



EFEITO OVICIDA E LARVICIDA DO EXTRATO DE *AZADIRACHTA INDICA* SOBRE MOSQUITO *AEDES AEGYPTI*

ANDRÉIA VIEIRA PEREIRA¹, NILTON GUEDES DO NASCIMENTO JUNIOR¹, LUIZ FERNANDO ANNUNZIATA TREVISAN², ONALDO GUEDES RODRIGUES³, EDNALDO QUEIROGA DE LIMA³, MÁRCIA ALMEIDA DE MELO⁴, MARIA DO SOCORRO VIEIRA PEREIRA⁵, LAURA NEY MARCELINO PASSERAT SILANS⁶

¹ Aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela UFCG/CSTR. Av. Universitária, s/n, Bairro Santa Cecília, CEP 58708-110, Patos, PB.

² Aluno(a) da Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária. UFCG/CSTR. Av. Universitária, s/n, Bairro Santa Cecília, CEP 58708-110, Patos, PB.

³ Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, UFCG/CSTR. Av. Universitária, s/n, Bairro Santa Cecília, CEP 58708-110, Patos, PB.

⁴ Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, UFCG/CSTR. Av. Universitária, s/n, Bairro Santa Cecília, CEP 58708-110, Patos, PB.

⁵ Departamento de Biologia Molecular, UFPB. Capus I, Av. Cidade Universitária, s/n, CEP 58059-900, João Pessoa, PB.

⁶ Núcleo de Entomologia e Pesquisa Operacional, da Secretaria de Estado da Saúde da Paraíba, João Pessoa, PB.

RESUMO

O extrato botânico de neem tem sido utilizado para o controle biológico de insetos, ácaros, bactérias e fungos agrícolas, parasitas hematófagos. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do extrato bruto de neem contra o mosquito *Aedes aegypti*, nas formas de ovo, larva. Para isso, foram coletadas folhas de *Azadiractha indica* em árvores originadas em fazendas do município de Patos-PB e, em seguida, preparado o extrato alcoólico utilizado-se 100 g de folhas de neem para cada 1 Litro de álcool etílico (g/v), previamente desidratadas sob centrifugação forçada a temperatura de aproximadamente 45 °C. O extrato alcoólico foi filtrado e colocado em um evaporador rotativo para obtenção do extrato vegetal concentrado (v/v), que em seguida, foi acondicionado sobre refrigeração (4 °C) até seu uso, armazenado em frascos de cor âmbar. Para avaliar a ação ovicida e larvicida sobre o mosquito *Aedes aegypti*, foram utilizadas amostras do mosquito em vários estágios de sua vida biológica a saber: 1000 ovos, 1000 larvas e 40 mosquitos adultos proveniente de população de mosquitos coletados em regiões focos do município de João Pessoa-PB e desenvolvidos no Núcleo de Entomologia da Secretaria de Estado da Saúde da Paraíba (SES). Já as concentrações do extrato utilizadas variaram entre 40:10 a 2,25:47,5. Sendo observado efeito ovicida e larvicida do extrato sobre os mosquitos avaliados.

Palavras-Chaves: Neem, Inseticidas biológicos, *Aedes aegypti*

OVICIDAL AND LARVICIDAL EFFECT OF THE EXTRACT OF *AZADIRACHTA INDICA* ON *AEDES AEGYPTI* INSECT

ABSTRACT

The botanical extract of neem has been used for the biological control of insects, agricultural mites, bacteria and fungus, hematófagos parasites. This study it had as objective to evaluate the effect of the rude extract of the neem against the *Aedes aegypti* insect, in the forms of egg, larva. For this, leaves of *Azadiractha indica* had been collected in trees originated in farms of the city of duck and, after that, chemical preparation 100 the alcoholic extract used leaf g of approximately neem for each 1 Liter of ethyl alcohol (g/v), previously dehydrated under forced centrifugation the temperature of 45 °C. The alcoholic extract was filtered and placed in a rotating evaporator for attainment of the concentrated vegetal extract (v/v), that after that, amber was conditioned on refrigeration (4 °C) until its use, stored in bottles of color. To evaluate the ovicidal and larvicidal action on the *Aedes aegypti*, had been used samples of the mosquito in some periods of training of its biological life namely: 1000 adult eggs, 1000 larvae and 40 mosquitoes proceeding from population of mosquitoes collected in focus regions of the city of João Pessoa and developed in the Nucleus of Entomology of secretary the State the Health of Paraíba (SES). Already the used concentrations of the extract had varied between 40:10 the 2,25:47,5. Being observed ovicidal and larvicidal effect of the extract on the evaluated mosquito.

