 2013. Biological activities of lignans and neolignans on the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Arthropod-Plant Interact.* 7: 225–233.
- Shaw, J.M.H. 2002. The genus *Podophyllum*, part III, pp. 239–314. In P. S. Green and B. Mathew (Eds.), *The genus Epimedium and other herbaceous Berberidaceae including the genus Podophyllum*. Timber Press, Portland, Oregon.
- Silva, C. G. 2000. Tissue culture and phytochemical studies of *Podophyllum*, *Diphylleia* and *Passiflora* species. PhD thesis, University of Nottingham, United Kingdom, 251p.

- Soares, R. O., A. Echevarria, M. S. Bellieny, R. T. Pinho, R. M. de Leo, W. S. Seguin, G. M. Machado, M. M. Canto-Cavalheiro, and L. L. Leon. 2011. Evaluation of thiosemicarbazones and semicarbazones as potential agents anti-*Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 129: 381–387.
- Sokal, R. R., and F. J. Rohlf. 1979. *Principios y Metodos Estadísticos en La Investigación Biológica*. H. Blume Ed., Madrid, España.
- Solis, N. P., D. Olmedo, N. Nakamura, A. I. Calderón, M. Hattori, and M. P. Gupta. 2005. A new larvicidal lignin from *Piper fimbriatum*. *Pharm. Biol.* 43: 378–381.
- Souza, T. M., D. F. Farias, B. M. Soares, M. P. Viana, G.P.G. Lima, L.K.A. Machado, S. M. Morais, and A. F. Carvalho. 2011. Toxicity of Brazilian plant seed extracts to two strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and non-target animals. *J. Med. Entomol.* 48: 846–851.
- Souza, T. M., A. P. Cunha, D. F. Farias, L. K. Machado, S. M. Morais, N.M.P.S. Ricardo, and A. F. Carvalho. 2012. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* of *m*-pentadecadienyl-phenol isolated from *Myracrodruon urundeuva* seeds. *Pest Manag. Sci.* 68: 1380–1384.
- Valotto, C.F.B., H.H.G. da Silva, G. Cavasin, R. Geris, E. Rodrigues Filho, and I. G. da Silva. 2011. *Aedes aegypti* subject to labdane diterpene isolated from *Copaifera reticulata* (Leguminosae) and a fraction enriched with tannins of *Magonia pubescens* (Sapindaceae). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 44: 194–200.
- (WHO) World Health Organization 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. ([http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69101/1/WHO\\_CDS\\_WHOPES\\_GCDPP\\_2005.13.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69101/1/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf))
- (WHO) World Health Organization 2011. Comprehensive guidelines for prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever. Regional Office for South-East Asia. SEARO Technical Publication Series No. 60. WHO, Geneva.
- (WHO) World Health Organization 2012. Global strategy for dengue prevention and control 2012–2020. WHO, Geneva.
- Wu, S., and J. Chappell. 2008. Metabolic engineering of natural products in plants; tools of the trade and challenges for the future. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19: 145–152.

## **Artigo 4**

**Larvicidal activity of lignan desoxypodophyllotoxin against *Aedes albopictus***

## Short Communication

# Larvicidal Activity of the Lignan desoxypodophyllotoxin Against *Aedes albopictus*

Marise Maleck<sup>1-4\*</sup>, Walquiria da Silva Pedra Parreira<sup>1</sup>, Michele Teixeira Serdeiro<sup>1,5</sup>, Richard Raphael Borges Tavares Vieira<sup>1</sup>, Nildimar Alves Honório<sup>6</sup>, and Cláudia Gontijo Silva<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Insetos Vetores, Universidade Severino Sombra, Brazil

<sup>2</sup>Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas em Saúde, Universidade Severino Sombra, Brazil

<sup>3</sup>Mestrado Profissional em Ciências Ambientais, Universidade Severino Sombra, Brazil

<sup>4</sup>Laboratório de Entomologia Médica e Forense, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Brazil

<sup>5</sup>Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemiptera, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Brazil

<sup>6</sup>Laboratório de Transmissores de Hematozoários e Núcleo Operacional Sentinela de Mosquitos Vetores, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

<sup>7</sup>Serviço de Biotecnologia Vegetal, Divisão de Ciência e Inovação, Fundação Ezequiel Dias, Brazil

## \*Corresponding author

Dra Marise Maleck, Laboratório de Insetos Vetores, Universidade Severino Sombra, Avenida Expeditório Osvaldo Almeida Ramos, 280, 27700-000, Vassouras, RJ, Brazil, Tel: 55 24 2471 8351; Email: marise.maleck@gmail.com

Submitted: 30 March 2017

Accepted: 19 April 2017

Published: 21 April 2017

ISSN: 2475-9465

## Copyright

© 2017 Maleck et al.

## OPEN ACCESS

## Keywords

- *Aedes albopictus*
- Desoxypodophyllotoxin
- Lignan
- *Podophyllum hexandrum*
- Larvicidal activity

## Abstract

*Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae), the Asian tiger mosquito, is a less efficient vector of dengue compared to *Ae. aegypti* although, it is able to transmit other arboviruses and thus, should remain a concern for the public health. Dengue is regarded as the most rapidly spread mosquito-borne infectious disease world. Disease prevention is dependent on controlling the mosquito population. Plant-derived natural products have been investigated in the search for new insecticides and larvicides aiming to help in the control of insects and their larvae. Lignans are phenolic compounds mainly distributed in plants even though they are found in other organisms and the insecticidal properties have been reported. This communication describes the evaluation of the activity of desoxypodophyllotoxin (1), isolated from the rhizomes and roots of *Podophyllum hexandrum* against the mosquito *Ae. albopictus*. Bioassays were performed on 25 larvae (L3) of *Ae. albopictus*. The desoxypodophyllotoxin was dissolved in a mixture of acetone: dimethylsulfoxide (DMSO) (1:1) and applied at final concentrations of 1-30 µg/mL. The mortality (100%) of the *Ae. albopictus* larval was observed in all the concentrations occurred. This study showed the larvicidal activity of the lignan desoxypodophyllotoxin (1) against the larvae of *Ae. albopictus*, and to some extent, confirms its potential as an application in the control of mosquitoes, the main vectors of arboviruses.

## INTRODUCTION

*Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae), is a mosquito originally from Asia which is also an invasive species that can also be found in areas of tropical, subtropical and temperate climates [1]. It has been reported that this Asian tiger mosquito is a less efficient vector of dengue compared to *Ae. aegypti* although, it offers a special concern to the public health implications because it is able to transmit other arboviruses such as chikungunya [2]. It can also transmit heartworm parasites [1] in dogs. Dengue is regarded as the most rapidly spread mosquito-borne infectious disease world. Despite its consequences, there is no effective treatment for patients who rely on supportive care. Moreover, disease prevention is dependent on controlling the mosquito population [3]. The use of conventional insecticides is not safe since some of them are toxic to humans and to non-target organisms and limited success has been achieved with them. In addition, due to repeated applications, the emergence of insecticide resistance in

mosquitoes has increased and this causes environmental damage. Furthermore, vector control is costly and has only been partially successful in reducing transmission of the disease. Controlling the mosquito at the larval stage may be an alternative.

Plant-derived natural products have been investigated in the search for new insecticides and larvicides aiming to help in the control of insects and their larvae. It is desirable to find an environmentally safe, biodegradable and target insecticide. Many natural products are highly active against arthropods particularly alkaloids, phenolic compounds and terpenoids [4].

Lignans are phenolic compounds mainly distributed in plants even though they are found in other organisms. Their biological activities were fully reviewed by MacRae and Towers (1984) [5], and include antibacterial, antifungal, antiviral and antioxidant activity. Besides the insecticidal properties of lignans have also been reported [6].

*Podophyllum* species have well known lignan profiles [7], and

Cite this article: Maleck M, da Silva Pedra Parreira W, Serdeiro MT, Tavares Vieira RR, Honório NA, et al. (2017) Larvicidal Activity of the Lignan desoxypodophyllotoxin Against *Aedes albopictus*. Ann Community Med Pract 3(2): 1022.

podophyllotoxin and its derivatives have received more attention due to their medicinal applications [8]. On the other hand, the spectrum of activities for these compounds is being expanded due to their effect on insects by known lignans [9]. In a recent study, we have reported that the larvicidal activity of podophyllotoxone against the larvae of *Ae. aegypti* made a possible contribution to the delayed development of its larvae [10].

Our research group is currently investigating the insecticidal and larvicidal potential of plants containing lignans and their isolated compounds and their use against vectors of great concern to the public health. This communication describes the evaluation of the larvicidal activity of desoxypodophyllotoxin (1) (Figure 1), against the mosquito *Ae. albopictus*. In a previous study [10], we reported on the isolation and identification of this compound from an ethanolic (EtOH) extract from the rhizomes and roots of *Podophyllum hexandrum*.

## MATERIALS AND METHODS

*Ae. albopictus* eggs were obtained from the Núcleo Operacional Sentinela de Mosquitos Vetores, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro. The bioassays were held in the Laboratório de Insetos Vetores, Universidade Severino Sombra, Rio de Janeiro. The larvae at 3rd stage (L3) were pooled and separated for the bioassays.

Desoxypodophyllotoxin (1) was dissolved in a mixture of acetone: dimethylsulfoxide (DMSO) (1:1) and applied at final concentrations of 1, 10 and 30 µg/mL in a receptacle containing mineral water (25 mL) and a diet of fishmeal (Alcon Guppy) at a dose of 0.3 mg/larva. Twenty-five third-stage (L3) larvae were used per group: test, control (without desoxypodophyllotoxin (1) and without a mixture of acetone: DMSO) and testimony control (with a mixture of acetone: DMSO). The experiments were performed in triplicate, totaling 75 larvae (L3) per group, with three repetitions. The larvae were maintained in a climate-controlled chamber at 28 ± 1 °C and 70 ± 10% relative humidity. The bioassays followed the methodology described by Maleck and collaborators (2017) [10], which were adapted from WHO (2005) [11]. The data were analyzed by means of one-way ANOVA with means separated using the Tukey test with a significance level of 5% [12], and standard deviations were calculated using the averages from the experiments through GraphPad Instat

3.05 [13]. The LC<sub>50</sub> value was calculated by means of Trimmed Spearman-Kärber analysis [14].

## RESULTS AND DISCUSSION

In this study, the treatment with desoxypodophyllotoxin (1) showed that the L3-L4 larval development was reduced (1-5 d) at the concentrations of 1 µg/mL, 10 µg/mL, and 30 µg/mL when compared with both controls which showed delayed development of larvae (1-10 d) (Table 1A).

The larvae (L3) of *Ae. albopictus* treated with desoxypodophyllotoxin showed L3-L4 viability of 52% (1 µg/mL), 25% (10 µg/mL) and 28% (30 µg/mL) (Table 1B). Both controls presented 100% viability of the L3-adult, however at the same concentrations evaluated (1, 10 and (30 µg/mL)) the larvae did not reach the adult phase as shown (Table 1B).

Regarding mortality, the concentration of 1 µg/mL of compound (1) affected 48% (12 ± 8.7) of the L3 larvae between the 1st to 3rd day. The high mortality rate above 70% for L3 was observed at 10 µg/mL (15.3 ± 11.1) (2-7 d) and 30 µg/mL (18 ± 7) (1-6 d) concentration. The data showed a toxic activity with an LC<sub>50</sub> of 1.1 µg/mL. The mortality (100%) of the *Ae. albopictus* larval (L3+L4) was observed in all the concentrations occurred of the 1st to 7th (Table 1C).

Studies with lignans have shown their effects on the insects. In studies with podophyllotoxin and desoxypodophyllotoxin, both compounds have shown insecticidal activity against larvae of *Epilachna sparsa orientalis* [15]. According to the authors, desoxypodophyllotoxin was also active against adult females of *Culex pipiens molestus*, *Musca domestica*, *Blatella germanica* and *Periplaneta fuliginosa* [15].

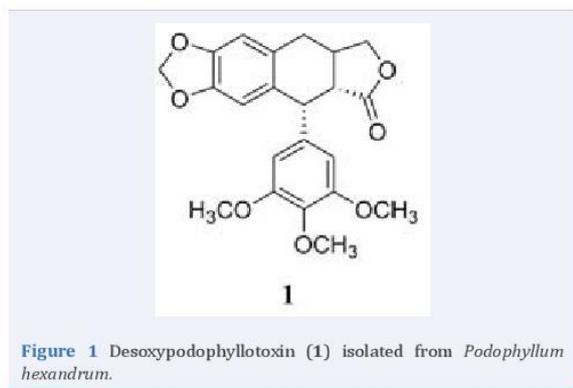
Cabral and collaborators (2000) [9] evaluated some lignans and neolignans as inhibitors of ecdysis on four instar larvae of *Rhodnius prolixus*, a major vector of Chagas disease. Podophyllotoxin caused a high moulting inhibition and significant toxicity when applied either orally and topically. Whereas the high percentage of ecdysis inhibition (58%) was observed for pinoselinol applied orally at a concentration of 100 mg/mL. Moreover, podophyllotoxin and burchellin reduced the excretion of the insect in 24 h while the other evaluated lignans did not have any effect on the excretion.

Burchellin, a lignan isolated from the stems of *Ocotea cymbarum* (Lauraceae) was very effective against *Ae. aegypti* and showed larval mortality of 100% at a concentration of 30 µg/mL, between 24 and 78 h after the treatment [16].

Overall, desoxypodophyllotoxin demonstrated 100% larval mortality on *Ae. albopictus* at all the concentrations evaluated until 7 days after treated. These results corroborate with our previous work, where this compound has shown a 100% larval mortality for *Ae. aegypti* at the same concentrations [10]. In addition, desoxypodophyllotoxin did not demonstrated toxicity toward the peritoneal macrophage cells of BALB/c mice, and thus, is worthy of further studies [10].

## CONCLUSION

This study showed the larvicidal activity of the lignan desoxypodophyllotoxin (1) against the larvae of *Ae. albopictus*,



**Table 1:** Duration of development (A), viability (B) and mortality (C) among *Aedes albopictus* larvae (L3) treated with desoxydopodophyllotoxin (1).

Treatment	L3-L4 (days)			Pupae (days)		L3-adult (days)	
	X ± SD	VI		X ± SD	VI	X ± SD	VI
Control	2.1 ± 1.5a	1-10		11.2 ± 3a	5-18	18.8 ± 3a	7-20
Testimony	3.3 ± 2.1bc	1-10		11 ± 2.3a	5-17	13.6 ± 2.2a	8-18
1 µg/mL	2.8 ± 0.4ac	2-3		0	0	0	0
10 µg/mL	2.1 ± 0.6ad*	1-4		0	0	0	0
30 µg/mL	3.8 ± 1bc	2-5		0	0	0	0
	<b>L3</b>	<b>L3-L4</b>		<b>L4-Pupae</b>		<b>L3-adult</b>	
<b>B</b>	X ± SD	X ± SD	%	X ± SD	%	X ± SD	%
Control	25 ± 0a	25 ± 0a	100	25 ± 0a	100	25 ± 0	100
Testimony	25 ± 0a	25 ± 0a	100	25 ± 0a	100	25 ± 0	100
1 µg/mL	25 ± 0a	13 ± 8.7a	52	0	0	0	0
10 µg/mL	25 ± 0a	6 ± 6b*	25	0	0	0	0
30 µg/mL	25 ± 0a	7 ± 7b*	28	0	0	0	0
	<b>Larvae (L3+L4)</b>			<b>Pupae</b>			
<b>C</b>	X ± SD	VI	%	X ± SD	VI	%	
Control	0a	0	0	0	0	0	
Testimony	0a	0	0	0	0	0	
1 µg/mL	25 ± 0b***	1-7	100	0	0	0	
10 µg/mL	25 ± 0b***	2-7	100	0	0	0	
30 µg/mL	25 ± 0b***	1-6	100	0	0	0	

Experiments with 25 larvae (L3) of *Ae. albopictus*, for each test group and control, in triplicate, with three repetitions (n = 75). Mean and standard deviation (X ± SD). Range of variation (VI). Values followed by the same letter (a = a, b = b, c = c) have no significant differences. Significance levels according to the Tukey test, represented as \*\*\*P < 0.001, \*P < 0.1 vs. acetone: dimethyl sulfoxide (DMSO) (1:1) (testimony).

and to some extent, confirms its potential as an application in the control of mosquitoes, the main vectors of arboviruses.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thanks FUSVE/USS; Fundação de Amparo a Novas estratégias para o controle do mosquito *Aedes aegypti*, vetor da Dengue, Chikungunya e do virus Zika: uma abordagem integrada/RedeZIKA#1” and FIOCRUZ/CAPES-Brasil Sem Miséria. In addition, CGS is grateful to Dr Patrick H Huddleston (Nottingham Trent University, UK) for discussing the results of the isolation and identification of lignans from *Podophyllum* species.

## REFERENCES

1. Cdc.gov [homepage on the Internet]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention. [updated 2016 April 5; cited 2016 Dec 6].
2. Bonilauri P, Bellini R, Calzolari M, Angelini R, Venturi L, Fallacara F, et al. Chikungunya virus in *Aedes albopictus*, Italy. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14: 852-854.
3. Schwartz LM, Halloran ME, Durbin AP, Longini Jr IM. The dengue vaccine pipeline: implications for the future of dengue control. *Vaccine*. 2015; 33: 3293-3298.
4. Mann RS, Kaufman PE. Natural product pesticides: their development, delivery and use against insect vectors. *Mini Rev Org Chem*. 2012; 9: 185-202.
5. MacRae WD, Towers GHN. Biological activities of lignans. *Phytochemistry*. 1984; 23: 1207-1220.
6. Saguez J, Attoumbré J, Giordanengo P, Baltora-Rosset S. Biological activities of lignans and neolignans on the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Arthropod Plant Interact*. 2013; 7: 225-233.
7. Jackson DE, Dewick PM. Tumour-inhibitory aryltetralinlignans from *Podophyllum pleianthum*. *Phytochemistry*. 1985; 24: 2407-2409.
8. Silva CG, Almeida VL, Campana PRV, Rocha MP. Plant Cell Cultures as Producers of Secondary Metabolites: *Podophyllum* Lignans as a Model. In: Jha S (ed.), *Transgenesis and Secondary Metabolism*, Reference Series in Phytochemistry (Mérillon JM, Ramawat KG, series eds.). Springer. 2016; 1-36.
9. Cabral MMO, Azambuja P, Gottlieb OR, Garcia ES. Effects of some lignans and neolignans on the development and excretion of *Rhodnius prolixus*. *Fitoterapia*. 2000; 71: 1-9.
10. Maleck M, de Oliveira Holanda P, Serdeiro MT, de Araújo Soares RO, Honório NA, Silva CG. Toxicity and larvicidal activity of *Podophyllum*-based lignans against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2017; 54: 159-166.
11. World Health Organization. Dept. of Communicable Disease Prevention, Control and Eradication. WHO Pesticide Evaluation Scheme Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. 2002. 39.
12. Sokal RR, Rohlf FJ. *Principios y Metodos Estadísticos en la Investigación Biológica*. Madrid, España: H. Blume Ed. 1979; 223.
13. Motulsky HJ. *Analyzing data with GraphPad Prism*, GraphPad Software Inc, San Diego, CA. 2002.
14. Hamilton MA, Russo RV. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in bioassays. *Thurston*

- Environ Sci Technol. 1978; 11: 714-719.
15. Inamori Y, Tsujibo H, Oki S, Kodama Y, Ogawa K. Mechanism of action of deoxypodophyllotoxin (Anthricin). III. The mode of delayed insecticidal action of deoxypodophyllotoxin. Chem Pharm Bull. 1986; 34: 2247-2250.
16. Narciso JOA, Soares ROA, Mallet JRS, Guimarães AE, Chaves COM, Barbosa-Filho JM, et al. Burchellin: study of bioactivity against *Aedes aegypti*. Parasit Vectors. 2014; 7: 172.

**Cite this article**

Maleck M, da Silva Pedra Parreira W, Serdeiro MT, Tavares Vieira RR, Honório NA, et al. (2017) Larvicidal Activity of the Lignan deoxypodophyllotoxin Against *Aedes albopictus*. Ann Community Med Pract 3(2): 1022.

**Artigo 5**

**Atividade larvicida de óleos essenciais sobre *Aedes aegypti*  
(Manuscrito a ser apresentado para publicação)**

## Atividade larvicida de óleos essenciais sobre *Aedes aegypti*

Michele Teixeira Serdeiro<sup>1,2</sup>, Thiago Dutra Dias<sup>2</sup>, José Maria Barbosa-Filho<sup>3</sup>, Marise Maleck<sup>2,4,5,6</sup>, Jacenir Reis dos Santos-Mallet<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Diptera e Hemiptera, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; <sup>2</sup>Laboratório de Insetos Vetores, Universidade Severino Sombra, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; <sup>3</sup>Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil; <sup>4</sup>Mestrado Profissional em Ciências Ambientais, Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ, Brasil; <sup>5</sup>Centro de Ciências da Saúde, Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ, Brasil; <sup>6</sup>Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas em Saúde, Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ, Brasil;

**Resumo.** Dengue, zika, chikungunya e febre amarela urbana são arboviroses, que circulam no Brasil, responsáveis pelo elevado número de morbidade e mortalidade, além de consequências severas à saúde da população. Esforços para controlar o mosquito são importantes para prevenir surtos destas doenças. Uma alternativa eficaz no âmbito do controle biológico é o uso dos produtos naturais de plantas. Nesta perspectiva, os óleos essenciais têm recebido atenção como potenciais agentes bioativos contra os insetos. Este estudo teve como objetivo investigar o potencial de 27 óleos essenciais no controle do mosquito *Ae. aegypti* como alternativas naturais no controle destas doenças. Os óleos essenciais foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações 1-100 µg/mL. Após a diluição, as soluções foram aplicadas (µg/mL) no meio de criação das larvas de 3º estágio. A toxicidade das soluções foi avaliada em relação ao crescimento e desenvolvimento das larvas de *Ae. aegypti* até a emergência. Dentre os 27 terpenóides avaliados sobre *Ae. aegypti*, no presente estudo foi revelado o potencial promissor dos óleos dihydrojasnone, farnesol, thymol, p-cymene, carvacrol e nerolidol como agentes contra o principal transmissor da dengue.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, atividade larvicida, produtos naturais, óleos essenciais

## 1 Introdução

*Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) é considerado um dos mais importantes vetores na atualidade em saúde pública, pois transmite várias arboviroses, sendo o principal transmissor dos quatro sorotipos (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4) do vírus Dengue, assim como um importante vetor da febre amarela urbana (BRASIL, 2001). No Brasil, este mosquito é também vetor dos vírus Chikungunya, que provoca um quadro muito parecido com a dengue, e do vírus Zika, o qual foi associado aos casos de microcefalia e outros problemas neurológicos (BRASIL 2015ab, ZANLUCA et al. 2015). Com exceção da febre amarela que existe uma vacina preventiva, o principal método de prevenção e transmissão desses vírus ainda é o controle do mosquito vetor. Uma alternativa eficaz no âmbito do controle biológico é o uso dos produtos naturais de plantas que irão atuar como inseticidas, porém ambientalmente mais seguros no controle dos mosquitos (Ghosh 2012). Nesta perspectiva, os óleos essenciais têm recebido atenção como potenciais agentes bioativos contra os insetos, seja na sua forma bruta ou através de suas substâncias purificadas (Tunc et al 2000, Camara et al 2015, Dambolena et al 2016). Os óleos essenciais são constituídos principalmente por terpenóides, particularmente monoterpenos e sequiterpenos (Bizzo et al 2009). Estes possuem diversas atividades biológicas, entre elas nematicida (Abdel-Rahman et al 2013), antileishmanicida (Rosa et al. 2003), antiinflamatória (Marsik et al 2005) e atividades antitumorais (Li et al 2016), bem como atividade inseticida (Park et al 2008). O presente estudo teve como objetivo investigar o potencial de 27 óleos essenciais, no controle do mosquito *Ae. aegypti* como alternativas naturais no controle das doenças veiculadas por este vetor e verificar alterações morfológicas dos óleos mais ativos sobre as larvas de 3<sup>o</sup> estágio.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Óleos essenciais

Os óleos essenciais avaliados sobre *Ae. aegypti* foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). A estrutura química é mostrada na Figura 1.

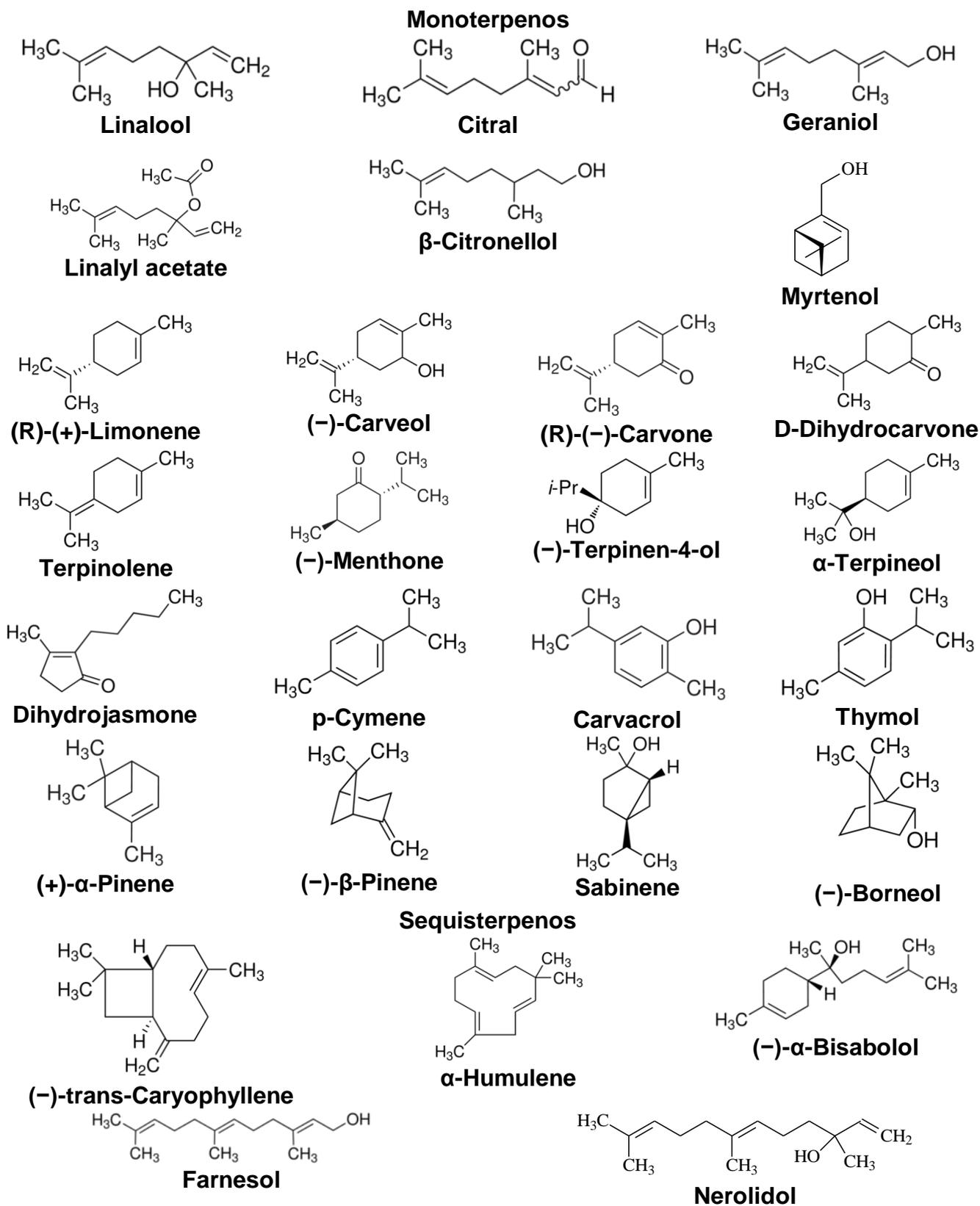


Figura 1: Estrutura química dos óleos estudados no presente estudo.

