

## Artigo

**Investigação do Efeito Larvicida de *Petiveria alliacea* (Guiné) sobre as Larvas de Mosquitos da Espécie *Aedes Aegypti***

Hartmann, I.; Silva, A.; Walter, M. E.; Jeremias, W. J.

Rev. Virtual Quim., 2018, 10 (3), no prelo. Data de publicação na Web: 26 de junho de 2018

<http://rvq.sbq.org.br>**Investigation of the Larvicidal Effect of Guinea (*Petiveria alliacea*) on Larvae of Mosquitoes of the Species *A. Aegypti***

**Abstract:** Currently, the main diseases transmitted by *Aedes aegypti* are dengue, chikungunya and zika. For this purpose, vector control measures have been adopted for the elimination of proliferation foci mainly through the use of larvicidal agents. Therefore, the objective of this work is to test extracts of *Petiveria alliacea* (Guinea)'s larvicide capacity, known as cytotoxic. Guiné's crude extract was used from 30% hydroalcoholic percolated at different dilutions. Alcohol in extract was evaporated by convection to the air stream and dimethylsulfoxide (DMSO) was added to the obtained extract to stabilize it as an emulsion. The *A. aegypti* eggs were collected in the metropolitan area of Belo Horizonte. Wood platelets were used in ovitraps with attractive infusion for the mosquito, and weekly collection and exchange were performed. Hatching was performed under uncontrolled environmental conditions, but monitored. Two groups were assayed and tested for stage 3 larvae at each dilution (1%, 3%, 5%, 10%, 25%, 50% v/v) for the test group to refute DMSO larvicidal effect. The assays were performed in triplicates. The results show that the hyperexcitability of the larvae in guinean extracts was followed by death at the highest concentrations when compared to the control groups. Thus, it is evident that there is a cytotoxic effect of *P. alliacea* extract on *A. aegypti* larvae and its larvicidal effect is confirmed. Dilutions that had presented lower mortality's rate or absence of mortality were that by 1 and 3% v / v. The results showed that Guinea extract can be used as larvicide in concentrations higher than 5% v / v.

**Keywords:** *A. aegypti*, *P. alliacea*, larvicide, guiné, dengue, ovitramp, public health care.

**Resumo**

Atualmente, as principais doenças transmitidas pelo *A. aegypti* são dengue, chikungunya e zika. Portanto, tem-se adotado medidas de controle do vetor a partir de eliminação dos focos de proliferação através do uso de agentes larvicidas. Em virtude disso o presente trabalho tem por objetivo testar a capacidade larvicida de extratos de *Petiveria alliacea* (Guiné), conhecida como citotóxica. O extrato bruto da guiné foi utilizado a partir de percolado hidroalcoólico a 30% em diferentes diluições. O álcool presente no extrato foi evaporado por convecção forçada através de fluxo de ar e, ao extrato, adicionou-se dimetilsulfóxido (DMSO) para estabilizar a emulsão. Os ovos foram coletados na região metropolitana de Belo Horizonte. Foram utilizadas placas de madeira em ovitrapas com infusão atrativa para o mosquito e realizou-se coleta e troca com periodicidade semanal. A eclosão foi realizada em condições ambiente não-controladas, porém, monitorizadas. Foram ensaiados dois grupos, teste e controle contendo 25 larvas no estágio 3 em cada diluição. Nos grupos controles utilizou-se as mesmas diluições da solução percolada (1%, 3%, 5%, 10%, 25%, 50% v/v) utilizada para o grupo teste a fim de refutar efeito larvicida do DMSO. Os ensaios foram realizados em triplicatas. Os resultados mostram que há hiperexcitabilidade das larvas nos extratos da guiné seguido de morte nas concentrações mais altas quando comparados aos grupos controle. Assim, foi evidenciado o efeito citotóxico do extrato da *P. alliacea* sobre as larvas do *A. aegypti* e comprovou-se seu efeito larvicida. As diluições que apresentaram menor taxa ou ausência de mortalidade foram as de 1 e 3% v/v. Os resultados mostraram que o extrato de Guiné pode ser utilizado como larvicida em concentrações superiores a 5% v/v.

**Palavras-chave:** *A. aegypti*, *P. alliacea*, larvicida, guiné, dengue, ovitrampa, saúde pública.

\* Centro Universitário de Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (IET), Unidade Estoril, Av. Prof. Mário Werneck, 1685, CEP 30575-180, Belo Horizonte-MG, Brasil.

✉ [wander.jeremias@prof.unibh.br](mailto:wander.jeremias@prof.unibh.br)

DOI:

## Investigação do Efeito Larvicida de *Petiveria alliacea* (Guiné) sobre as Larvas de Mosquitos da Espécie *Aedes Aegypti*

Ingrid Hartmann,<sup>a</sup> Andreia da Silva,<sup>a</sup> Maria Elena Walter,<sup>a</sup> Wander de Jesus Jeremias<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup> Centro Universitário de Belo Horizonte, Instituto de Engenharia e Tecnologia (IET), Campus Estoril, Av. Prof. Mário Werneck, 1685, CEP 30575-180, Belo Horizonte-MG, Brasil.

<sup>b</sup> Centro Universitário de Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS), Campus Estoril, Av. Prof. Mário Werneck, 1685, CEP 30575-180, Belo Horizonte-MG, Brasil.