Keywords: Neem, Biological insecticides, *Aedes aegypti*

INTRODUÇÃO

O dengue é considerado a mais importante arbovirose que afeta o homem em termos de morbidade e mortalidade. Acredita-se que, anualmente, mais de 100 milhões de indivíduos, habitantes de 61 países tropicais de todo o mundo, se infectem com este vírus, e essas epidemias vêm ocorrendo em quase todo o Brasil, desde 1986, incluindo casos de dengue hemorrágico (BARRETO, 2008). Os vírus do dengue são arbovírus, transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes*, e pertencem à família do Flaviviridae. A origem do nome dengue, segundo Vambéry, citado por Siler em 1926, seria árabe arcaica, significando fraqueza. A palavra descreve sintomas da doença ou comportamento praticado em virtude dela. O *Aedes aegypti* pertence à família Culicidae, a qual apresenta duas fases ecológicas interdependentes: a aquática, que inclui três etapas de desenvolvimento – ovo, larva e pupa; e a terrestre, que corresponde ao mosquito adulto (DENGUE, 2007). A duração do ciclo de vida, em condições favoráveis, é de aproximadamente 10 dias, a partir da oviposição até a idade adulta. Diversos fatores influem na duração desse período, entre eles a temperatura e a oferta de alimentos (HONÓRIO & OLIVEIRA, 2001). O *Aede aegypti*, é o principal transmissor da febre amarela urbana e do dengue em todo o mundo. É um aclicídeo de origem africana, levado para as Américas depois do descobrimento.

O Nordeste brasileiro possui uma flora nativa e exótica vasta. Estudos etnobotânicos recentes têm mostrado muitas plantas com propriedades terapêuticas de uso rotineiro (ALBUQUERQUE, 2001). Este fato tem contribuído no conhecimento e na preservação de nossa flora. No entanto, à aplicação de métodos cientificamente controlados são necessários na investigação do potencial fitoterápico destas plantas visando um aproveitamento racional. O neem foi introduzido no Brasil em 1993 na cidade de Goiânia-GO pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Pertencente à família Meliaceae, como a santa-bárbara, ou cinamomo, o cedro, o mogno, etc., o neem é originário do Sudeste da Ásia e é cultivado em todos os países da África, na Austrália e América Latina (MARTINEZ, 2006). Originária de clima tropical, a planta se desenvolve bem em temperaturas acima de 20 °C, em solos bem drenados, não ácidos e altitudes abaixo de 700 m. Tem

diversas aplicações, em especial como anti-séptico, curativo, vermífugo; é colocado em sabões medicinais, cremes, pastas dentais e o seu uso como inseticida se tornou bem conhecido nos últimos 30 anos, quando seu principal composto, a azadiractina, foi isolado (MARTINEZ, 2006). Os inseticidas naturais de neem são biodegradáveis, portanto não deixam resíduos tóxicos nem contaminam o ambiente. Estudos recentes comprovam o efeito das substâncias existentes no neem (*Azadirachta indica*), sobre insetos, pragas que habitam em áreas urbanas, como exemplo da Lepidoptera extremamente sensível as concentrações de 1 a 50 ppm; Heteroptera, Homoptera e Coleoptera sensível a partir de 100 á 600 ppm; Hymenoptera de 100 á 500 ppm; e Orthoptera de 0.001 á 1000 ppm (MORDE & MISBET, 2000). Mostrando-se até certo ponto eficiente, como por exemplo a repelência em mosquitos (evitar picadas) e a eliminação de piolhos e pulgas (de seus hospedeiros); e das larvas de culicidae (em seus criadouros). No entanto o objetivo deste trabalho foi estudar a atividade biológica do extrato alcoólico de *Azadirachta indica* sobre ovos e larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de execução da pesquisa

O experimento foi conduzido nos laboratórios de Ciências Químicas e Biológicas e Laboratório de Parasitologia Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande-UFCG do Centro de Saúde e Tecnologia Rural-CSTR, junto ao laboratório de Ciências Químicas e Biológicas da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG e no Núcleo de Entomologia e Pesquisa Operacional (NEPO), da Secretaria de Estado da Saúde (SES) da Paraíba.

Colheita de folhas de neem (*Azadirachta indica*)

As folhas de neem foram adquiridas de plantio comercial em fazendas comerciais do município de São José de Espinharas sob a supervisão do engenheiro florestal professor Lúcio Valério Coutinho (DEF/CSTR/UFCG). Após a colheita foram postas para secagem em estufa de ventilação forçada a ± 65 °C e em seguida maceradas e acondicionadas em reservatórios de vidro até seu uso.