## **2.2 Bioensaios**

### **2.2.1 *Aedes aegypti***

Os ovos de *A. aegypti* foram obtidos da colônia de mosquitos mantida no Laboratório de Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ, Brasil. Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Insetos Vetores, Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ. Para a realização dos testes os ovos foram colocados para a eclosão em recipientes contendo água mineral previamente aquecida a 28° C e adicionado ração para peixe (Alcon Guppy®). Os recipientes contendo os ovos foram mantidos em câmara climatizadas BOD a 27 ± 1 °C e 70 ± 10% UR.

### **2.2.2 Atividade larvicida**

Os bioensaios seguiram a metodologia de Cabral et al. (2009) e Maleck et al (2016) adaptadas de WHO (2005). Os óleos essenciais foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e aplicados nas concentrações finais de 1 a 100 µg/mL em recipientes de vidro contendo água mineral (20 mL). Foram utilizadas vinte larvas de 3º estágio (L3) por grupo: teste, controle (sem óleo essencial e sem solvente de diluição) e controle testemunho (sem óleo essencial e com solvente de diluição). Os experimentos foram realizados em triplicatas, totalizando 60 larvas por grupo e três repetições. Após o tratamento, os insetos foram mantidos em dieta normal (ração de peixe na proporção de 0,3 mg/larva) em câmara climática - BOD a 27 ± 1 ° C e 70 ± 10% UR e observado por 30 dias, sobre o desenvolvimento, viabilidade e mortalidade.

### **2.2.3 Análise estatística**

Os resultados obtidos dos ensaios biológicos foram submetidos ao teste de Tukey através do programa GraphPad Prism versão 6.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA - [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## 2.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Para a microscopia de transmissão, as larvas de *Ae. aegypti* provenientes dos ensaios de atividade larvicida (controle, DMSO e grupo teste) foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e cloreto de cálcio 0,5 mM em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7 por 1 hora à temperatura ambiente. Após a lavagem no mesmo tampão, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7.2, por 1 hora à temperatura ambiente, no escuro. A desidratação foi feita em gradientes crescentes de acetona (50%, 70%, 90% e 100%) seguida de infiltração e inclusão na resina epoxi Epon 812. Cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo 1% para observação ao microscópio eletrônico de transmissão modelo Tecnai Spirit iCorr 120Kv do Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem (CENABIO) da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Atividade larvicida

#### -Screening

No presente estudo foi avaliado a atividade de 27 óleos essenciais terpenóides sobre as larvas de 3º estágio (L3) de *Ae. aegypti*. Inicialmente foi realizado um screening utilizando a concentração de 100 µg/mL (Tabela 1). Todos os óleos essenciais apresentaram ação sobre as larvas de *Ae. aegypti*, no entanto, trans-caryophyllene e (-)-borneol apresentaram a menor atividade larvicida com 5 e 7% de mortalidade, respectivamente, seguidos dos óleos (-)-carveol (18%), α-humulene (20%), α-terpineol (22%), (R)-(1)-carvone (23%), (R)-(+)-limonene (25%), citrol (28%), myrtenol (30%), (+)-α-pinene (33%), geraniol (37%), sabine (38%), linalyl acetate (41%), linalool (42%), (-)-terpinen-4-ol (47%), β-citronellol (58%), terpinolene (58%), β-pinene (65%), β-bisabolol (67%), 1-(-)-menthone (77%) e D-dihydrocarvone (88%).

Entre os 27 óleos essenciais testados, os mais ativos foram o carvacrol, dihydrojasmone, farnesol, p-cymene, nerolidol e thymol apresentando 100% de mortalidade larval na concentração de 100 µg/mL. Para thymol, nerolidol, p-cymene, carvacrol e farnesol a mortalidade deu início imediatamente após as larvas entrarem em contato com os óleos essenciais, sendo a mortalidade total das larvas registrada

em 15 minutos, 1 h, 2 h, 24 h e 24 h, respectivamente. Já dihydrojasmone, após a aplicação, a mortalidade larval total foi registrada em 1 a 6 dias. A partir dos resultados do screening, estes seis óleos foram testados nas concentrações de 1, 10, 30, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µg/mL e avaliados quanto o desenvolvimento, viabilidade e emergência dos adultos. Nas larvas provenientes dos bioensaios foram verificadas as possíveis alterações morfológicas causadas por thymol, nerolidol, p-cymene, carvacrol, farnesol e dihydrojasmone.

#### -Dihydrojasmone

O óleo essencial dihydrojasmone quando testado sobre as larvas L3 de *Ae. aegypti* estendeu o período larval nas concentrações de 70 (10,1±3,4 dias;  $P < 0,001$ ) e 80 µg/mL (11,7±3,6 dias;  $P < 0,001$ ), respectivamente. (Tabela 1A). O mesmo óleo também interferiu no desenvolvimento das larvas (L3) até a fase adulta nas concentrações de 70 (11,8±3,7 dias;  $P < 0,001$ ) e 80 µg/mL (13,7±3,6 dias;  $P < 0,001$ ) (Tabela 1A). Dihydrojasmone causou diminuição da viabilidade larval (L3-L4) com 85% (50 µg/mL), 67% (60 µg/mL), 55% (70 µg/mL), 38% (80 µg/mL) e 10% (90 µg/mL) (Tabela 1B), mas estas concentrações apresentaram 100% de viabilidade L4-pupa (Tabela 1B). Dihydrojasmone testado nas concentrações de 1, 10 e 30 µg/mL não obteve mortalidade larval, esta ação foi observada a partir da concentração de 50 µg/mL com 15%, que ocorreu de 1-12 dias após a aplicação, e observada também nas concentrações de 60, 70, 80 e 90 µg/mL apresentando os seguintes percentuais: 33%, 45%, 62% e 90%, respectivamente (Tabela 1C). Dihydrojasmone atingiu 100% de mortalidade larval na maior concentração (100 µg/mL) em 1 a 6 dias após o tratamento (Tabela 1C). Apresentou também atividade sobre as pupas de *Ae. aegypti* sendo registrado o maior percentual de mortalidade (15%) na concentração de 70 µg/mL.

**Tabela 1.** Desenvolvimento (A), viabilidade (B) e mortalidade (C) de *Aedes aegypti* em larvas L3 tratadas com **dihydrojasmane** nas concentrações de 1-100 µg/mL.

Tratamento	Larval (dias)		Pupal (dias)		L3-adulto (dias)	
	X ±DP	IV	X ± DP	IV	X ±DP	IV
Controle	5,9±1,3a	4-9	1,8±0,4a	1-2	7,8±1,5a	5-11
DMSO	7,3±0,9b	6-9	2±0ab	2-2	9,2±1,1b	6-11
1	6,8±1,5ab	5-12	2±0ab	2-2	8,2±1,5ab	7-14
10	7,9±2,5b	4-15	2,3±0,3c****	2-3	10,2±2,5ab	6-17
30	6,6±2,2ab	3-14	2,1±0,7b	1-3	8,7±2,4ab	5-16
50	5,9±1,5a*	2-10	2±0ab	2-2	7,8±1,4a*	4-12
60	8,5±2,2b	4-13	2±0ab	2-2	10,5±2,2b	6-15
70	10,1±3,4c****	2-17	2±0ab	2-2	11,8±3,7c****	4-19
80	11,7±3,6c****	4-18	2±0ab	2-2	13,7±3,6c****	6-20
90	7,7±2,6b	4-10	2±0ab	2-2	9,5±3ab	6-12
100	0	0	0	0	0	0

B	L3-L4		L4-pupa		Pupa		L3-adulto	
	X ±DP	%	X ±DP	%	X ±DP	%	X ±DP	%
Controle	20 ±0ab	100	20 ±0ab	100	20 ±0ab	100	20 ±0ab	100
DMSO	20 ±0ab	100	20 ±0ab	100	20 ±0ab	100	20 ±0ab	100
1	20 ±0ab	100	20 ±0ab	100	20±0ab	100	20±0ab	100
10	20 ±0ab	100	20 ±0ab	100	20±0ab	100	20±0ab	100
30	20 ±0ab	100	20 ±0ab	100	20±0ab	100	20±0ab	100
50	17 ±2,6c**	85	17 ±2,6c**	100	16,3±2,1ac*	97	16,3±2,1ac*	82
60	13,3 ±0,5d****	67	13,3 ±0,5d****	100	13,3±0,5c****	100	13,3±0,5c****	67
70	11 ±1d****	55	11 ±1d****	100	9±2,0d****	73	9±2,0d****	40
80	7,7 ±1,5e****	38	7,7 ±1,5e****	100	7,7±1,5d****	100	7,7±1,5d****	38
90	2±1,7f****	10	2±1,7f****	100	1,3±0,5e****	67	1,3±0,5e****	7
100	0	0	0	0	0e****	0	0e****	0

C	L3			L4			Pupa		
	X ± DP	IV	%	X ± DP	IV	IV	X ± DP	IV	%
Controle	0ab	0	0	0	0	0	0ab	0	0
DMSO	0ab	0	0	0	0	0	0ab	0	0
1	0ab	0	0	0	0	0	0ab	0	0
10	0ab	0	0	0	0	0	0ab	0	0
30	0ab	0	0	0	0	0	0ab	0	0
50	3±1c**	1-12	15	0	0	0	0,7±0,5ab	1-2	3
60	6,7±0,5d****	1-10	33	0	0	0	0ab	0	0
70	9±1d****	1-15	45	0	0	0	3±1c**	1-2	15
80	12,3±1,5e****	1-12	62	0	0	0	0ab	0	0
90	18±1,7f****	1-6	90	0	0	0	0,7±1,1ab	1-1	3
100	20±0f****	1-6	100	0	0	0	0	0	0

Experimentos com 20 larvas (L3) de *Ae. aegypti* para cada grupo teste (1-100 µg/mL), controle (sem dihydrojasmane e sem DMSO) e controle testemunho (DMSO), em triplicatas (n=60) e com 3 repetições. Média e desvio padrão (X±DP). Intervalo de Variação (IV). Valores seguidos da mesma letra na mesma coluna não possuem diferenças significativas entre si pelo teste de Tukey. Níveis de significância representados como \*\*\*\* P<0,0001; \*\*P<0,01; \*P<0,1 vs controle testemunho (DMSO).

## -Farnesol

O farnesol aplicado no meio de criação das larvas de *Ae. aegypti* diminuiu o período de desenvolvimento larval nas concentrações de 30 µg/mL ( $4,4 \pm 0,9$  dias;  $P < 0,001$ ) e 50 µg/mL ( $4 \pm 1$  dias;  $P < 0,1$ ) e o período de desenvolvimento L3-adulto na concentração de 30 µg/mL ( $6,1 \pm 0,7$  dias;  $P < 0,001$ ) quando comparados ao controle testemunho DMSO ( $7,3 \pm 0,9$  dias) (Tabela 2A). Os bioensaios com farnesol mostraram viabilidade larval (L3-L4) de 98% (1 µg/mL), 67% (10 µg/mL), 12% (30 µg/mL), 5% (50 µg/mL), 5% (60 µg/mL), 3% (70 µg/mL), 2% (80 µg/mL) e 2% (90 µg/mL) e destas larvas, a viabilidade L4-pupa e viabilidade Pupa-adulto foi de 100% (Tabela 2B). Os testes apresentaram atividade larvicida desde a menor concentração (1 µg/mL), com 2% de mortalidade, seguidos de 33% (10 µg/mL), 88% (30 µg/mL), 95% (50 µg/mL), 95% (60 µg/mL), 97% (70 µg/mL), mantendo o percentual de 98% para 80 µg/mL e 90 µg/mL. Após 24h do tratamento, atingiu a taxa de mortalidade de 100% na concentração de 100 µg/mL (Tabela 2C). Foi observada mortalidade pupal de 10% na concentração de 1 µg/mL (Tabela 2C).

**Tabela 2.** Desenvolvimento (A), viabilidade (B) e mortalidade (C) de *Aedes aegypti* em larvas L3 tratadas no meio de criação com **farnesol** nas concentrações 1-90 µg/mL.

Tratamento	Larval (dias)		Pupal (dias)		L3-adulto (dias)	
	X ±DP	IV	X ± DP	IV	X ±DP	IV
Controle	5,9±1,3a	4-9	1,9±0,3a	1-2	7,8±1,5a	5-11
DMSO	7,3±0,9b	6-9	2±0ab	2-2	9,2±1,1b	6-11
1	7,3±2b	4-12	1,9±0,3ab	1-2	9,3±2,1b	6-14
10	6,6±2ab	3-11	2±0ab	2-2	8,6±1,9ab	5-13
30	4,4±0,9ac***	3-6	1,7±0,5ab	1-2	6,1±0,7ac***	5-7
50	4±1ac*	3-5	2,2±0,5ab	2-3	6,3±1,5ab	5-8
60	5,7±1,2ab	5-7	2±0ab	2-2	7,7±1,2ab	7-9
70	4,5±0,5ab	4-5	1,5±0,7ab	1-2	6,5±0,5ab	6-7
80	5±0ab	5-5	0	0	0	0
90	6±0ab	6-6	2±0	2-2	8±0ab	8-8
100	0	0	0	0	0	0

B	L3-L4		L4-pupa		Pupa		L3-adulto	
	X ±DP	%	X ±DP	%	X ± DP	%	X ± DP	%
Controle	20 ±0ab	100	20 ±0ab	100	20 ±0ab	100	20 ±0ab	100
DMSO	20 ±0ab	100	20±0ab	100	20±0ab	100	20±0	100
1	19,7 ±0,5ab	98	19,7±0,5 ab	100	17,7±1,5ab	90	17,7±1,5ab	88
10	13,3± 2,1c****	67	13,3±2,1c****	100	13,0±2,6c****	98	13,0±2,6c****	65
30	2,3 ±2,3d****	12	2,3±2,3d****	100	2,3±2,3d****	100	2,3±2,3d****	12
50	1,0 ±1,0d****	5	1,0±1,0d****	100	1,0±1,0 d****	100	1,0±1,0 d****	5
60	1,0 ±1,0d****	5	1,0±1,0 d****	100	1,0±1,0 d****	100	1,0±1,0 d****	5
70	0,7 ±0,5d****	3	0,7±0,5 d****	100	0,7±0,5 d****	100	0,7±0,5 d****	3
80	0,3 ±0,5d****	2	0,3±0,6 d****	100	0	0	0	0
90	0,3±0,5d****	2	0,3±0,5d****	100	0,3±0,5d****	100	0,3±0,5d****	2
100	0	0	0	0	0	0	0	0

B	L3			L4			Pupa		
	X ± DP	IV	%	X ± DP	IV	%	X ± DP	IV	%
Controle	0ab	0	0	0	0	0	0a	0	0
DMSO	0ab	0	0	0	0	0	0a	0	0
1	0,3±0,5ab	1-1	2	0	0	0	2±2b*	5-8	10
10	6,7±2,1c****	1-4	33	0	0	0	0,3±0,5a	3-3	2
30	17,7±2,3d****	1-4	88	0	0	0	0a	0	0
50	19±1d****	1-3	95	0	0	0	0a	0	0
60	19±1d****	1-2	95	0	0	0	0a	0	0
70	19,3±0,5d****	1-3	97	0	0	0	0a	0	0
80	19,7±0,5d****	1-2	98	0	0	0	0,3±0,5a	3-3	2
90	19,7±0,5d****	0-1	98	0	0	0	0a	0	0
100	20±0d****	0-1	100						

Experimentos com 20 larvas (L3) de *Ae. aegypti* para cada grupo teste (1-90 µg/mL), controle (sem farnesol e sem DMSO) e controle testemunho (DMSO), em triplicatas (n=60) e com 3 repetições. Média e desvio padrão (X±DP). Intervalo de Variação (IV). Valores seguidos da mesma letra na mesma coluna não possuem diferenças significativas entre si pelo teste de Tukey. Níveis de significância representados como \*\*\*\*P<0,0001; \*\*\* P< 0,001; \*P<0,1 vs controle testemunho (DMSO).

## -Thymol

O thymol não interferiu no período de desenvolvimento do mosquito *A. aegypti* (Tabela 3A). Quanto à viabilidade, nos bioensaios com thymol nas concentrações 1, 10 e 30  $\mu\text{g/mL}$  100% das larvas (L3) chegaram à fase adulta (L3-adulto), enquanto que para os testes em 50, 60, 70  $\mu\text{g/mL}$  a emergência foi de apenas 20, 10 e 5%, respectivamente (Tabela 3B). No presente estudo foi observada a mortalidade das larvas L3 de *A. aegypti* tratadas com thymol a partir da concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  com 80%. Houve um crescente aumento da mortalidade na medida em que a concentração aumentava, perfazendo 90 (60  $\mu\text{g/mL}$ ), 95 (70  $\mu\text{g/mL}$ ) e 100% (80  $\mu\text{g/mL}$ ) (Tabela 3C). Thymol não registrou mortalidade pupal.

**Tabela 3.** Desenvolvimento (A), viabilidade (B) e mortalidade (C) de *Aedes aegypti* em larvas L3 tratadas no meio de criação com **thymol** nas concentrações 1-80 µg/mL.

Tratamento	Larval (dias)		Pupal (dias)		L3-adulto (dias)	
	X ± DP	IV	X ± DP	IV	X ± DP	IV
Controle	6,6±3a	3-14	2,3±0,5a	2-3	10±2,9a	6-18
DMSO	7,7±3,2ab	3-16	1,9±0,3b	1-2	10,2±3,4ab	6-18
1	8,1±2b	5-15	2±0b	2-2	10,3±2,1ab	7-16
10	7,5±1,1ab	6-9	2,2±0,4a	2-3	9,7±1,2ab	8-12
30	7,6±1,5ab	3-10	2±0b	2-2	9,8±1,5ab	5-12
50	6,6±0,8ab	5-7	2,2±0,4a	2-3	8,7±0,9ab	7-10
60	5,4±1,1ab	4-7	2±0b	2-2	7,7±1,2ab	6-9
70	5±1ab	4-6	2±0b	2-2	6,7±1,5ab	5-8
80	0	0	0	0	0	0

B	L3-L4		L4-pupa		Pupa		L3-adulto	
	X ±DP	%						
Controle	19,7±0,6a	98	19,7±0,6a	100	19,7±0,6a	100	19,7±0,6a	98
DMSO	20±0ab	100	20±0ab	100	20±0ab	100	20±0ab	100
1	20±0ab	100	20±0ab	100	20±0ab	100	20±0ab	100
10	20±0ab	100	20±0ab	100	20±0ab	100	20±0ab	100
30	20±0ab	100	20±0ab	100	20±0ab	100	20±0ab	100
50	4±1c****	20	4±1c****	100	4±1c****	100	4±1c****	20
60	2±2cd****	10	2±2cd****	100	2±2cd****	100	2±2cd****	10
70	1±1d****	5	1±1d****	100	1±1d****	100	1±1d****	5
80	0	0	0	0	0	0	0	0

C	L3			L4			Pupa		
	X ±DP	IV	%	X ±DP	IV	%	X ±DP	IV	%
Controle	0,3±0,6a		2	0	0	0	0	0	0
DMSO	0ab	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0ab	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0ab	0	0	0	0	0	0	0	0
30	0ab	0	0	0	0	0	0	0	0
50	16±1c****	1-2	80	0	0	0	0	0	0
60	18±2cd****	1-1	90	0	0	0	0	0	0
70	19±1d****	1-1	95	0	0	0	0	0	0
80	20±0d****	0-1	100	0	0	0	0	0	0

Experimentos com 20 larvas (L3) de *Ae. aegypti* para cada grupo teste (1-80 µg/mL), controle (sem thymol e sem DMSO) e controle testemunho (DMSO), em triplicatas (n=60) e com 3 repetições. Média e desvio padrão (X±DP). Intervalo de Variação (IV). Valores seguidos da mesma letra na mesma coluna não possuem diferenças significativas entre si pelo teste de Tukey. Níveis de significância representados como \*\*\*\* P<0,0001 vs controle testemunho (DMSO).

## -P-cymene

O tratamento no meio de criação de larvas L3 de *A. aegypti* com p-cymene estendeu o período de desenvolvimento larval nas concentrações de 1 µg/mL ( $8,2 \pm 1,2$  dias;  $P < 0,001$ ) e 10 µg/mL ( $8,5 \pm 1,1$  dias;  $P < 0,0001$ ) em comparação ao controle testemunho DMSO ( $7,3 \pm 0,9$  dias) (Tabela 4A). Este monoterpene quando testado nas concentrações de 1 µg/mL ( $10,2 \pm 1,2$  dias;  $P < 0,01$ ) e 10 µg/mL ( $10,5 \pm 2,3$  dias;  $P < 0,0001$ ) interferiu no período de desenvolvimento L3-adulto, enquanto que esse tempo de desenvolvimento do controle testemunho DMSO foi menor ( $9,2 \pm 1,1$  dias) (Tabela 4A). Os bioensaios com este óleo nas concentrações de 1 e 10 µg/mL apresentaram viabilidade larval de 98% e 97% (Tabela 4B), respectivamente, obtendo baixa toxicidade larval com apenas 2 e 3% (Tabela 4C). A alta mortalidade larval foi registrada a partir da concentração de 30 µg/mL resultando em 80%, p-cymene exibiu o seu potencial larvicida na concentração de 80 µg/mL matando 100% das larvas de *A. aegypti* (Tabela 4C). A mortalidade de pupas ocorreu nas concentrações de 1, 10, 30, 60 e 70 µg/mL com percentual de 18, 24, 5, 2 e 2%, respectivamente (Tabela 4C).

**Tabela 4.** Duração do desenvolvimento (A), viabilidade (B) e mortalidade (C) de *Aedes aegypti* em larvas L3 tratadas no meio de criação com **P-cymene** nas concentrações de 1-80 µg/mL.

Tratamento	Larval (dias)		Pupal (dias)		L3-adulto(dias)	
	X ±DP	IV	X ± DP	IV	X ± DP	IV
Controle	6,6±3a	3-14	2,3±0,5a	2-3	10±2,9a	6-18
DMSO	7,7±3,2ab	3-16	1,9±0,3b	1-2	10,2±3,4ab	6-18
1	8,1±2b	5-15	2±0b	2-2	10,3±2,1ab	7-16
10	7,5±1,1ab	6-9	2,2±0,4a	2-3	9,7±1,2ab	8-12
30	7,6±1,5ab	3-10	2±0b	2-2	9,8±1,5ab	5-12
50	6,6±0,8ab	5-7	2,2±0,4a	2-3	8,7±0,9ab	7-10
60	5,4±1,1ab	4-7	2±0b	2-2	7,7±1,2ab	6-9
70	5±1ab	4-6	2±0b	2-2	6,7±1,5ab	5-8
80	0	0	0	0	0	0

B	L3-L4		L4-pupa		Pupa		L3-adulto	
	X ±DP	%						
Controle	19,7±0,6a	98	19,7±0,6a	100	19,7±0,6a	100	19,7±0,6a	98
DMSO	20±0ab	100	20±0ab	100	20±0ab	100	20±0ab	100
1	20±0ab	100	20±0ab	100	20±0ab	100	20±0ab	100
10	20±0ab	100	20±0ab	100	20±0ab	100	20±0ab	100
30	20±0ab	100	20±0ab	100	20±0ab	100	20±0ab	100
50	4±1c****	20	4±1c****	100	4±1c****	100	4±1c****	20
60	2±2cd****	10	2±2cd****	100	2±2cd****	100	2±2cd****	10
70	1±1d****	5	1±1d****	100	1±1d****	100	1±1d****	5
80	0	0	0	0	0	0	0	0

C	L3			L4			Pupa		
	X ±DP	IV	%	X ±DP	IV	%	X ±DP	IV	%
Controle	0,3±0,6a		2	0	0	0	0	0	0
DMSO	0ab	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0ab	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0ab	0	0	0	0	0	0	0	0
30	0ab	0	0	0	0	0	0	0	0
50	16±1c****	1-2	80	0	0	0	0	0	0
60	18±2cd****	1-1	90	0	0	0	0	0	0
70	19±1d****	1-1	95	0	0	0	0	0	0
80	20±0d****	0-1	100	0	0	0	0	0	0

Experimentos com 20 larvas (L3) de *Ae. aegypti* para cada grupo teste (1-80 µg/mL), controle (sem P-cymene e sem DMSO) e controle testemunho (DMSO), em triplicatas (n=60) e com 3 repetições. Média e desvio padrão (X±DP). Intervalo de Variação (IV). Valores seguidos da mesma letra na mesma coluna não possuem diferenças significativas entre si pelo teste de Tukey. Níveis de significância representados como \*\*\*\*P<0,0001 vs controle testemunho (DMSO).

## -Nerolidol

O estudo da atividade do nerolidol testado na concentração de 10 µg/mL sobre as larvas de *Ae. aegypti* estendeu os períodos de desenvolvimento larval ( $9,1 \pm 2,7$  dias;  $P < 0,0001$ ) e desenvolvimento L3-adulto ( $11,1 \pm 2,7$  dias;  $P < 0,0001$ ) em relação ao controle testemunho DMSO (Tabela 5A). As larvas tratadas mostraram viabilidade larval de 93%, 90%, 2% e 2% nas concentrações de 1, 10, 30 e 50 µg/mL, respectivamente (Tabela 5B). O tratamento com estas concentrações apresentou 100% de viabilidade L4-pupa e Pupa-adulto (Tabela 5B). Nos bioensaios com o sequiterpeno nerolidol, a menor concentração (1 µg/mL) apresentou 7% de mortalidade larval. Houve um crescente aumento na mortalidade quando aumentou a concentração de 10 µg/mL (10%) para 30 µg/mL (98%), e o percentual manteve-se em 98% na concentração 50 µg/mL (Tabela 5C). Nerolidol foi capaz de causar 100% de mortalidade larval na concentração de 60 µg/mL 24h após o tratamento e não apresentou mortalidade pupal (Tabela 5B).

**Tabela 5.** Desenvolvimento (A), viabilidade (B) e mortalidade (C) de *Aedes aegypti* em larvas L3 tratadas no meio de criação com óleo essencial **nerolidol** nas concentrações de 1-60 µg/mL.

Tratamento	Larval (dias)		Pupal (dias)			L3-adulto (dias)	
	X ±DP	IV	X ± DP	IV	X ±DP	IV	
Controle	5,9±1,3a	4-9	1,8±0,4a	1-2	7,8±1,5a	5-11	
DMSO	7,3±0,9b	6-9	2±0ab	2-2	9,2±1b	8-11	
1	6,9±1,4b	4-12	2±0ab	2-2	9±1,4b	6-14	
10	9,1±2,7c****	5-13	2±0ab	2-2	11,1±2,7c****	7-15	
30	3±0a*	3-3	2±0ab	2-2	5±0a*	5-5	
50	5±0ab	5-5	2±0ab	2-2	7±0ab	7-7	
60	0	0	0	0	0	0	

B	L3-L4		L4-pupa		Pupa		L3-adulto	
	X ±DP	%						
Controle	19,7±0,5a	98	19,7±0,5a	100	19,7±0,5a	100	19,7±0,5a	98
DMSO	20±0ab	100	20±0ab	100	20±0ab	100	20±0ab	100
1	18,7±0,5abc	93	18,7±0,5abc	100	18,7±0,5abc	100	18,7±0,5abc	93
10	18,0±1,0c*	90	18,0±1,0c*	100	18,0±1,0c*	100	18±1,0c*	90
30	0,3±0,5d****	2	0,3±0,6d****	100	0,3±0,6d****	100	0,3±0,6d****	2
50	0,3±0,6d****	2	0,3±0,6d****	100	0,3±0,6d****	100	0,3±0,6d****	2
60	0	0	0	0	0	0	0	0

C	L3			L4			Pupae		
	X ± DP	IV	%	X ± DP	IV	%	X ± DP	IV	%
Controle	0,3±0,6a		2	0	0	0	0	0	0
DMSO	0ab	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1,3±0,6abc	5-5	7	0	0	0	0	0	0
10	2±1c*	5-5	10	0	0	0	0	0	0
30	19,7±0,6d****	1-3	98	0	0	0	0	0	0
50	19,7±0,6d****	1-2	98	0	0	0	0	0	0
60	20±0d****	1-1	100	0	0	0	0	0	0

Experimentos com 20 larvas (L3) de *Ae. aegypti* para cada grupo teste (1-60 µg/mL), controle (sem nerolidol e sem DMSO) e controle testemunho (DMSO), em triplicatas (n=60) e com 3 repetições. Média e desvio padrão (X±DP). Intervalo de Variação (IV). Valores seguidos da mesma letra na mesma coluna não possuem diferenças significativas entre si pelo teste de Tukey. Níveis de significância representados como \*\*\*\*P<0,0001; \*P<0,1 vs controle testemunho (DMSO).

