

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

MICHELLINE DO VALE MACIEL

CONTRIBUIÇÃO PARA O CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL:
ATIVIDADE INSETICIDA DE PLANTAS SOBRE *Lutzomyia longipalpis*
(LUTZ E NEIVA, 1912).

FORTALEZA-CE
2009

MICHELLINE DO VALE MACIEL

CONTRIBUIÇÃO PARA O CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL:
ATIVIDADE INSETICIDA DE PLANTAS SOBRE *Lutzomyia longipalpis*
(LUTZ E NEIVA, 1912).

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e Sanidade de Carnívoros, onívoros e aves.

Orientadora: Prof.(a). Dr.(a). Selene Maia de Morais

CONTRIBUIÇÃO PARA O CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL:
ATIVIDADE INSETICIDA DE PLANTAS SOBRE *Lutzomyia longipalpis*
(LUTZ E NEIVA, 1912).

Michelline do Vale Maciel

Tese Aprovada em: ____/____/____

Conceito: _____

Nota obtida: _____

Banca Examinadora

Prof. (a). Dr. (a). Selene Maia de Moraes
Orientadora

Prof. Dr. Francisco Marlon Carneiro Feijó
Universidade Federal Rural do Semi-Árido

Prof. (a) Dr. (a). Claudia Maria Leal Bevilaqua
Universidade Estadual do Ceará

Dr.(a) Elizabeth Ferreira Rangel
Fiocruz

Prof. Dr. Edy Sousa de Brito
EMBRAPA – Agroindústria Tropical

Prof. (a) Dr. (a) Nilza Dutra Alves
Universidade Federal Rural do Semi-Árido

“Does anybody want to know what's on my mind?”

Marie Fredriksson & Per Gessle

Aos meus pais

Aos meus irmãos

À minha filha

Ao Sr. Raimundo Nonato Sousa

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu **DIVINO PAI ETERNO**, que sempre me carregou nos braços todos estes anos, deixando apenas as suas pegadas na areia.

À professora Dra. Selene Maia de Moraes, por sua consideração, orientação e dedicação a este trabalho.

À professora Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua, que considero uma mãe, por tanta dedicação, compreensão e amizade oferecida todos estes anos, e pela co-orientação deste trabalho.

Aos professores do PPGCV, em especial a Dra Fátima por sempre me considerar um de seus alunos.

A todos os integrantes do Laboratório de Química em Produtos Naturais, que contribuíram com trabalho e conhecimentos, em especial ao Davi, por toda amizade e paciência.

Dizem que a amizade é o bem mais valioso do ser humano. Assim, gostaria de agradecer a **TODOS** os colegas e estagiários do Laboratório de Doenças Parasitárias, que juntos fazemos a família LABODOPAR, o laboratório mais animado do PPGCV. Obrigada pela ajuda na realização desse trabalho e pela força durante este período, principalmente, Lorena Mayana, Iara Tersia, Fernanda Rondon, Marina Parisi, Vitor Luz e Sthenia Santos por todo auxílio, dedicação, carinho. Em especial, a Cícero Costa por toda a amizade, paciência e dedicação e Ana Lourdes Vasconcelos por todo auxílio fornecido em minha vida profissional e pessoal, a vocês, o meu **MUITO OBRIGADA**.

Às minhas amigas Renata Barros, Rafaella Albuquerque e Roberta Rocha, pelos sorrisos, conselhos, por me escutarem e todo auxílio nestes quatro anos.

À Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, e a TODOS os funcionários do Núcleo de Controle de Vetores (NUVET), que me receberam sempre de braços abertos. À Lindemberg Caranha e Ricristhi Gonçalves, por todo apoio nesta batalha.

Em especial, ao Sr. Raimundo Nonato Sousa, por todos os conselhos, pelo carinho, as viagens, os ensinamentos e pela paciência. Sem ele, a realização deste meu sonho, não teria sido possível.

Aos professores que considero meus amigos Francisco Marlon Carneiro Feijó e Nilza Dutra Alves, pelo grande apoio e incentivo em minha vida profissional, desde a minha graduação.

À Adriana Albuquerque, Cristina e Fred da Secretaria do PPGCV, que em muito me ajudaram durante todo o tempo de mestrado e doutorado, e aos funcionários, César, André e Celmar.

Agradeço também a toda minha família, em especial aos meus pais, Antônio Pereira Maciel e Maria Suely do Vale Maciel, por serem toda a força do meu viver, o meu alicerce. Gostaria de deixar registrado aqui, que Deus me deu o maior presente de todos. A minha família. Mãe, Pai, obrigada pelo apoio, pelo amor, por serem tão especiais.

À minha filha Larissa Emanuelle Pereira do Vale Maciel, por ser o meu amor maior.

Aos meus irmãos, Myllena do Vale Maciel e Michel do Vale Maciel por todo incentivo, e estarmos sempre unidos em todos os momentos das nossas vidas.

Aos meus avós paternos e maternos (*in memoriam*). Em especial, às minhas avós Maria Julieta de Oliveira Vale e Maria Ferreira Maciel, que eu “perdi” no início e no

final desta caminhada, respectivamente. E que não puderam estar presentes no meu hoje, mas que tenho certeza, que olham por mim lá de cima. E que me ensinaram que Deus é o nosso pai verdadeiro.

Aos meus tios, em especial Paulo Moisés Ferreira Maciel, por todo apoio.

A meus padrinhos, Aldo (*in memoriam*) e Célia, pela força.

Ao Pe. Alfredo por acreditar em mim, pelo carinho e ajuda em tantos momentos da minha vida.

A minha “irmã de coração”, Dayanne Farias de Paula, que muito me ajudou em todos os aspectos da minha vida, e a Faguino pela amizade e convivência.

À minha grande amiga Ana Kelen Felipe Lima, cujos poderes de “fada madrinha” estão sempre me auxiliando quando eu mais preciso. E ao “Cláudio” que eu já considero como um amigo.

Aos meus amigos do peito, Leonardo Praxedes e Irapuan Brandão, por tudo que fizeram por mim, e pela grande amizade que nasceu entre nós.

Aos meus amigos Consuelo e Josenilson pelos momentos de descontração.

Às minhas queridas amigas da colônia mossoroense, Suzana e Tânia por TUDO.

Aos meus amados “internautas”, Alexandre Silveira, Juca Alves e Edvânio Pontes, por todos os momentos, de alegria, descontração, auxílio e pela amizade conquistada apesar da distância.

Ao meu amigo-irmão, Raul Nogueira Santos, por ser minha fortaleza quando mais necessito, não importa a hora, o momento, nem o tempo.

A aquele que me mostrou o que é o AMOR. E que mesmo que não tenhamos vencido as guerras e batalhas, nem as pedras do caminho, *estará sempre em meu coração.*

A Dra Ana Maria Barros Leal, pelo apoio psicológico.

A CAPES, pelo financiamento da bolsa durante o período de quatro anos.

RESUMO

A Leishmaniose visceral é atualmente um problema urbano e de saúde pública. *Lutzomyia longipalpis* é o vetor mais importante no Américas, e é certamente a principal espécie de flebotomíneo que possui todos os critérios estabelecidos para competência vetorial, realçando aqueles que são considerados essenciais como: antropofilia, distribuição espacial coincidindo com casos humanos da doença, e infecção natural por *Leishmania (L.) infantum chagasi*. Modelos matemáticos referentes a três métodos de controle sugerem que o uso de inseticidas e a vacinação dos cães são as melhores soluções para o problema quando comparado à eutanásia dos animais soropositivos. Neste trabalho, os efeitos dos óleos essenciais de *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus globulus*, *Coriandrum sativum*, *Azadirachta indica* e *Lippia sidoides* foram avaliados sobre as fases de ovo, larva e adulto de *Lu. longipalpis*. Os insetos foram coletados no município de Sobral no Estado do Ceará, Brasil. Cinco tratamentos com diferentes concentrações foram realizados, utilizando três controles negativos, com água destilada e dimetilsulfóxido (3%)/ Tween 80 (3%), e controle positivo com cipermetrina (0,196mg/ml). Os testes foram realizados em potes de plásticos revestidos com gesso e utilizando uma ração de fezes de coelho e folha de mandioca. Os ovos, larvas e adultos foram aspergidos com os óleos. As larvas eclodidas foram observadas por 10 dias consecutivos e as larvas tratadas até a pupação. A mortalidade dos insetos foi observada após 24, 48 e 72 horas. O óleo essencial de *E. staigeriana* foi o mais efetivo sobre ovos do inseto (CE₅₀: 3,6 (2,28 - 5,23) mg/ml). O óleo de *L. sidoides* foi o mais efetivo sobre as larvas de *Lu. longipalpis* (CE₅₀: 0,25 (0,20 - 0,31) mg/ml). Os óleos de *E. staigeriana* e *L. sidoides* foram os mais eficazes sobre os insetos adultos do vetor, apresentando CE₅₀ nos valores de 0,59 (0,37 - 0,82) mg/ml e 0,54 (0,42 - 0,68) mg/ml, respectivamente. Os constituintes majoritários dos óleos foram (+) limoneno, Z-citral e E-citral (*E. staigeriana*); β-citronelal (*E. citriodora*); 1,8-cineol (*E. globulus*), 6-Dimethylocta-2,7-dien-6-ol (β-linalol) (*C. sativum*), triterpenos (*A. indica*) e Timol (*L. sidoides*) respectivamente. Estes resultados demonstram as boas possibilidades do uso de plantas como uma alternativa ao controle de *Lu. longipalpis*.