Obtenção do extrato de neem (*Azadirachta indica*) e determinação de sua concentração

As amostras de folhas de neem foram trituradas, manualmente, macerada e homogeneizada. Será determinada a matéria seca segundo o método descrito por Silva (1990). Uma fração de 100 g do material fresco e macerado, foi colocado em um cartucho de papel de filtro; previamente tarado, costurado e submetida a uma extração com álcool etílico puro e com acetona num sistema Soxhlet. O extrato obtido foi concentrado por evaporação, a uma temperatura de $45 (\pm 5) ^\circ\text{C}$, através de um Evaporador Rotativo MA 120. Em seguida, o extrato Bruto concentrado foi levado a uma estufa de ventilação forçada à $55 ^\circ\text{C}$, por 24 horas, filtrado em cadinho de vidro sintetizado, de porosidade média, e acondicionado em recipientes previamente esterilizados, em capela de fluxo laminar. O extrato bruto filtrado será estocado em ambiente a baixa temperatura ($\pm 4 ^\circ\text{C}$) até seu uso. Destas amostras foram determinadas às respectivas densidades e a concentração final do resíduo de extrato bruto de cada amostra.

Aquisição das amostras do *Aedes aegypti*

Ovos de *Aedes aegypti* foram obtidos em focos naturais da cidade de João Pessoa-PB por agentes da Fundação Nacional de Saúde – FUNASA. Foram mantidos até completarem seu ciclo biológico (ovo, larva, pupa e adultos). Os aquários foram protegidos com caixas teladas durante todo o período experimental. O ciclo biológico foi registrado para que seja confrontado com relatos feitos do ciclo do mosquito em outros estados.

Avaliação da atividade biológica do extrato de neem sobre ovos de *Aedes aegypti*

Os testes *in vivo* usando ovos do mosquito foram realizados após a identificação da integridade dos ovos. Realizado-se dois tratamentos; o primeiro homogenizando-se alíquotas do extrato de Neem a água nas bandejas 20 x 40 dose única, e o segundo pulverizando diretamente os ovos na superfície das palhetas. Em seguida, foram estimados o quantitativo de ovos, eclosões e de adultos formados a partir do início dos tratamentos. Foram utilizados no grupo exposto 450 ml de água para 50 ml do extrato de neem, e 100% na pulverização, já no grupo controle usou-se apenas água destilada.

Avaliação da atividade biológica do extrato de neem sobre larvas de *Aedes aegypti*

Os testes *in vivo* para avaliar a ação do extrato bruto de neem sobre lavas do mosquito, foi realizado após identificação da eclosão de ovos do mosquito nas bandejas e contagem da população das larvas por 100 ml de água coletada. Estas larvas foram separadas com o auxílio de uma pipeta onde serão selecionadas apenas aquelas que se encontram no 3º e início do 4º estágio, sendo separados em copos descartáveis em grupos de vinte. Alíquotas do extrato de Neem foram devidamente homogeneizadas a água nos copos, em doses diferentes e observado durante todo o ciclo larval do mosquito. Ao encerrar o ciclo biológico do mosquito, contou-se a população viva e morta. A temperatura permaneceu no intervalo de no mínimo vinte graus e máxima de 30 graus. Após preparados os copos, coloca-se 1 ml de álcool nos quatro copos de controle, agitando-o com bastão agitador por 30 segundos. Determinação da susceptibilidade ou resistência de larvas aos inseticidas segundo metodologia padronizada pela OMS.

Análise dos dados

A média dos dados observada foi tratada estatisticamente por análises de variância (ANOVA) pelo teste t de Student com nível de significância de 95%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito Ovicida

Foi observado retardo no desenvolvimento em relação ao grupo controle o número de eclosão, após um período de exposição de 48 horas. Ocorrendo a pupação após um período de 240 horas, o que corresponde a 10º dia após o início da exposição. No 12º dia após o início da exposição já se observou a presença de adultos com baixo desenvolvimento em relação ao grupo controle, que no 5º dia após a exposição, todos já haviam se tornado adultos, ocorrendo este retardo também na pulverização (Tabelas 1 e 2). Em estudos semelhante utilizando extrato de Neem, mostram que este apresenta eficácia no que se refere a controle de insetos, e que atualmente, são extraídos e comercializados compostos químicos ativos sobre mais de 200 espécies de insetos, incluindo alguns moluscos (NDU-MU, 1999 apud VIEGAS JUNIOR, 2003). Estes pro-

dutos são muito mais seguros que outros de origem sintética, insistentemente utilizados no controle de insetos, e que podem atuar como veneno sobre o sistema nervoso central do homem (VIVAN, 2005).