<sup>c</sup> Grupo de Pesquisa em Biologia do *Schistosoma mansoni* e sua Interação com o Hospedeiro, Instituto de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Augusto de Lima, 1715, Barro Preto, CEP 30190-002, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

\* [wander.jeremias@prof.unibh.br](mailto:wander.jeremias@prof.unibh.br)

Recebido em 21 de setembro de 2017. Aceito para publicação em 12 de junho de 2018

1. Introdução
2. Materiais e métodos
  - 2.1. Ovitampas
  - 2.2. Preparo da infusão atrativa
  - 2.3. Coleta dos ovos
  - 2.4. Eclosão e obtenção das larvas
  - 2.5. Obtenção da *P. alliacea*
  - 2.6. Preparo das folhas e do extrato
  - 2.7. Bioensaios
  - 2.8. Preparo das soluções dos extratos
  - 2.9. Atividade larvicida
  - 2.10. Análise estatística
3. Resultados
4. Discussão
5. Conclusão

### 1. Introdução

A literatura científica registra nos últimos

anos a crescente preocupação e a importância do controle e combate ao mosquito *A. aegypti*, principal vetor de transmissão de grave doença hemorrágica

conhecida como dengue. De acordo com a Organização Mundial de Saúde,<sup>1</sup> o número de casos de dengue é hoje o de mais rápido crescimento entre as doenças infecciosas, abrangendo cerca de 400 milhões de ocorrências por ano. Nos últimos 50 anos a doença tem se manifestado e expandido chegando a ser endêmica em 128 países, incluindo 36 que eram previamente caracterizados como livres da doença. As maiores prevalências são observadas em países das Américas, Ásia e África, expondo, finalmente, 3,97 bilhões de habitantes ao risco de infecção. Além disso, viajantes para estas regiões também correm risco de carrear o vírus após ser picado pelo mosquito.<sup>2</sup>

Pesquisas envolvendo o desenvolvimento de vacina contra dengue tem como um marco histórico o início em 2010 dos primeiros ensaios clínicos na fase III, cujos testes são realizados em humanos suscetíveis a contrair a doença.<sup>3</sup> No Brasil, foram aprovados ensaios em dezembro de 2015 para serem realizados em pessoas com faixa etária entre 9 a 45 anos de idade, que habitem zonas endêmicas. A patente da vacina em teste pertence à *Sanofi Pasteur*. O intuito da vacina é reduzir a morbidade e a mortalidade por dengue. A meta estabelecida pela OMS é de uma redução 25% na morbidade e 50% na mortalidade até o ano de 2020.<sup>4</sup>

Apesar de excelente estratégia contra a dengue, a imunização por vacina não representa a solução de um problema de saúde pública. Sabe-se, atualmente, que, além dos vírus da dengue, ele é vetor de vírus de outras duas doenças conhecidas no Brasil: a Chikungunya e a Zika. Essa última tem gerado grandes transtornos à saúde pública frente ao seu potencial risco de acometer o desenvolvimento neurológico de fetos em qualquer idade gestacional.<sup>5</sup>

Os larvicidas que podem ser usados em medidas preventivas e controle são classificados em três grupos: químicos (organofosforados e piretróides), biorreguladores (análogos sintéticos de hormônios de insetos) ou biológicos

(bactérias entomopatogênicas). Esses produtos devem ser recomendados pela OMS e passar por uma rigorosa avaliação da *World Health Organization Pesticed Evaluation Scheme* (WHOPES). O principal larvicida utilizado no Brasil até 2012 era o temefós, agente químico organofosforado. Porém, seu uso contínuo provocou resistência seletiva à população de mosquitos *A. Aegypti*, o que levou o Ministério da Saúde a buscar alternativas incluindo Diflubenzuron, Novaluron (agentes químicos), Pyriprozyfen (biorregulador) e produtos à base de *Bacillus thuringiensis israelenses* (agente biológico).<sup>6,7</sup>

A escolha do larvicida a ser utilizado em cada região ocorre a partir de testes de susceptibilidade e efetividade desse. Entretanto, a despeito da possibilidade de desenvolvimento de resistência decorrente da utilização prolongada do mesmo larvicida, não se realizam avaliações periódicas de sua eficácia.<sup>7</sup>

Diante do cenário apresentado em que há crescente número de casos de dengue e, acima de tudo, maior diversidade de doenças transmitidas pelo mosquito *A. aegypti*, é importante buscar alternativas para prevenir a infecção de mais pessoas. A imunização através de vacinas tem se mostrado a melhor forma de erradicar doenças. Neste caso, a proteção direta se daria ao imunizar as pessoas vacinadas e a proteção indireta ocorreria em função da redução de exposição para toda a população de risco por meio da redução de indivíduos infectados passíveis de transmitir o vírus ao mosquito. Entretanto, conforme exposto, apenas para a dengue há a possibilidade de se realizar essa medida cujos ensaios realizados com a vacina se mostraram eficazes. Portanto, as medidas de prevenção e controle de proliferação ainda são as opções de primeira escolha. Nesse âmbito, quanto maiores as opções de larvicidas, repelentes – seja de uso pessoal ou de ambiente – e inseticidas cujos componentes sejam menos agressivos ao indivíduo e ao ambiente, maior a possibilidade de a população se sensibilizar e apresentar adesão aos programas de prevenção e controle da proliferação do

mosquito. Além disso, o custo para os órgãos públicos e para a população pode ser reduzido com o uso produtos alternativos para combate aos insetos. Nesse sentido, o uso de componentes extraídos de óleos essenciais de plantas medicinais tem sido muito estudado como larvicida e repelente. A guiné (*P. alliacea*) é um arbusto perene, sublenhoso, ereto, com ramos compridos e ascendentes. Suas folhas são alternas, membranosas, afinadas no ápice e estreitas na base. As flores são pequenas e seccionadas, reunidas em inflorescências.<sup>8</sup>