PALAVRAS-CHAVE: Flebotomíneo, plantas inseticidas, leishmaniose

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is currently a public health and urban health problem. *Lu. longipalpis* is the most important visceral leishmaniasis vector in the Americas, and is certainly the only sand fly species that meets all the established criteria for vectorial competence, highlighting those that are considered essential, like anthropophilia, spatial distribution coinciding with human cases of the disease, and natural infection by *Leishmania (L.) infantum chagasi*. Mathematical models of the three methods of control suggest that insecticide spraying and dog vaccination are better solutions to the problem than the destruction of serologically positive dogs. In this work, the effects of *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus globules*, *Coriandrum sativum*, *Azadirachta indica* and *Lippia sidoides* oils were evaluated on egg, larva and adult phases of *Lu. longipalpis*. The insects were collected in the municipality of Sobral in the State of Ceará, Brazil. Five treatments with different concentrations were performed along with three negative controls, distilled water and dimethylsulfoxide (3%)/Tween 80 (3%), and a positive control, cypermethrin (0.196 mg/ml). The tests were carried out in plastic pots internally coated with sterile plaster and filled with a substrate made of rabbit feces and crushed cassava leaves. The eggs, larvae and adults were sprayed with the oils. The hatched larvae were counted for 10 consecutive days and observed until pupation. Insect mortality was observed after 24, 48 and 72 hours. The essential oil of *E. staigeriana* was the most effective on the eggs of the insect (CE₅₀: 3.6 (2.28 – 5.23) mg/ml). The essential oil of *L. sidoides* was the most effective on the larvae of *Lu. longipalpis* (CE₅₀: 3.6 (2.28 – 5.23) mg/ml). The oils of *E. staigeriana* and *L. sidoides* were the most effective on the adult insects of the vector, presenting CE₅₀ in the values of 0.59 (0.37 – 0.82) mg/ml and 0,54 (0,42 - 0,68) mg/ml, respectively. The major constituents of the oils were, (+) limonene, Z-citral and E-citral (*E. staigeriana*); β-citronellal (*E. citriodora*); 1,8-cineole (*E. globulus*), 6-Dimethylocta-2,7-dien-6-ol (β-linalool) (*C. sativum*), triterpenes (*A. indica*) and Thymol (*L. sidoides*), respectively. These results demonstrate good potential for the use of plants as an alternative control strategy for *Lu. longipalpis*.

KEYWORDS: Sandfly, insecticidal plants, leishmaniasis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotografia de <i>Eucalyptus staigeriana</i> (folhas)	31
Figura 2 – Estrutura química do Limoneno.....	31
Figura 3 – Fotografia de <i>Eucalyptus citriodora</i> (folhas)	32
Figura 4 – Estrutura química do Citronelal	33
Figura 5 – Fotografia de <i>Eucalyptus globulus</i> (folhas e flores)	34
Figura 6 – Estrutura química do Eucaliptol	34
Figura 7 – Fotografia de <i>Coriandrum sativum</i> (folhas e frutos)	35
Figura 8 – Estrutura química do Linalol	35
Figura 9 – Fotografia de <i>Azadirachta indica</i> (folhas e fruto)	36
Figura 10 – Estrutura química da Azadirachtina	37
Figura 11 – Fotografia de <i>Lippia sidoides</i> (folhas)	38
Figura 12 – Estrutura química do Timol	38
Figura 1 - Estruturas químicas dos principais constituintes presentes em óleos essenciais repelentes de insetos	50
Figura 2 - Estrutura química da azadirachtina	52
Figura 3 – Estrutura química da rotenona	53
Figura 4 – Estrutura química da piretrina I	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fontes vegetais, classes químicas ativas e princípios ativos de plantas inseticidas	46
Tabela 2 – Efeito de atividade inseticida de algumas plantas sobre mosquitos potencialmente vetores de zoonoses	48
Tabela 1 – Composição percentual relativa do óleo essencial de folhas de <i>Lippia sidoides</i>	72
Tabela 2 – Composição percentual relativa do óleo essencial dos frutos secos de <i>Coriandrum sativum</i>	73
Tabela 3 – Eficácia (média \pm desvio padrão) do óleo essencial de folhas de <i>Lippia sidoides</i> e do óleo essencial dos frutos secos de <i>Coriandrum sativum</i> sobre ovos de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	73
Tabela 4 – Eficácia (média \pm desvio padrão) do óleo essencial de folhas de <i>Lippia sidoides</i> e do óleo essencial dos frutos secos de <i>Coriandrum sativum</i> sobre larvas de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	74
Tabela 5 – Eficácia (média \pm desvio padrão) do óleo essencial de folhas de <i>Lippia sidoides</i> e do óleo essencial dos frutos secos de <i>Coriandrum sativum</i> sobre adultos de <i>Lutzomyia longipalpis</i> após 24 horas de observação	74
Tabela 6 – Eficácia (média \pm desvio padrão) do óleo essencial de folhas de <i>Lippia sidoides</i> e do óleo essencial dos frutos secos de <i>Coriandrum sativum</i> sobre adultos de <i>Lutzomyia longipalpis</i> após 48 horas de observação	75
Tabela 7 – Eficácia (média \pm desvio padrão) do óleo essencial de folhas de <i>Lippia sidoides</i> e do óleo essencial dos frutos de <i>Coriandrum sativum</i> sobre adultos de <i>Lutzomyia longipalpis</i> após 72 horas de observação	75
Table 1 – Relative percentage composition of leaf essential oils of <i>Eucalyptus</i> species	94
Table 2 – Efficacy (mean percentage \pm SD) of three species of <i>Eucalyptus</i> on the eggs of <i>Lutzomyia longipalpis</i>	95
Table 3 – Efficacy (mean percentage \pm SD) of three species of <i>Eucalyptus</i> on the larvae of <i>Lutzomyia longipalpis</i>	96
Table 4 – Efficacy (mean percentage \pm SD) of three species of <i>Eucalyptus</i> after 24 hours on adults of <i>Lutzomyia longipalpis</i>	97