Tabela 1. Demonstrado o desenvolvimento biológico do *Aedes aegypti*, fase de ovo até a fase adulta

Grupo controle (H ₂ O)	
Após 24h	Larvas fase 1
Após 48h	Larvas fase 2-3
Após 72h	Larvas fase 3-4
Após 96h	Pupas
Após 120h	Adultos

Tabela 2. Demonstrado desenvolvimento biológico do *Aedes aegypti* submetido ao extrato de neem

Grupo Teste (450 ml de H ₂ O + 50 ml de extrato a 2%)	
Após 240 hs	Início da fase de Pupa
Após 288 hs	Poucos adultos

Segundo Vivan, 2005 a azadiractina além de possuir atividade fagoinibidora atua interferindo no funcionamento das glândulas endócrinas que controlam a metamorfose em insetos, impedindo o desenvolvimento na fase larval. O efeito inibidor de crescimen-

to ocorre em doses de microgramas e é devido à interferência na regulação neuroendócrina de hormônios nas larvas, atuando principalmente sobre os túbulos de Malpigue e no *corpus cardiacum* do inseto (VIEGAS JUNIOR, 2003). Nos *corpus cardiacum*, as azadiractinas reduzem o “turnover” do material neurosecretório, fazendo com que os níveis de hormônios morfo genéticos dos insetos jovens e larvas sejam modificados e concomitantemente decresçam após a ingestão de azadiractina. Desta forma, a metamorfose dos insetos jovens é inibida assim como a reprodução dos adultos, sendo também conhecidos distúrbios ou inibição no desenvolvimento dos ovos (GODFREY, 1994 apud VIEGAS JUNIOR, 2003).

Efeito Larvicida

O extrato não mata instantaneamente as larvas porem as impede de continuarem se alimentando, interferindo no seu desenvolvimento demonstrando ser um regulador de crescimento de insetos, no entanto foi possível observar a eficácia do extrato líquido de neem em todos os tratamentos realizados em doses e concentrações diferentes, ocorrendo mortalidade no período de 24 á 48 horas. Em trabalhos anteriores

Tabela 3. Resultados dos testes com as larvas (cada amostra continha grupos com 20 larvas cada) do mosquito *Aedes aegypti* expostas ao extrato líquido de neem em diferentes diluições (v/v; extrato/água destilada), a temperatura ambiente de 24 °C, temperatura da água de 21 °C e umidade de 82%

Grupos/diluições	TRATAMENTOS REALIZADOS COM EXTRATO LÍQUIDO DE NEEM 0,03 % (mg/mL) - Fração 1															
	GNT		40:10		20:30		10:40		7,5:42,5		5,5:44,5		5:45		2,5:47,5	
Resultados	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M
Total nº larvas expostas	40	-	80*	-	80*	-	80*	-	80*	-	80*	-	80*	-	80*	-
Após 24:00 horas	40		0,0	80	0,0	80	0,0	80	27	63	37	43	33	47	48	32
Eficácia larvas mortas após 24:00 horas %	100	0,0	0,0	100	0,0	100	0,0	100	33,75	66,25	46,25	53,75	41,25	58,75	60	40
Após 48:00 horas	40	0,0	0,0	80	0,0	80	0,0	80	16	64	23	57	25	55	39	41
Eficácia larvas mortas após 48:00 horas %	100	0,0	0,0	100	0,0	100	0,0	100	20	80	28,75	71,25	31,25	68,75	48,75	51,25

Tabela 4. Resultados dos testes com as larvas (cada amostra continha grupos com 20 larvas cada) do mosquito *Aedes aegypti* expostas ao extrato líquido de neem em diferentes diluições (v/v; extrato/água destilada), a temperatura ambiente de 24 °C, temperatura da água de 21 °C e umidade de 82%