A planta é conhecida por sua capacidade inseticida e possui propriedades citotóxicas.<sup>8,9</sup> A *P. alliacea* é uma planta comumente encontrada em áreas residenciais na América Latina e há relatos de várias crenças populares em que está envolvida, além de achados que realçam suas propriedades medicinais, com atividades antineoplásica, hipoglicemiante, diurética, anti-reumática, anti-helmíntica, antiespasmódica, anti-convulsionante, emenagoga, abortiva, analgésica e anti-térmica, transtornos mentais e afrodisíaca.<sup>8-16</sup> Então, visando esses aspectos, vislumbrou-se a possibilidade de sua capacidade citotóxica atuar sobre o desenvolvimento larvário de *A.*

*egypti*. Desse modo, o objetivo do presente estudo é investigar a capacidade larvicida do extrato de *P. alliacea*, planta conhecida popularmente como Guiné, Erva-de-pipi, Amansa-Senhor, entre outros nomes menos comuns. Os objetivos específicos do presente trabalho envolvem: obter o extrato bruto da *P. alliacea*; testar seu efeito larvicida; quantificar a concentração letal larvicida.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Ovitampas

Foram confeccionadas armadilhas, ovitampas, a partir de garrafas PET cortadas pela metade e pintadas com tinta preta texturizada. Essas dispunham de uma placa de madeira fixa junto à superfície da garrafa de modo a favorecer a oviposição (Figura 1), uma vez que a fêmea tem preferência por realizá-la na parede dos criadouros.<sup>17</sup> As ovitampas continham água com infusão de fermentado de gramínea como forma de atraí-las a criadouros ricos em nutrientes para seus filhotes.



**Figura 1.** Ovitampa feito com garrafa PET pintada com tinta preta texturizada e disposta com uma placa de madeira para oviposição

As ovitrampas foram dispostas próximo a concentrações humanas, dado o hábito antropofílico de fêmeas de *A. Aegypti* porém, suficientemente distantes para que não houvesse vítimas de arboviroses decorrentes deste estudo. O raio mínimo de segurança estabelecido foi de 10 m de distância livre entre domicílio e áreas de instalação de ovitrampas. Estas foram inspecionadas semanalmente, quando foi realizada troca de placas de madeira bem como da infusão atrativa.

## 2.2. Preparo da infusão atrativa

Em estudo realizado por Sant'Ana e colaboradores<sup>18</sup> observou-se a capacidade atrativa da fêmea do *A. aegypti* por infusões preparadas a partir de fermentados de gramíneas. Nesse estudo foram avaliados fermentados aeróbios e anaeróbios e diferentes tempos de fermentação. Encontraram eficácia em fermentados anaeróbios com tempos de fermentação de 15 e de 20 dias.

Com base nesse estudo, optou-se por realizar um fermentado anaeróbio de colônia-capim, *Panicum maximum*. Para o

preparo utilizaram-se proporções similares ao citado estudo de modo que uma massa de 16 g da gramínea, cortada com tamanhos de 5 cm, foi imersa em 2 litros de água em um frasco plástico tampado e submetida a fermentação anaeróbia. O frasco permaneceu hermeticamente fechado por 21 dias em repouso, à temperatura ambiente e ao abrigo da incidência direta de raios solares. Após esse período, o fermentado foi filtrado para retirar a biomassa e a infusão foi utilizada na proporção de 10% nas ovitrampas, de acordo com literatura

## 2.3. Coleta dos ovos

A coleta dos ovos se deu a partir da identificação de sua presença na placa de madeira e sua retirada da armadilha. A placa foi, então, seca com papel toalha e armazenada envolta em papel até o momento em que se realizaram os testes. Foi verificada a autenticidade dos ovos e realizada contagem da quantidade de ovos contidos nessas placas com o auxílio de uma lupa estereoscópica binocular (Digilab®) no aumento de 20 vezes (Figura 2).



**Figura 2.** Imagem dos ovos do mosquito *A. aegypti* aderidos à placa de madeira após sua secagem (aumento: 20x)

#### 2.4. Eclosão e obtenção das larvas

As larvas foram obtidas a partir da eclosão dos ovos coletados. Para tal, as placas de madeira contendo ovos foram submergidas para incubação em bandejas contendo água. Para mais fácil visualização e identificação das larvas em seu primeiro estágio, as bandejas utilizadas eram brancas proporcionando contraste de seus conteúdos. Suas dimensões eram de 28 x 42 cm e 7 cm de profundidade e continham 1,5 L de água. Essa era proveniente da rede pública de abastecimento de água. Foi realizada inspeção a cada 2 h após a exposição dos ovos à água para verificar a ocorrência de eclosões.

Imediatamente após identificadas algumas eclosões as larvas foram alimentadas com ração de gato finamente moída.<sup>19</sup> As larvas foram mantidas neste recipiente em temperatura ambiente e luminosidade natural até atingirem o terceiro estágio, idade alvo dos bioensaios, preconizada para avaliação de suscetibilidade e efetividade da ação larvicida.<sup>20</sup>

#### 2.5. Obtenção das folhas de *P. alliacea*

Folhas frescas da planta foram obtidas de cultivo doméstico na região metropolitana de Belo Horizonte, no período entre maio e setembro de 2016. Após coleta, a espécimes da planta foram submetidos a procedimentos de verificação de autenticidade e certificação da espécie, sendo então mantidas em local fresco e ventilado a temperatura entre 20-25 °C.