Table 5 – Efficacy (mean percentage \pm SD) of three species of <i>Eucalyptus</i> after 48 hours on adults of <i>Lutzomyia longipalpis</i>	98
Table 6 – Efficacy (mean percentage \pm SD) of three species of <i>Eucalyptus</i> after 72 hours on adults of <i>Lutzomyia longipalpis</i>	99
Tabela 1 – Percentual de eficácia do óleo da semente de <i>Azadirachta indica</i> sobre ovos de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	113
Tabela 2 – Percentual de eficácia do óleo da semente de <i>Azadirachta indica</i> sobre larvas de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	113
Tabela 3 – Percentual de eficácia do óleo da semente de <i>Azadirachta indica</i> sobre adultos de <i>Lutzomyia longipalpis</i> após 24, 48 e 72 horas	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BOD	- Biochemical Oxygen Demand (demanda bioquímica de oxigênio)
°C	- Grau Celsius
CAPES	- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CE ₅₀	- Concentração efetiva capaz de inibir 50% da eclosão dos ovos, do desenvolvimento das larvas e promover a mortalidade de 50% dos insetos adultos.
DDT	- Diclorodifeniltricloroetano
DDT	- Diclorodifeniltricloroetano
DMSO	- Dimetilsufóxido
dp	- Desvio padrão
g	- Grama
h	- Hours (hora)
H ₂ SO ₄	- Ácido sulfúrico
LABODOPAR	- Laboratório de Doenças Parasitárias
LTA	- Leishmaniose tegumentar americana
LV	- Leishmaniose visceral
LVC	- Leishmaniose visceral canina
m	- Meter (metro)
mg	- Milligram (miligrama)
min	- Minute (minuto)
ml	- Milliliter (mililitro)
mm	- Millimeter (milímetro)
OMS	- Organização Mundial de Saúde
RH	- Relative humidity (umidade relativa)
SESA	- Secretaria Estadual de Saúde
µg	- Microgram (micrograma)
µl	- Microliter (microlitro)
VL	- Visceral Leishmaniasis (leishmaniose visceral)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Leishmaniose visceral	19
2.1.1 Generalidades	19
Flebotomíneos	19
Controle da doença	21
2.2 Plantas com propriedades inseticidas	24
2.3 Óleos essenciais	25
Monoterpenos	27
Triterpenos	28
2.4 <i>Eucalyptus</i> spp	30
<i>Eucalyptus staigeriana</i>	30
<i>Eucalyptus citriodora</i>	32
<i>Eucalyptus globulus</i>	33
2.5 <i>Coriandrum sativum</i>	34
2.6 <i>Azadirachta indica</i>	36
2.7 <i>Lippia sidoides</i>	37
3 JUSTIFICATIVA	39
4 HIPÓTESE	40
5 OBJETIVOS	41
6 CAPÍTULOS	42
CAPÍTULO 1: Atividade inseticida de plantas sobre dípteros vetores de zoonoses	42
CAPÍTULO 2: Atividade inseticida dos óleos essenciais de <i>Lippia sidoides</i> e <i>Coriandrum sativum</i> sobre <i>Lutzomyia longipalpis</i>	58
CAPÍTULO 3: Atividade inseticida do óleo de <i>Eucalyptus</i> spp sobre o flebotomíneo <i>Lutzomyia longipalpis</i>	76
CAPÍTULO 4: Atividade inseticida <i>in vitro</i> do óleo de sementes de <i>Azadirachta indica</i> sobre <i>Lutzomyia longipalpis</i>	100
7 CONCLUSÕES	115
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose visceral (LV) ou “calazar” está entre as principais endemias no mundo, apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo na Ásia, Europa, Oriente Médio, África e nas Américas. Na América Latina a doença já foi descrita em 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na região Nordeste. No Estado do Ceará os primeiros casos foram registrados em 1934, provenientes do município de Sobral. Atualmente a doença encontra-se em processo de expansão, tanto em magnitude, como geograficamente. É endêmica no Ceará com registro de surtos freqüentes. Inicialmente sua ocorrência era limitada às áreas rurais. No período de 1986 a 2006, a maior incidência da doença foi em 2006 com 789 casos confirmados, e taxa de incidência de 9,6 casos por 100.000 habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

O agente etiológico da LV é um protozoário tripanosomatídeo do gênero *Leishmania*, parasito intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear, com forma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e forma aflagelada ou amastigota nos tecidos dos vertebrados. No Brasil, a doença é causada pela *Leishmania (infantum) chagasi*, e ocorre através da picada de fêmeas de insetos dípteros pertencentes à família Psychodidae, tendo como principal vetor a *Lutzomyia longipalpis* (MONTEIRO et al., 2005) e mais recentemente, *Lu. cruzi*, Mangabeira 1938, foi incriminado como vetor no Brasil (GALLATI et al., 1998). *Lu. longipalpis* tem hábitos alimentares ecléticos e se adapta facilmente as condições do peridomicílio (XIMENES et al., 2007).

O objetivo do programa de controle da LV é reduzir os casos fatais, o grau de morbidade e diminuir os níveis de transmissão da doença. No entanto, as estratégias utilizadas não conseguiram atingir a eficácia esperada. Modelos matemáticos, referentes a três métodos de controle, sugerem que o sacrifício dos cães sorologicamente positivos, é muito menos provável de resolver o problema da LV do que a borrifação com inseticida ou a vacinação dos cães (DYE, 1996). Além disso, a borrifação como medida de controle vetorial é mais bem aceita pelos proprietários de cães do que a eutanásia de seus animais. Entretanto, a resistência adquirida e a poluição ambiental, devido à aplicação repetida de inseticidas sintéticos persistentes, têm levado a um aumento no interesse por novos produtos químicos.

Neste contexto, a triagem de produtos naturais tem recebido a atenção de pesquisadores em todo o mundo, mas parece ser particularmente importante, no âmbito da saúde pública, para os países em desenvolvimento. Como muitas doenças são transmitidas por insetos (i.e. malária, dengue, febre amarela, leishmaniose, doença de Chagas, etc) são

endêmicas em países do Terceiro Mundo, a busca de inseticidas e repelentes de origem botânica tem sido impulsionada pela necessidade de descobrir novos produtos que sejam eficazes, seguros e menos dispendiosos do que aqueles utilizados atualmente (DE PAULA, 2004). Ademais, estes produtos têm boa aceitabilidade e biodisponibilidade (YAGHOOB-ERSHADI et al., 2006).

Metabólitos secundários de plantas são conhecidos por suas propriedades inseticidas, em muitos casos as plantas têm uma história de uso para remédios caseiros e ainda para matar ou repelir insetos (BROUSSALIS et al., 1999). O incentivo às investigações sobre interações plantas/insetos nas últimas décadas desvenda o uso potencial dos metabólitos de plantas ou aleloquímicos como agentes com esta finalidade (PAVELA, 2004). Sabe-se que uma propriedade que decorre da interação dos constituintes químicos dos óleos essenciais, com o meio ambiente é a sua utilização como inseticida natural (SILVA, 2007). Compostos específicos isolados de extratos/óleos essenciais de plantas são testados para fumigação (RAJENDRAM; SRIRANJINI, 2008). Dentre as diversas famílias descritas na literatura como possuidoras de atividade inseticida e/ou repelente, encontram-se as plantas das famílias Meliaceae (VIEGAS – JÚNIOR, 2003), Rutaceae (EZEONU et al., 2001), Graminae (ANSARI e RAZDAN, 1995), Labiatae (PATHAK et al., 2000) e Verbenaceae (CARVALHO et al. 2003). Estes dados são um incentivo à pesquisa científica de plantas destas famílias no controle do vetor da LV, *Lu. longipalpis*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose visceral

2.1.2 Generalidades

A LV é uma zoonose de grande importância para a saúde pública e para a medicina veterinária. Apresenta ampla distribuição mundial, atingindo 88 países (SILVA et al., 2007), sendo considerada a forma mais grave das leishmanioses, por ser fatal quando não tratada. Estima-se que aproximadamente 500.000 casos e 59.000 mortes ocorrem todos os anos devido a esta forma de leishmaniose (WHO, 2002). A doença é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, parasito que infecta um grande número de espécies de mamíferos, incluindo seres humanos (GRAMICCIA ; GRADONI, 2005). No Brasil, o agente etiológico é *L. chagasi* (GONTIJO; MELO, 2004).

A LV é doença reemergente, e encontra-se em expansão geográfica e sofrendo processo de urbanização em várias regiões do Brasil (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006). Sua transmissão já foi reportada em 19 dos 27 estados brasileiros e até o momento, em todas as regiões do país (RANGEL; VILELA, 2008). Na década de 90, aproximadamente 90% dos casos notificados de LV ocorreram na região Nordeste. À medida que a doença se expandiu para as outras regiões e atingiram áreas urbanas e periurbanas, esta situação veio se modificando e, no período de 2000 a 2002, a região Nordeste apresentou redução para 77% e em 2003 para 65% dos casos do país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Assim, com a expansão da área de abrangência da doença e o aumento significativo do número de casos, a LV passou a ser considerada pela OMS uma das prioridades dentre as doenças tropicais (GONTIJO; MELO, 2004).