## -Carvacrol

Os bioensaios das larvas tratadas com o carvacrol estendeu o período de desenvolvimento larval ( $9,9 \pm 3,7$  dias;  $P < 0,001$ ) e L3-adulto ( $11,9 \pm 3,7$  dias;  $P < 0,0001$ ) na concentração de  $1 \mu\text{g/mL}$  (Tabela 6A). Nas concentrações de 1 e  $10 \mu\text{g/mL}$  100 % das larvas tratadas completaram a emergência (viabilidade L3-adulto), como observado no grupo controle testemunho DMSO, enquanto que para as concentrações de 10, 30 e  $50 \mu\text{g/mL}$  esta taxa foi de 88%, 92% e apenas 17%, respectivamente (Tabela 6B). O percentual de mortalidade das larvas L3 ocasionado pelo óleo essencial carvacrol iniciou-se com 8% ( $30 \mu\text{g/mL}$ ), aumentando para 83% quando testado na concentração de  $50 \mu\text{g/mL}$  (Tabela 6C). A concentração de  $60 \mu\text{g/mL}$  foi a mais efetiva causando a morte de 100% das larvas em 24 h após a aplicação do carvacrol no meio de criação das larvas de *A. aegypti* (Tabela 6C). Apesar da concentração de  $10 \mu\text{g/mL}$  não ter apresentado mortalidade larval foram registrados 12% de mortalidade pupal (Tabela 6C).

**Tabela 6.** Desenvolvimento (A), viabilidade (B) e mortalidade (C) de *Aedes aegypti* em larvas L3 tratadas no meio de criação com óleo essencial **carvacrol** nas concentrações de 1-60 µg/mL.

Tratamento	Larval (dias)		Pupal (dias)		L3-adulto (dias)	
	X ± DP	VI	X ± DP	IV	X ± DP	IV
Controle	7,8±1,8a	4-12	2,1±0,4a	1-3	9,8±1,7a	6-13
DMSO	7,8±1,8ab	4-11	2,2±0,5ab	1-3	10±1,6ab	7-13
1	9,9±3,7c***	3-18	2±0ab	2-2	11,9±3,7c****	5-20
10	7,9±3,2ab	4-16	2±0,3ab	2-2	10,3±3,2ab	6-18
30	7,9±2,5ab	4-14	2,2±0,5ab	2-4	9,9±2,4ab	6-18
50	5,1±1,1d	4-7	3,2±1c****	2-4	8,3±1,2ab	7-11
60	0	0	0	0	0	0

B	L3-L4		L4-pupa		Pupa		L3-adulto	
	X ± DP	%						
Controle	19,3±1,1a	98	19,3±1,1a	100	19,3±1,1a	100	19,3±1,1a	98
DMSO	20±0ab	100	20±0ab	100	20±0ab	100	20±0ab	100
1	20±0ab	100	20±0ab	100	20±0ab	100	20±0ab	100
10	20±0ab	100	20±0ab	100	17,7±0,5c**	88	17,7±0,5c**	88
30	18,3±1,5ab	92	18,3±1,5ab	100	18,7±0,5ab	100	18,7±0,5ab	92
50	3,3±0,5c****	17	3,3±0,5c****	100	3,3±0,5d****	100	3,3±0,5d****	17
60	0	0	0	0	0	0	0	0

C	L3			L4			Pupa		
	X ± DP	IV	%	X ± DP	IV	%	X ± DP	IV	%
Controle	0,7±0,5a		2	0	0	0	0	0	0
DMSO	0ab	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0ab	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0ab	0	0	0	0	0	2,3±0,5c****	4-8	12
30	1,7±0,5ac**	1-3	8	0	0	0	0	0	0
50	16,7±0,5d****	1-2	83	0	0	0	0	0	0
60	20±0e****	1-1	100	0	0	0	0	0	0

Experimentos com 20 larvas (L3) de *Ae. aegypti* para cada grupo teste (1-60 µg/mL), controle (sem carvacrol e sem DMSO) e controle testemunho (DMSO), em triplicatas (n=60) e com 3 repetições. Média e desvio padrão (X ± DP). Intervalo de Variação (IV). Valores seguidos da mesma coluna não possuem diferenças significativas entre si pelo teste de Tukey. Níveis de significância representados como \*\*\*\* P<0,0001\*\*\* P< 0,001; \*\*P = <0,01; \*P<0,1 vs controle testemunho (DMSO).

### 3. 2 Microscopia eletrônica de transmissão

A análise por microscopia eletrônica de transmissão das larvas (L4) de *Ae. aegypti* dos grupos controle e controle-DMSO mostraram o revestimento cuticular externo de aspecto normal apresentando aspecto laminar e presença de projeções regulares na superfície externa (Figuras 1 e 2). Os núcleos das células epiteliais localizadas logo abaixo da cutícula apresentam-se ovalados ou de aspecto irregular com cromatina distribuída uniformemente (Figuras 2 e 3). Mitocôndrias nesta região apresentam-se com a dupla membrana característica assim como as cristas mitocondriais sem alterações de espessura (Figuras 2 e 4). O tubo digestório apresenta-se com região apical, mediana e basal com aspectos normais e sem alterações morfológicas, ou seja, as células epiteliais se apresentaram dispostas em uma única camada de células cilíndricas baixas, com uma superfície apical recoberta de inúmeras microvilosidades bem preservadas e alongadas (Figura 5, 6 e 7). Nas figuras 5 e 6 podemos observar junções intercelulares preservada, aspecto do citoplasma homogêneo com presença de grande número de mitocôndrias devido ao transporte de íons deste tipo de célula. A musculatura apresenta o típico aspecto estriado com as fibras musculares arranjadas e dispostas paralelamente (Figura 8). As larvas (L4) de *Ae. aegypti* tratadas com os óleos essenciais terpênicos apresentaram alterações variadas de acordo com a substância utilizada, porém, de uma forma geral todas causaram algum tipo de alteração no tegumento ou nas porções internas. As larvas tratadas com a substância dihydrojasmone apresentaram alterações na parede do corpo exibindo a cutícula com deformações e presença de inclusões eletron densas (Figuras 9, 10 e 11). As células apresentavam intensa destruição citoplasmática não sendo observado nenhuma organela íntegra apenas muitas figuras de mielina (Figura 12). O tratamento com a substância farnesol provocou poucas alterações na cutícula. O núcleo das células epiteliais apresentou aspecto normal com cromatina e nucléolo evidentes enquanto que o citoplasma apresenta alguns vacúolos (Figuras 13 e 14). Com a utilização da substância thymol grandes alterações no tegumento foram observadas (Figuras 15-18). O citoplasma apresentou sinais de degeneração exibindo mitocôndrias de aspecto alterado (Figura 19), com intensa vacuolização citoplasmática exibindo vacúolos de diferentes tamanhos (Figuras 20, 21 e 22). Os núcleos apresentaram aspecto mais pálido com fragmentação da cromatina Figuras 23 e 24). A região basal do epitélio não apresentou o tipo aspecto de interdigitações basais sendo

visualizados muitos vacúolos (Figura 25). A musculatura presente não apresentou os padrões paralelos das fibras sendo também observadas rupturas no tecido (Figura 26). A ultraestrutura da larva (L4) de *Aedes aegypti* tratada com a substância p-cymene demonstrou aspecto alterado, onde não se observam os contornos celulares, junções e organelas, caracterizando uma completa desorganização tecidual. A parede do corpo exibiu a cutícula com deformações. Foram observadas inclusões eletrondensas mitocôndrias com aspecto alterado e intensa vacuolização (Figuras 27 – 30). As larvas tratadas com a substância nerolidol apresentaram a parede do corpo exibindo a cutícula com deformações (Figuras 31 e 32). Inclusões eletrondensas também estavam presentes (Figura 33, 36 e 37) além de mitocôndrias com aspecto alterado e intensa vacuolização. De uma forma geral a larva demonstrou aspecto alterado (Figura 34), onde não se observou contornos celulares, junções e organelas. O citoplasma apresentou um aspecto desorganizado (Figura 35). Algumas traquéias apresentavam o aspecto normal (Figura 33), enquanto outras mostraram-se dilatadas (Figura 38). As microvilosidades apresentaram aspecto fragmentado (Figura 39). Aspecto alterado do citoplasma é vem evidenciado mostrando intensa vacuolização e destruição citoplasmática (Figuras 40, 41 e 42). O tratamento com a substância carvacrol resultou em alterações na parede do corpo exibindo a cutícula com deformações (Figura 43), retículo endoplasmático rugoso bastante aumentado (Figura 44). Várias figuras de mielina são visualizadas (Figura 45) e a musculatura apresenta espaços entre as fibras (Figura 46). Citoplasma apresentou aspecto denso com muitos ribossomas e granulações, e intensa vacuolização, sendo também visualizados perfis do Retículo endoplasmático enovelado (Figuras 47 a 50).

## 4 DISCUSSÃO

O surgimento de um grande número de arboviroses transmitidas por *Ae. aegypti* e sua capacidade de resistir a inseticidas químicos sintéticos aumentou o interesse em explorar novos produtos contra o mosquito vetor da dengue. O controle de *Ae. aegypti* com pesticidas não tem apresentado grande eficácia, forçando o uso de doses cada vez mais altas, o que representa riscos para a saúde humana e meio ambiente (WHO 2012).

As plantas são uma importante fonte rica de compostos químicos bioativos que podem atuar de forma efetiva no controle do *Ae. aegypti*, com menor impacto à saúde humana e meio ambiente (GHOSH et al. 2012, HERRERA et al. 2015). De acordo com Lambrano et al (2015) o uso de óleos essenciais (Oes), em geral, tem duas vantagens sobre outros produtos naturais, a sua baixa toxicidade para mamíferos, aves e peixes, e a sua grande diversidade estrutural como caminho para uma fonte potencial de moléculas bioativas. De acordo com os resultados do presente estudo, o óleo dihydrojasmone mostrou alta eficácia quanto a atividade larvicida ( $CL_{50} = 66 \mu\text{g/mL}$ ), para *Ae. aegypti*, com duração de 1 a 6 dias após a sua aplicação. Importante salientar que até esta data não houve registro descrito na literatura sobre a atividade do óleo dihydrojasmone contra larvas de *Ae. aegypti*. Resultado semelhante foi encontrado para o monoterpeneo p-cymene, com uma  $CL_{50}$  de  $23,1 \mu\text{g/mL}$ . Estes dados mostraram sua eficiência, quando comparados ao p-cymene de *Clausena excavata* apresentou  $CL_{50} = 43,3 \text{ mg/L}$  sobre as larvas de 4º estágio (L4) de *Ae. aegypti* e  $CL_{50} = 34,9 \text{ mg/L}$  contra larvas de 4º estágio (L4) de *Aedes albopictus*.(Cheng et al 2009).

De acordo com Govindarajan et al (2016) a atividade larvicida de carvacrol foi observada diferentes espécies de mosquitos incluindo *Anopheles stephensi* ( $CL_{50}=21,15 \mu\text{g/mL}$ ), *Anopheles subpictus* ( $CL_{50}=24,06 \mu\text{g/mL}$ ), *Culex*

*tritaeniorhynchus* (CL<sub>50</sub>=27,95 µg/mL) e *Culex quinquefasciatus* (CL<sub>50</sub>=26,08 µg/mL). Tang et al. 2011 encontraram semelhantes com carvacrol contra *Aphis craccivora* e *Leucania separata*, nas concentrações letais medianas (CL<sub>50</sub>) de 16,8 e 12,7 mg/L (1), respectivamente. Neste estudo, o Carvacrol apresentou uma maior que as citadas anteriormente (CL<sub>50</sub>=42 µg/mL). No entanto, quando utilizados ensaios de imersão foliar, a ação encontrada contra ninfas de *Pochazia shantungensis* mostrou CL = 56,74 mg/L (PARK et al. 2017). A atividade larvicida de thymol (CL<sub>50</sub> = 27 µg/mL) corrobora estudos de Waliwitiya et al. (2009) sobre as larvas de *Ae. aegypti*. A atividade tóxica do thymol também foi relatada sobre *Spodoptera litura* (Hummelbrunner e Isman 2001), *Musca domestica* (Lee et al. 1997), *Drosophila melanogaster*, *P. shantungensis* (PARK et al 2017) e para o mosquito *C. quinquefasciatus* (FRANZIOS et al. 1997, TRABOULSI et al. 2002). Este monoterpeneo testado sobre as larvas das espécies de mosquitos *An. subpictus*, *Ae. albopictus* e *C. tritaeniorhynchus* apresentou CL<sub>50</sub> de 22.06, 24.83 e 28.19 µg/mL, respectivamente (GOVINDARAJAN et al. 2013).

O bioensaio com farnesol registrou CL<sub>50</sub> = 11,1 µg/mL para atividade larvicida e Simas et al. (2004) apresentou a mesma atividade sobre *Ae. aegypti* com CL<sub>50</sub> = 13 ppm.

O sesquiterpeneo nerolidol mostrou -se bastante eficiente com uma mortalidade larval (100%) na concentração de 60 µg/mL (CL<sub>50</sub> = 17,1 µg/mL). Este resultado corrobora o trabalho de Simas (2004), com uma CL<sub>50</sub> = 17 ppm, com *Ae. aegypti*. Esta atividade do nerolidol foi relatada por Chantraine et al. (1998) e Ali et al (2013), porém com CL<sub>50</sub> = 9 ppm e 13,4 ppm, respectivamente, valores menores em relação ao resultado do presente estudo e aos achados de Simas et al (2004).

Alguns autores determinaram formas para classificar o potencial dos produtos naturais como larvicidas (CHANTRAINE et al. 1998, MAGALHÃES et al. 2010). De

acordo com a classificação de Cheng et al. (2003), os óleos essenciais avaliados no presente estudo: farnesol ( $CL_{50}=11,1 \mu\text{g/mL}$ ), p-cymene ( $CL_{50}=23,1 \mu\text{g/mL}$ ), nerolidol ( $CL_{50}=17,1 \mu\text{g/mL}$ ), thymol ( $CL_{50}=27 \mu\text{g/mL}$ ) e carvacrol ( $CL_{50}=42 \mu\text{g/mL}$ ) são substâncias altamente ativas no controle de *Ae. aegypti* por apresentar  $CL_{50}<50 \text{ mg/L}$ , enquanto que o dihydrojasmone ( $CL_{50} = 66 \mu\text{g/mL}$ ) é considerado ativo por apresentar  $CL_{50}<100 \text{ mg/L}$ .

Os óleos essenciais, muitas vezes mostram um amplo espectro de bioatividade sobre o desenvolvimento de insetos importantes na saúde pública e agricultura. Sua natureza lipofílica facilita a interferência nas funções metabólicas, bioquímicas, fisiológicas e comportamentais básicas dos insetos (NISHIMURA 2001). Considerando os diversos parâmetros biológicos dos efeitos dos óleos essenciais sobre insetos, no presente estudo foram verificadas possíveis alterações morfológicas internas nas larvas de 3º estágio (L3) tratadas com dihydrojasmone, p-cymene, carvacrol, thymol, farnesol e nerolidol através da microscopia eletrônica de transmissão.

As larvas tratadas com os diferentes óleos essenciais apresentaram alterações na parede externa do tegumento, mostrando que estas substâncias atuam diretamente na cutícula. Além deste aspecto a ultraestrutura das larvas tratadas mostrou alterações no intestino médio com evidências de uma destruição celular, vacuolização das células epiteliais indicando uma desorganização celular com espaçamento entre as células acúmulos de grânulos em alguns locais do citoplasma, e núcleos com aspecto pálido, característico de uma degeneração nuclear. As microvilosidades apresentaram aspectos alterados o que pode prejudicar a absorção de alimentos, afetando assim diretamente na alimentação das larvas. Mitocôndrias inchadas ou destruídas dificultariam o transporte de íons, importante função das células epiteliais. A intensa vacuolização das células epiteliais e a

presença de figuras de mielina indicam sofrimento celular. Narciso et al (2014) avaliaram o efeito morfológico da neolignana burchellin isolada das folhas da espécie vegetal *Ocotea cymbarum* (Lauraceae) no sistema digestivo das formas imaturas de *A. aegypti*. As larvas tratadas com esta neolignana apresentaram na região média do intestino desorganização e destruição celular, espaçamento entre células e vacuolização das células epiteliais. Maleck et al (2014) relataram o efeito citotóxico da amida piperlonguminine isolada de *Piper turbeculatum* e *Piper scutifolium* nas células epiteliais do sistema digestivo de *Ae. aegypti*. O estudo mostrou vacuolização do citoplasma e edema mitocondrial. De acordo com Cantrell et al. (2010), as substâncias larvicidas podem ser absorvidas através da cutícula do inseto, via trato respiratório, ou ainda através da ingestão. No interior da larva, as substâncias podem atingir o local de ação ou causar efeitos sistêmicos por difusão em diferentes tecidos (SOUZA et al. 2012).

## 5. CONCLUSÃO

De acordo com resultados apresentados, dentre os 27 terpenóides avaliados sobre *Ae. aegypti*, no presente estudo foi revelado o potencial promissor dos óleos dihydrojasmone, farnesol, thymol, p-cymene, carvacrol e nerolidol como agentes contra o principal transmissor da dengue.

**Agradecimentos:** Os autores agradecem à CAPES pela bolsa de doutorado concedida; à FAPERJ pelo apoio financeiro e científico através da Rede Zika#1; à Fundação Educacional Severino Sombra (FUSVE/USS); ao Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem (CENABIO) da Universidade Federal do Rio de Janeiro pelo uso do microscópio eletrônico de transmissão; ao Laboratório de Transmissores de Hematozoários-IOC/FIOCRUZ pelos ovos de *Ae. aegypti*.

## Referências

- Abdel-Rahman FH, Alaniz NM, Saleh MA. Nematicidal activity of terpenoids. *J. Environ. Sci. Health.* 2013; 48, 16–22.
- Bizzo HR, Hovell AMC, Rezende CM. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova.* 2009; 32(3), 588-594.
- Barbosa P, Medeiros RS, Sampaio PT, Vieira G, Wiedemann LS, Veiga-Junior VF. Influence of abiotic factors on the chemical composition of copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne): soil composition, seasonality and diameter at breast height. *Journal of the Brazilian Chemical Society,* 2012; 23(10): 1823-1833.
- Brasil. Ministério da Saúde. 2015a. Febre de Chikungunya: manejo clínico. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/febre\\_chikungunya\\_manejo\\_clinico.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/febre_chikungunya_manejo_clinico.pdf).
- Brasil. Ministério da Saúde. 2015b. Ministério da Saúde confirma relação entre vírus Zika e microcefalia. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/21014-ministerio-da-saude-confirma-relacao-entre-virus-zika-e-microcefalia>.
- da Camara, CA, Akhtar Y, Isman MB, Seffrin RC, Born FS. Repellent activity of essential oils from two species of *Citrus* against *Tetranychus urticae* in the laboratory and greenhouse. *Crop Protection.* 2015; 74, 110-115.
- Cantrell CL, Pridgeon JW, Fronczek FR, Becnel JJ. Structure–activity relationship studies on derivatives of eudesmanolides from *Inula helenium* as toxicants against *Aedes aegypti* larvae and adults. *Chemistry & biodiversity,* 2010; 7(7): 1681-1697.
- Chantraine JM, Laurent D, Ballibian C, Saavedra G, Ibañez, R, Vilaseca LA. *Phytother Res.* 1998; 12, 350.

Dambolena JS, Zunino MP, Herrera JM, Pizzolitto RP, Areco VA, Zygadlo JA. Terpenes: Natural Products for Controlling Insects of Importance to Human Health—A Structure-Activity Relationship Study. *Journal of Entomology*. 2016.

Funasa. Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD). Brasília: Funasa; 2001.

George S, Vincent S. Comparative efficacy of *Annona squamosa* Linn. and *Pongamia glabra* Vent. to *Azadirachta indica* A. Juss against mosquitoes. *Journal of vector borne diseases*. 2005; 42(4), 159.

Ghosh A, Chowdhury N, Chandra G. Plant extracts as potential mosquito larvicides. *Indian Journal of Medical Research*. 2012; 135(5): 581-598.

Govindarajan M, Sivakumar R, Rajeswary M, Veerakumar K. Mosquito larvicidal activity of thymol from essential oil of *Coleus aromaticus* Benth. against *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus*, and *Anopheles subpictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res*. 2013; 112:3713–3721.

Hemingway, J., & Ranson, H. Chemical control of vectors and mechanisms of resistance. *Biology of Disease Vectors*. Edited by: Marquardt WC. 2005.

Herrera JM, Zunino MP, Dambolena JS, Pizzolitto RP, Ganán NA, Lucini EI, Zygadlo JA. Terpene ketones as natural insecticides against *Sitophilus zeamais*. *Industrial Crops and Products*. 2015; 70:435-442.

Li J, Liu C, Sato T. Novel Antitumor Invasive Actions of p-Cymene by Decreasing MMP-9/TIMP-1 Expression Ratio in Human Fibrosarcoma HT-1080 Cells. *Biol. Pharm. Bull*. 2016; 39, 1247–1253.

Marsik P, Kokoska L, Landa P, Nepovim A, Soudek P, Vanek T. In vitro inhibitory effects of thymol and quinones of *Nigella sativa* seeds on cyclooxygenase-1- and -2-catalyzed prostaglandin E2 biosyntheses. *Planta Med*. 2005; 71:739–742. 10.1055/s-2005-871288

de Morais LAS. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Hortic. Bras.* 2009; 27(2).

Park IK, Kim JN, Lee YS, Lee SG, Ahn YJ, Shin SC. Toxicity of plant essential oils and their components against *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae). *J. Econ. Entomol.* 2008; 101: 139–144.

Park JH, Jeon YJ, Lee CH, Chung N, Lee HS. Insecticidal toxicities of carvacrol and thymol derived from *Thymus vulgaris* Lin. against *Pochazia shantungensis* Chou & Lu., newly recorded pest. *Sci Rep.* 2017; 7: 40902.

Rosa MSS, Mendonça-Filho RR, Bizzo HR, de Almeida Rodrigues I, Soares RM, Souto-Padrón T, Alviano CS, Lopes AH. Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Croton cajucara*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47(6): 1895-1901.

Simas NK, Lima EC, Conceição SR, Kuster RM, Oliveira Filho AM, Lage CLS. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue-atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Quím. Nova.* 2004; 27(1): 46-49.

Santos SR, Melo MA, Cardoso AV, Santos RL, de Sousa DP, Cavalcanti SC. Structure–activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. *Chemosphere.* 2011; 84(1): 150-153.

Souza TM, Cunha AP, Farias DF, Machado LK, Morais SM, Ricardo NM, Carvalho AF. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* of m-pentadecadienyl-phenol isolated from *Myracrodruon urundeuva* seeds. *Pest Manag Sci.* 2012; 68(10): 1380-1384.

Sun L, Dong H, Guo C, Qian J, Sun J, Ma L, Zhu C. Larvicidal activity of extracts of *Ginkgo biloba* exocarp for three different strains of *Culex pipiens pallens*. *Journal of medical entomology.* 2006; 43(2): 258-261.

Tang et al 2011. Purification and identification of carvacrol from the root of *Stellera chamaejasme* and research on its insecticidal activity. Nat Prod Res. 2011; 25(3):320-5. doi: 10.1080/14786419.2010.532796.

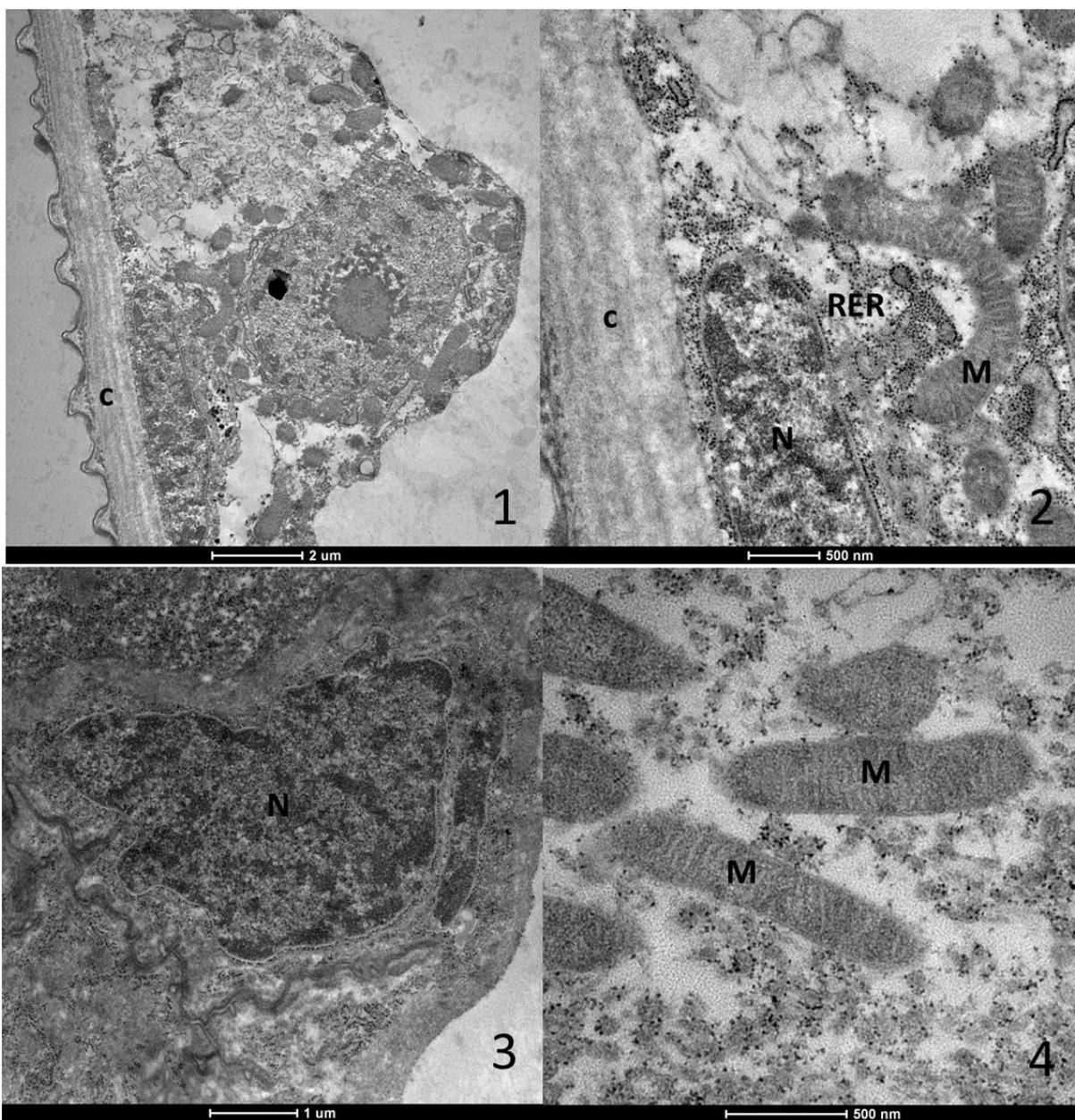
Tunc I, Berger BM, Ertler F, Dağlı F. Ovicidal activity of essential oils from five plants against two stored-product insects. Journal of Stored Products Research. 2000; 36(2): 161-168.