#### 2.6. Preparo do extrato vegetal

Após sua coleta, em um prazo máximo de 48 h, as folhas frescas foram lavadas com água destilada e secas com papel toalha. Da biomassa dessas amostras foram separadas alíquotas que foram submetidas a extrações hidro-alcoólicas conforme método de

percolação descrito pela Normas Ramales de Salud Pública 311.<sup>21</sup> A solução hidro-alcoólica tem concentração de 30% v/v. Em uma proporção de 1:4 m/v da biomassa em relação a essa solução, as folhas foram trituradas finamente e mantidas em um percolador ao abrigo da incidência de radiação luminosa, revestido com papel laminado de alumínio. Reservou-se o percolador durante 5 dias para, então, filtrar a mistura através de papel de filtro em funil de vidro, a fim de se obter o extrato bruto. O material sólido foi descartado enquanto o extrato foi armazenado em geladeira, a 4 °C, em frasco âmbar até o momento de sua utilização. Devido a fortes interferências do solvente orgânico utilizado, neste caso o álcool etílico, durante os ensaios, foi necessário realizar-se sua evaporação. Essa foi procedida com o uso de um secador convectivo por fluxo de ar, à temperatura do aquecimento de seu motor (<40 °C). O percolado foi submetido a tal procedimento até que seu volume tivesse reduzido 30%. Após essa redução observou-se conteúdo oleoso na parede do Becker e utilizou-se dimetilsulfóxido (DMSO) para estabilizar a emulsão formada. Essa solução foi armazenada, novamente, em frasco âmbar em geladeira, a 4 °C, até o momento de sua utilização.

#### 2.7. Bioensaios

Os procedimentos dos bioensaios foram realizados conforme regem as diretrizes da OMS – *Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides*.<sup>20</sup> Os objetivos são estabelecer a relação dose-resposta à suscetibilidade do vetor estudado, determinar concentrações letais para mortalidade de 50 e 90% (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>).

Os ensaios foram realizados em triplicata e os dados foram registrados em formulário apropriado, conforme recomendado pelo *guideline* supracitado.

Inicialmente, as larvas foram expostas a



uma alta concentração do extrato (50% v/v), a fim de se averiguar se há atividade larvicida efetivamente.

### 2.8. Preparo das soluções dos extratos

Os extratos obtidos foram diluídos sob agitação em água destilada a concentrações de 1%, 3%, 5%, 10%, 25% e 50% v/v. Para testes nos grupos controle foi preparada uma solução de água destilada e a mesma concentração de DMSO que a solução teste e preparadas as mesmas diluições supracitadas para o extrato para fins de comparação quanto à capacidade larvicida do extrato, além de se verificar fatores interferentes relacionados ao solvente.

### 2.9. Atividade larvicida

Larvas no terceiro estágio do ciclo de desenvolvimento larvário foram selecionadas para serem submetidas aos testes. Elas foram transferidas a recipientes de 15 cm de altura e 2,5 de diâmetro, contendo 40 mL água da rede pública de abastecimento. Foram formados dois grupos contendo, aproximadamente, 25 indivíduos sadios e sem lesões. Um deles serviu de controle e o outro grupo que foi exposto ao potencial larvicida em teste. Esses recipientes proporcionaram uma profundidade de 5 a 10 cm a fim de se evitar mortalidades indevidas.

As larvas tiveram um fotoperíodo de 12 h em ambiente claro, sem incidência direta de raios solares, e 12 h de ambiente escuro. A temperatura a que foram expostas variou de 25 a 28°C, a uma umidade relativa do ar ambiente na ocasião. Os recipientes foram cobertos por microtule a fim de se evitar que algum mosquito adulto emergido escapasse para o ambiente.

Ao todo foram 12 recipientes utilizados para os bioensaios a saber, 2 grupos de 6 diferentes diluições. A mortalidade larvária foi registrada após 12 e 24, 48 e 72 h de exposição. Foram consideradas mortas as larvas que não apresentavam movimentos normais comparadas ao grupo controle ou aquelas que não reagem a estímulo mecânico em sua região cervical.

Durante o período de testes as larvas de ambos os grupos continuaram a ser igualmente alimentadas com ração de gato finamente moída a uma concentração de 10 mg/L. Esse aporte nutricional foi fornecido em suspensão no meio através de uma ponta de espátula a cada dois dias até finalização da contagem de mortes.

### 2.10. Análise estatística

Os percentuais de mortalidade observados durante os testes do potencial larvicida da guiné foram corrigidos utilizando-se a equação de Abbott<sup>20</sup> (Eq.1):

$$\% \text{ mortalidade} = \frac{X-Y}{X} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Em que: X é o número de larvas sobreviventes do grupo controle;

Y é o número de larvas sobreviventes do grupo teste.

A fim de verificar se houve diferença estatisticamente significativa nos testes realizados aplicou-se o teste de análise de variância (ANOVA), e as diferenças de mortalidade entre as médias de

experimentos aos pares foram analisadas com teste de Tukey, ao nível de significância de 95%. As CL50 e CL90 foram calculadas a partir da regressão linear de dosagem *log-probit paper*. Foram obtidas a partir desses dados a equação da reta e o R<sup>2</sup> da dispersão gerada, utilizando o programa Excel (Microsoft Office® 365).