Flebotomíneos

No Novo Mundo, a principal forma de transmissão do parasito para o homem e outros hospedeiros mamíferos é através da picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, denominados genericamente por flebotomíneos, e conhecidos popularmente por “cangalha”, “cangalhinha”, “birigui”, “tatuira”, “mosquito palha” ou “asa dura” (BRASIL, 2003). O gênero *Lutzomyia* é responsável pela transmissão das leishmanioses nas Américas, existindo 350 espécies catalogadas, distribuídas desde o sul do Canadá até o norte da Argentina. Destas, pelo menos 200 ocorrem na bacia amazônica (GILL

et al., 2003). *Lu. longipalpis* (LUTZ & NEIVA, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) é o vetor primário da LV canina e humana no Novo Mundo, e mais recentemente, *Lu. cruzi*, MANGABEIRA 1938, foi incriminado como vetor no Brasil (GALLATI et al., 1998). Os flebotomíneos estão adaptados ao meio urbano onde encontram condições para proliferação, reprodução e transmissão da doença. Estes insetos perpetuam-se em diferentes biótipos e nenhuma outra espécie de flebotomíneo entre nós é tão sinantrópica quanto *Lu. longipalpis* (GONTIJO; MELO, 2004).

As fêmeas adultas vivem em torno de 20 dias e somente estas são hematófagas. O sangue ingerido auxilia na maturação dos ovários (REY, 1991). Quando se alimentam de sangue de um hospedeiro infectado, os vetores ingerem as formas amastigotas que no tubo digestivo do inseto, passam por diversas modificações e evoluem para a forma promastigota infectante. Quando o vetor se alimenta de um novo hospedeiro, as formas promastigotas são regurgitadas com a saliva no tecido cutâneo, completando o ciclo da doença (MORENO; ALVAR, 2002). Estes insetos são pequenos, medindo de 1 a 3 mm de comprimento. Possuem o corpo revestido por pêlos e são de coloração clara, sendo facilmente reconhecidos pelo seu comportamento, ao voar em pequenos saltos e pousar com as asas entreabertas.

O ciclo biológico de *Lu. longipalpis* se processa no ambiente terrestre e compreende quatro fases de desenvolvimento: ovo, 4 estágios de larva, pupa e adulto. Após a cópula as fêmeas colocam seus ovos sobre um substrato úmido no solo e com alto teor de matéria orgânica, para garantir a alimentação das larvas. Os ovos eclodem geralmente de 7 a 10 dias após a postura. As larvas se alimentam e desenvolvem-se em média entre 20 a 30 dias, de acordo com as condições do meio ambiente e em condições adversas, as larvas de quarto estágio podem entrar em dipausa, que é a parada no desenvolvimento até um período favorável que permita o retorno a sua completa evolução com sucesso. Após este período as larvas de quarto estágio se transformam em pupas, que são mais resistentes às variações de umidade do que os ovos e as larvas. O período pupal em condições favoráveis tem duração média de uma a duas semanas. O desenvolvimento de ovo a inseto adulto decorre num período de aproximadamente 30 a 40 dias dependendo da temperatura. As fêmeas de flebotomíneos necessitam de sangue de vertebrados para a maturação de seus ovários, daí a importância para a transmissão de agentes patógenos. Os machos sugam apenas sucos vegetais ou açúcares, o que a fêmea também costuma fazer antes ou após a alimentação sanguínea (RANGEL; LAISON, 2003). *Lu. longipalpis* tem hábitos crepusculares e noturnos, podendo picar tanto no domicílio como fora dele (DEANE; DEANE, 1962). Em situação de laboratório, o inseto se alimenta a qualquer hora do dia (SHERLOCK; SHERLOCK, 1972).

Controle da Doença

A introdução do agente etiológico a partir do reservatório doméstico, em áreas infestadas pelo vetor parece ser o fator facilitador da urbanização da LV em cidades de médio e grande porte (CAMARGO-NEVES et al., 2004). O padrão de transmissão da doença pode se modificar devido às alterações ambientais e, conseqüentemente, à adaptação do vetor, associado às migrações da população (BEJARANO et al., 2002).

Em relação aos reservatórios, os hospedeiros silvestres de *L. chagasi* até agora conhecidos são as raposas e os marsupiais. No ciclo doméstico, o cão é considerado um importante hospedeiro e fonte de infecção para os vetores, sendo um dos alvos nas estratégias de controle. A Organização Mundial de Saúde preconiza como medidas de controle: a eutanásia dos cães portadores da doença juntamente com medidas de controle ambiental visando a eliminação dos vetores e atenção ao homem, através do diagnóstico precoce dos casos e o tratamento com antimoniais pentavalentes (GONTIJO; MELO, 2004). Entretanto a eliminação dos cães soropositivos tem sido difícil tanto por razões éticas, como sociais (MORENO; ALVAR, 2002). O impacto da remoção e eliminação dos animais soropositivos tem sido discutido por se mostrar trabalhosa e duvidosa. Modelos matemáticos têm demonstrado que a eliminação dos cães positivos tem sido menos eficaz que outras medidas de controle (DYE, 1996).

O controle da LV também envolve educação das comunidades em áreas de risco, a fim de evitar a formação de áreas favoráveis ao desenvolvimento de *Lu. longipalpis* (WERNECK et al., 2007). Medidas simples como manter as áreas urbanas limpas, eliminação correta dos resíduos orgânicos, eliminação das fontes de umidade, evitar a entrada de animais domésticos dentro das casas, entre outros, contribuem para prevenir ou reduzir a proliferação do vetor (BRASIL, 2003). Como medidas preventivas para o homem e a população canina, o Ministério da Saúde recomenda o uso de medidas de proteção pessoal, saneamento ambiental, controle da população canina errante, uso de telas em canis individuais e coletivos, uso de coleiras impregnadas com deltametrina (4%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). No entanto, em países em desenvolvimento da América do Sul, o controle da LV é claramente mais complexo do que nos países do Mediterrâneo. Existe uma série de fatores ecológicos, epidemiológicos e socioeconômicos que podem reduzir o impacto dos programas de controle da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003). O Programa Nacional de Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil prioriza regiões nas quais a incidência da doença vem

umentando. Apesar da epidemiologia da doença ser conhecida no Brasil o controle não foi satisfatoriamente alcançado (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006).

As diversidades epidemiológicas dos vários distritos afetados, a capacidade adaptativa do vetor e fatores ainda não conhecidos, podem contribuir para a expansão da doença. Limitações nas medidas de controle incluem dificuldades na eliminação dos reservatórios, medidas insuficientes de controle vetorial, principalmente em relação a alterações ambientais, e alto custo, ambos, financeiros e sociais (OLIVEIRA et al., 2008). A situação atual da LV no Brasil pode ser vista como um paradoxo: os aspectos mais importantes da doença são conhecidos, mas o controle desta doença ainda não foi conseguido. Já que as estratégias atuais não têm sido capazes de prevenir a expansão geográfica, além do aumento da incidência e da letalidade da doença. Existe, portanto, a necessidade de uma melhor definição das áreas prioritárias, mas também da implementação de um sistema de monitoramento das atividades dirigidas para o controle e vigilância epidemiológica, o que poderia permitir melhor avaliação do programa de controle nas diversas regiões do Brasil (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006).

Teoricamente, as estratégias de controle propostas hoje em dia, parecem adequadas, mas na prática a prevenção de doenças transmissíveis por vetores biológicos é bastante difícil. Um dos fatores de risco mais importantes na aquisição da leishmaniose é a exposição ao inseto vetor (DIETZE et al., 1997). O papel do controle de vetores em saúde pública é prevenir a infecção mediante o bloqueio ou redução da transmissão, sendo seus principais objetivos: manejar os problemas existentes, como surtos, epidemias, alta mortalidade e alta morbidade; prevenir epidemias ou a re-introdução de doenças e reduzir os fatores de risco ambiental da transmissão (BRAGA et al., 1999). O melhor método para diminuir doenças causadas por vetores é a redução do contato homem-vetor. Os principais métodos de controle para flebotomíneos são: controle químico, modificações ambientais, controle biológico (SHARMA e SINGH, 2008) e uso de coleiras com inseticidas (KILLICK-KENDRICK et al., 1997). O controle químico de flebotomíneos é feito através da borrifação de inseticidas residuais, e outras maneiras de proteção, como o uso de repelentes e mosquiteiros (KISHORE et al., 2006). Inseticidas residuais também são borrifados nas paredes do domicílio, além de galinheiros, chiqueiros e estábulos (CABRERA, 1999).