Waliwitiya R, Kennedy CJ, Carl A, Lowenberger CA. Larvicidal and oviposition-altering activity of monoterpenoids, trans-anethole and rosemary oil to the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Pest Manag Sci 2009; 65: 241–248.

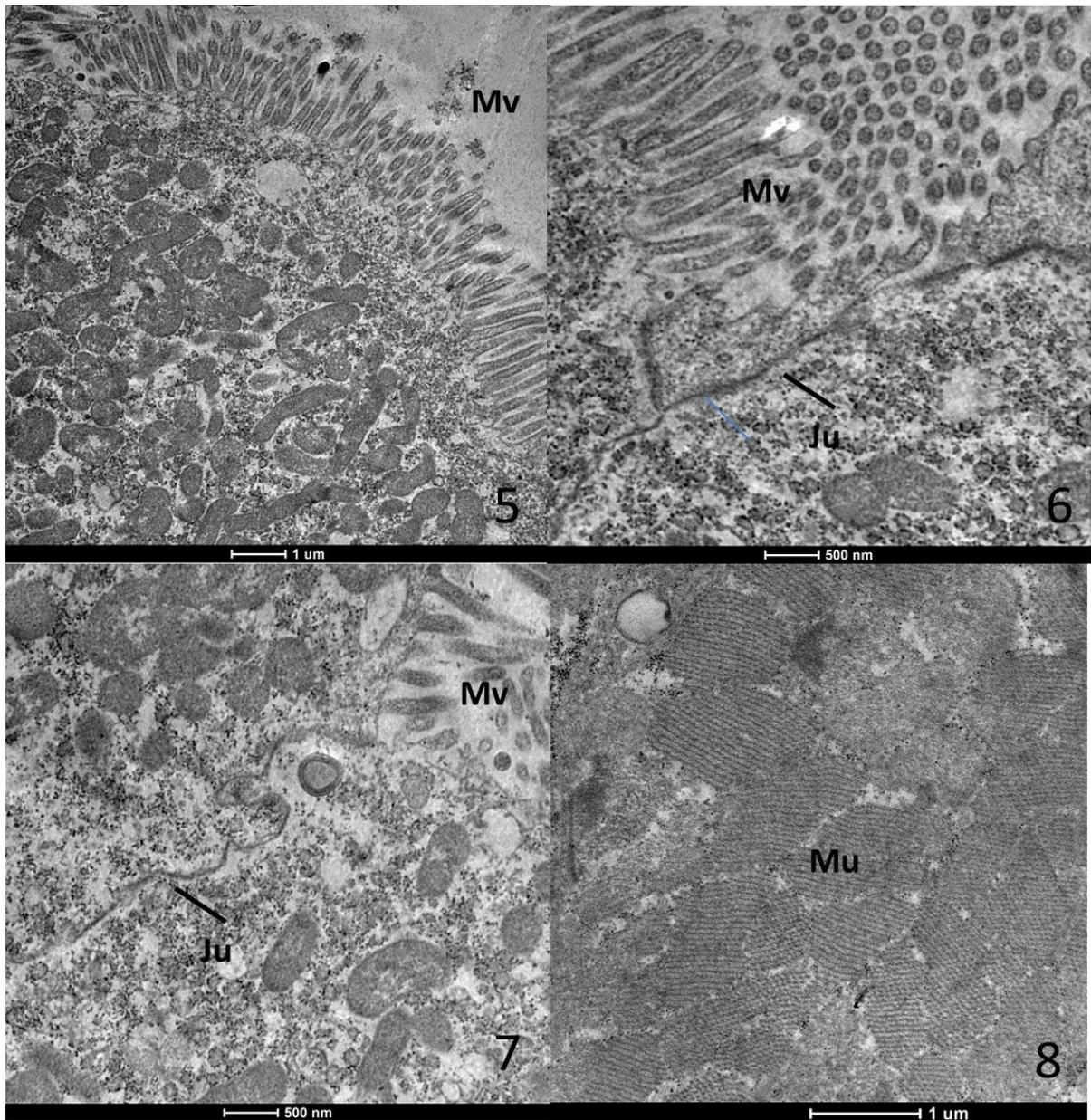
(WHO) World Health Organization. Handbook for Integrated Vector Management. Geneva: World Health Organization. 2012. 67p.

Zanluca C, Melo VC, Mosimann AL, Santos GI, Santos CN, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2015; 110: 569-572.

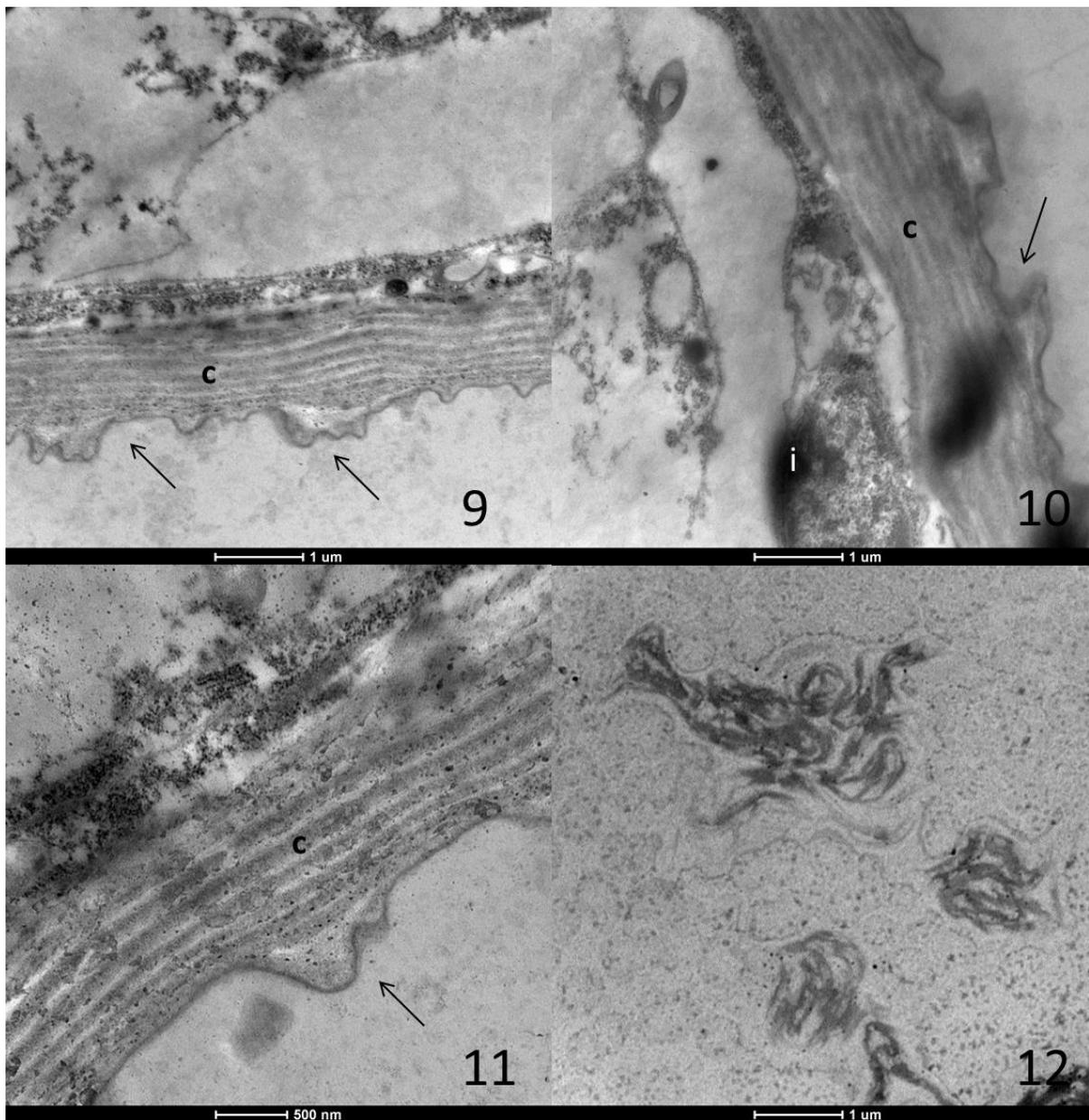
## ANEXOS



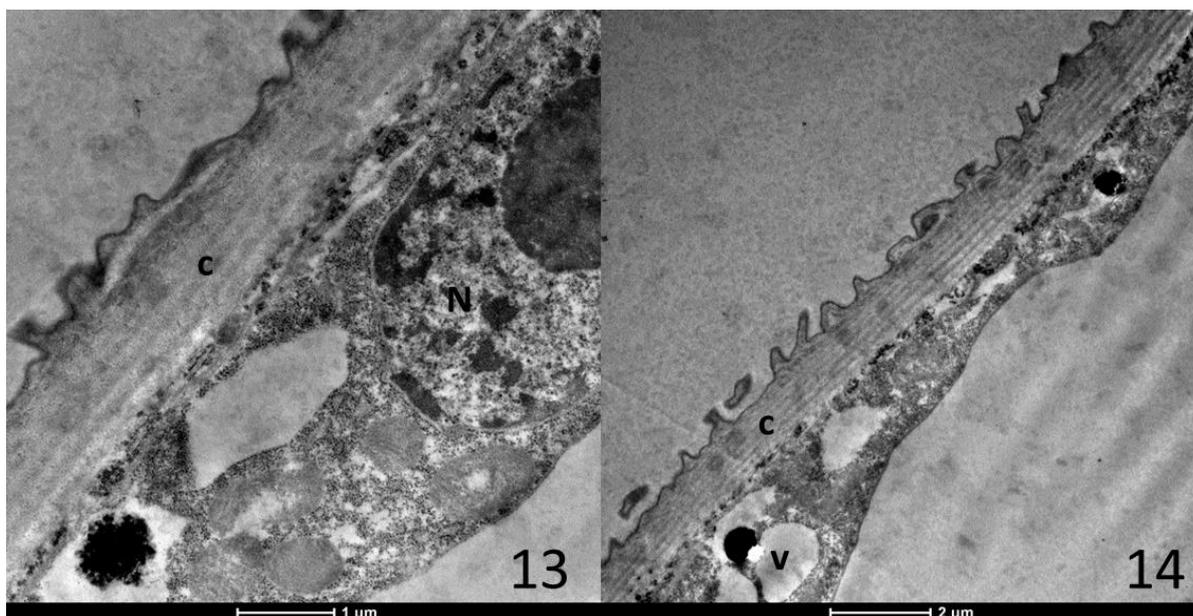
Ultraestrutura da larva (L4) de *Aedes aegypti* – grupo controle e controle com DMSO. Figura 1- Parede do corpo exibindo a cutícula (c) normal, sem deformações; Figura 2- Cutícula (c), Núcleo (N), Retículo endoplasmático rugoso (RER) e mitocôndrias (M) de aspecto normal; Figura 3- Núcleo (N) normal; Mitocôndrias (M) normais.



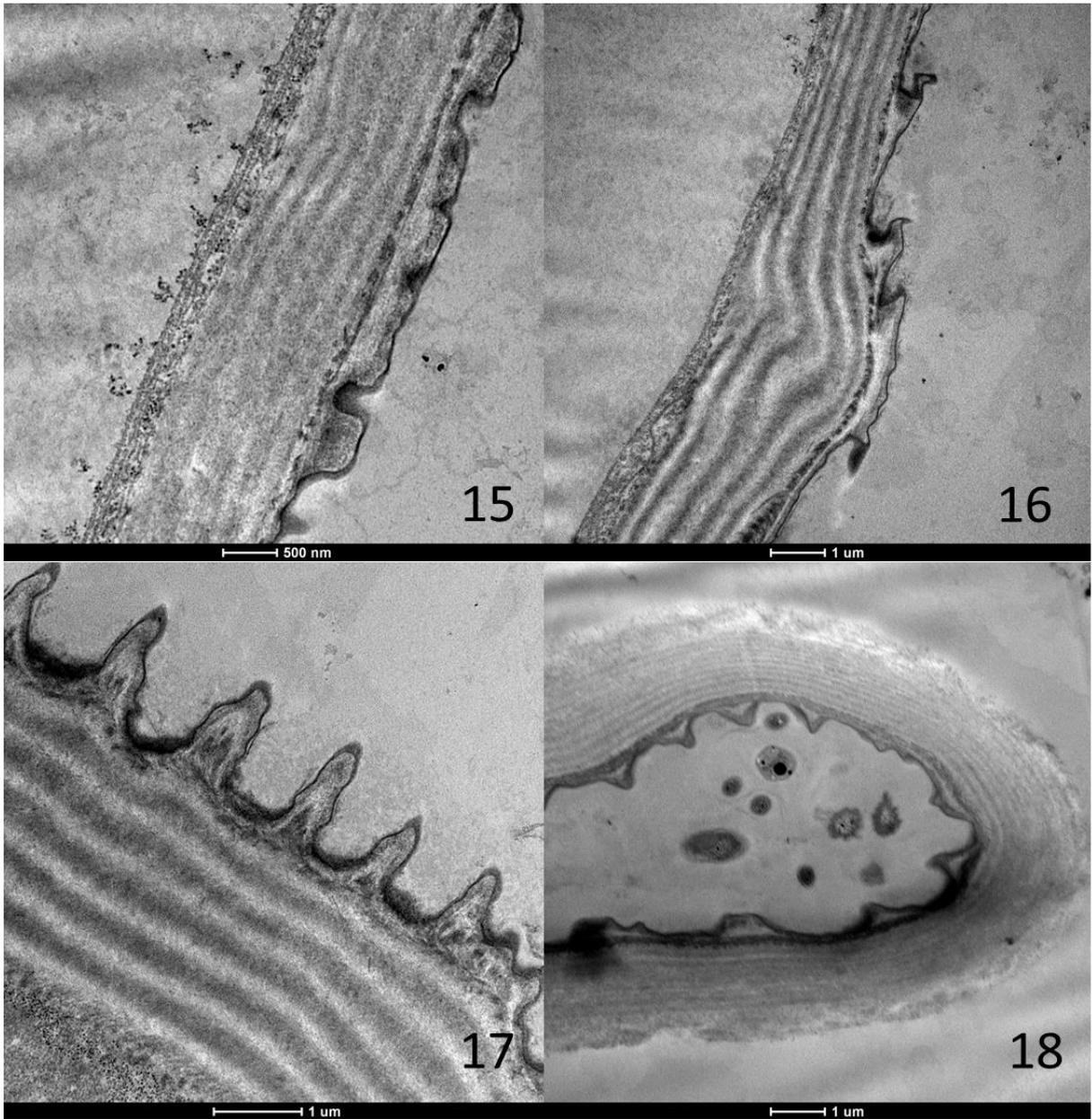
Ultraestrutura da larva (L4) de *Aedes aegypti* – grupo controle e controle com DMSO. Figura 5- Região apical da do tubo digestório onde visualizamos microvilosidades (Mv); Figuras 6 e 7 – Região de contato entre duas células do trato digestório demonstrando a integridade da junção intracelular (Ju). Figura 8- Musculatura (Mu) de aspecto normal.



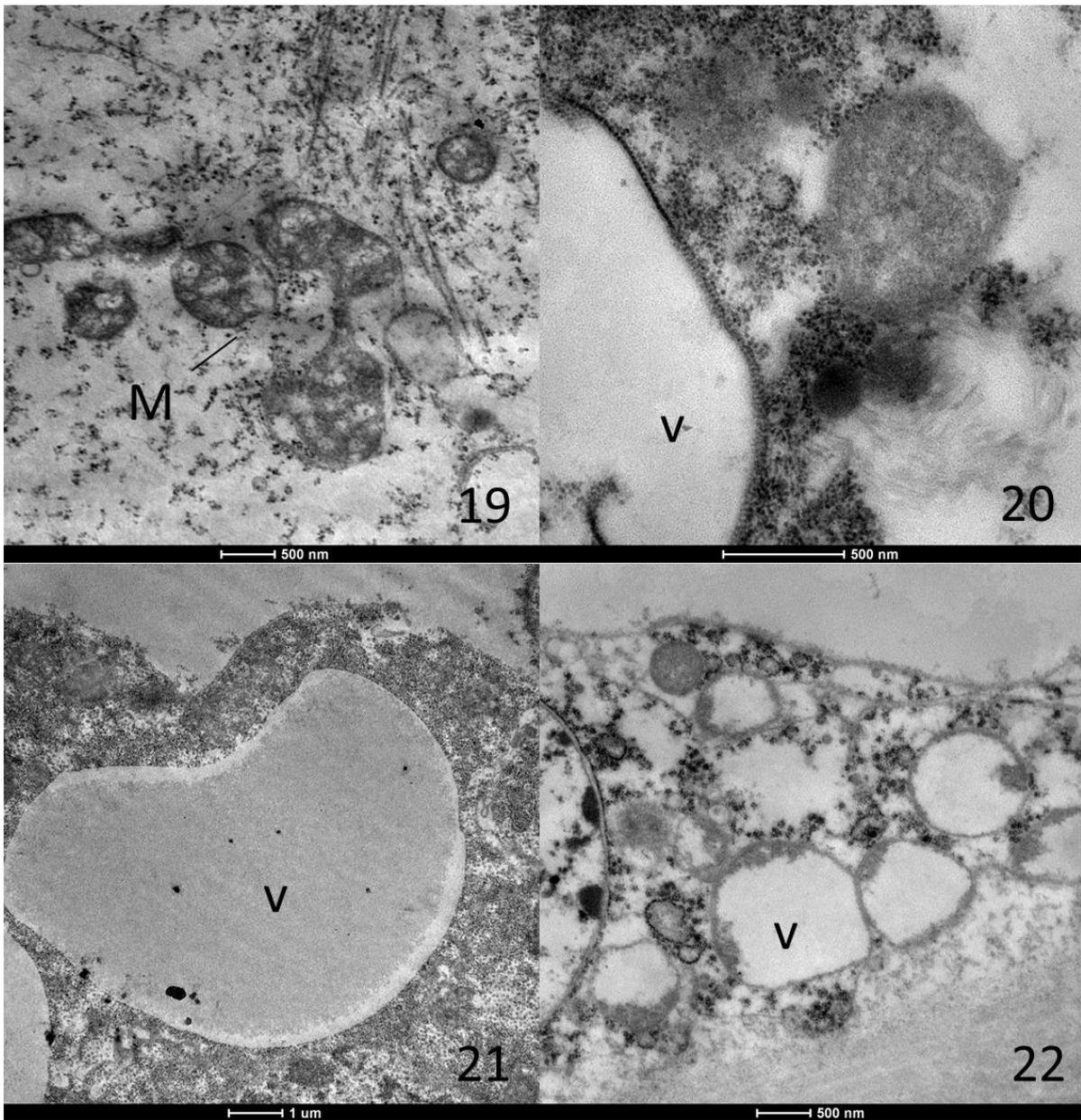
Ultraestrutura da larva (L4) de *Aedes aegypti* tratada com a substância Dihydrojasmon. Figuras 9, 10 e 11- Parede do corpo exibindo a cutícula (c) com deformações (setas); Figura 10 – Inclusões eletrondensas presentes, intensa destruição citoplasmática; Figuras 12- Presença de figuras de mielina.



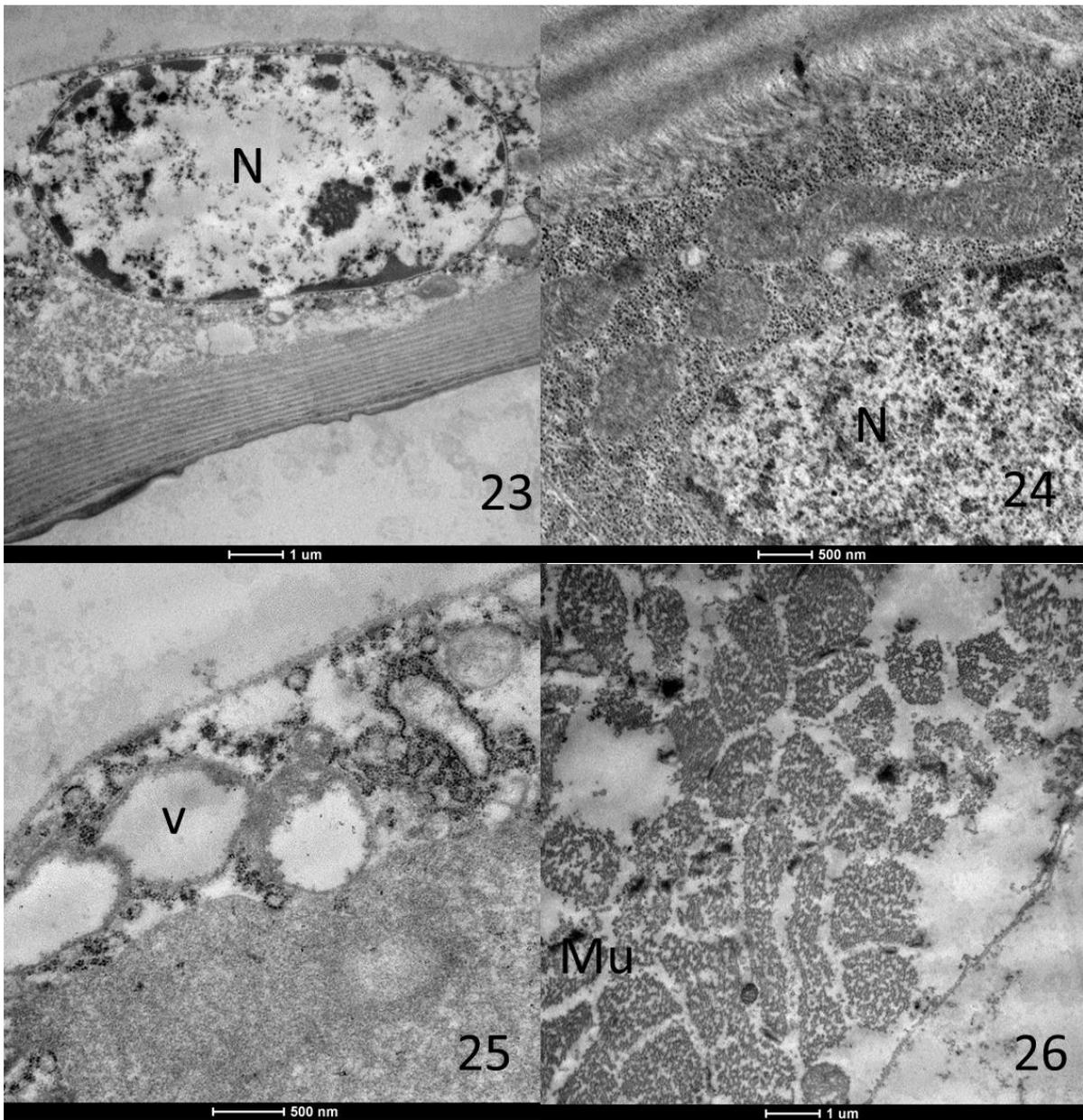
Ultraestrutura da larva (L4) de *Aedes aegypti* tratada com a substância Farnesol. Figura 13- Porção externa do tegumento apresentando poucas alterações na cutícula (c). N - Núcleo de aspecto normal. Figura 14- Citoplasma apresentando alguns vacúolos. (v) .



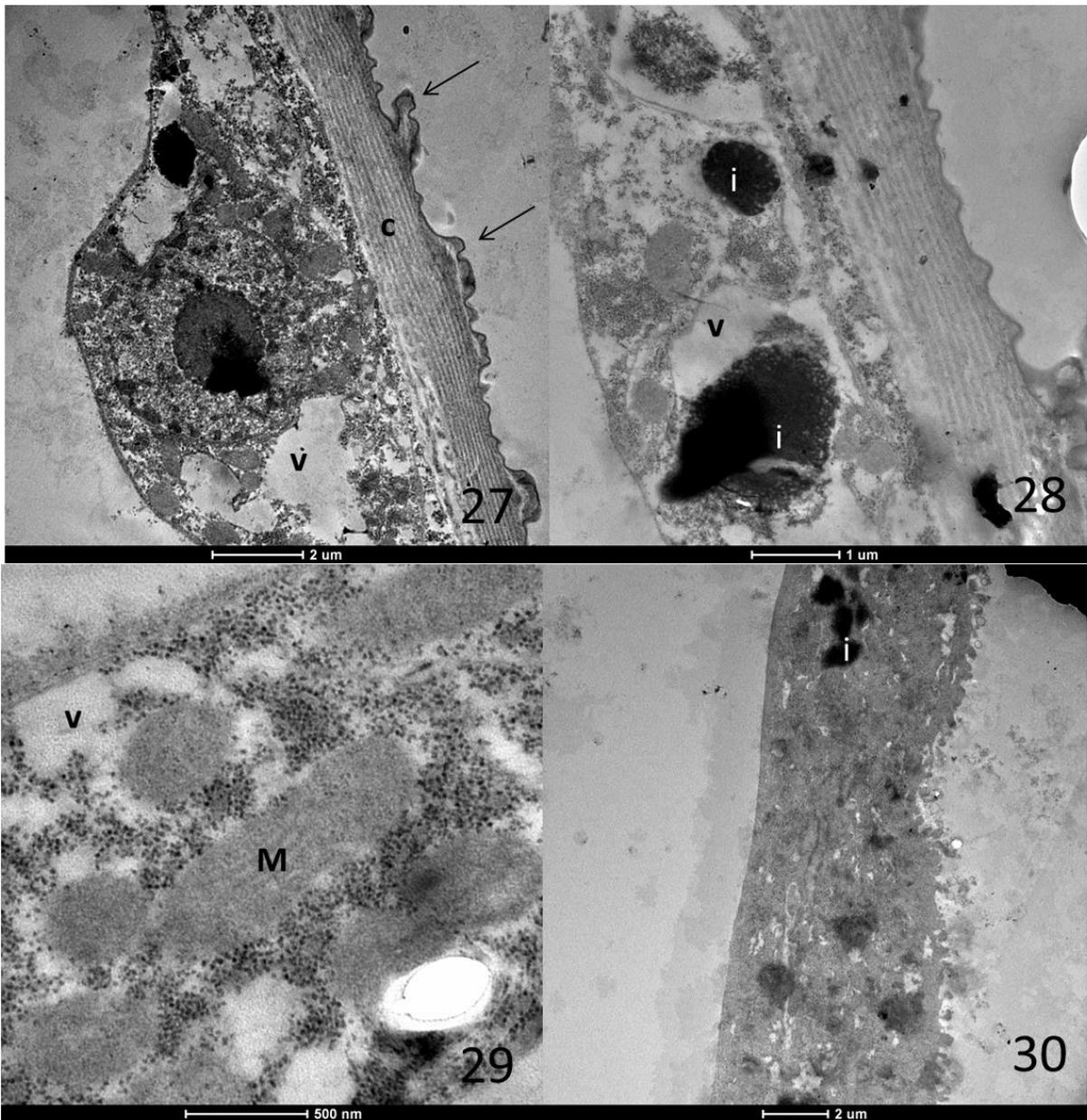
Ultraestrutura da larva (L4) de *Aedes aegypti* tratada com a substância Thymol. Figuras 15 – 18: Parede do corpo exibindo a cutícula (c) com deformações.