### 3. Resultados

Durante a realização das triplicatas dos testes, foram submetidos a eclosão 1.278 ovos, dos quais obteve-se 1.191 larvas. Dessas, 1.176 larvas foram identificadas estando no terceiro estágio sendo essas submetidas aos bioensaios. Em uma das réplicas, não foi possível alcançar o número de 25 larvas por concentração teste e controle devido à grande discrepância de períodos de desenvolvimento encontrada nas larvas restantes, que se apresentavam ainda no primeiro estágio. Portanto, o número obtido foi de 24 larvas no recipiente. Nas duas outras réplicas, o número desejado de 25 larvas foi atingido. Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 1.

Não houve mortalidade quando o extrato vegetal foi utilizado na diluição de 1% em nenhum dos tempos de contato com as larvas empregados no estudo. A menor mortalidade foi observada em larvas expostas ao extrato na diluição de 3% v/v, já ao menor tempo de exposição (12 horas). Contudo, as diferenças entre mortalidades observadas em todos os tempos de exposição das larvas ao extrato nas diluições de 3% v/v e 5% v/v não se mostraram estatisticamente significativas, especialmente no tempo de 12 horas de exposição, em que os desvios padrões mostraram-se consideravelmente elevados. Em relação a estas duas diluições, as diferenças entre mortalidades passam a ser significativas para exposições por 48 e 72 horas na diluição de 10% v/v. Em todos os tempos de exposição de larvas as concentrações de 25 e de 50% v/v houve 100% de eficiência larvicida.

**Tabela 1.** Atividade larvicida (mortalidade percentual média  $\pm$  desvio padrão) de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da *P. alliacea* sobre o terceiro estágio larval do *A. aegypti*

Concentrações (% v/v)	Tempo de exposição (h)			
	12	24	48	72
1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
3	5,41 $\pm$ 6,11	20,27 $\pm$ 6,74	37,50 $\pm$ 13,67	40,28 $\pm$ 13,8
5	2,70 $\pm$ 4,62	9,46 $\pm$ 8,41	32,43 $\pm$ 0,77	30,56 $\pm$ 3,86
10	32,43 $\pm$ 31,07	43,06 $\pm$ 32,74	86,11 $\pm$ 23,09*	96,97 $\pm$ 4,81*
25	100 $\pm$ 0*	100 $\pm$ 0*	100 $\pm$ 0*	100 $\pm$ 0*
50	100 $\pm$ 0*	100 $\pm$ 0*	100 $\pm$ 0*	100 $\pm$ 0*

Os resultados da análise de regressão linear apontam uma possível correlação positiva entre o percentual de mortalidade e as concentrações (v/v) de extrato bruto etanólico de *P. alliacea*, sendo o coeficiente de regressão encontrado igual a 1 em todos os tempos de exposição das larvas.

Entretanto, devido à larga faixa de concentrações em que se encontram as CL<sub>50</sub> para cada período de exposição, não se pode afirmar haver correlação com elevada precisão. A Tabela 2 apresenta os resultados dessa análise, bem como as CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> encontradas para cada período de exposição.

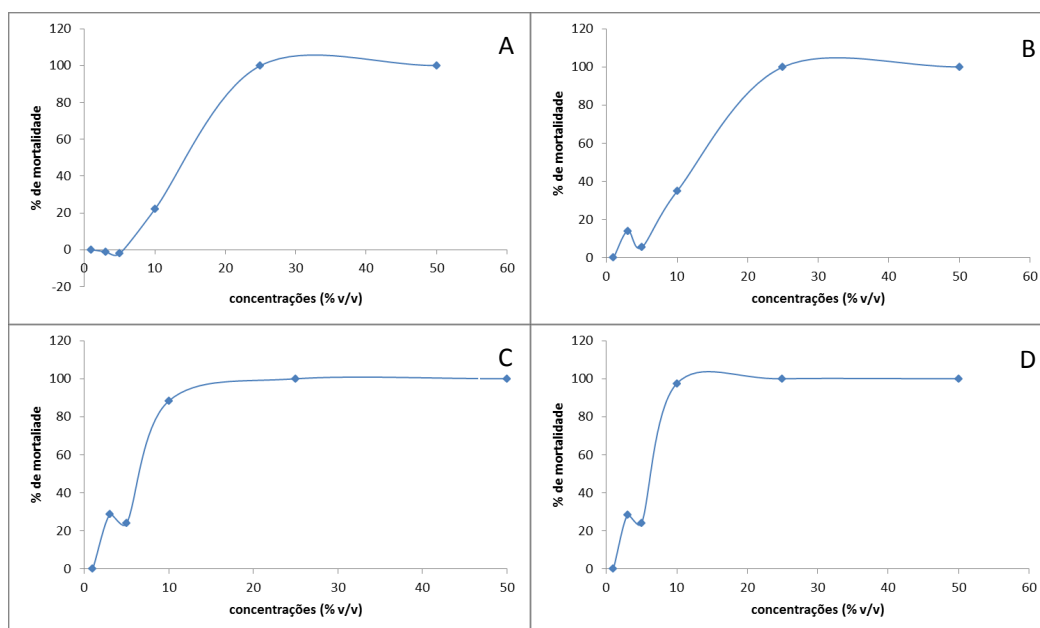


Estes resultados mostram ainda que as concentrações mínimas causadoras de letalidade mediana (CL<sub>50</sub>) e para 90% das larvas (CL<sub>90</sub>) foram cada vez menores a medida que o tempo de exposição das larvas aumenta.