O controle químico por meio da utilização de inseticidas de ação residual é a medida de controle vetorial recomendada no âmbito da proteção coletiva. Esta medida é dirigida apenas para o inseto adulto e tem como objetivo evitar e/ou reduzir o contato entre o inseto transmissor e a população humana, e conseqüentemente, diminuir o risco de transmissão da

doença. Em áreas com registro do primeiro caso autóctone de LV humano, imediatamente após a investigação entomológica e em áreas com transmissão moderada e intensa, se a curva de sazonalidade do vetor for conhecida, a aplicação do inseticida de ação residual deverá ser realizada no período do ano em que se verifica o aumento da densidade vetorial. Caso contrário, o primeiro ciclo de tratamento deverá ser realizado ao final do período chuvoso e o segundo, 3 a 4 meses após o primeiro ciclo. Os produtos mais empregados atualmente no controle a esses vetores são a cipermetrina, na formulação pó molhável (PM) e a deltametrina, em suspensão concentrada (SC) usados nas doses, de 125 mg. i.a./m² e de 25 mg. i.a./ m² respectivamente. Na zona rural, o controle químico será realizado em todos os domicílios da localidade onde ocorreu a transmissão. Na zona urbana, deverá ser considerada a área previamente delimitada conforme classificação epidemiológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O uso de DDT na Índia para controlar os vetores da malária resultou numa diminuição significativa no número de casos de LV, indicando que um controle vetorial eficaz, pode ser alcançado (GUERIN et al., 2002). Entretanto, O uso contínuo de inseticidas químicos é problemático, pois muitas espécies chave têm-se tornado resistentes a estas substâncias, enquanto espécies secundárias estão correndo riscos de dizimação dos seus predadores naturais, em virtude da ação neurotóxica inespecífica dos produtos utilizados. A resistência adquirida e a poluição ambiental, devido à aplicação repetida de inseticidas sintéticos persistentes, têm levado a um aumento no interesse por novos produtos químicos (VIEGAS-JÚNIOR, 2003). O primeiro caso de resistência a inseticida foi reportado em Bihar, Índia, onde *Phlebotomus papatasi* sobreviveu a exposição ao DDT na dose de 4 e 8 % (KAUL et al., 1978). DHIRMAN e MITTAL (2000) compararam a susceptibilidade de *P. papatasi* a inseticidas e observaram alta resistência deste inseto ao DDT e ao Dieldrin a 4%.

Diante do exposto, faz-se necessário o desenvolvimento de novos inseticidas, com monitoramento e avaliação da eficácia destes produtos (COSTA, 2008). Neste contexto, muitos trabalhos têm sido realizados avaliando a atividade biológica de componentes de plantas contra um grande número de patógenos e artrópodes e diversas exemplos de plantas têm sido descritas com potencial inseticida na literatura (SHAALAN et al., 2005).

2.2 Plantas com propriedades inseticidas

Produtos naturais com atividade biológica são fontes principais de novas substâncias químicas úteis no desenvolvimento de moléculas com potencial utilização na farmacologia, agronomia e outros campos de conhecimento humano (MACÍAS et al., 2008).

O Brasil é um país de grande riqueza botânica, com 56 mil espécies de plantas das 256 mil existentes no mundo, possuindo um grande potencial como fonte de compostos biologicamente ativos provenientes de plantas (NAKATANI et al., 2004). A necessidade de métodos mais seguros no controle de insetos tem estimulado a busca de novos princípios ativos de vegetais (VIEGAS-JÚNIOR, 2003). Neste contexto, muitos trabalhos têm sido realizados avaliando a atividade biológica de componentes destes vegetais contra um grande número de patógenos e artrópodes e diversas plantas têm sido descritas com potencial inseticida (SHAALAN et al., 2005). Atualmente, os inseticidas naturais têm sido cada vez mais requisitados, apresentando inúmeras vantagens quando comparados ao emprego de inseticidas sintéticos, pois são obtidos de recursos renováveis e rapidamente degradados, não deixando resíduos em alimentos e no ambiente. No entanto, o desenvolvimento destes compostos requer tempo e também um estudo sistematizado que preencha requisitos, tais como seletividade contra inimigos naturais, baixa toxicidade em mamíferos, biodegradabilidade e ausência de fitotoxicidade, além dos requisitos econômicos para que sua produção em alta escala seja viável (VIEIRA et al., 2001).

As plantas com atividade inseticida podem causar diversos efeitos sobre os insetos, como repelência, inibição de oviposição e da alimentação, alterações no sistema hormonal, causando distúrbios no desenvolvimento, deformações, infertilidade e mortalidade nas diversas fases dos insetos. A extensão dos efeitos e o tempo de ação são dependentes da dosagem utilizada, de maneira que a morte ocorre nas dosagens mais elevadas e os efeitos menos intensos e mais duradouros nas dosagens menores (ROEL, 2001).

Entretanto, a toxicidade de uma planta contra insetos, não a qualifica necessariamente como um inseticida. Vários aspectos devem ser levados em consideração tais como: forma de extração e conservação dos extratos, eficácia em baixas concentrações, ausência de toxicidade para mamíferos e animais superiores, fácil obtenção, manipulação e aplicação e viabilidade econômica (VIEGAS-JÚNIOR, 2003). Entre as limitações ao uso de extratos vegetais no campo, podem ser apontadas a falta de dados, principalmente no Brasil, relacionados à fitotoxicidade, à persistência e aos efeitos sobre organismos benéficos. Além disso, o isolamento de princípios ativos e a concentração em diferentes partes vegetais, também

devem ser mais pesquisados. Ainda devem ser avaliados a disponibilidade de matéria-prima, a seleção de solventes, bem como técnicas de conservação e aplicação dos produtos (COSTA et al., 2004).

Várias são as estratégias capazes de determinar a atividade de produtos de origem natural contra insetos e o seu isolamento. De uma maneira geral, podem ser utilizados extratos brutos de plantas preparados com diversos solventes (hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e água). Em seguida, os extratos ativos são fracionados através dos métodos cromatográficos e as frações obtidas são retestadas, repetindo-se o processo até a obtenção do(s) composto(s) ativo(s) (NOGUEIRA; PALMÉRIO, 2001). A presença de mais de um produto ativo nos inseticidas vegetais é considerada por GALLO et al. (2002) como uma vantagem, já que reduz a possibilidade de desenvolvimento de resistência pelos insetos. No entanto, as variações na composição dos extratos dificultam o estabelecimento da relação entre o efeito e o ingrediente ativo, bem como entre o efeito e a concentração utilizada. A eficiência de extratos de sementes de Nim são atribuídas ao composto azadiractina, mas existem outras substâncias nos extratos que têm atividade biológica e que atuam conjuntamente (MORDUE LUNTZ; NISBET, 2000).

Os óleos essenciais de plantas também têm sido pesquisados, por possuírem componentes odoríferos e metabólitos secundários que podem ser separados dos tecidos das plantas através de destilação (ISMAN, 2000). Vários óleos essenciais foram descritos por produzir efeito agudo tóxico contra insetos (HUMMELBRUNNER; ISMAN, 2001). Compostos específicos isolados de extratos/óleos essenciais de plantas já foram testados para fumigação (RAJENDRAM; SRIRANJINI, 2008).

2.3 Óleos essenciais

Óleos essenciais são combinações voláteis, naturais, complexas, caracterizadas por um odor forte, formados por metabólitos secundários de plantas aromáticas. São misturas naturais que podem conter aproximadamente 20–60 componentes em concentrações diferentes. Caracterizam-se por apresentar 2 ou 3 constituintes majoritários que compõem 20-70% do óleo e o constituinte majoritário, em geral, é o responsável pela atividade do óleo (BAKKALI et al., 2008). São produtos obtidos tradicionalmente de parte de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água, também conhecida por hidrodestilação. Também são chamados de óleos essenciais, etéreos ou essências. Essas denominações derivam de algumas de suas características físico-químicas, como, por exemplo, a de serem geralmente líquidos de

aparência oleosa a temperatura ambiente, advindo daí a designação de óleo. Com relação à localização, podem ser encontrados em estruturas especializadas, como os pêlos glandulares e células parenquimáticas. Podem estar estocados também nas flores (laranjeira), folhas (eucalipto) cascas de caule (canela), rizomas (gingibre), frutos (erva-doce), dentre outros (SPITZER, 2004).

Os óleos essenciais têm sido largamente estudados devido as suas propriedades antibacterianas, antifúngicas e inseticidas (SILVA et al., 2003). O óleo essencial de uma planta pode conter diversos constituintes em diferentes quantidades (RAJENDRAN; SRIRANJINI, 2008). Variações na composição dos óleos essenciais podem ocorrer devido a fatores como variação sazonal, diferenças na região de origem, método de extração adotado e a parte da planta utilizada (MULLER-RIEBAU et al., 1997). Entre as amplas variedades de efeitos biológicos que estas substâncias de origem natural podem ter, um interesse maior tem sido dado aos metabólitos secundários das plantas (MACÍAS et al., 2008). A resposta dos insetos aos metabólitos secundários de plantas pode variar muito, e a sensibilidade de espécies de insetos pode variar para uma mesma substância (REGNAULT-ROGER, 1997).