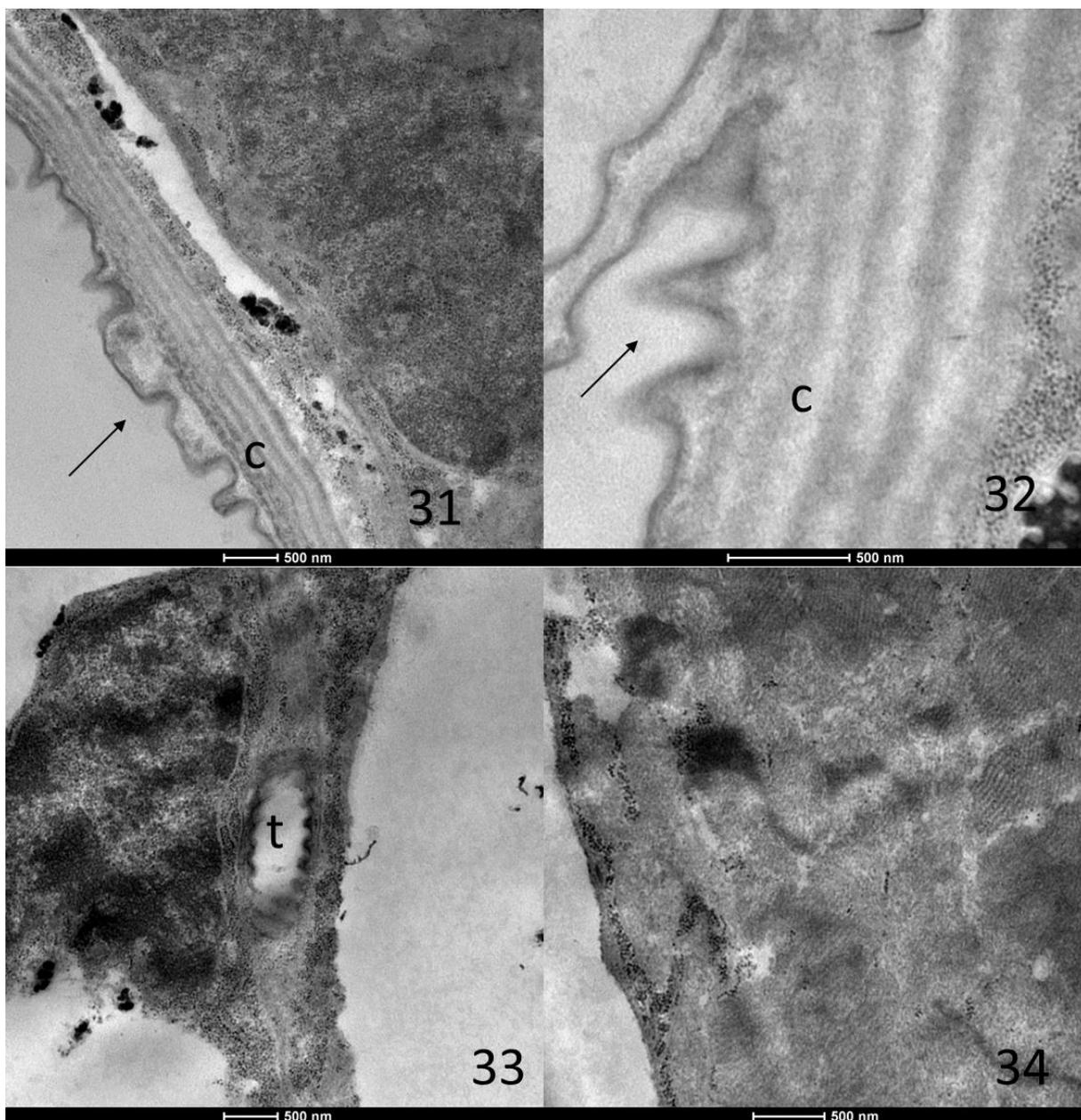
Ultraestrutura da larva (L4) de *Aedes aegypti* tratada com a substância Thymol. Figura 19- Citoplasma apresentando sinais de degeneração. Mitocôndrias de aspecto alterado. Figuras 20, 21, 22- Vacuolização citoplasmática com vacúolos de diferentes tamanhos presentes.



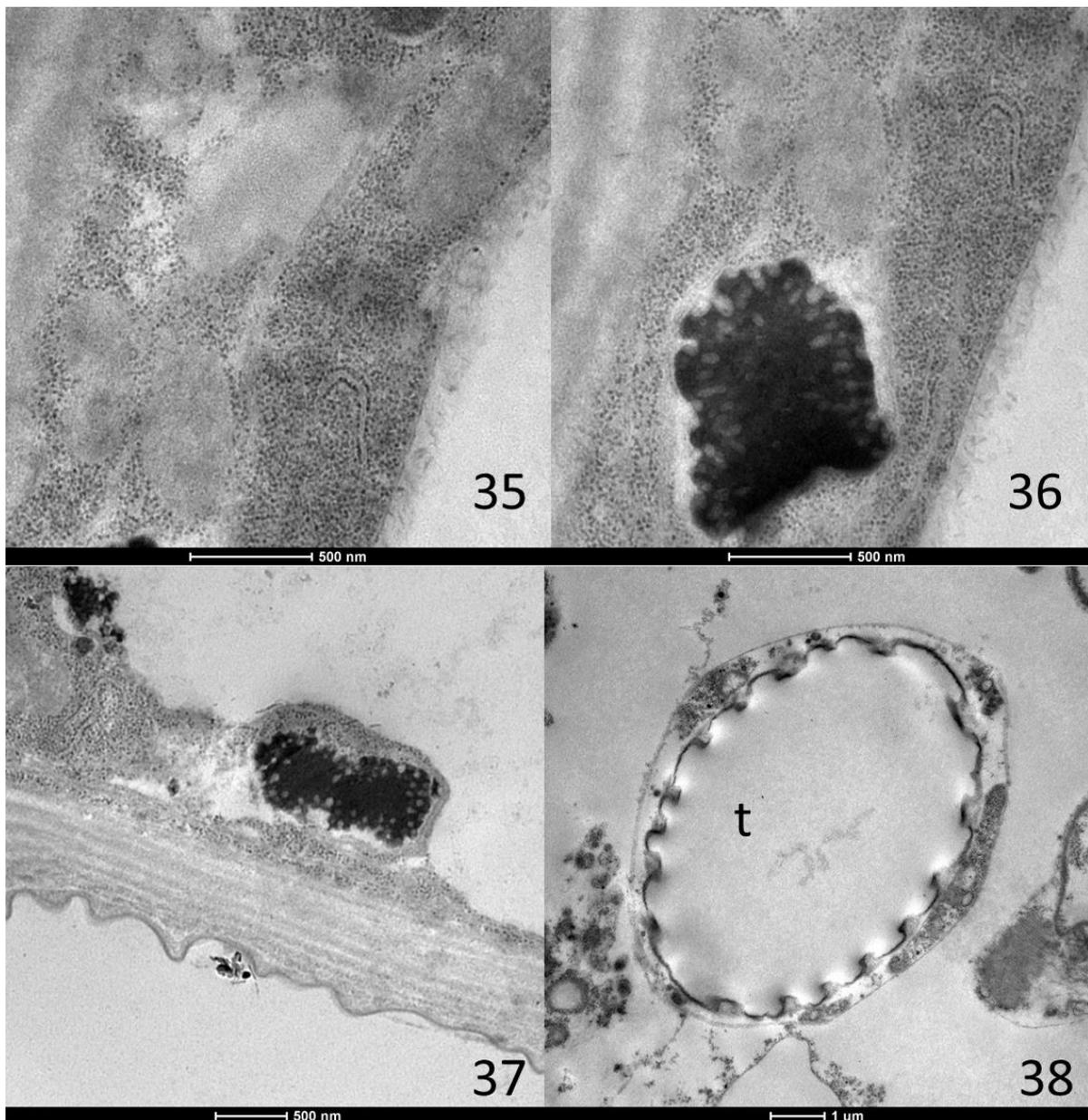
Ultraestrutura da larva (L4) de *Aedes aegypti* tratada com a substância Thymol. Figuras 25 e 26- Núcleo de aspecto alterado. Figura 25 – Vacúolos na região basal; Figura: 26- Células musculares alteradas.



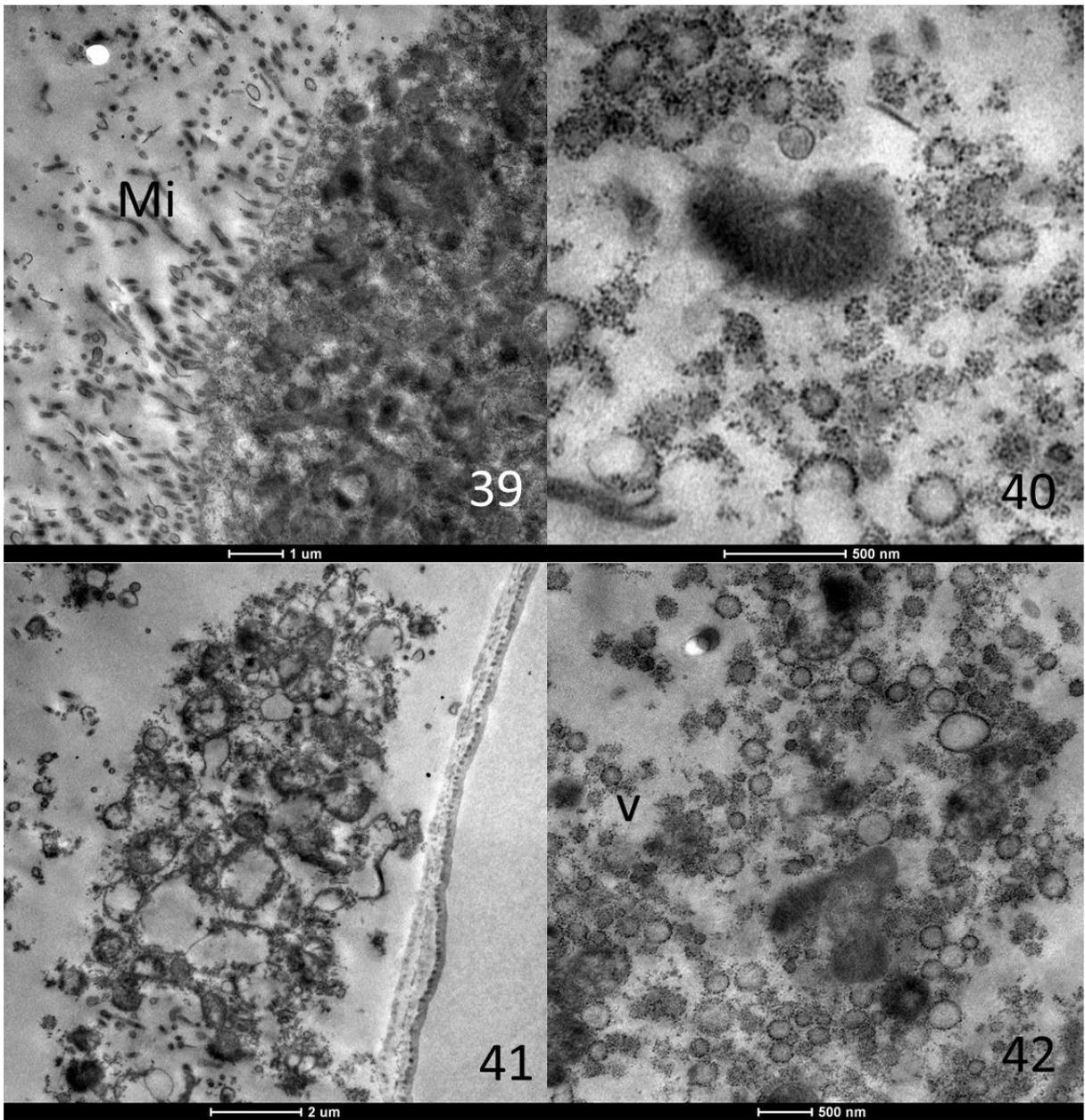
Ultraestrutura da larva (L4) de *Aedes aegypti* tratada com a substância p-cymene. Figura 27- Parede do corpo exibindo a cutícula (c) com deformações (setas); Figura 28 – Inclusões eletrondensas presentes; Figura 29- Mitocôndrias (M) com aspecto alterado e intensa vacuolização (v). Figura 30- Visão geral da larva demonstrando aspecto alterado, onde não se observam os contornos celulares, junções e organelas.



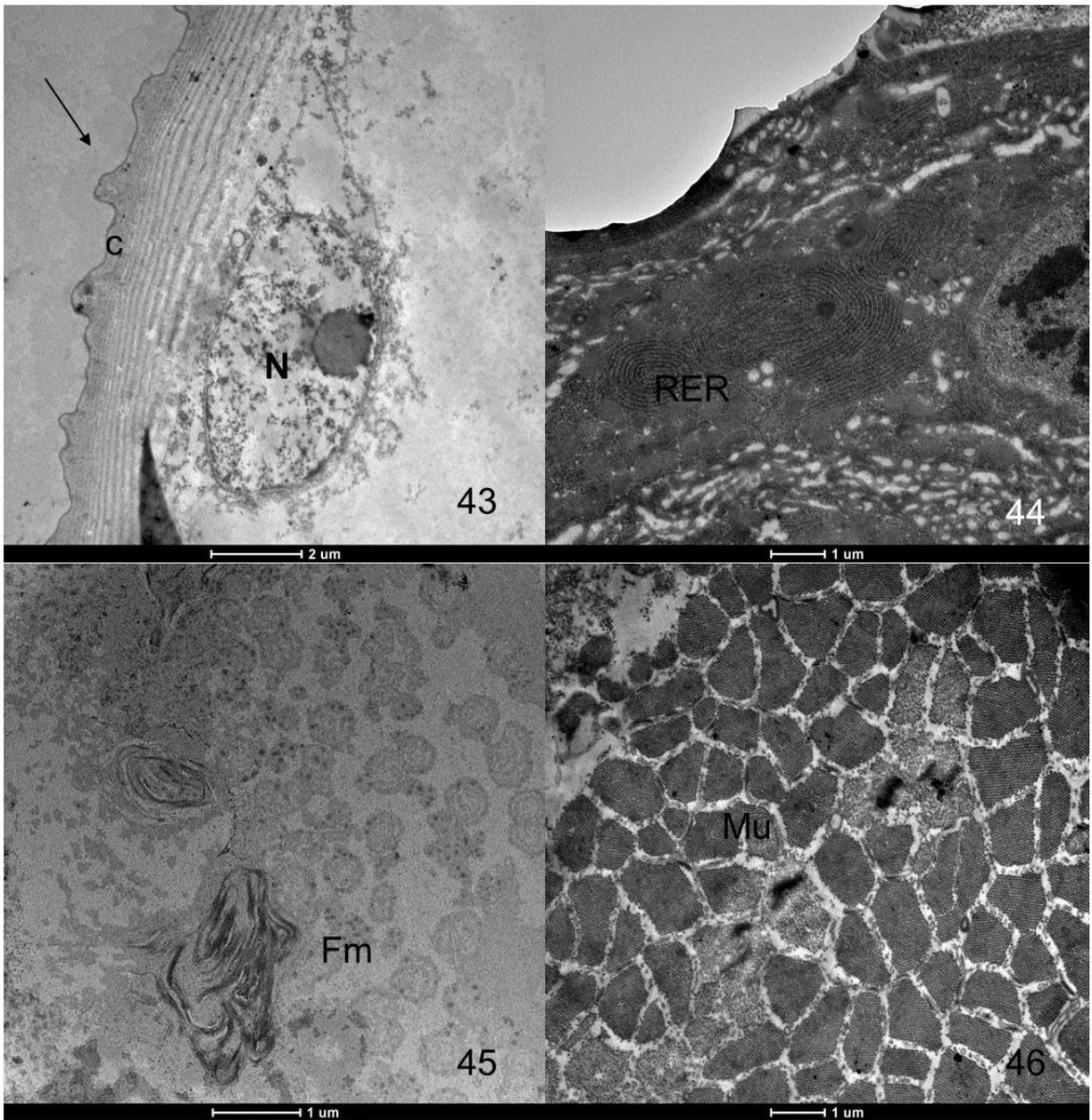
Ultraestrutura da larva (L4) de *Aedes aegypti* tratada com a substância Nerolidol. Figuras 31 e 32- Parede do corpo exibindo a cutícula (c) com deformações (setas); Figura 33 – Inclusões eletrondensas presentes e traquéia de aspecto normal; Figura 34- Visão da larva demonstrando aspecto alterado, onde não se observam os contornos celulares, junções e organelas.



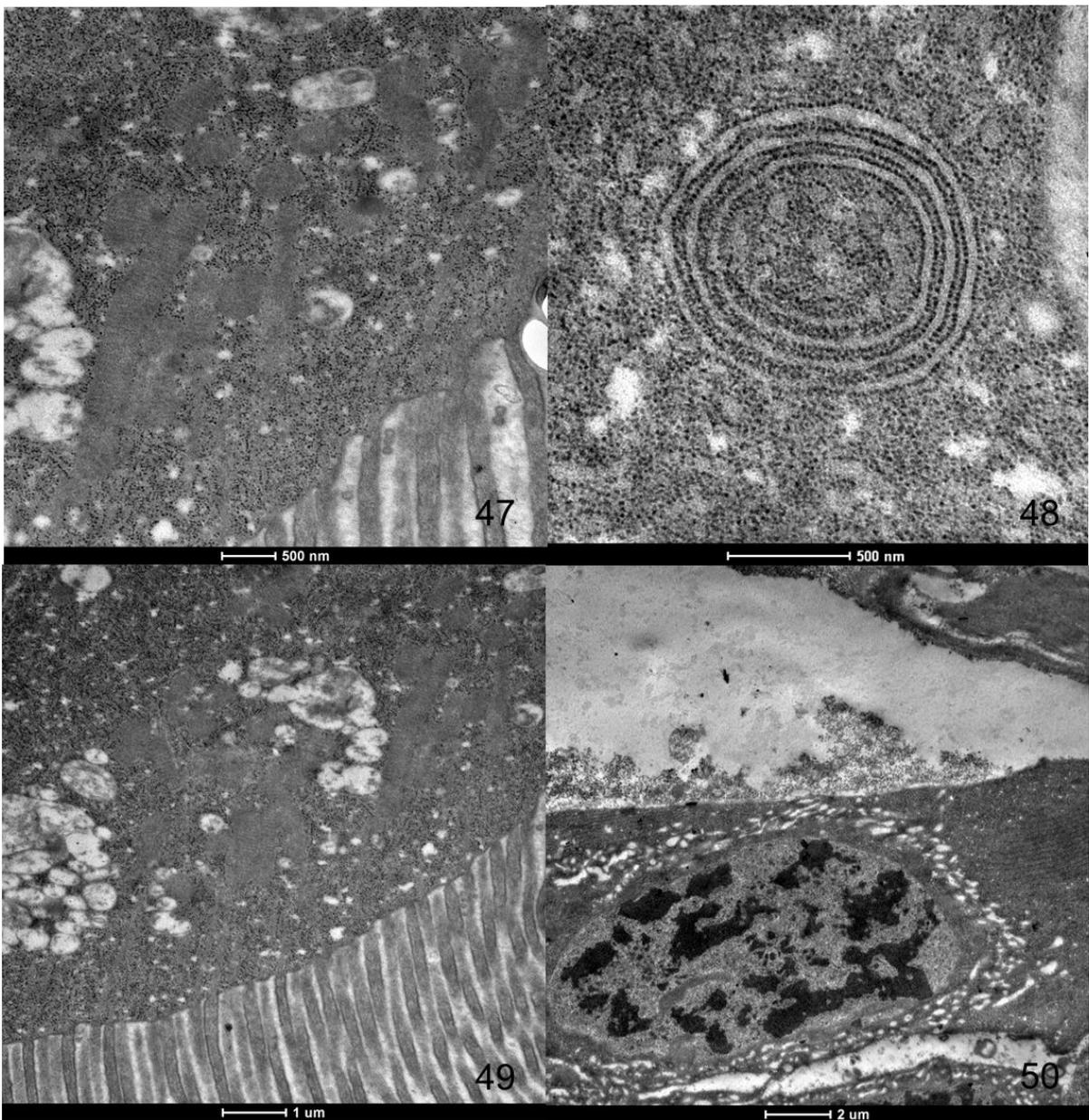
Ultraestrutura da larva (L4) de *Aedes aegypti* tratada com a substância Nerolidol. Figura 35- Aspecto desorganizado do citoplasma; Figuras 36 e 37- Inclusões eletrondensas presentes; 38- Traqueia (t) com aspecto alterado.



Ultraestrutura da larva (L4) de *Aedes aegypti* tratada com a substância Nerolidol. Figura 39- Microvilosidades com aspecto fragmentado; Figuras 40, 41 e 41 - Aspecto alterado do citoplasma mostrando intensa vacuolização (v) e destruição citoplasmática.



Ultraestrutura da larva (L4) de *Aedes aegypti* tratada com a substância Carvacrol. Figura 43- Parede do corpo exibindo a cutícula (c) com deformações (setas); Figura 44 – Retículo endoplasmático rugoso bastante aumentado; Figura 45- Figuras de mielina (Fm). Figura 46- Musculatura com espaços entre as fibras.

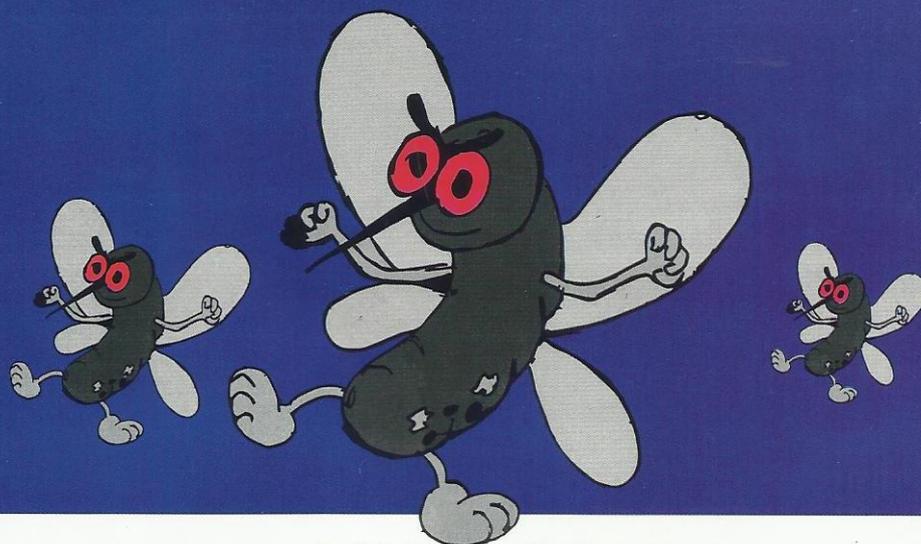


Ultraestrutura da larva (L4) de *Aedes aegypti* tratada com a substância Carvacrol. Figura 47 – Citoplasma denso apresentando muitos ribossomos e granulações; Figura 48- Grande quantidade de ribossomos e Retículo endoplasmático enovelado; Figuras 49 e 50– Intensa vacuolização citoplasmática.

## **CAPÍTULO 2**

### **AÇÕES DE EDUCAÇÃO E SAÚDE NO CONTROLE DE *Aedes aegypti* EM CONSONÂNCIA COM O PLANO BRASIL SEM MISÉRIA**

## **Livro de Atividades**



# LIVRO DE ATIVIDADES

## O MOSQUITO DENGOSO



# LIVRO DE ATIVIDADES

O MOSQUITO  
DENGOSO

© 2015 por Universidade Severino Sombra  
1ª Edição 2015

**Presidente da FUSVE**  
Marco Antônio Vaz Capute

**Reitor da USS:**  
Marco Antônio Soares de Souza

**Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação**  
Gustavo Mendes Gomes

**Pró-reitora de Extensão Universitária e Relações  
Interinstitucionais**  
Consuelo Mendes

**Responsável e Coordenadora do Projeto Educação  
Antidengue: na rota do mosquito**  
Marise Maleck

**Distribuição:**  
Laboratório dos Insetos Vetores/Parasitologia/Entomologia e Malacologia de Parasitos e Vetores/ USS.

**Autores**  
Marise Maleck<sup>1,2,3</sup> / Diego Luiz Souza da Cruz<sup>1</sup> / Bárbara Mendes Pardal<sup>1,2</sup> / Igor Luiz Souza da Cruz<sup>1,2</sup> / Michele Teixeira Serdeiro<sup>1,4</sup> / Simone Pereira Alves<sup>1</sup>

**Colaboradores**  
Nayara Batista de Oliveira<sup>1,2</sup> / Antonio José da Cruz Junior<sup>1,2</sup> / Jacenir Reis dos Santos<sup>4</sup> / Gilliarde de Carvalho Caetano<sup>1,2,5</sup> / Taissa Maleck<sup>6</sup>

Todos os direitos reservados. A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constituiu violação do copyright. (Lei 9.610/98)

**Apoio Financeiro e Científico:**  
FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do RJ)

**Autoria da Canção: O mosquito dengoso:**  
João Luiz da Silva

**Elaboração e Organização**  
Marise Maleck

**Ilustração /Diagramação**  
Diego Luiz Souza da Cruz

**Impressão**  
Gráfica Palmeiras

**Convênio**  
Prefeitura Municipal de Vassouras

**Parceria**  
Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ

1 Laboratório de Insetos Vetores, Entomologia e Malacologia de Parasitos e Vetores, Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ, Brasil. mmaleck@oi.com.br

2 Pró-Reitoria das Ciências da Saúde, Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ.

3 Mestrado Profissional em Ciências Ambientais, Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ.

4 Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ,

5 Secretaria Municipal de Saúde, Vassouras, RJ.

6 www.joiaaporter.com

L76771 Livro de atividades - O mosquito dengoso / Marise Maleck ... [et al.]  
- Vassouras: Universidade Severino Sombra, 2015.  
ii, 10 p. : il. ; 21 cm.

978-85-88187-42-9

ISBN

Livro de atividades.

1. *Aedes aegypti*. 2. Dengue. 3. Educação. 4. Saúde pública -  
Problemas, exercícios, etc. I. Maleck, Marise. II. Universidade Severino  
Sombra. III. Título.

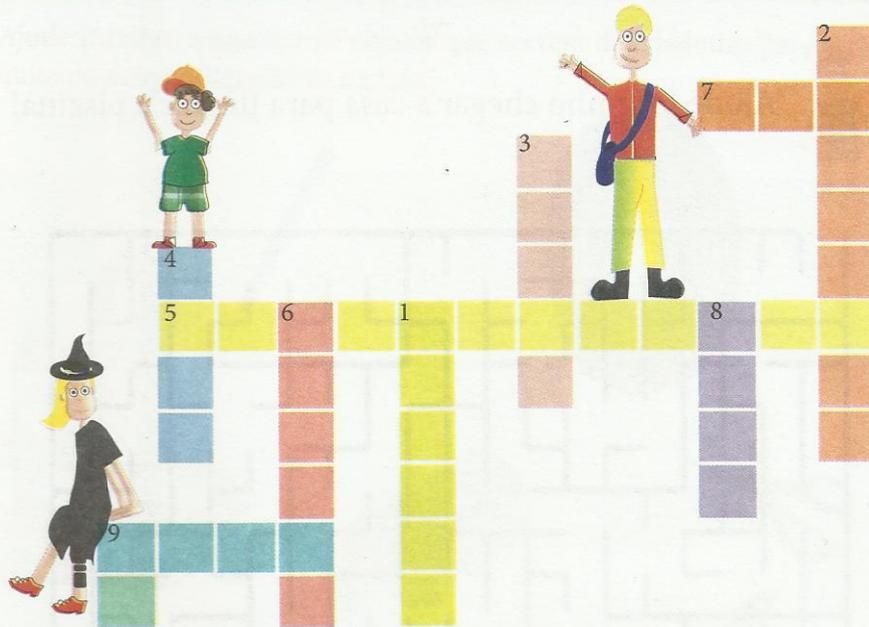
CDD 616.921

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ

### **Agradecimentos**

FUSVE/Universidade Severino Sombra; Cursos de Graduação em Ciências Biológicas, Medicina e Biomedicina/USS; Curso de Mestrado Profissional em Ciências Ambientais/USS; Secretaria de Saúde do Município de Vassouras; Prefeitura Municipal de Vassouras; Gráfica Palmeiras; Assessoria de Marketing/USS; Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação /USS; Pró Reitoria de Extensão Universitária e de Relações Interinstitucionais/USS; Laboratório de Transmissores de Leishmanioses/IOC/FIOCRUZ; Taíssa Maleck; Prof. Simão Pedro dos Santos; e a FAPERJ pelo apoio financeiro e científico.