**Tabela 2.** Análise de regressão linear *log-probit paper* da atividade larvicida do extrato hidroalcoólico de *P. allieacea* e sua correlação com o tempo de exposição; R<sup>2</sup> = coeficiente de correlação

Tempo de exposição (h)	Equação da regressão linear	R <sup>2</sup>	CL <sub>50</sub> (%v/v)	CL <sub>90</sub> (%v/v)
12	$y = 0,7907x - 1,5451$	1	13,28243	22,0282
24	$y = 0,6459x - 1,0791$	1	11,52831	21,41511
48	$y = 0,7802x - 0,8986$	1	6,005149	10,02725
72	$y = 0,9274x - 1,1355$	1	5,833006	8,978616

Os gráficos apresentados na Figura 3 mostram os perfis de mortalidade por concentração em cada tempo de exposição estudado. Observa-se que, especialmente, em 24 h, 48 h e 72 h já há mortalidade para as concentrações de 3 e de 5% v/v. Em todas as concentrações superiores a 5% a mortalidade crescente.



**Figura 3.** Perfil de mortalidade das larvas do *A. aegypti* após período de exposição de 12 h (A), 24 h (B), 48 h (C) e 72 h (D) ao extrato hidroalcoólico de *P. allieacea*

#### 4. Discussão

Atualmente, a principal medida de controle do *A. aegypti* está direcionada ao combate às larvas. Inseticidas, em geral, são pouco eficientes, pois, ao contrário do que ocorre com as larvas, o mosquito adulto tem uma mobilidade muito grande. Por outro lado, o controle da larva é facilitado pela possibilidade de fazer estudos para estabelecer sua maior concentração populacional e atuar diretamente nessas áreas.<sup>22</sup>

Os metabólitos secundários de plantas representam um vasto arsenal, em potencial, de compostos com ampla atividade biológica. O controle biológico de insetos e micro-organismos através de extratos e óleos essenciais de plantas vem sendo utilizado há centenas de anos. Entre as inúmeras substâncias ativas contidas na *P. alliacea* o dibenziltrissulfeto (DTS) é o mais importante por sua atividade comprovadamente citotóxica.<sup>23</sup>

O DTS é o constituinte mais abundante encontrado em investigação sobre as propriedades acaricidas das folhas e caule da planta, seguido do dibenzildissulfeto (DDS). Esses foram os dois constituintes do extrato do caule identificados em maiores quantidades, totalizando 63,1 e 32,5% dos compostos benzílicos, respectivamente.<sup>24</sup>

Sendo um dos constituintes químicos mais abundantes da *P. alliacea*, o DTS, a princípio amplamente utilizado por sua atividade inseticida e repelente, vem sendo muito estudado nas últimas décadas por seu potencial terapêutico.<sup>8,19,24,25</sup> Por se tratar de uma pequena molécula com capacidade de interferência em vias de sinalização mitogênicas (MAPKinasas), é responsável por alterações na transcrição gênica, diferenciação, divisão e até apoptose celular, a partir de interações com receptores de membranas<sup>26</sup>. Sendo assim, é possível regular o processo de apoptose ou morte programada de células. Essa característica é

de grande interesse em vários tipos de câncer, nas doenças de Alzheimer e de Parkinson, em doenças auto-imunes como diabetes, na síndrome da imunodeficiência adquirida – AIDS – e linfoma de Hodgkin, condições de rejeição de transplantes de tecidos. É fato notável que, além de ter a capacidade de ativar a apoptose, o DTS apresenta ligação preferencial a receptores de células patogênicas, especialmente cancerígenas.<sup>18</sup>

Urueña e colaboradores (2008) também encontraram múltiplas atividades biológicas *in vitro* da *P. alliacea* consistentes com capacidade citotóxica. Os pesquisadores constataram que ela exerce influência sobre a reorganização do citoesqueleto afetando a morfologia celular, causando fragmentação do DNA (ácido desoxirribonucleico) e reduzindo a capacidade de clonagem. Assim, sua ação sobre células tumorais se torna evidente e favorável.<sup>14</sup>

As atividades citotóxicas dos extratos desta planta também foram demonstradas por Pérez-leal e colaboradores (2006), que evidenciaram sua ação em cinco linhagens celulares tumorais: sistema nervoso central (SNC), próstata, leucemia, cólon e mama. Dentre estas, ação citotóxica considerável (62,2%) foi observada na linhagem de células prostáticas.<sup>15</sup>

Os resultados do presente estudo apontam forte evidência do potencial larvicida do extrato hidroalcoólico de *P. alliacea* sobre o *A. aegypti*. Sendo a substância mais abundante, cuja atividade citotóxica seletiva está associada a células de rápida proliferação, presume-se que o DTS seja também o principal constituinte responsável pela atividade larvicida. Sabe-se que durante o estágio larvário do mosquito ocorre rápida proliferação celular até atingir a idade adulta. Entretanto, tendo-se conhecimento do revestimento cuticular por quitinas do epitélio das larvas, é mais provável que a ação das substâncias ativas da *P. alliacea* tenha ocorrido sobre células mesentéricas intestinais. É conhecido que, em resposta ao efeito tóxico de qualquer

substância, as células mesentéricas produzem toxinas que, dependendo do nível de agressão, causam destruição de suas células.<sup>27</sup> Dessa maneira, a principal causa da morte seria desnutrição por ineficiência intestinal para absorção dos nutrientes necessários ao crescimento e desenvolvimento larvário.<sup>28</sup>