A grande maioria destes óleos essenciais é constituída de derivados terpenóides – mono- e sesqui-terpenoides. Terpenóides são substâncias derivadas de unidades do isopreno. Os esqueletos carbonados dos terpenóides são formados pela condensação de um número variável de unidades pentacarbonadas (unidades isopropênicas). Assim de acordo com a quantidade de átomos de carbono os terpenóides podem ser: isopreno (unidade básica – 5 carbonos), monoterpénóides (10 átomos de carbonos), sesquiterpenóides (15 átomos de carbono), diterpenóides (20 átomos de carbono), sesterpenos (25 átomos de carbono), triterpenóides (30 átomos de carbono), tetraterpenóides (40 átomos de carbonos), polisoprenóides (n átomos de carbono) (ALVES, 2001).

Terpenos constituem a classe mais variada estruturalmente de produtos naturais de plantas. São comercialmente importantes devido a sua larga aplicação na indústria farmacêutica, de perfumes, como inseticidas e agentes antimicrobianos (MARTIN et al., 2003). Embora muitos deles sejam associados ao metabolismo primário, outros são tipicamente metabólitos secundários de plantas. Um amplo número de terpenóides incluindo mono e sesquiterpenos possuem moléculas bioativas que apresentam importante papel na interação das plantas com outros organismos (AHARONI et al., 2006). Os óleos essenciais são constituídos principalmente de monoterpénos e os sesquiterpenos. Diterpenos são encontrados apenas nos óleos essenciais extraídos com solventes orgânicos (SPITZER, 2004). Na maioria dos casos relatados, só os principais componentes dos óleos essenciais como:

terpineol, eugenol, timol, carvacrol, carvone, geraniol, linalol, citronelal, nerol, safrol, eucaliptol, limoneno, cinamaldeído são avaliados, pois geralmente, atribui-se a estes constituintes o efeito biológico do óleo (IPEK et al., 2005).

Monoterpenos

Os monoterpenos representam 90% das moléculas que constituem os óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008). As propriedades naturais de alguns monoterpenos fazem destes compostos guias do desenvolvimento de inseticidas seguros, efetivos e biodegradáveis. Testes prévios com monoterpenos sobre insetos demonstraram suas atividades biológicas sobre ovos, fumigante e toxicidade por contato (RICE; COATS, 1994). Estas substâncias podem ser tóxicas pela penetração na cutícula do inseto, pela via respiratória e por via digestiva (PRATES et al., 1998).

Diversos trabalhos têm sido realizados com óleos essenciais sobre insetos, sendo a maioria compostos por monoterpenos. Trabalhos realizados com larvas do mosquito *Ochlerotatus caspius* com os óleos de *C. sativum*, *Petroselinum crispum*, *Pimpinella anisum*, e *Thymus vulgaris*, demonstraram que o óleo de sementes de *P. crispum* e *P. anisum*, bem como, dos frutos de *C. sativum* e inflorescência de *T. vulgaris* apresentaram potencial larvicida e que o constituinte majoritário de cada óleo testado demonstrou ser o responsável por esta atividade (KNIO et al., 2008). Constituintes químicos isolados presentes nos óleos de *Eucalyptus* spp, como o 1,8 cineole (eucaliptol) atuou sobre ovos do piolho *Pediculus humanus capitis* obtendo $67 \pm 1,7\%$ de eficácia na dose de $1\text{mg}/\text{cm}^2$ (YANG et al., 2004). A ação do eucaliptol sobre machos e fêmeas de *Musca domestica* e *Chrysomya megacephala* obtiveram CL_{50} de 118; 177 e 197 e $221\mu\text{g}/\text{mosca}$ respectivamente. A aplicação tópica sobre adultos comprovou que os machos de *M. domestica* foram mais susceptíveis do que as fêmeas (SUKONTASON et al., 2004).

YANG et al., (2005) testaram 5 óleos essenciais sobre adultos do inseto *Culex pipiens quiquefasciatus*, observando que o óleo essencial da laranja (*Citrus sinensis*), foi o mais efetivo. A análise química deste óleo mostrou que o citral e o α -citral foram os constituintes majoritários do óleo de *C. sinensis* (69,27%). O citral isoladamente e o óleo de *C. sinensis* apresentaram CL_{50} de 0,0133 e 0,0012% respectivamente. O composto 1,8-cineol utilizado sobre os adultos, machos e fêmeas com 10 dias de idade do coleóptero *Tribolium confusum*, apresentaram CL_{50} de $7,0\mu\text{L}/\text{L}$ para ambos os sexos. O mesmo experimento realizado com machos e fêmeas com 40 dias de idade mostrou diminuição da CL_{50} para 4,8 e $5,1\mu\text{L}/\text{L}$

respectivamente (STAMOPOULOS et al., 2007). Testes utilizados com o Timol revelaram que a CE_{50} deste composto sobre *Musca domestica* foi de 0,22 μmol /mosca (0,20 – 0,24) (GRODNITZKY; COATS, 2002). O estudo da atividade fumigante de vários compostos químicos sobre o besouro *Rhyzopertha dominica* concluiu que o linalol foi um dos mais eficazes, com 100% de mortalidade na dose de 0,1 μL /720mL (ROZMAN et al., 2007)

É importante ressaltar que a avaliação da toxicidade de contato em insetos com monoterpenos puros revelou diferenças entre eles. A mortalidade para cada monoterpeno diferiu entre concentrações e tempo de exposição (SOSA; TONN, 2007). Embora alguns monoterpenóides sejam usados comercialmente, o mecanismo de ação destas substâncias ainda não está bem elucidado (GRODNITZKY; COATS, 2002). Uma das hipóteses cogitadas seria a inalação dos óleos pelos espiráculos dos insetos (YANG et al., 2005). Outra hipótese seria a de que os monoterpenos podem atuar sobre outros sítios vulneráveis, como o citocromo P450 (LEE et al., 2001). Certos monoterpenos provenientes de óleos essenciais *in vitro* são inibidores competitivos da acetilcolinesterase (MIYAZAWA et al., 1997), mas esta ação pode não estar correlacionada com a toxicidade *in vivo* para insetos (ISMAN, 2000). Atualmente, sabe-se que insetos adultos são mais susceptíveis do que os ovos e as larvas à fumigação com monoterpenos, isso deve-se as diferenças entre as taxas respiratórias destes estágios (WINKS; HYNE, 1997 citado por RAJENDRAM; SRIRANJINI, 2008).

Triterpenos

Com relação aos triterpenóides, um grande número de novos triterpenos com atividade biológica vem sendo isolado a partir de extratos de sementes e folhas do Nim (LUO et al., 1999).

Os limonóides são tetranotriterpenóides e talvez os maiores representantes dessa classe com substâncias inseticidas, também conhecidas como meliacinas. A denominação limonóides origina-se no seu sabor amargo. Tais substâncias foram isoladas de plantas pertencentes às famílias Meliaceae, Rutaceae e Cneoraceae. Sua rota biossintética em plantas prevê como precursor um triterpeno que no final, dá origem aos tetranotriterpenóides pela perda de 4 átomos de carbono do precursor original. Os limonóides são conhecidos pelo fato de apresentarem atividade contra insetos, seja interferindo no seu crescimento, seja pela inibição de sua alimentação (SIMÕES et al., 2000).

Os limonóides representam o nível máximo na seqüência de produção de terpenóides em plantas que normalmente não são atacadas por insetos. No nível inferior, os monoterpenos

de estrutura relativamente simples como o limoneno, o mirceno, exercem funções de proteção às plantas que os produzem. A grande maioria de trabalhos que trata de terpenóides superiores, indica como atividade destes compostos a inibição ou retardamento do crescimento, danos na maturação, redução da capacidade reprodutiva, supressão de apetite, podendo levar os insetos predadores à morte por inanição ou toxicidade direta (VIEGAS-JUNIOR, 2003).