# PALAVRAS CRUZADAS

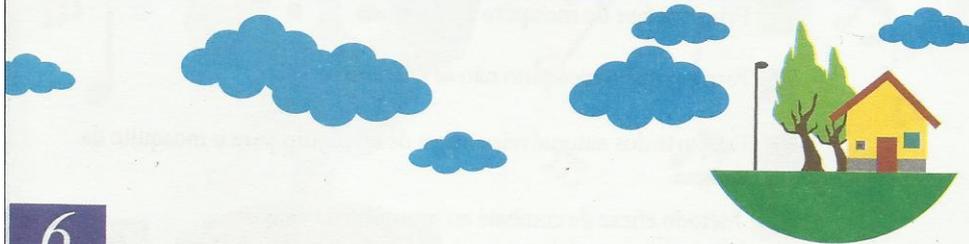
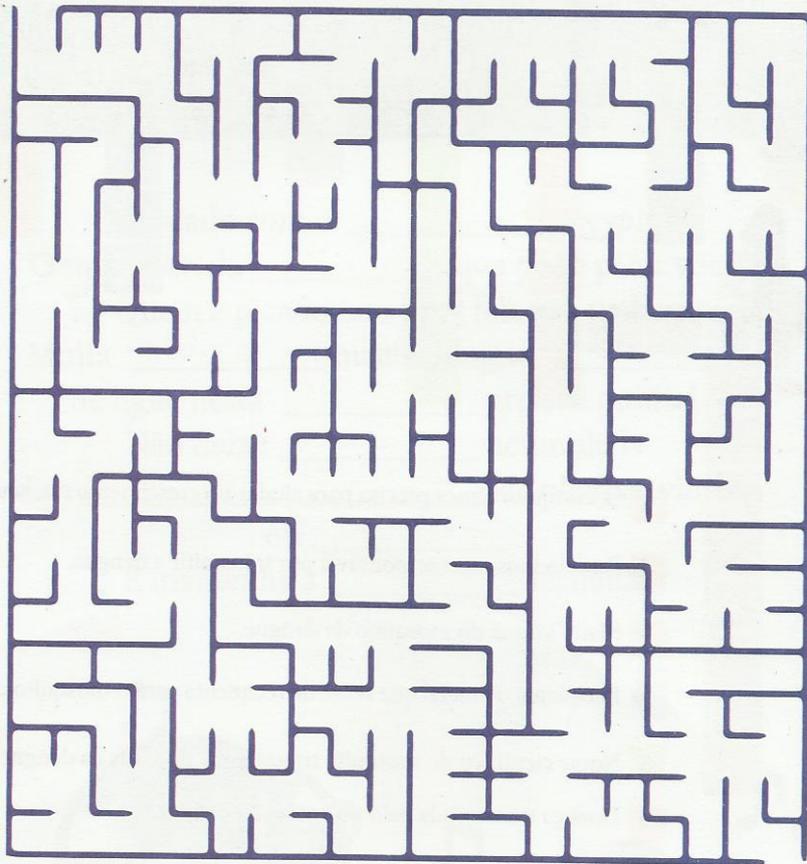


- 1 O mosquito fêmea precisa para ajudar no crescimento dos seus ovos.
- 2 Fase do mosquito responsável por transmitir a dengue.
- 3 Maior vítima do mosquito da dengue.
- 4 Recipiente de metal que serve de recipiente para o mosquito da dengue.
- 5 Nome científico do mosquito transmissor do vírus da dengue.
- 6 Doença transmitida pelo mosquito da dengue.
- 7 Primeira fase do mosquito da dengue.
- 8 Fase em que o mosquito não se alimenta.
- 9 Faz parte dos automóveis e serve de criadouro para o mosquito da dengue.
- 9 Método eficaz de combate ao mosquito da dengue.

# LABIRINTO



Ajude Joãzinho chegar a casa para limpar a piscina!



6

# PARA COLORIR



10

# CAIXA DE PANDORA

Ajude Pandora a guardar os objetos que servem de criadouro para o mosquito da dengue, ligando-os à caixa:



11

# COMPLETE A MÚSICA

Olá amiguinhos! Agora que já brincamos, preciso da sua ajuda para completar a letra da nossa musiquinha. Que tal procurar na caixa maluca as palavras que mais bem se encaixam? Depois é hora de soltar a voz!!!

LATAS - DENGUE - PREVENÇÃO - ÁGUA - AEDES - PNEUS -  
HEMORRÁGICA - CAIXA D'ÁGUA - VASOS - DOR DE CABEÇA

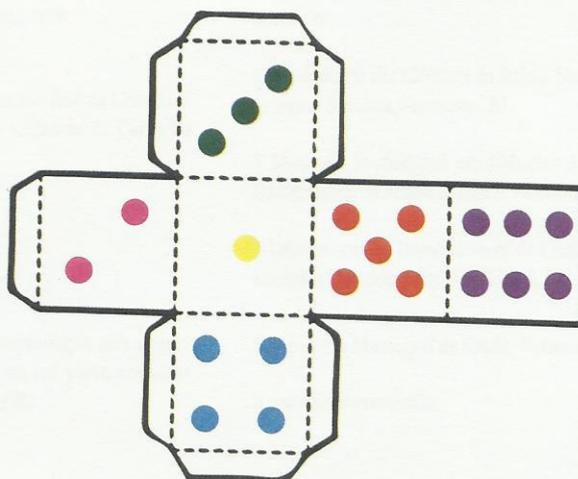
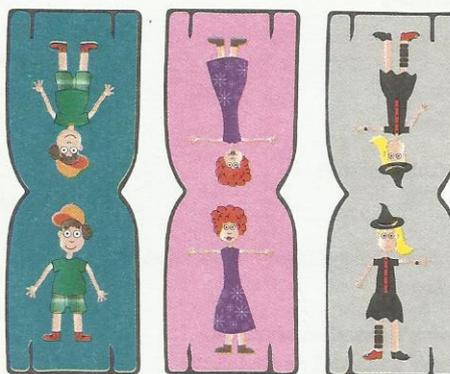
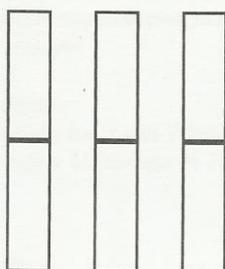
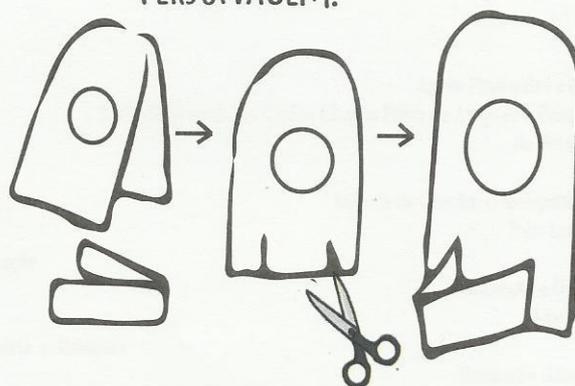
Cuidado com o \_\_\_\_\_ *aegypti*  
O mosquito da \_\_\_\_\_ que pode picar você  
Quem é picado tem uma febre danada  
Muita \_\_\_\_\_ ou até dengue \_\_\_\_\_  
Se ligue nesta \_\_\_\_\_ pro seu quintal  
Não deixe \_\_\_\_\_ acumulada  
Em \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de plantas, vidros  
ou \_\_\_\_\_  
E mantenha a \_\_\_\_\_ fechada!



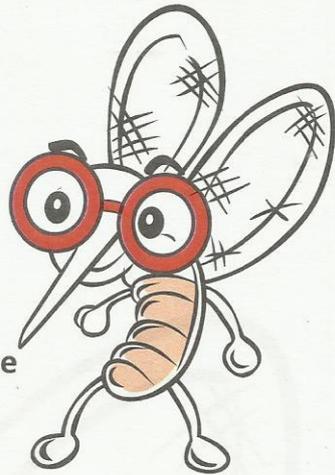
12

Peça a algum adulto para cortar as peças do seu jogo de tabuleiro!

### COMO MONTAR SEU PERSONAGEM!



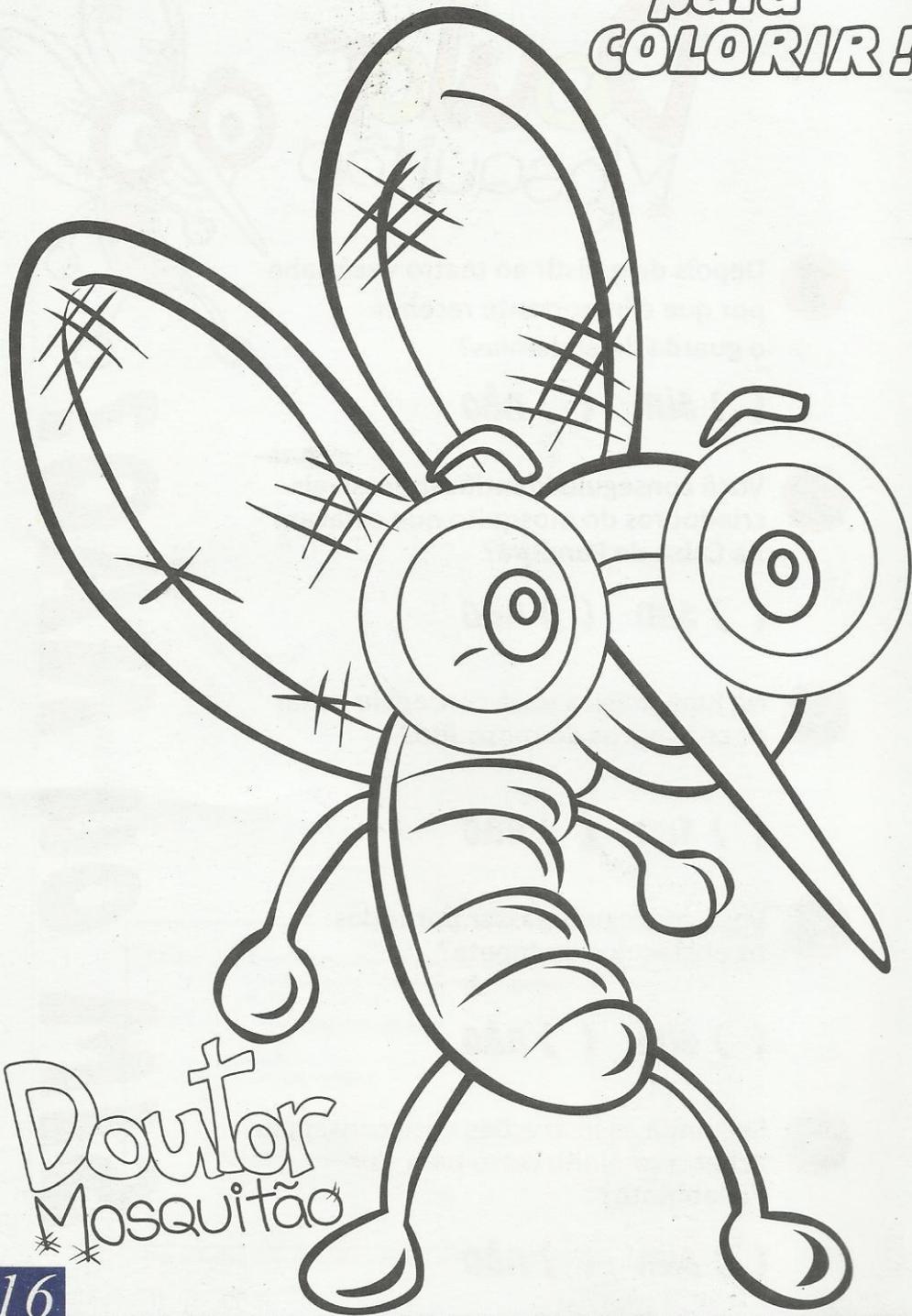
# Doutor Mosquitão



- 1** Depois de assistir ao teatro você sabe por que é importante receber o guarda de endemias?  
( ) *sim* ( ) *não*
- 2** Você conseguiu identificar possíveis criadouros do mosquito que estavam na Caixa de Pandora?  
( ) *sim* ( ) *não*
- 3** Na lupa mágica você conseguiu achar os criadouros do mosquito?  
( ) *sim* ( ) *não*
- 4** Você conseguiu passar por todos os obstáculos do tapete?  
( ) *sim* ( ) *não*
- 5** Seguindo as instruções você conseguiu achar o caminho certo para sair do labirinto?  
( ) *sim* ( ) *não*

**SIM OU NÃO?**

para  
COLORIR!



Doutor  
Mosquitão

16

© 2015 por Universidade Severino Sombra  
1ª Edição 2015

#### **Referências Bibliográficas**

MALECK, Marise; ALVES, Simone Pereira; CRUZ, Igor de Souza; PARDAL, Bárbara Mendes; PINHEIRO, Renata Fraga. O mosquito Dengoso. Vassouras, RJ: Universidade Severino Sombra, 2012.

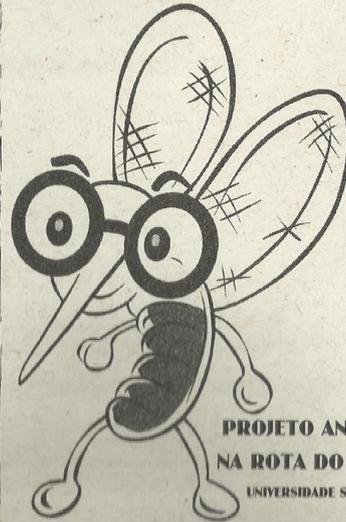
POUZADOUX, Claude; MANSOT, Frédérick; BRANDÃO, Eduardo. Contos e lendas da mitologia grega. São Paulo: Companhia das Letras, 2001.



ISBN978-85-88187-42-9

**Cordel do Dr Mosquitão**

# CORDEL DO Dr. Mosquitão



PROJETO ANTIDENGUE:  
NA ROTA DO MOSQUITO  
UNIVERSIDADE SEVERINO SOMBRA

APOIO:



JOIA-À-PORTER



# CORDEL DO Dr. Mosquitão

## ORGANIZAÇÃO E AUTORIA:

Marise Maleck, Simone Pereira Alves,  
Michele Teixeira Serdeiro, Angelo Ferreira Monteiro,  
Jussara Pereira de Almeida e  
Maria Fernanda Garavana de Castro Moraes Ricci.

## CIRANDA DE AUTORES

Vitória - Rita Atiléi - Fernanda - Geovana  
Ana Beatriz - Pedro Augusto - Giovanna - Kauã  
Bárbara Vittória - Marina - Maria Eduarda  
João Vitor - Christian - Flávia - Clara - Olívia

1ª Edição

PROJETO ANTIDENGUE:  
NA ROTA DO MOSQUITO

UNIVERSIDADE SEVERINO SOMBRA

Vassouras 2016

© Universidade Severino Sombra  
Todos os direitos reservados. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte e que não seja para venda ou qualquer fim comercial. Os textos são de inteira responsabilidade dos autores.

**Presidente da Fuvse**  
Eng. Marco Antonio Vas Capute

**Reitor**  
Prof. Dr. Marco Antonio Soares de Souza

**Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação**  
Prof. Dr. Carlos Eduardo Cardoso

**Revisão**  
Adiel Quatroz Rioto

**Capa, Projeto Gráfico e Diagramação**  
Talissa Maleck Rezende

**Organização e autoria**  
Marise Maleck  
Simone Pereira Alves  
Michelle Tezimbra Serdiero  
Angelo Ferreira Monteiro  
Jussara Pereira de Almeida  
Maria Fernanda de Castro Moraes Rioto

**Impressão**  
Grédina Palmestros

**Participantes:**  
Centro Educacional Tia Conceição/CETIC - Colégio Peter Pan, Vassouras, RJ.  
Colégio Sul Fluminense de Aplicação/CAP, Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ.

**Parceria:**  
Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ

**Realização e Elaboração**  
Laboratório de Insetos Vetores, Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ e Academia de Letras de Vassouras, Vassouras, RJ.

**Apoio Científico e Financeiro**  
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ.

Editora USS  
Tel: (24) 2471 8591  
Editora.uss.br

M2935c Maleck, Marise  
O cordel do Dr Mosquito / Marise Maleck. - Vassouras : Editora USS, 2016.  
25 p. ; 15 cm.

ISBN 978-85-88187-45-0

1. *Aedes aegypti*. 2. Dengue. 3. Mosquito - Controle. 4. Literatura de cordel brasileira. I. Universidade Severino Sombra. II. Título.

CDD 616.921

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Severino Sombra, Vassouras - RJ

**Àqueles que abraçaram este projeto  
com muita poesia e ideias contagiantes.**

#### DICA DE LEITURA:

**Leia a primeira estrofe de cada autor e, depois, a segunda estrofe, e veja que leitura fantástica! As demais estrofes poderão ser lidas de forma aleatória e... Invente a sua leitura de cordel!**

#### COMBATER É PRECISO

**Pra início de conversa  
Quero hoje vos falar  
A Dengue é uma doença  
Que está a assustar.**

**O mosquito é o culpado  
Por essa doença propagar  
Vai crescendo pra todo lado  
Assim ninguém vai se safar.**

**Combater é preciso  
Todos tem que ajudar  
Pra não ficar no prejuízo  
Não deixar a água acumular.**

Olivia Almeida Brito Teixeira

### **A DENGUE EM CORDEL**

O *Aedes aegypti* é um mosquito do mal  
Pois nos transmite uma doença viral  
Essa doença chama-se Dengue  
Tome muito cuidado, porque ela pode ser fatal.

Se a Dengue clássica você pegar  
Febre, vômito, dor no corpo, nas juntas sentirá  
Enjoo, manchas na pele também pode causar  
Mas se a Dengue for hemorrágica, ela pode matar.

Para a Dengue não proliferar  
Alguns cuidados deve-se tomar  
A principal medida  
É não deixar água acumular.

Para evitar essa doença  
Não há outra solução  
É cada um fazer a sua parte  
Exercer a prevenção.

Ana Beatriz Ferreira da Silva

### **PEQUENO DESTRUIDOR**

Não acumular água  
É o principal objetivo  
Sem causar descuido  
Para não deixar esse pequeno inseto vivo.

Não devemos deixar  
Que esse pequeno inseto cresça  
Para que não traga dores  
Com vômito e dor de cabeça.

Para todos que ele pica  
Ele chega trazendo dor  
Fazendo pedir socorro  
Sendo um pequeno destruidor.

Flávia da S. Moreira Amalti

### **O INCONVENIENTE**

Uma praga bem famosa  
Tomou conta da cidade  
Para ser contaminado  
Não importa a idade.

Ele é um mosquitinho  
Voa baixo e mansinho  
Tem uma cara de inocente  
Mas prejudica muita gente.

Proteja seus quintais  
Seja sempre consciente  
Não deixe água parada  
E passe sempre repelente.

Maria Eduarda da Silva Serafim

### **DR. MOSQUITÃO**

A Dengue mata!  
Tenha isso em sua mente  
Não deixe água parada  
Não seja inconsciente.

Os nossos hábitos  
É o que temos que mudar  
Faça sua parte  
Para o mosquito não voltar!

Se meu bairro faz sua parte  
E a cidade toda começa  
O país agradece  
Você cumpriu sua meta!

João Vitor Rosa Rebelo

### **DR. MOSQUITÃO**

O mosquito da dengue  
É um inseto bem perigoso  
Quando pica deixa doente  
Crianças, adultos e idosos.

Tenha cuidado com ele  
Avisa quem é amigo  
Se aí tem água parada  
Você está correndo perigo.

Ele é bem pequenininho  
Mas duro de matar  
Devemos todos nos unir  
E esta doença eliminar.

Bárbara Vitória Meirelles Lopes

### **DENGUE**

Que mosquito maldoso  
Que gosta de picar  
Vamos vencer a dengue  
E o mosquito eliminar.

Esse mosquito é malvado  
Só vive fazendo mal  
Não queira ele por perto  
Limpe bem o seu quintal.

Mosquito que a gente  
Não gosta e nem entende  
Que deixa a gente doente  
Picando muita gente.

Kauã Soares Braga

### **MOSQUITÃO**

Fique de olho no mosquitão  
Com a Dengue não se brinca  
Não podemos dar mole, não  
Com doença não se fica.

Retire a água das latinhas  
O quintal tem que estar limpinho  
Coloquemos terra nos pratinhos  
Pra vencer o mosquitinho.

Vamos todos colaborar  
Ninguém pode desistir  
Da saúde temos que cuidar  
Pra Dengue não existir.

Giovanna dos Santos de Oliveira

### **DR. MOSQUITÃO**

Muito cuidado com o Dr. Mosquitão  
Pode picar seu pé e também sua mão  
Fique ligado com o Dr. Mosquitão  
Ele pode te atacar  
É a Dengue, meu irmão!

É muito mau, o Dr. Mosquitão  
Pega o pai, a mãe, a vovó e o irmão  
É o terror, o Dr. Mosquitão  
Manda uns pro hospital, e outros pro caixão.

O que posso fazer com o Dr. Mosquitão?  
Tire água parada da garrafa, do vaso e do latão  
E para que não volte o Dr. Mosquitão  
Se for preciso, use a fumaça do caminhão.

Pedro Augusto Pereira de Aquino

### DENGUE NUNCA MAIS

O Mosquito é terrível  
Não desiste fácil, não  
Vamos acabar com ele  
Juntos, como uma nação.

Vamos todos para a rua  
Avisar a população  
Que a Dengue está chegando  
Vamos começar a prevenção.

O Mosquito vai fugir  
Pra longe ele vai  
Nunca mais vai voltar  
Para o povo assustar.

Vitória da Silva Compertino Carnavale

### DENGUE EVITAR

Uma campanha vai começar  
Pra Dengue eliminar  
E a população salvar  
Venha nos ajudar!

A fêmea do *Aedes* quer te pegar  
O seu sangue sugar  
Para seus ovinhos maturar  
É melhor se preparar.

Água parada? Nem pensar!  
Criatórios de larvas? Agora exterminar!  
Terreno baldio? A vigilância avisar!  
Tudo isso, para a Dengue evitar.

Rita Natiele de Oliveira

### PREVENIR A DENGUE

A Dengue é perigosa  
E precisamos prevenir  
Está cada vez mais difícil  
A população tem que agir!

A picada do mosquito  
Pode até ser fatal  
Temos que tomar cuidado  
Ou pararemos no hospital.

Prevenindo essa doença  
Nós podemos ajudar  
Milhares de pessoas  
Juntas para lutar.

Geovana Paiva Amarante

### O MOSQUITO DO MAU

O mosquito é tinoso  
A todos quer infectar  
Esse bicho é malvado  
Só vive fazendo o mal.

Esse é um tipo de guerra  
Todos devem ajudar  
Eliminando poças d'água  
E assim ele morrerá.

Ele é muito atrevido  
E chega à escondida  
Limpe bem sua casa  
E salve sua vida.

Fernanda Leal Lopes Marcondes

### CUIDADO VS MOSQUITO DA DENGUE

O mosquito Dengue  
Não tem muito o que fazer  
Se não tomar cuidado  
Ele vai picar você!

Se ficar o bicho pega  
Se correr o bicho come  
Pois o mosquito só tem um vilão  
Que é o homem!

Não tem nenhum remédio  
Só tem uma solução  
Se a gente não tomar cuidado  
Eles vencerão!

Cristian Silva Nunes

### DENGUE O MOSQUITÃO

É este tal de *Aedes*  
Que é pequeno e fortão  
Que está trazendo a Dengue  
E vem matando de montão.

Ele ama uma sujeira  
E se cria no lixo  
Adora água parada  
E também um calorão.

Se o homem não abrir o olho  
E fizer um mutirão  
A doença alastrará  
Sem matar o mosquitão.

Marina Nogueira Leal

### QUE MOSQUITO É ESSE?

É um bicho terrível  
Ele pega muita gente  
Não importa quem seja  
Ele nunca está contente.

Com ele não tem conversa  
Deixa o povo doente  
Ele pica bem depressa  
Tira o sossego da gente.

O estrago dele é grande  
É melhor se proteger  
Ou você se orienta  
Ou ele pode pegar você.

Clara Furtado Granadeiro

### AGRADECIMENTOS

À Universidade Severino Sombra. À equipe da Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Severino Sombra. À equipe do Laboratório de Insetos Vetores da Universidade Severino Sombra. Aos membros da Academia de Letras de Vassouras/ALV. Ao professor Simão Pedro dos Santos. Ao Colégio Sul Fluminense de Aplicação (CAp) e Centro Educacional Tia Conceição (CETIG) - Colégio Peter Pan. Aos estudantes e professores que participaram deste edital. À FAPERJ pelo apoio financeiro e científico. À designer Taissa Maleck Rezende pela ilustração e diagramação. À Gráfica Palmeiras pela impressão. À Editora da Universidade Severino Sombra. Ao professor Adiel Queiroz Ricci pela revisão do texto.

Artigo publicado

**EDUCAÇÃO ANTIDENGUE: UM RELATO DE EXPERIÊNCIA**



Extensio  
UFSC

Revista Eletrônica  
de Extensão

## EDUCAÇÃO ANTIDENGUE: UM RELATO DE EXPERIÊNCIA

**Marise Maleck**

Universidade Severino Sombra  
marise.maleck@gmail.com

**Igor Luiz Souza da Cruz**

Universidade Severino Sombra  
igorlscruz@gmail.com

**Michele Teixeira Serdeiro**

Universidade Severino Sombra  
mserdeiro@gmail.com

**Bárbara Mendes Pardal**

Universidade Severino Sombra  
barbara.m.pardal@gmail.com

**Renata Fraga Pinheiro**

Universidade Severino Sombra  
rfrpinheiro@ufrj.br

**Simone Pereira Alves**

Universidade Severino Sombra  
enomisalves@hotmail.com

### Resumo

*Aedes aegypti* (L., 1762) é o principal vetor reconhecido como transmissor do vírus da dengue. Este vetor, uma vez adaptado aos hábitos humanos, não encontra dificuldades para se reproduzir em ambientes domésticos que disponham de recipientes acumuladores de água, encontrados facilmente nas ruas e nos lixos das cidades. As instituições de ensino têm papel fundamental na formação de jovens como cidadãos disseminadores de práticas a favor da promoção da saúde. Com a finalidade de promover a educação para o controle do mosquito vetor do vírus dengue, este trabalho foi desenvolvido através de atividades lúdicas e didáticas nas escolas públicas e particulares do Centro-Sul Fluminense, cidades, centros culturais e espaços públicos do Estado do Rio de Janeiro. Os resultados apontaram respostas positivas acima de 80% sobre o tema *Aedes*-dengue-controle. O projeto atendeu a 2500 participantes. O Projeto Educação Antidengue demonstrou que a educação é uma ferramenta eficaz no tripé educação-saúde-meio ambiente.

**Palavras chave:** *Aedes Aegypti*. Educação e Saúde. Dengue. Educação e Ambiente.

### ANTI DENGUE EDUCATION: A EXPERIENCE REPORT

#### Abstract

*Aedes aegypti* (L., 1762) is the main vector recognized as a dengue virus transmitter. This vector, once adapted to human habits, finds it easy to reproduce in homes that have open water containers, easily found in city streets and garbage dumps. Educational institutions play a fundamental role in the formation of young people as disseminator citizens in favor of health improvement practices. In order to promote education for the control of the dengue virus mosquito vector, this work was developed through recreational and educational activities in Central-South Rio de Janeiro state public and private schools, cities, cultural centers and public spaces. The results showed positive responses above 80% of the *Aedes*-dengue-control issue. The project had 2500 participants. The Antidengue Education Project demonstrated that education is an effective tool regarding education, health and the environment.