Como meio indireto de confirmar essa interferência sobre o estado nutricional, sugere-se a um delineamento para continuidade dos trabalhos, envolvendo experimentos com exposição de larvas ao extrato vegetal também na presença do fator de regulação de crescimento em insetos (IGR), buscando caracterizar se há uma cinética de competição que possa interferir no desenvolvimento larvário até a idade adulta do mosquito.<sup>29</sup>

Das concentrações testadas, observou-se uma lacuna importante para doses intermediárias a 5 e 25% v/v já que a CL<sub>50</sub> foi encontrada na faixa entre 5,83 a 13,28% v/v. Então, mesmo com um coeficiente de regressão igual a 1, a especificidade e sensibilidade merecem ser exploradas em estudos adicionais, executados com uma maior quantidade de variações das concentrações mais próximas da CL<sub>50</sub> encontrada. Ao menor tempo de exposição das larvas de terceiro estágio (12 horas) e a baixas concentrações do extrato (3, 5 e 10% v/v) os resultados não foram concisos, o que pode-se atribuir, dentre outros, ao fato de que, embora as larvas selecionadas sejam de terceiro estágio, os ovos foram obtidos de oviposições diferentes, o que pode gerar alguma variabilidade na capacidade de resposta das larvas aos efeitos do extrato vegetal.

Outro aspecto a ser considerado é o rendimento do extrato hidroalcoólico da planta. Previamente à definição do método de extração do presente estudo, tentou-se o método de destilação de óleos essenciais pelo uso do extrator *Clevenger*, que tem a coobação como princípio do método de extração. Essa tentativa não foi bem-sucedida até o momento, já que não se obteve óleo em quantidade adequada.

Assumindo, portanto, que o rendimento da extração do óleo na planta seja muito baixo, a utilização do extrato hidroalcoólico é uma alternativa viável.

## 5. Conclusão

A partir dos experimentos do presente estudo, evidenciou-se atividade biológica do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Petiveria alliacea* sobre larvas de *A. aegypti*, mostrando-se um potente larvicida. Sendo a planta muito comumente encontrada em residências no Brasil, é possível que a população a utilize como método simples que contribua para a erradicação do mosquito transmissor das arboviroses, zika, dengue e chikungunya. Para tanto, estudos adicionais devem ser realizados a fim de se estabelecer com maior precisão a toxicidade do extrato, especialmente aos humanos, bem como testar preparações que apresentem viabilidade financeira e tecnológica para aplicação como larvicida de origem natural. Além disso, é necessário estudar em maiores detalhes se o mecanismo principal da toxicidade para as larvas é consequência da influência do extrato da *P. alliacea* sobre a regulação da transdução de sinais em células de seu trato digestivo, que comprometa, por fim, o crescimento e o estado nutricional larvário. Com isso, será possível avaliar com maior precisão a segurança e eficácia do seu uso rotineiro como larvicida.

Os recursos financeiros e infraestrutura para desenvolvimento deste trabalho foram oriundos do Centro Universitário de Belo Horizonte – UNIBH.

## Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> OMS – Organização Mundial de Saúde. Dengue, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/dengue/en/>>. Acesso em: 30 março 2016.
- <sup>2</sup> Brady, O. J.; Gething, P. W.; Bhatt, S.; Messina, J. P.; Brownstein, J. S. Hoen, A. G.;