Existe uma grande diversidade de limonóides isolados da família Meliaceae, entre eles azedarachtinas, sendaninas e trichilinas, além dos que apresentam o anel C-seco, como a azadiractina que é o principal representante. Estes podem ser encontrados em todos os tecidos das plantas, no entanto, os órgãos podem individualmente produzir diferentes tipos de limonóides (NAKATANI et al., 1995). Azadiractina e outros compostos bioativos do Nim podem exercer múltiplas ações afetando a alimentação, crescimento e desenvolvimento de patógenos e seus vetores (MULLA; TIANYUN, 1999). Também têm sido identificados produtos derivados e produtos análogos do composto azadiractina (RAMJI et al., 1998). Dos nove isômeros de azadiractina descritos, azadiractina A e B representam a maior concentração de metabólitos presentes nas sementes e são consideradas importantes para a comercialização da planta como biopesticida (SIDHU et al., 2003). A azadiractina A, isolada pela primeira vez por Butterworth e Morgan, e um grupo de outros limonóides estão intimamente associados à ação supressora de apetite ou inibidora de crescimento em insetos de *A. indica* e têm sido extensamente estudados, com o objetivo de conhecer a química, biossíntese, toxicologia e o potencial inseticida deste grupo de compostos naturais (VIEGAS-JÚNIOR, 2003).

Uma das inovações no controle de insetos são as substâncias que afetam o seu crescimento e desenvolvimento. Estas substâncias tem sido denominadas “Reguladoras de Crescimento”, do inglês “Insect Growth Regulators (IGRs)” e a azadiractina é uma delas. De acordo com o modo de ação, podem ser: inibidoras da síntese de quitina ou substâncias que interferem na ação dos hormônios dos insetos (TUNAZ; UYGUN, 2004).

A azadiractina se concentra nos frutos, aumentando ao longo do desenvolvimento, sendo máxima no amadurecimento e durante o armazenamento, podendo sofrer variações de acordo com o modo de colheita, armazenamento, teores de umidade, presença de luz e temperatura (SCHMUTTERER, 1990). Não necessariamente age matando diretamente o inseto como a maioria dos inseticidas, mas atua sobre sua reprodução e crescimento ou como toxina direta (ROY; SARAF, 2006). Ao que se sabe, um dos mecanismos de ação mais comuns da azadiractina é através da inibição da síntese de quitina necessária para o

desenvolvimento dos mosquitos (CASSIER; PAPILLON, 1991). Esta substância também pode causar interferência no sistema neuroendócrino dos insetos, manifestando desordem hormonal em diferentes etapas do processo de crescimento do inseto, afetando os hormônios da ecdise e o hormônio juvenil. Assim, os insetos não são capazes de se desenvolver, o que resulta em deformações do tegumento, asas, pernas e outras partes do corpo (MARTINEZ, 2000).

Diante do exposto, verifica-se que muitas pesquisas têm sido realizadas com óleos de plantas, e algumas substâncias tem se mostrado promissoras. No entanto, apesar da comprovação de vários efeitos biológicos dos óleos essenciais, poucos estudos têm sido realizados sobre a estabilidade destes óleos e seus constituintes (RAJENDRAM; SRIRANJINI, 2008).

2.4. *Eucalyptus* spp

O eucalipto é uma árvore de grande porte, originária da Tasmânia. O cultivo desta planta se dá pela importância de sua madeira como combustível, na fabricação de papel e para extração do óleo essencial. As folhas são coriáceas, opostas e apresentam dois tipos morfológicos. Nos ramos jovens são largas e peltadas, porém, as dos ramos maduros são mais largas, lanceoladas ou em forma de foice. Os botões florais são solitários formados pelo crescimento conjunto de pétalas e sépalas gerando frutos operculados (MATOS et al., 2004). Esta árvore é uma das mais plantadas no mundo inclui mais de 700 espécies e pertence à família Myrtaceae (MENUT et al., 1995). Diversas propriedades terapêuticas já foram atribuídas ao gênero *Eucalyptus*, dentre estas, a atividade larvicida sobre culicídeos (NATHAN, 2006; CHENG et al., 2008), inseticida sobre coleópteros (BRITO et al., 2006), além da ação repelente sobre *Phlebotomus papatasi* (YAGHOUBI-ERSHADI et al., 2006). No Brasil, as principais espécies de eucaliptos que tem seus óleos essenciais comercializados são: *Eucalyptus staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus*. (VITTI; BRITO, 2003).

Eucalyptus staigeriana

E. staigeriana (Figura 1) é uma árvore de tamanho médio, podendo chegar a 22 m de altura, com copa reduzida e espalhada. No Brasil o seu plantio é feito basicamente para produção do óleo essencial. As folhas apresentam cheiro característico cítrico, proveniente do seu principal componente, o citral. Está adaptada a zonas climáticas quentes e subúmidas, a

solos pobres e bem drenados, matas ou florestas abertas. Sua cultura é destinada basicamente à obtenção de óleos essenciais para perfumaria sendo a madeira vendida como lenha (VITTI; BRITO, 2003). Seus principais constituintes obtidos por cromatografia gasosa são dl-limoneno (Figura 2) (24,78%), E-citral (14,99%), Z-citral (11,36%), alfa-terpinoleno (10,78%), acetato de geranila (7,61%), 1-felandreno (3,32%), alfa-pineno (3,37%), gama-terpineno (2,36%), beta-pineno (2,30%), beta-mirceno (0,97%), entre outros em menor percentual (CHAGAS et al., 2002). A atividade anti-helmíntica *in vitro* sobre ovos e larvas de *Haemonchus contortus* do óleo essencial desta planta foi descrita por MACEDO (2008) e carrapaticida por CHAGAS (2002). A atividade inseticida do citral foi comprovada sobre *Culex pipiens* (YANG et al., 2005).



Figura 1: *Eucalyptus staigeriana*.

Fonte: <http://www.augustus-oils.ltd.uk/pics/euclptus.jpg>

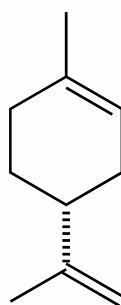


Figura 2: Estrutura química do limoneno

Fonte: <http://z.about.com/d/chemistry/1/0/8/p/Limonene-2D-skeletal.jpg>

Eucalyptus citriodora

E. citriodora (Figura 3) é uma árvore de porte médio, que ocorre em vários tipos de solo, em florestas abertas juntamente com outras espécies, sendo facilmente diferenciada em função do forte cheiro de citronelal (Figura 4) de suas folhas. É conhecida popularmente como eucalipto limão é uma árvore de porte médio, com casca áspera e pulverulenta de coloração branca, às vezes rosa ou vermelha e folhas juvenis lanceoladas. No Brasil, tem sido cultivada prioritariamente para a produção de madeira (VITTI; BRITO, 2003). Esta planta é rica em citronelal, também presente no capim citronela (MACEDO, 2008). Extratos de água quente das folhas secas de *E. citriodora* são tradicionalmente usadas como analgésico, anti-inflamatório e antipirético, como também, para os sintomas de infecções respiratórias, como gripe, e congestão de sinus (SILVA et al., 2003)



Figura 3: *Eucalyptus citriodora*

Fonte: www.evphotographics.com.au/.../images/euc014.jpg

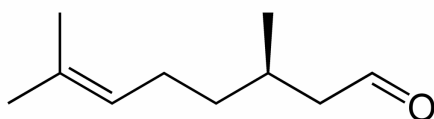


Figura 4: Estrutura química do citronelal

Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Citronelal>

Eucalyptus globulus

E. globulus (Figura 5) é uma árvore de grande porte, até 70m de altura ou mais, ramos cilíndricos, pouco foliosos, casca lisa, acinzentada ou castanha, folhas alternas e pecioladas (BRAGA, 1976), flores grandes, brancas, vistosas e frutos quadrangular e verrucoso (CORREA, 1931 citado por ROCHA; SANTOS, 2007).

As folhas de *E. globulus*, são usadas para produção de óleo essencial e principalmente obtenção do eucaliptol. Embora ocorram vários constituintes biologicamente ativos presentes em suas folhas, cascas e madeira, o uso do eucalipto como fitoterápico ainda é baseado nas propriedades inerentes ao eucaliptol (Figura 6) (MATOS et al., 2004). O eucaliptol tem sido descrito como possuidor de atividade fungicida sobre os fungos *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* e *Pyrenophora graminea* (TERZI et al., 2007) e inseticida sobre o coleóptero *Tribolium castaneum* (STAMAPOULOS et al., 2007), as moscas *Musca domestica* e *Chrysomya megacephala* (SUKONTASON et al., 2004).