**Keywords:** *Aedes Aegypti*. Education and Health. Dengue. Education and Environment.

### EDUCACIÓN ANTIDENGUE: UN RELATO DE EXPERIENCIA

#### Resumen

*Aedes aegypti* (L., 1762) es el principal vector reconocido como transmisor del virus del dengue. Este vector, una vez adaptado a los hábitos humanos, no encuentra dificultades para reproducirse en ambientes domésticos que dispongan de recipientes acumuladores de agua, encontrados fácilmente en las calles y basureros de las ciudades. Instituciones educacionales tienen el papel fundamental en la formación de jóvenes como ciudadanos disseminadores de prácticas a favor de la promoción de la salud. Con la finalidad de promover la educación para el control del mosquito vector del virus del dengue, se llevó a cabo este trabajo mediante actividades lúdicas y didáticas en escuelas públicas y particulares del Centro-Sur Fluminense, ciudades, centros culturales y espacios públicos del Estado de Río de Janeiro. Los resultados revelaron respuestas positivas por encima de 80% acerca del tema *Aedes*-dengue-controle. El Proyecto Educación Antidengue demostró que la educación constituye una herramienta eficaz en la triada educación-salud-medio ambiente.

**Palabras clave:** *Aedes Aegypti*. Educación y Salud. Dengue. Educación y Ambiente.



Esta obra está licenciada sob uma [Licença Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Extensio: R. Eletr. de Extensão, ISSN 1807-0221 Florianópolis, v. 14, n. 26, p. 74-83, 2017.

## INTRODUÇÃO

A dengue é objeto da maior campanha de saúde pública do Brasil que se concentra no controle do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), único vetor reconhecido como transmissor do vírus da dengue em nosso país. Este mosquito, uma vez adaptado aos hábitos humanos, não encontra dificuldades para se reproduzir em ambientes domésticos que disponham de recipientes que acumulem água, encontrados facilmente nas ruas e nos lixos das cidades (TAUIL, 2001). Para que o controle da dengue seja efetivo, discussões recentes apontam para a necessidade de maiores investimentos em metodologias adequadas, a fim de sensibilizar a população sobre a necessidade de mudanças de comportamento que objetivem o controle do vetor; e no manejo ambiental, incluindo a ampliação do foco das ações de controle racional de vetores, para minimizar a utilização de inseticidas e, dessa forma, garantir maior sustentabilidade às ações (BRAGA e VALLE, 2007). Um dos pontos chave do controle de vetores é o papel das comunidades na eliminação dos criadouros, tarefa difícil de obter êxito, devido à quantidade e aos diferentes tipos de criadouros (BRASSOLATI e ANDRADE, 2002; FRANÇA *et al.*, 2002).

Diante desta premissa, a comunicação, a educação e mobilização social são ações fundamentais para o bom desempenho dos programas de prevenção e promoção da saúde, principalmente pela sua capacidade de abrir espaços de diálogo e conversação entre profissionais, agentes de saúde e população, na busca de solução para os problemas que os afetam. É muito importante relativizar o poder dessas práticas em produzir ou induzir mudanças de comportamentos e atitudes, especialmente em contextos tão adversos à proteção e promoção da saúde (RANGEL, 2008).

Essas ferramentas são capazes de transformar e induzir novos comportamentos, e demonstram serem mais eficazes quando em crianças e adolescentes. Neste contexto, as instituições de ensino têm papel fundamental na formação de jovens como cidadãos disseminadores de práticas a favor da promoção em saúde tornando-os agentes sociais importantes em suas comunidades. Esta proposta corrobora com projetos interdisciplinares, como a citação de FREIRE (1996) “tanto educadores quanto educandos envolvidos numa pesquisa, não serão mais os mesmos. Os resultados devem implicar em mais qualidade de vida, devem ser indicativos de mais cidadania, de mais participação nas decisões da vida cotidiana e da vida social”.

Pela sua representatividade, a escola é um espaço privilegiado para a base do envolvimento da população no controle de vetores de doenças endêmicas e parasitárias (REGIS *et al.*, 1995) e precisam ser abordadas de maneira consistente, criativa, e adequada às realidades

## Educação antidengue: um relato de experiência

locais (LENZI e COURA, 2004). Essa abordagem pode ser realizada através das atividades lúdicas associadas a ações educativas, já que o lúdico possui características tais como: estímulo da imaginação, construção da personalidade, exploração e manipulação de objetos que não fazem parte do cotidiano da criança, e também proporciona o contato com outras pessoas (KISHIMOTO, 1994). A escola normalmente envolve membros da maioria das famílias do bairro, e a dengue e o controle do mosquito são temas excelentes para diferentes tipos de abordagem; pela sua incorporação ao conteúdo programático e sua reprodução nos anos subsequentes; pela oportunidade de aproximação de um problema existente na comunidade e, principalmente, por necessitar de mudanças de atitudes. York (1993) indica que, de fato, a mudança de hábitos é muito mais fácil de ser conseguida entre as crianças do que nos adultos, uma vez que as mesmas são muito mais estimuladas pela própria curiosidade.

O projeto educação antidengue teve como objetivo mobilizar e sensibilizar a comunidade escolar e a população em geral no estado do Rio de Janeiro, quanto à importância de um estado de vigilância para *Ae. aegypti*, com a proposta de divulgar o conhecimento científico, através de atividades lúdicas e ações educativas, de modo a buscar parceiros no processo de prevenção da dengue.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Local de estudo

A execução do projeto constou de visitas a nove escolas no município de Vassouras, RJ, sendo quatro estaduais, três municipais, um centro integrado de educação pública e uma escola particular, perfazendo um total de 712 alunos participantes. Os eventos de extensão foram realizados em locais públicos, nos municípios fluminenses de Miguel Pereira, Três Rios; Maricá; em Centros Culturais; locais públicos no município de Vassouras; e no campus Universitário da Universidade Severino Sombra/USS, no município de Vassouras.

### Ações educativas

As atividades foram realizadas pela equipe do Laboratório de Insetos Vetores da Universidade Severino Sombra/USS, composta de estudantes de doutorado/FIOCRUZ, mestrado/USS, iniciação científica (PIBIC-USS; PIBIC-FAPERJ; PIBIC-CNPq), jovens

## Educação antidengue: um relato de experiência

**LABORATÓRIO de INSETOS VETORES** 1º SEGMENTO

Nome da Escola ou Comunidade: \_\_\_\_\_  
Série: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_  
Município: \_\_\_\_\_  
Nome: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

1. Depois de assistir ao teatro você sabe por que é importante receber o guarda de endemias?  
( ) sim ( ) não

2. Você conseguiu identificar possíveis criadouros do mosquito que estavam na Caixa de Pandora?  
( ) sim ( ) não

3. Na lupa mágica você conseguiu achar os criadouros do mosquito?  
( ) sim ( ) não

4. Você conseguiu passar por todos os obstáculos do tapete?  
( ) sim ( ) não

5. Seguindo as instruções você conseguiu achar o caminho certo para sair do labirinto?  
( ) sim ( ) não

**SIM ou NÃO? Doutor Mosquitão!**

Apoio e financiamento: FAPERJ, Prefeitura Municipal de Vassouras, Prefeitura Municipal de Três Rios. Realização, convênio e parceiros: Prefeitura Municipal de Vassouras, Prefeitura Municipal de Três Rios.

**LABORATÓRIO de INSETOS VETORES** 2º SEGMENTO

Nome da Escola ou Comunidade: \_\_\_\_\_  
Série: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_  
Município: \_\_\_\_\_  
Nome: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

1. Você sabe o nome científico do mosquito que transmite o vírus da dengue?  
( ) sim ( ) não

2. Você conhece o ciclo de vida do mosquito vetor do vírus da dengue?  
( ) sim ( ) não

3. Você sabe por que só a fêmea do mosquito pica o homem?  
( ) sim ( ) não

4. Você sabe de que se alimenta o mosquito macho?  
( ) sim ( ) não

5. Você sabe qual o melhor jeito de se prevenir da dengue?  
( ) sim ( ) não

**SIM ou NÃO? Doutor Mosquitão!**

Apoio e financiamento: FAPERJ, Prefeitura Municipal de Vassouras, Prefeitura Municipal de Três Rios. Realização, convênio e parceiros: Prefeitura Municipal de Vassouras, Prefeitura Municipal de Três Rios.

Figura 1: Formulário utilizado para avaliação do aprendizado: “Sim ou Não? Dr. Mosquitão!”

Este estudo, licença 001/2010/CEP-USS, de pesquisa e extensão, está diretamente ligado ao incentivo e popularização da ciência, e na formação de estudantes, como agentes e promotores efetivos de ações, no âmbito educação-ambiente-saúde.

Os resultados dos formulários de avaliação “Sim ou Não? Dr. Mosquitão!” foram mensurados por somatório e percentual.

## RESULTADOS E ANÁLISES

A proposta de “educar com diversão” forneceu subsídios importantes para o conhecimento sobre o mosquito vetor da dengue, e induziu mudanças de comportamento no que tange o ambiente e saúde.

As atividades contaram com 2500 pessoas no total, sendo estes estudantes, professores e o público em geral dos municípios de Vassouras, Três Rios, Maricá e Miguel Pereira (Tabela 1).

## Educação antidengue: um relato de experiência

**Tabela 1:** Resultado das ações educativas, locais da realização e número de participantes.

Atividades	Número de atividades	Local das atividades	Número de participantes
Escolas	8	Vassouras	694
	1	Vassouras	18
Subtotal			712
Eventos	4	Vassouras	409
	4	Vassouras	725
	3	Vassouras	366
	1	Três Rios	108
	1	Maricá	74
	1	Miguel Pereira	106
Subtotal			1788
<b>TOTAL</b>			2500

As atividades realizadas com os estudantes do primeiro segmento do ensino fundamental resultaram em 552 respostas e demonstraram principalmente a importância da guarda de endemias no controle do mosquito. A caixa de pandora, o labirinto e a peça teatral foram as ações mais atrativas, representando acima de 80% de aceitação pelos estudantes (Tabela 2).

**Tabela 2:** Respostas positivas relacionadas às atividades (peça teatral, caixa de pandora, lupa mágica, corrida maluca e labirinto) realizadas com 137 alunos do 1º segmento do ensino fundamental, em 4 escolas do município de Vassouras, RJ.

Escolas	Peça teatral	Caixa de pandora	Lupa mágica	Corrida maluca	Labirinto
<b>A</b>	11	16	6	10	9
<b>B</b>	38	37	32	23	33
<b>C</b>	32	43	42	30	39
<b>D</b>	30	29	25	33	34
<b>Total (RP)</b>	111	125	105	96	115
<b>%</b>	81	91	77	70	84

**Legendas:** RP= Respostas positivas.

## Educação antidengue: um relato de experiência

As atividades realizadas com o segundo segmento do Ensino Fundamental, com a participação de 222 estudantes, o nome científico e os métodos de controle de *Ae. aegypti* foram os assuntos mais conhecidos, em torno de 84% em comparação ao ciclo de vida, hábitos e tipo de alimentação (26-36%) (Tabela 3A). Após as atividades, os resultados (Tabela 3B), demonstraram um aumento significativo do conhecimento sobre o inseto vetor (95%) e os métodos de controle (98%). Os assuntos abordados como o ciclo de vida atingiram 86% de respostas corretas, enquanto os hábitos e a alimentação dos insetos apresentaram um resultado de 70-75% (Tabela 3B).

**Tabela 3:** Respostas positivas da avaliação prévia (3A) e posterior (3B) às atividades realizadas com 222 estudantes do 2º segmento do ensino fundamental, em 9 escolas do município de Vassouras, RJ.

Escolas	Nome científico	Ciclo de vida	Hábitos	Alimentação	Prevenção e controle
<b>A</b>					
A	17	4	4	5	23
B	19	7	5	4	17
C	61	44	31	28	62
D	63	9	13	8	66
E	17	11	2	7	18
F	10	5	4	8	3
<b>Total (RP)</b>	187	80	59	60	189
<b>%</b>	84	36	26	27	85
<b>B</b>					
A	30	28	24	26	34
B	20	18	19	19	20
C	64	57	37	36	67
D	69	61	56	57	68
E	18	18	12	18	19
F	10	9	7	10	10
<b>Total (RP)</b>	211	191	155	166	218
<b>%</b>	95	86	70	75	98

**Legendas:** RP= Respostas positivas.

## Educação antidengue: um relato de experiência

O resultado do concurso de cartazes realizado como material didático de fixação do aprendizado, foi divulgado em evento científico no Centro Cultural (CeCult) da Universidade Severino Sombra, e os resumos e textos publicados *on-line* no site institucional, conforme *link*: [http://www.uss.br/arquivos/Escola\\_dengue\\_redacoes\\_selecionadas.pdf](http://www.uss.br/arquivos/Escola_dengue_redacoes_selecionadas.pdf).

De acordo com LENZI e COURA (2004) uma maior aproximação do campo científico ao senso comum se faz necessária para a interação entre essas formas de conhecimento, permitindo a construção de mensagens mais direcionadas e, possivelmente, de maior contribuição ao esclarecimento da população. Paulo Freire (1996) afirma que “ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua própria produção ou a sua construção”. De acordo com Huizinga (1971) e Piaget (1970), a atividade lúdica supõe uma ordenação da realidade, seja ela subjetiva ou intuitiva, ou objetiva e consciente. Para Piaget (1978) a atividade lúdica humana contribui para o desenvolvimento porque propicia a descentração do indivíduo, a aquisição de regras, a expressão do imaginário e a apropriação do conhecimento.

Educação em saúde é um passo essencial no programa de controle de vetores, uma vez que demonstra a eficiência da informação e conhecimento científico do vetor e da transmissão de doenças para a população. O conhecimento sobre o ciclo de vida do vetor, sua ecologia e biologia devem ser disseminados a fim de promover condições saudáveis e auxiliar na erradicação dos criadouros dos mosquitos (AZIS *et al.*, 2014).

Os resultados desta proposta possibilitaram novos espaços de diálogos e conversação e, através das atividades realizadas, sanaram dúvidas da população e introduziram conhecimento científico às comunidades, transformando teoria em ações concretas envolvendo educação, sociedade e pesquisa.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo mostrou que a educação realizada de forma lúdica e com uma linguagem adequada é uma forma propícia de educar para a saúde e o ambiente, e formar novos multiplicadores do conhecimento no controle do mosquito e prevenção da dengue, febre amarela urbana, zika e chikungunya no município.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). Projeto vinculado ao *PROCESSO n.º E-26/111.481/2010, Difusão e popularização da Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro*; às escolas participantes; Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação/USS; Pró-Reitoria de Extensão/USS; as bolsas PIBIC e PIBITI/USS; as bolsas PIBIC/FAPERJ e PIBIC/CNPq; as bolsas de JOVENS TALENTOS/FAPERJ; e ao Convênio firmado com a Secretaria de Saúde do Município de Vassouras, Vassouras, RJ. Os autores agradecem, em especial, a João Luiz da Silva, pela letra e música do “Mosquito dengoso”; a Taíssa Maleck e a Diego Luiz Souza da Cruz pelas artes gráficas, e ao Prof. Adiel Queiroz Ricci, pela revisão do manuscrito.

## REFERÊNCIAS

AZIZ, A.T.; AL-SHAMI, S.A.; MAHYOUB, J.A.; HATABBI, M.; AHMAD, A.H.; RAWI, C.S. **Promoting health education and public awareness about dengue and its mosquito vector in Saudi Arabia.** *Parasites & Vectors*, v. 7, p. 487, 2014.

BRAGA, I.A.; VALLE, D. ***Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil.** *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, Brasília, v. 16, n. 2, p.113-118, 2007.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **Oficinas de Educação em Saúde e Comunicação.** Vamos fazer juntos. Brasília-DF, 2001.

BRASSOLATTI, R.C.; ANDRADE, C.F.S. **Avaliação de uma intervenção educativa na prevenção da dengue.** *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 7, n. 2, p. 243-245, 2002.

FRANÇA, E.; DE PAULA, J.C.; SILVA, R.R.; ANUNCIACÃO, L.R. **Participação da população em projeto de controle de dengue em Belo Horizonte, Minas Gerais: uma avaliação.** *Informe Epidemiológico do SUS*, v. 11, n. 4, p. 205-213, 2002.

FREIRE, P. **Pedagogia da Autonomia: Saberes Necessários à Prática Educativa.** São Paulo: Paz e Terra, 1996.

HUIZINGA, J. ***Homo ludens – O jogo como elemento da cultura.*** São Paulo, Universidade de São Paulo e Perspectiva, p. 3, 1971.

KISHIMOTO, T.M. **O jogo e a educação infantil.** São Paulo: Ed. Pioneira, 1994.

LENZI, M.F.; COURA, L.C. **Prevenção de dengue: a informação em foco.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 37, n. 4, p. 343-350, 2004.

Educação antidengue: um relato de experiência

MALECK, M.; ALVES, S.P.; CRUZ, I.S.; PARDAL, B.M.; PINHEIRO, R.F. **O mosquito Dengoso**. 1ª edição. Vassouras. Universidade Severino Sombra, 2012.

MALECK, M.; CRUZ, D.L.S.; PARDAL, B.M.; CRUZ, I.L.S.; SERDEIRO, M.T.; ALVES, S.P. **Livro de atividades- O mosquito dengoso**. 1ª edição. Vassouras. Universidade Severino Sombra, 16p, 2015.

PIAGET, J. **A Formação do Símbolo na Criança**. Rio de Janeiro: Ed. Zahar, 1978.

PIAGET, J. **Psicologia e pedagogia**. Trad. Dirceu Accioly Lindoso e Rosa Maria Ribeiro da Silva. Rio de Janeiro / São Paulo: Forense (Ed. Original: 1969), 1970.

POUZADOUX, C.; MANSOT, F.; BRANDÃO, E. **Contos e lendas da mitologia grega**. São Paulo: Companhia das Letras, 2001.

RANGEL-S, M.L. **Dengue: educação, comunicação e mobilização na perspectiva do controle - propostas inovadoras**. Interface (Botucatu), v. 12, n. 25, p. 433-441, 2008.

REGIS, L.; SILVA-FILHA, M.H.N.L.; OLIVEIRA, C.M.F.; RIOS, E.M.; SILVA, S.B.; FURTADO, A.F. **Integrated control measures against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in Recife**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 90, n. 1, p. 115-119, 1995.

SILVA, J.L.; MALECK, M. Cd O mosquito dengoso. Laboratório de Insetos Vetores. Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ, 2012.

TAUIL, P.L. **Urbanização e ecologia do dengue**. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 17(supl), p. 99-102, 2001.

YORK, A.C. An Educational Assist to Urban Pest Management Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA: *Proceeding of the 187 International Conferences on Insect Pest in the Urban Environment/* Wildey, K.J. E.W.H. Robinson eds., 1993.

## 4 DISCUSSÃO

Em face da epidemiologia consolidada da dengue e a introdução dos vírus zika e chikungunya no Brasil, este estudo pretendeu contribuir para o enfrentamento do vetor dessas doenças (1) através da atividade larvicida de produtos naturais vegetais na busca de novas alternativas para o controle do vetor *Aedes aegypti* e (2) promover ações de educação em saúde através de atividades lúdicas de modo buscar parceiros no controle da dengue.

(1) O mosquito *Ae. aegypti* apresenta uma capacidade de resistir às medidas de controle através de inseticidas sintéticos, o que é um problema devido à escolha limitada de inseticidas utilizados na saúde pública (WHO 2012). Além disso, os inseticidas sintéticos representam riscos para a saúde humana e meio ambiente (WHO 2012). Uma alternativa eficaz no âmbito do controle biológico é o uso dos produtos botânicos que irão atuar como inseticidas, porém ambientalmente mais seguros no controle dos mosquitos (GHOSH 2012).

Em muitos países em desenvolvimento, alguns métodos à base de plantas, tais como a queima de matéria-prima, extratos e velas possuem atividade repelente contra mosquitos e forneceram proteção para os seres humanos contra insetos vetores de doenças. Para muitas comunidades rurais, esses métodos tradicionais são acessíveis e facilmente disponíveis.

As plantas possuem uma rica fonte de bioativos químicos que podem ajudar no controle de insetos, com um destaque importante para a diversidade da flora brasileira que apresenta um imenso potencial para a produção de compostos que podem possuir atividades inseticidas (BEZERRA et al. 2014).

Na busca por um larvicida natural utilizou-se como ferramenta de estudo três espécies vegetais *Cecropia catharinensis* Cuatrec (Urticaceae), *Ottonia anisum* Sprengel (Piperaceae) e *Podophyllum hexandrum* Royale (Berberidaceae) e os óleos essenciais terpenóides.

*Cecropia catharinensis* e *Ottonia anisum* são vegetais brasileiros facilmente encontrados na Mata Atlântica e são amplamente utilizadas na medicina popular com grande relevância devido às suas propriedades medicinais.

*Cecropia catharinensis* é utilizada popularmente no tratamento de asma, bronquite e doenças cardiovasculares (MACHADO et al., 2008). Aragão et al. (2010) apresentaram fundamento para o uso da planta no tratamento da diabetes.

Na busca de substâncias ativas de plantas, a medicina popular pode ser fonte de importantes informações. Dados da literatura revelam a existência de uma maior probabilidade de se encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular do que em plantas escolhidas ao acaso (CECHINEL-FILHO e YUNES 1998). Tornando-se fundamental a avaliação de outros benefícios, dentre estes, extratos brutos e substâncias puras sobre larvas de *Ae. aegypti* e de *Ae. albopictus* na busca de um fitoproduto que possa ser utilizado no controle de vetores de doenças.

O material vegetal de *C. catharinensis* foi escolhido para um estudo biológico fundamentado em resultados anteriores com o extrato bruto metanólico sobre o percevejo *Oncopeltus fasciatus* Dallas (Hemiptera-Heteroptera: Lygaeidae) onde foi demonstrado que o extrato causou 30% de mortalidade das ninfas desse percevejo (MALECK et al., 2014). Mas, quando o mesmo foi testado sobre *Ae. aegypti*, não apresentou atividade larvicida (SERDEIRO et al., 2017).

Espécies do gênero *Ottonia* são popularmente utilizadas no país como diuréticas, salivantes e anestésicas, sendo muitas vezes conhecidas como "anestesia" (LOPES 1989; CÚNICO 2001; CÚNICO et al. 2004; AGRA et al. 2007). O potencial anestésico de *O. anisum* a partir do uso popular foi confirmado por López et al (2016).

A atividade larvicida de *O. anisum* se intensifica com o extrato bruto hexânico, o qual propiciou 100% de mortalidade larval em até 24 h após a sua aplicação no meio de criação das larvas de *Ae. aegypti*. A substância isolada desse extrato, um arilbutanóide, 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene, apresentou atividade larvicida sobre o mosquito, com uma CL<sub>50</sub> igual a 1,6 µg/mL. A substância 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene é responsável por mais de 10% do extrato hexânico e é facilmente isolada. Devido ao fácil isolamento o uso econômico dessa fonte natural pode ser viável e o cultivo sustentável de *O. anisum* pelas comunidades deve ser encorajado (MARQUES et al., 2017).

Os resultados obtidos dos bioensaios com *O. anisum* enfatizam a importância de espécies da família Piperaceae, em que pese a eficácia dos metabólitos secundários delas obtidos no controle de insetos. Tal eficácia é devida provavelmente à diversidade química dos compostos produzidos por essas plantas (MARQUES e KAPLAN 2015). De acordo com a revisão de Parmar (1997) no período de 1907 a 1996, apenas em espécies do gênero tipo de Piperaceae (*Piper*), aproximadamente 600 metabólitos secundários foram isolados, entre eles,

destacam-se as classes das amidas, flavonoides, alcaloides e ésteres graxos, que possuem ação inseticida (CABRAL et al., 2009).

O isolamento de metabólitos secundários através de um estudo químico biomonitorado pode ser uma ferramenta útil na busca de substâncias ativas (TREVISAN et al., 2006; SIMAS et al., 2007; CABRAL et al., 1995). Esse fato é demonstrado no artigo “Toxicity and Larvicidal Activity of Podophyllum-Based Lignans Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)” com a espécie *Podophyllum hexandrum* (Berberidaceae), que a partir da eficácia do extrato etanólico contra as larvas de *Ae. aegypti* foram isoladas as lignanas desoxipodofilotoxina e podofilotoxona. A comparação de atividade das duas lignanas contra *Ae. aegypti*, mostrou maior atividade da desoxipodofilotoxina, com uma  $CL_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$ , resultado confirmado também para *Ae. albopictus*. Apesar da podofilotoxona não ter apresentado mortalidade larval alta, quando testada na concentração de  $30 \mu\text{g/mL}$ , atrasou o desenvolvimento larval o que possivelmente pode sugerir a interferência desta lignana no hormônio da muda de *Ae. aegypti*. De acordo com Saguez et al. (2013) a atividade de lignanas e neolignanas pode causar impacto no crescimento e fertilidade de *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae) devido à interferência no sistema hormonal de insetos.

Espécies vegetais do gênero *Podophyllum* são reconhecidas por serem fontes de lignanas possuidoras de várias atividades biológicas (JACKSON e DEWICK, 1984), o que vem aumentando o interesse pelo gênero na busca de novos alvos biológicos e suas propriedades, o que enseja o estudo fitoquímico e de atividade biológica de *P. hexandrum*.

Nos bioensaios de atividade larvicida com os óleos essenciais terpenóides foi demonstrado o potencial de farnesol, thymol, carvacrol, dihydrojasnone, p-cymene e nerolidol no controle do mosquito *Ae. aegypti* (SERDEIRO et al., 2017. Artigo 5 da tese não foi publicado)

O presente estudo, diante de seus resultados, confirmou a atividade larvicida encontrada em todos os ensaios realizados com as piperáceas, urticáceas e berberidáceas, o que demonstra a importância de suas propriedades, despertando o interesse de pesquisadores de diferentes áreas do conhecimento.

(2) No que tange à proposta de ações de educação em saúde para o enfrentamento da dengue e outras doenças transmitidas pelo mosquito *Ae. aegypti* como ação concreta do Plano Brasil sem Miséria, preocupou-se em incentivar a participação da população através de várias estratégias metodológicas, baseadas no

diálogo e interação, que abordem o tema de forma direta, assegurando um aspecto dinâmico às atividades. A proposta de “educar com diversão” forneceu subsídios importantes para o conhecimento sobre o mosquito vetor da dengue e para mudanças de comportamento (MALECK et al., 2017). Para Piaget (1978) a atividade lúdica contribui para o desenvolvimento porque propicia a descentralização do indivíduo, a aquisição de regras, a expressão do imaginário e a apropriação do conhecimento.

As ações de interação com a população foram realizadas nas escolas do município de Vassouras (RJ) e em espaços públicos das cidades da região Sul Fluminense.

Pela sua representatividade, a escola é um espaço privilegiado para a base do envolvimento da população no controle de vetores de doenças (REGIS et al., 1995).

Para os eventos realizados em locais públicos foram montadas tendas e mesas em locais dos municípios com grande fluxo de pessoas. À medida em que as pessoas passavam pelo local recebiam informações sobre o assunto. Sobre as mesas foi exposto material biológico do mosquito *Ae. aegypti* (ovo, quatro estágios larvais, pupa e mosquito adulto) para a visualização com o uso de lupas manuais e visualização da morfologia externa das larvas no microscópio óptico. As atividades lúdicas realizadas nas escolas foram também levadas aos eventos proporcionando diversão e conhecimento para as crianças. Além dessas atividades, foram distribuídos a população folhetos informativos e o livro de atividades “O Mosquito Dengoso”

Nas atividades realizadas, tanto nas escolas quanto nos eventos, surgiram várias curiosidades, tais como “Por que você cria mosquito? ” ou “Como vocês conseguiram os ovos de *Ae. aegypti*? ”. Nesse ponto a conversa acabava sendo direcionada ao encontro das atividades científicas realizadas no laboratório e sobre a ciência de uma maneira geral. Destacamos a importância do trabalho científico e o contato com a população.