- Moyes, C. L.; Falow, A. W.; Scott, T. W.; Hay, S. I. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidenc-based consensus. *PLoS Neglected Tropical Disease* **2012**, *6*, e1760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>3</sup> Guy, B.; Barrere, B.; Malinowski, C.; Saville, M.; Teyssou, R.; Lang, J. From research to phase III: preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Vaccine* **2011**, *29*, 7229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>4</sup> Kantor, I. N. Dengue, Zika y Chikungunya, Buenos Aires. *Medicina* **2016**, *76*, 93. [[PubMed](#)]
- <sup>5</sup> CRF-SP – Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. Manual de orientação ao farmacêutico: Dengue, Zika e Chikungunya, 2016. [[Link](#)]
- <sup>6</sup> Monnerat, R.; Dumas, V.; Ramos, F.; Pimentel, L.; Nunes, A.; Sujii, E.; Praça, L; Vilarinhos, P. Evaluation of diferente larvicides for the controlo of *A. aegypti* (Linnaeus) (Diptera: *Culicidae*) under simulated field conditions, Brasília – DF. *BioAssay* **2012**, *7*, 3. [[Link](#)]
- <sup>7</sup> LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública. Avaliação da efetividade de larvicidas para o controle de *A. aegypti* em condições simuladas de campo. Governo do Estado da Bahia, Secretaria de Saúde do Estado da Bahia, Setor de Entomologia **2015**. [[Link](#)]
- <sup>8</sup> Camargo M. T. L. A. Contribuição etnofarmacobotânica ao estudo de *Petiveria alliacea* L. –Phytolacaceae– (“amansa-senhor”) e a atividade hipoglicemiante relacionada a transtornos mentais. *Dominguezia* **2007**, *23*, 21. [[Link](#)]
- <sup>9</sup> Di Stasi, L.C.; Santos, E.G.; Santos, C.M. e Hiruma, A. (1989). Plantas medicinais da Amazonia. São Paulo UNESP. [[Link](#)]
- <sup>10</sup> Lewis, W. and Elvin-Lewis, M.P.F. (1977). Medical botany – Plants effecting man’s health. New York, John Wiley & Sons. [[Link](#)]
- <sup>11</sup> Ratera, E.L. y Ratera, M.O. (1980). Plantas de flora argentina empleadas em medicina popular. Buenos Aires, Ed. Hemisferio Sur. [[Link](#)]
- <sup>12</sup> Chifa, C. y Ricciardi, A.I.A. (2001). “Plantas de uso en medicina vernácula del centro del Chaco argentino, Miscelánea 117. Fundación Miguel Lillo. [[Link](#)]
- <sup>13</sup> Chifa, C. (2005). Plantas medicinales usadas por las comunidades aborígenes del Chaco argentino. Buenos Aires, Universidad Nacional del Nordeste, Estudio Sigma. [[Link](#)]
- <sup>14</sup> Urueña, C.; Cifuentes, C.; Castañeda, D.; Arango, A.; Kaur, P.; Asea, A.; Fiorentino, S. *Petiveria alliacea* extracts uses multiple mechanisms to inhibit growth of human and mouse tumoral cells, Colômbia. *Complementary and Alternative Medicine* **2008**, *8*, 60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>15</sup> Pérez-Leal, R.; García-Mateos, M. R.; Martínez-Vásquez, M.; Soto-Hernández, M. Actividad citotóxica y antioxidante de *P. alliacea* L., México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* **2006**, *12*, 51. [[Link](#)]
- <sup>16</sup> Barbosa, F. S.; Leite, G. L. D.; Martins, E. R.; D’Avila, V. A.; Cerqueira, V. M. Medicinal plant extracts on the control of *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae), Montes Claros – MG. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **2013**, *15*, 142. [[CrossRef](#)]
- <sup>17</sup> Análises do comportamento de oviposição e avaliações na supressão por armadilhas de grávidas de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) 190 fl. Tese (Doutorado), Pós-graduação em Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, (UFMG), 2014. [[Link](#)]
- <sup>18</sup> Sant’ana, A. L.; Roque, R. A.; Eiras, A. E. Characteristics of grass infusions as oviposition attractants to *A. (Stegomyia) (Diptera: Culicidae)*. *Journal of Medical Entomology* **2006**, *43*, 214. [[PubMed](#)]
- <sup>19</sup> Silva, H. H. G.; Silva, I. G.; Lira, K. S. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *A. aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. *Revista de Patologia Tropical* **1998**, *27*, 53. [[CrossRef](#)]
- <sup>20</sup> WHO – World Health Organization. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. *WHO/CDS/WHOPES/GCDPP* **2005**. [[Link](#)]
- <sup>21</sup> NRSP 311. Normas Ramales de Salud Pública, Cuba. Medicamentos de origen vegetal. Extractos y tintuvas. Processos tecnológicos, 1992, pág. 1-13. *In*: Echevarría, A.; Idavoy, D. T. Efecto de um extracto de *P. alliacea* Lin sobre ela crescimento de *Giardia*

lamblia in vitro. *Revista Cubana de Medicina Militar* **2001**, *30*, 161. [[Link](#)]

<sup>22</sup> Howard, A. F. V.; Zhou, G.; Omlin, F. X. Malaria mosquito control using edible fish in western Kenya: preliminary findings of a controlled study. *BMC Public Health* **2007**, *7*, 199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>23</sup> Rodriguez, Z. L.; Pérez, M. E. G.; Duharte, A. B.; Peña, O. G.; Castillo, A. A. La tableta de anamú: um medicamento herbário imunoestimulante. *Medisan* **2004**, *8*, 57. [[Link](#)]

<sup>24</sup> Rosado-Aguilar, J. A.; Aguilar-Caballero, A.; Rodriguez-Vivas, R. I.; Borges-Argaez, R.; Garcia-Vazquez, Z.; Mendes-Gonzalez, M. Acaricidal activity of extracts from *P. alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae), México. *Veterinary Parasitology* **2010**, *168*, 299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>25</sup> Oliveira, F. R. Avaliação antifúngica, farmacognóstica e toxicológica sazonal de *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae). *Revista Brasileira de Farmácia* **2016**, *97*, 91. [[Link](#)]

<sup>26</sup> Williams, L. A. D.; Rosner, H.; Levy, H. G.; Barton, E. N. A critical review of the therapeutic potential of dibenzyl trisulphide isolated from *P. alliacea* L (Guinea hen weed, anamu), Jamaica. *West Indian Medical Journal* **2007**, *56*, 17. [[PubMed](#)]

<sup>27</sup> Arruda, W. Cavasin, G. M., Silva, I. G. Estudo ultra-estrutural do efeito da toxicidade do extrato da *Magonia pubescens* (ST. HIL.) no mesêntero de larvas de *A. aegypti* (L.) (dipetera: culicidae). *Revista de Patologia Tropical* **2008**, *37*, 255. [[Link](#)]

<sup>28</sup> Cabral, S. S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Goiás, Brasil, 2015. [[Link](#)]

<sup>29</sup> Telang, A.; Frame, L.; Brown, M. R. Larval feeding duration affects ecdysteroid levels and nutritional reserves regulating pupal commitment in the yellow fever mosquito *A. aegypti* (dipetera: culicidae). *The Journal of Experimental Biology* **2007**, *210*, 854. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]