Grupos/diluições	TRATAMENTOS REALIZADOS COM EXTRATO LÍQUIDO DE NEEM 2,0% (mg/mL) - Fração 2															
	GNT		2,5:47,5		1,25:48,75		5:45		1:49		2,5:47,5		1,25:48,75		1:49	
Resultados	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M
Total nº larvas expostas	40	-	80*	-	80*	-	80*	-	80*	-	80*	-	80*	-	80*	-
Após 24:00 horas	40	0,0	13	67	14	66	0,0	80	63	17	10	70	21	59	60	20
Eficácia larvas mortas após 24:00 horas %	100	0,0	16,25	83,75	17,5	82,5	0,0	100	78,75	21,25	12,5	87,5	26,25	73,75	75	25
Após 48:00 horas	40	0,0	2	78	4	76	0,0	80	40	40	6	74	13	67	32	48
Eficácia larvas mortas após 48:00 horas %	100	0,0	2,5	97,5	5	95	0,0	100	50	50	7,5	92,5	16,25	83,75	40	60

realizados com o extrato de neem, mostram que as larvas tratadas podem se desenvolver normalmente até uma próxima muda, mais não conseguem completá-la (GROSSCURT, et al 1978; TUNAZ; UYGUN, 2004). Devido a presença da azadiractina as larvas se tornam incapazes de deixar a cutícula precedente morrendo durante ou logo após a ecdise (ESTRELA et al. 2005). Vários estudos têm sido realizados nos últimos anos para elucidar as modificações no mecanismo de controle endócrino induzidas pela azadiractina, que provocam os efeitos observados na inibição de crescimento. Estes estudos permitiram identificar modificações nos níveis de hormônios morfogenéticos como a ecdisona (NDUMU, 1999 apud VIEGAS JUNIOR, 2003). Foi identificada uma acentuada similaridade estrutural entre a ecdisona e a azadiractina, entretanto não está claro se os efeitos sobre estas taxas hormonais são diretos ou indiretos (VIEGAS JUNIOR, 2003). Algumas evidências indicam que a azadiractina pode bloquear a liberação de várias substâncias localizadas no sistema nervoso central, assim como a formação de quitina, um polissacarídeo que forma o esqueleto de insetos, além de impedir a comunicação sexual, causa esterilidade e diminui a mobilidade intestinal (VIVAN, 2005).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo indicam a significância da utilização de extratos naturais no controle entomológico do *Aedes aegypti* e na avaliação de meios alternativos economicamente viáveis. Neste contexto podemos concluir que o extrato bruto *Azadirachta indica* do apresenta ação ovicida e larvicida *in vivo*, sobre cepas do mosquito em seu ambiente natural resultados semelhantes vistos no experimento performed em laboratório, sob condições controladas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, U. P. The use of medicinal plants by the cultural descendants of african people in Brazil. *Acta Farma. Bonaerense*, v. 20, p. 139-44, 2001.

ALZOREKY; N. S.; NAKAHARA, K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology*, v. 80, p. 223-230, 2003.

BARRETO M. L.; TEIXEIRA M. G. (2008). Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. *Estudos Avançados*, v. 22, n. 64, 2008. DENGUE fever climbs the social ladder [editorial]. *Nature*, v. 448, p. 734-5, 2007.

ESTRELA J. L. V. ; GUEDES R. N. C.; MALTHA C. R. A.; MAGALHÃES L. C.; FAZOLIN M. Toxicidade de amidas análogas à piperina para *Spodoptera Frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), *Magistra*, v. 17, n. 2, p. 69-75, 2005.

GROSSCURT, A. C. Diflubenzuron: some aspects of its ovicidal and larvicidal mode of action and an evaluation of its practical possibilities. *Pesticide Science*, Oxford, v. 9, p. 373-386, 1978.

HONÓRIO, N. A.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, E. R. Frequência de larvas e pupas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em armadilhas, Brasil. *Revista de Saúde Pública*. n. 35, v. 4. p. 385-91, 2001.

MARTINEZ S. S. O Nim – *Azadirachta indica* – um Inseticida Natural, IAPAR, 2006.

MORDE, A. J.; NISBET, A. J. Azadiractina do nim, *Azadirachta indica*: sua ação contra insetos. *Anais da Sociedade Entomológica Brasileira*, v. 29, p. 615-632, 2000.

MULLA, M. S. The future of insect growth regulators in vector control. *Journal of the American Mosquito Control Association*, Fresno, v. 11, n. 2, p. 269-273, June 1995.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Neem: a tree for solving global problems. *National Academy Press, Washington, DC*. 1992. 139p.

TUNAZ, H; UYGUN, N. Insect Growth Regulators for Insect Pest Control. *Turkish Journal of agriculture and Forestry*, Ankara, v. 28, p377-387, 2004.

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

VIVAN, MARILAC PRISCILA. Uso do cinamomo (*Melia azedarach*) como alternativa aos agroquímicos no controle do carrapato bovino (*Boophilus microplus*). Florianópolis, 2005. 72p. *Dissertação* (Mestrado em Agroecossistemas) – Curso de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Universidade Federal de Santa Catarina.