Durante a exposição do material biológico foi constatado, devido aos seguintes comentários: “ Eu já vi essa minhoquinha na minha casa ” ou “ Isso é larva do mosquito da dengue? ”referindo-se às larvas de *Ae. aegypti*, que algumas pessoas desconheciam informações importantes sobre o mosquito vetor da dengue. Rangel (2008) concluiu que o modo como se divulga a prevenção da dengue, o ciclo de vida do seu vetor e os meios de evitar sua proliferação se dá de forma pouco

abrangente, uma vez que a população geralmente não consegue identificar o mosquito *Ae. aegypti* nos locais de infestação. Uma abordagem mais realista sobre as características do inseto vetor e ciclo de vida certamente propicia maior engajamento de toda a sociedade no controle da dengue. No presente estudo, a população teve a oportunidade de conhecer o ciclo de vida da espécie *Ae. aegypti* e reconhecer as suas principais características.

É importante salientar que após décadas convivendo com a dengue a sociedade não incorporou a luta diária que deve ser travada contra o mosquito. Talvez a sazonalidade dos surtos tenha feito com que todos se esquecessem da doença por um período de tempo, tempo este, necessário para que o ciclo do mosquito se restabelecesse. De acordo com Silva et al. (2015) as estratégias de controle à dengue não devem ser de caráter sazonal e sim um trabalho contínuo de educação. No presente estudo, as atividades de educação em saúde foram realizadas em todo ano, muitas vezes, durante as atividades a equipe executora foi questionada pelos participantes o porquê falar de dengue no inverno.

Os resultados desta proposta possibilitaram espaços de diálogos e conversação e, através das atividades realizadas, sanaram dúvidas da população e introduziram conhecimento científico às comunidades, transformando teoria em ações concretas envolvendo educação, sociedade e pesquisa para muitas das pessoas para quem dirigimos nossos esforços.

## 5. CONCLUSÕES

1- Os resultados demonstraram que a fração obtida das folhas de *C. catharinensis* alterou o período de desenvolvimento de *Ae. aegypti*. Sugere-se a purificação desta fração ativa e maiores estudos da sua atividade biológica sobre os ovos e fisiologia de *Ae. aegypti*.

2- Os achados do estudo sugerem que o metabólito 1-butil- 3,4-metilenodioxibenzeno, isolado das folhas de *O. anisum*, pode ser usado como um pesticida adjuvante alternativo no controle do mosquito *Ae. aegypti*, em novas composições que seria ambientalmente mais seguro do que alguns sintéticos inseticidas. Os bioensaios utilizando este metabolito revelaram toxicidade significativa entre L3 larvas após 24 h após o tratamento em baixas concentrações. Além disso, a extração deste composto ativo natural de espécies arbustivas nativas brasileiras pode ser uma alternativa econômica contra os vírus tropicais tais como: dengue, zika e chikungunya, e pode contribuir para a redução do uso extensivo de pesticidas tóxicos nos países em desenvolvimento com altas taxas dessas infecções virais.

3- O presente estudo revelou que dihydrojasmone, farnesol, thymol, *p*-cymene, carvacrol e nerolidol promissores larvicidas para *Ae. aegypti*. Salienta-se a importância da descrição do dihydrojasmone citado pela primeira vez com importante ação sobre as larvas de *Ae. aegypti*. Todos os constituintes de óleos essenciais investigados nesta pesquisa causaram algum tipo de alteração no tegumento ou nas porções internas das larvas, o que pode sugerir a sua toxicidade sobre o inseto vetor de doenças. Os resultados confirmaram a contribuição dos óleos essenciais sobre a fisiologia, morfologia e controle do principal mosquito de importância médica mundial.

4- De acordo com os resultados deste estudo, pode ser concluído que as lignanas podofilotoxona e a desoxipodofilotoxina isoladas do extrato etanólico (PM-3) de rizomas e raízes de *P. hexandrum* exibiu toxicidade significativa para as larvas de *Ae. aegypti*, confirmando assim a sua eficácia como compostos larvicidas. Além do mais, a atividade tóxica e o número reduzido resultante de adultos dar a estas

lignanas um potencial que precisa ser mais investigado em busca de compostos ativos que possam interferir no crescimento e desenvolvimento de insetos, particularmente o mosquito *Ae. aegypti*.

5- Este estudo mostrou que a educação realizada de forma lúdica e com uma linguagem adequada é uma forma propícia de educar para a saúde e o ambiente, e formar novos multiplicadores do conhecimento no controle do mosquito e prevenção da dengue, febre amarela urbana, zika e chikungunya no município. Ainda, ressalta-se a importância do desenvolvimento de práticas de educação em saúde em cenários diferentes tais como as escolas, locais públicos, *campus* universitários entre outros, tornando possível criar uma rede de multiplicadores de informações, que se apresenta com menos formalidade e mais interação entre facilitadores e população. Além da formação de multiplicadores para a prevenção do mosquito vetor da dengue, o projeto pôde incentivar a ciência.

## 6. REFERÊNCIAS

AGRA, M.F.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p.114-140, 2007.

ARAGÃO, D.M.O.; GUARIZE L.; LANINI J., DA COSTA J.C. Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic's rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.128, p. 629-633, 2010.

BARRETO, M.L.; TEIXEIRA, M.G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos avançados**, v. 22, v. 64, p. 53-72, 2008.

BEZERRA, D.A.C. Estudo fitoquímico, bromatológico e microbiológico de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke. 2008.62 f. Dissertação (Pós-graduação em Zootecnia). Universidade Federal de Campina Grande.

BEZERRA, F.P.; AGUIAR, R.W.S.; CARVALHO, E.E.N.; BORGES, J.C.M.; VALE, B.N. *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) como novo bioinseticida: análise fitoquímica preliminar e atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Amazônia Science & Health**, v. 2, n. 3, p.17-25, 2014.

BRAIBANTE, M.E.; ZAPPE, J.A. A química dos agrotóxicos. **Química Nova na Escola**. v. 34, n. 1, p. 10-15, 2012.

BRAGA, A.I. e VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v.16, n.4, p.279-293, 2007.

BRAGA, A.I. e SAN MARTIN J.L. Histórico do controle de *Aedes aegypti*. In: VALLE, D.; PIMENTA, D.N.; CUNHA, R.V. **Dengue, teorias e práticas**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2015, p. 61-73.

BRASIL. Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde (Funasa). **Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas**.

2001. 3<sup>o</sup> ed. [acesso 2017 jun 4]. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man\\_dengue.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf)

BRASIL. Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde (Funasa). **Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD)**. 2002. [acesso 2017 jun 4]. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pncd\\_2002.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pncd_2002.pdf)

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância Epidemiológica de Febre Amarela**. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Guia de Bolso. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue / 2009**. 160 p. [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes\\_nacionais\\_prevencao\\_controle\\_dengue.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_prevencao_controle_dengue.pdf)

BRASIL. Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Ministério da Saúde. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Revista de Saúde Pública**. 2010. 44(1):200-202.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança**. 4<sup>a</sup> edição. 2013. [acesso 2017 jun 4]. Disponível em [http://www.caism.unicamp.br/PDF/Dengue\\_manejo\\_clinico\\_adulto\\_crianca\\_2013\\_4a\\_edicao.pdf](http://www.caism.unicamp.br/PDF/Dengue_manejo_clinico_adulto_crianca_2013_4a_edicao.pdf)

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome. O Brasil sem miséria – Brasília: MDS, 2014. 848 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Febre de chikungunya: manejo clínico**. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015a. 28 p. [acesso em: 2017 jun 22]. Disponível em:

<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2015/fevereiro/19/febre-de-chikungunya-manejo-clinico.pdf>

BRASIL. Ministério da Saúde. **Ministério da Saúde confirma relação entre vírus Zika e microcefalia**. Brasília: Ministério da Saúde, 2015b [acesso em: 2017 jul 10]. Disponível em: <http://www.blog.saude.gov.br/index.php/combate-ao-aedes/50399-ministerio-da-saude-confirma-relacao-entre-virus-zika-e-microcefalia>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Plano de Contingência para Resposta às Emergências em Saúde Pública: Febre Amarela**. 2016. 48p. [acesso em: 2017 jun 22]. Disponível em: [http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano\\_contingencia\\_emergencias\\_febre\\_amarela.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_contingencia_emergencias_febre_amarela.pdf)

BRASIL. Portal da Saúde – Ministério da Saúde – [www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br). **Ministério da Saúde declara fim do surto de febre amarela**. 2017b.[acesso em: 2017 set 29]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/29503-ministerio-da-saude-declara-fim-do-surto-de-febre-amarela>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de operações de emergências em saúde pública sobre Febre Amarela. 2017a; 43. **Boletim epidemiológico. Febre amarela**. [acesso em: 2017 jun 4]. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/02/COES-FEBRE-AMARELA---INFORME-43---Atualiza----o-em-31maio2017.pdf>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Atenção Básica **Chikungunya: Manejo Clínico/ Ministério da Saúde**, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2017c. [acesso em: 2017 jun 23]. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/25/chikungunya-novo-protocolo.pdf>.

BUENO, V.S.; ANDRADE, C.F.S. Avaliação preliminar de óleos essenciais de plantas como repelentes para *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 2, p. 215-219, 2010.

CABRAL, M.M.O.; GARCIA, E.S.; KELECOM, A. Lignans from the brazilian *Melia azedarach*, and their activity in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 6, p. 759-763, 1995.

CABRAL, M.M.O.; AZAMBUJA, P.; GOTTLIEB, O.R.; GARCIA, E.S. Neolignans inhibit *Trypanosoma cruzi* infection of its triatomine insect vector, *Rhodnius prolixus*. **Parasitology Research**, v. 85, n. 3, p. 184-187, 1999.

CABRAL, M.M.O.; KOLLIEN, A.H.; KLEFFMANN, T.; GOTTLIEB, O.R.; GARCIA, E.S.; SCHAUB, G.A. *Rhodnius prolixus*: Effects of the neolignan burchellin on in vivo and in vitro diuresis. **Parasitology Research**, v. 86, p.710-716, 2000.

CABRAL, M.M.O.; AZAMBUJA, P.; GOTTLIEB, O.R.; KLEFFMANN, T.; GARCIA, E.S.; SCHAUB, G.A. Burchellin: effects on *Triatoma infestans* and on *Trypanosoma cruzi* within this vector. **Parasitology Research**, v. 87, n.9, p. 730-735, 2001.

CABRAL, M.M.O.; MENDONÇA, P.M.; GOMES, C.M.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; DIAS, C.S.; SOARES, M.J.; QUEIROZ, M.M.C. Biological activity of yangambin on the postembryonic development of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Medical Entomology**, v. 44, p. 249-255, 2007.

CABRAL, M.M.O.; ALENCAR, J.A.; GUIMARÃES, A.E.; KATO, M.J. Larvicidal Activity of grandisin against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 25, n. 1, p.103-105, 2009.

CAO-LORMEAU, V.M.; ROCHE, C.; TEISSIER, A.; ROBIN, E.; BERRY, A.L.; MALLET, H.P. et al. Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, v. 6, p. 1085–1086, 2014.

CARVALHO, R.G.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; BRAGA, I.A. Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 787-796, 2016.

CAVALCANTE, K.R.L.J.; TAUIL, P.L. Características epidemiológicas da febre amarela no Brasil, 2000-2012. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 1, p.11-20,2016.

CAVALCANTE, K.R.L.J.; TAUIL, P.L. Risco de reintrodução da febre amarela urbana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 26, n. 3, p.617-620, 2017.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHIARAVALLLOTI-NETO, F.C.; MORAES, M.S.; FERNANDES, M.A. Avaliação dos resultados de atividades de incentivo à participação da comunidade no controle da dengue em um bairro periférico do município de São José do Rio Preto, São Paulo, e da relação entre conhecimento e práticas desta população. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 14, n. Sup 2, p. 101-109, 1998.

CLOYD R. Natural indeed: Are natural insecticide safer and better then conventional insecticide? **Illinois Pesticide Review**. v. 17, p. 1-3, 2004.

CONSOLI, R.O.A.G.B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Editora Fiocruz, 1994.

CORRÊA, J.C.R.; SALGADO, H.R.N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, p. 500-506, 2011.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). **Biochemistry and molecular biology of plants**, v. 24, p. 1250-1319, 2000.

CÚNICO, M.M. Estudo fitoquímico e das atividades antimicrobianas da *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae. [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2001.

CÚNICO, M.M.; CARVALHO, J. L. S.; KERBER, V.A.; HIGASKINO, C.E.K.; CRUZ ALMEIDA, S. C.; MIGUEL, M. D. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 97-103, 2004.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509-520, 1952.

DUFFY, M.R.; CHEN, T.H.; HANCOCK, W.T.; POWERS, A.M.; KOOL, J.L.; LANCIOTTI, R.S. ET AL. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, 2009.

DUPONT-ROUZEYROL, M.; O'CONNOR, O.; CALVEZ, E.; DAURES, M.; JOHN, M.; GRANGEON, J.P.; GOURINAT, A.C. Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 2, p. 381, 2015

EIRAS, A.E. Culicidae .In: NEVES, D.P. **Parasitologia humana**. 12 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2011, p. 387-401.

FERREIRA, J.T.B.; CORRÊA, A.G.; VIEIRA, P.C. **Produtos Naturais no Controle de Insetos**. São Carlos: EdUFSCAR, São Carlos, 2001, 176 p.

FORATTINI, O.P. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 20, n. 3, p. 244-245, 1986.

FORATTINI, O. P. Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia, Vol. II. **Edusp, São Paulo**, 2002.

GARCEZ, W.S.; GARCEZ, F.R.; SILVA, L.M.G.E.; SARMENTO, U.C. Substâncias de origem vegetal com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 363-393, 2013.

GHOSH, A.; CHOWDHURY, N.; CHANDRA, G. Plant extracts as potential mosquito larvicides. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 135, n. 5, p. 581-598, 2012.

GUIMARÃES, M.G.A.; MARTINS, K.S.; CARVALHO, M.A.; KERSTEN, V.A.; VIEIRA, R.B.T; MALECK, M. Ação dos extratos de *Neoregelia compacta* e *Aechmea fasciata* Baker sobre as formas imaturas de *Aedes (Stegomyia) aegypti*, Linnaeus, 1762. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 8, n. 2, p. 113-124, 2015.

HARBACH R. Culicidae Meigen, 1818. In: Mosquito Taxonomic Inventory. 2008. [acesso em: 2017 dez 3]. Disponível em: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/simpletaxonomy/term/6045>

HARBACH R. Culicinae Meigen, 1818. In: Mosquito Taxonomic Inventory 2008. [acesso em: 2017 dez 3]. Disponível em: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/simpletaxonomy/term/6060>

HARBACH R. Genus *Aedes* Meigen, 1818. In: Mosquito Taxonomic Inventory. 2008. [acesso em: 2017 dez 3]. Disponível em: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/node/12738#>

HEMING, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual review of entomology**, v. 45, n. 1, p. 371-391, 2000.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ. Disponível em: [www.fiocruz.br/ioc/media/NotaTecnica\\_IOC](http://www.fiocruz.br/ioc/media/NotaTecnica_IOC)).

JACKSON, D.E.; DEWICK, P.M. Aryltetralin lignans from *Podophyllum hexandrum* and *Podophyllum peltatum*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 5, p.1147-52, 1984.

JEYASANKAR, A.; PREMALATHA, S.; ELUMALAI, K. Antifeedant and insecticidal activities of selected plant extracts against *Epilachna beetle*, *Henosepilachna*

*vigintioctopunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). **Advances in Entomology**, v. 2, n. 1, p. 14-19, 2014.

KEMPRAJ, V.; BHAT SK. Ovicidal and larvicidal activities of *Cyperus giganteus* Vahl and *Cyperus rotundus* Linn essential oils against *Aedes albopictus* (Skuse). **Natural Product Radiance**, v. 7, n. 5, p. 416-419, 2008.

KERBAUY, G.B. Fisiologia Vegetal. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

LEITE, A.C.C.F.; KATO M.J.; SOARES, R.O.A.; GUIMARÃES, A.E.; SANTOS-MALLET, J.R.; CABRAL, M.M.O. Grandisin caused morphological changes larval and toxicity on *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 3, p. 517-521, 2012.

LOPES, M. **Contribuição para o estudo fitoquímico de *Ottonia martiniana* Miq.** [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 1989, 102 p.

LÓPEZ, K.S.E.; MARQUES, A.M.; MOREIRA, D.L.; VELOZO L.S.; SUDO, R.T.; ZAPATA-SUDO G. et al. Local Anesthetic Activity from Extracts, Fractions and Pure Compounds from the Roots of *Ottonia anisum* Spreng. (Piperaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 4, p. 2229-2237, 2016.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; VAZEILLE, M.; FILIPPIS, A.M.B.; FAILLOUX, A.B. *Aedes albopictus* from Brazil and southern United States: genetic variation and vector competence for dengue and yellow fever viruses. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 69, p. 105-114, 2003.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Biologia e comportamento do vetor. In: VALLE, D.; PIMENTA, D.N.; CUNHA, R.V. **Dengue: teorias e práticas**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2015, p. 75-92.

LUZ, S. L. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Forest Culicinae mosquitoes in the environs of Samuel hydroelectric plant, state of Rondônia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 4, p. 427-432, 1996.

MACHADO, E.C.; YUNES, R.A.; MALHEIROS, A.; GOMEZ, E.C.; DELLE MONACHE, F. Two new 11 $\alpha$ , 12 $\alpha$ -epoxy-ursan-28, 13 $\beta$ -olides and other triterpenes from *Cecropia catharinensis*. **Natural Products Research**, v.22, n. 15, p. 1310-1316, 2008.

MALECK, M.; SANTOS, F.C.C.; SERDEIRO, M.T.; GUIMARÃES, A.E.; FERREIRA, B.; GUNAYDIN, K.; ALMEIDA, A.P. Khellin: A furanochromone with toxicity against *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera) and *Aedes aegypti* (Diptera). **Journal of Natural Pharmaceuticals**, v. 4, n. 2, p. 32-36, 2013.

MALECK, M.; SERDEIRO, M.T.; Santos, F.C.C.; Braun, A. M. O.; Chaves, D.S.A., Faria A.R. et al. Bioactivity of Brazilian plant extracts on *Oncopeltus fasciatus*. **International Journal of Fauna and Biological Studies**, v. 1, n. 6, p. 114-20, 2014.

MALECK, M et al. Educação antidengue: um relato de experiência. **Extensio: Revista Eletrônica de Extensão**, v. 14, n. 26, p. 74-83, 2017.

MARCONDES, C.B. **Doenças transmitidas e causadas por artrópodes**. São Paulo. Editora Atheneu. 2009.

MARQUES, A.M.; KAPLAN, M.A.C. Active metabolites of the genus *Piper* against *Aedes aegypti*: natural alternative sources for dengue vector control. **Universitas Scientiarum**, v. 20, n.1, p. 61-82, 2015.

MARQUES, A.M; VELOZO, L.S.; CARVALHO, M.A.; SERDEIRO, M.T.; HONÓRIO, N.A.; KAPLAN M.A·et al. Larvicidal activity of *Ottonia anisum* metabolites against *Aedes aegypti*: A potential natural alternative source for mosquito vector control in Brazil. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 54, n. 1, p. 61, 2017.

MENEZES, E.L.A. **Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola**. Seropédica, Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia. 2005. 58p.

MITCHELL, C.J.; MILLER, B.R. Vertical transmission of dengue viruses by strains of *Aedes albopictus* recently introduced into Brazil. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 6, n. 2, p. 251-253, 1990.

NARCISO, J.O.A.; SOARES, R.O.A.; MALLETT, J.R.S.; GUIMARÃES, A.E. CHAVES, M.C.O.; BARBOSA-FILHO, J.M.; MALECK, M. Burchellin: study of bioactivity against *Aedes aegypti*. **Parasites & Vectors**, 7:172, 2014.

MORNER, T.; OSENDORF, D.L.; ARTOIS, M.; Woodford MH. Surveillance and monitoring of wildlife disease. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties**, v. 21, n. 1, p. 67-76, 2002.

OSANAI, C.H.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.; TANG, A.T.; DO AMARAL, R.S.; PASSOS, A.D.; TAUIL, P.L. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 25, n. 1, p. 53-54, 1983.

(PAHO) PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. 2014. [acesso: 2017 jun 13]. Disponível em:<http://www.paho.org/world-health-day-2014/wp-content/uploads/2014/04/Yellow-fever.pdf>.

PARMAR, V.S. et al. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997.

PAUPY, C.; DELATTE, H.; BAGNY, L.; CORBEL, V.; FONTENILLE, D. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. **Microbes and Infection**. v.1, n. 14-15, p.1177-11785, 2009.

PIAGET, J. **A Formação do Símbolo na Criança**. Rio de Janeiro: Ed. Zahar, 1978.

PONTES, R.J.S.; RUFFINO-NETTO, A. A dengue em localidades urbanas da região sudeste do Brasil. Aspectos epidemiológicos. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, n. 3, p. 218-227, 1994.

RANGEL-S, ML. Dengue, educação, comunicação e mobilização na perspectiva do controle-propostas inovadoras. **Interface**, v. 12, n. 25, p. 433-441, 2008.

RAWANI, A.; RAY, A.S.; GHOSH, A.; SAKAR, M.; CHANDRA, G. Larvicidal activity of phytosteroid compounds from leaf extract of *Solanum nigrum* against *Culex vishnui* group and *Anopheles subpictus*. **BMC research notes**, v. 10, n. 1, p. 135, 2017.

REGIS, L.; SILVA-FILHA, M.H.N.L.; OLIVEIRA, C.M.F.; RIOS, E.M.; SILVA, S.B.; FURTADO, A.F. Integrated control measures against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in Recife. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 1, p. 115-119, 1995.

SANTOS, P.L.; PRANDO, M.B.; MORANDO, R.; PEREIRA, G.V.N.; KRONKA, A.Z. Utilização de extratos vegetais em proteção de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, p. 2562-2576, 2013.

SERDEIRO, M.T.; MALLETT, J.R.S.; HONÓRIO, N.A.; MALECK, M. *Aedes aegypti*: modelo experimental de atividade biológica de fitoprodutos. **Revista de Saúde**, v. 8, n. 1, p. 28-32, 2017.

SAGUEZ, J.; ATTOUMBRE J.; GIORDANO P., BALTORA-ROSSET. Biological activities of lignans and neolignans on the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). **Arthropod-Plant Interact**, v. p. 225-233, 2013.

SHAALAN, E.A.S.; CANYON, D.; YOUNES, M.W.; ABDEL-WAHAB, H.; MANSOUR, A.H. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. **Environment International**, v. 31, p. 1149 -1166, 2005.

SIMAS, N.K.; LIMA, E.C; KUSTER, R.M.; LAGE, C.L.S.; OLIVEIRA FILHO, A.M. Utilização em potencial do extrato alcoólico de *Piper nigrum* como larvicida em *Aedes aegypti* resistente a piretróides. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 40, p. 405-407, 2007.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. 1104p.

da SILVA, I.B.; MALLMANN, D.G.; de VASCONCELOS, E.M.R. Estratégias de combate à dengue através da educação em saúde: uma revisão integrativa. **Saúde (Santa Maria)**, v. 41, n. 2, p. 27-34, 2015.

SMITHBURN, K.C. Neutralizing antibodies against certain recently isolated viruses in the sera of human beings residing in East Africa. **The Journal of Immunology**, v. 69, n. 2, p. 223-234, 1952.

SOUZA, T.M.; CUNHA, A.P.; FARIAS, D.F.; MACHADO, L.K.; MORAIS, S.M.; RICARDO, N.M.P.S.; CARVALHO, A.F. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* of *m*-pentadecadienyl-phenol isolated from *Myracrodruon urundeuva* seeds. **Pest Management Science**, v. 68, p. 1380-1384, 2012.

SOUZA, T.M.; FARIAS, D.F.; SOARES, B.M.; VIANA, M.P.; LIMA, G.P.G.; MACHADO, L.K.A. et al. Toxicity of Brazilian plant seed extracts to two strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and non-target animals. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 4, p. 846-851, 2011.

SUKUMAR, K.; PERICH, M.J.; BOOBAR, L.R. Botanical derivatives in mosquito control: a review. **Journal of American Mosquito Control Association**. v. 7, p. 210-237, 1991.

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed. 2009, 719 p.

TAUIL, PL. Aspectos críticos do controle da febre amarela no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 3, p. 555-558, 2010.

TEIXEIRA, M.G.; ANDRADE, A.M.S.; COSTA, M.C.N.; CASTRO, J.S.M.; OLIVEIRA, F.L.S.; GOES, C.S.B. et al. East/Central/ South African genotype Chikungunya virus, Brazil. 2014. **Emerging Infectious Disease**, v. 21, p. 906-907, 2015.

TREVISAN, M.T.S.; BEZERRA M.Z.B; SANTIAGO G.M.P.; FEITOSA C.M.; VERPOORTE R.; BRAZ FILHO R. Atividades larvicida e anticolinesterásica de plantas do gênero *Kalanchoe*. **Química Nova**. v.29, nº 3, p. 415-418, 2006.

TUNC, I.; BERGER, B.M.; ERLER, F.; DAĞLI, F. Ovicidal activity of essential oils from five plants against two stored-product insects. **Journal of Stored Products Research**, v. 36, n. 2, p.161-168, 2000.

VASCONCELOS, E.M. Redefinindo as práticas de Saúde a partir de experiências de Educação Popular nos serviços de saúde. **Interface**, v. 5, n. 8, p. 121-126, 2001.

VEGA-RUA, A.; ZOUACHE, K.; GIROD, R.; FAILLOUX, A.B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. **Journal of virology**, v. 88, n. 11, p. 6294-6306, 2014.

VENDRAMIM, J.D.; CASTIGLIONI, E. 2000. Aleloquímicos, resistência de plantas e plantas inseticidas, p.113-128. In Guedes JC, da Costa IDE. Castiglioni E. Bases e técnicas do manejo de insetos, cap. 8. Santa Maria, UFSM/CCR/DFS, Palloti, 248p.

VIEGAS-JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

van EMDEN, H.F., PEAKALL, D.B. **Beyond Silent Spring: Integrated Pest Management and Chemical Safety**. Chapman and Hall, London.

von POISER, G.L. In: **Farmagnocosa: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre Artmed, 2017.

WARD, R.A. 1982. Culicidae, p. 417–429. In: S. H. Hurlbert & A. VillalobosFigueroa. (eds). **Aquatic biota of Mexico, Central America and the West Indies**. San Diego San Diego State University, 529 p.

(WHO) World Health Organization. **Handbook for Integrated Vector Management**. Geneva: World Health Organization. 2012. 67p.

(WHO) World Health Organization. **Zika vírus**. 2016. [acesso: 2017 jun 22]. Atualizado em 6 de setembro de 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/pt/>.

(WHO) World Health Organization. **Dengue and Dengue Severe**. 2017a. [acesso em: 2017 jun 4]. Atualização: abril de 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>.

(WHO) World Health Organization. Chikungunya. 2017b. [acesso em: 2017 jun 11]. Atualização: abril de 2017. Chikungunya. Disponível: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/>.

ZANLUCA, C.; MELO, V.C.A.D.; MOSIMANN, A.L.P.; SANTOS, G.I.V.D.; SANTOS, C.N.D.D.; LUZ, K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569-72, 2015.