Figura 5: *Eucalyptus globulus*

Fonte: http://www.anbg.gov.au/images/photo_cd/632030813540/023_2.jpg

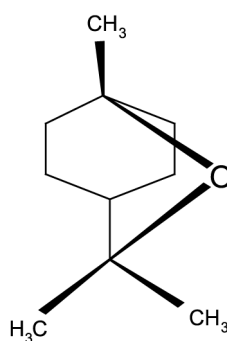


Figura 6: Estrutura química do Eucaliptol

Fonte: <http://www.emeraldinsight.com/fig/1290350205009.png>

2.5. *Coriandrum sativum*

Coriandrum sativum (Figura 7) pertence à família Apiaceae (BURDOCK; CARABIN, 2009). É uma erva anual provavelmente originária do Mediterrâneo, cultivada extensivamente na Índia, Rússia, Europa central, Turquia, Marrocos, Argentina e EUA. Possui frutos aromáticos, amargos, com propriedades anti-inflamatórias e diuréticas (VARIER, 1994 citado por ALI et al., 2008). As raízes são finas, talos eretos, com flores pequenas e branco-rosadas (SMALL, 1997 citado por BURDOCK; CARABIN, 2009). O óleo essencial desta planta é

obtido por arraste a vapor dos frutos secos, o rendimento varia entre 0,3 a 1,1% (SALZER, 1977). O componente principal deste óleo é o linalol (Figura 8) que compõe aproximadamente 2/3 do óleo (GIL et al., 2002). O odor, doce e aromático do óleo, é característico de linalol. Na indústria de alimentos este óleo é usado principalmente como condimento (BURDOCK; CARABIN, 2009). Coentro também é usado em aromaterapia (COOKSLEY, 2003). Dentre as atividades biológicas desta planta podemos citar: antidiabética (GRAY e FLATT, 1999) e antioxidante (ALI et al., 2008).



Figura 7: *Coriandrum sativum* (frutos e folhas)

Fonte: www.soniaskitchen.com/images/coriander.jpg

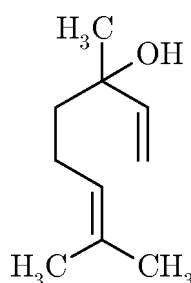


Figura 8: Estrutura química do linalol

Fonte: <http://img1.tradeget.com/mentholandallied/VCEP2HEA1linalool.jpg>

2.6. *Azadirachta indica*

Azadirachta indica (Figura 9) é uma árvore pertencente à família Meliaceae que tem sido pesquisada como fonte de substâncias naturais com ação inseticida (SCHMUTTERER, 1991). É originária da Índia, entretanto, o cultivo desta planta tem sido disseminado por outros continentes. No Brasil, já existem plantações dessa árvore em algumas regiões, como nordeste, centro-oeste e sul do país (MARTINEZ, 2002). O principal produto desta espécie é o óleo retirado das sementes, o qual contém inúmeros compostos ativos, sendo a azadirachtina (Figura 10) o mais importante (NEVES, 2004).

É uma planta perene ou decídua, bastante resistente e de crescimento rápido, podendo, atingir até 25 metros de altura. As folhas são compostas e imparipinadas aglomeradas nos extremos dos ramos, simples e sem estípulas (SCHMUTTERER, 1990). As flores são de coloração branca e reunidas em inflorescências densas, com estames crescentes formando um tubo, actinomórficas, pentâmeras e hermafroditas (LOPES, 1993). Os frutos são produzidos normalmente uma vez ao ano, às vezes duas. Possuem forma oval medindo de 1,4 a 2,4 cm de comprimento e quando maduro apresentam uma polpa doce amarelada e tegumento branco contendo um óleo marrom no interior de uma semente (SCHUMUTTERER, 1990).



Figura 9: *Azadirachta indica* (frutos e folhas)

Fonte: www.neemintheworld.com/immagini/neem.jpg

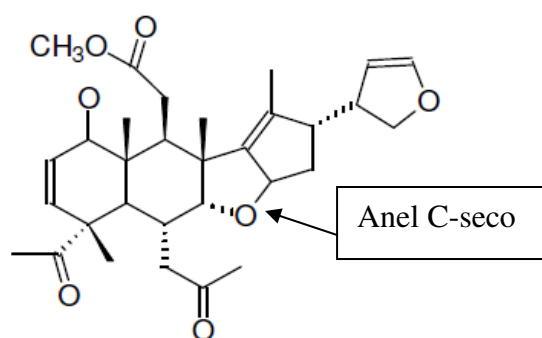


Figura 10: Estrutura química da Azadirachtina.

Fonte: Prado (2007).

2.7. *Lippia sidoides*

Lippia sidoides (Figura 11) é conhecida popularmente como alecrim-pimenta, é um arbusto de folhas caducas, bastante aromáticas, pertencente à família Verbenaceae próprio da vegetação do semi-árido nordestino, comum na caatinga entre Mossoró, Rio Grande do Norte e Tabuleiro do Norte, Ceará (MATOS, 2000). Suas folhas são opostas, simples, com margens finamente crenadas. As flores são pequenas e se acham reunidas em inflorescências tetragonais. Os frutos são cápsulas agrupadas em infrutescências e produzem sementes pequenas. Tanto as folhas frescas como as secas têm odor forte, e sabor aromático picante. O óleo essencial é constituído principalmente de timol (Figura 12), α - felandreno, β - cariofileno, p - miceno, mirceno, e carvacrol (CRAVEIRO et al., 1981).

Lippia sidoides contém até 6% de óleo essencial muito rico em timol. Após sua introdução nos programas de fitoterapia em atenção primária de saúde, passou a ser cultivada em vários estados do Brasil (MATOS et al., 2004). Dentre as atividades biológicas desta planta podemos citar: leishmanicida (FAÇANHA et al., 1995), fungicida (FONTENELLE, 2005), anti-helmíntica (CAMURÇA-VASCONCELOS, 2006) e larvicida sobre *A. aegypti* (CAVALCANTI et al., 2004).



Figura 11: *Lippia sidoides* (folhas)

Fonte: www.lyndha.com/zenflora/alecrimpimenta.jpg

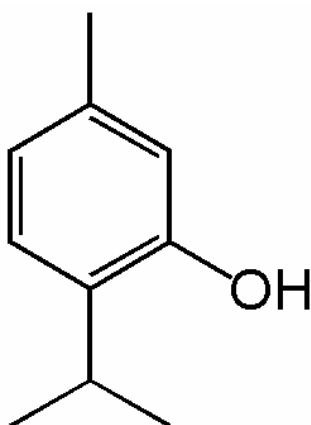


Figura 12: Estrutura química do Timol.

Fonte: Carvalho et al., (2003)

3 JUSTIFICATIVA

A Leishmaniose visceral é uma zoonose importante, devido a sua alta prevalência e incidência no Brasil, sendo endêmica no Estado do Ceará. Entretanto, as medidas atuais de controle direcionadas ao vetor, através do uso de inseticidas sintéticos, não têm apresentado a eficácia desejada. Diante disso, há a necessidade de formas de controle alternativas. Diversas plantas com propriedades inseticidas têm se mostrado promissoras no controle de ampla variedade de insetos. Desta forma, ao se avaliar a ação de produtos naturais de plantas no controle de flebotomíneos, pretende-se promover a redução da incidência da doença, descobrindo novos produtos que sejam eficazes, seguros, menos dispendiosos do que os atuais e tendo boa aceitabilidade e disponibilidade.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

Os óleos essenciais de folhas de *E. staigeriana*, *E. citriodora*, *E. globulus*, *C. sativum* e *L. sidoides* e o óleo da semente prensada de *A. indica* têm ação sobre ovo, larva e adulto do vetor da leishmaniose visceral, *Lu. longipalpis*.

5 OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral:

Aprimorar o controle da Leishmaniose visceral avaliando o efeito *in vitro* de óleos de plantas sobre ovos, larvas e adultos de *Lu. longipalpis*

5.2. Objetivos específicos:

- Avaliar a ação dos óleos essenciais nas diferentes fases de desenvolvimento de *Lu. longipalpis* em laboratório;
- Avaliar a eficácia entre os óleos essenciais de folhas de *E. staigeriana*, *E. citriodora*, *E. globulus*, *C. sativum*, *L. sidoides* e o óleo da semente prensada de *A. indica* sobre os estágios de ovo, larva e adulto de *Lu. longipalpis* em laboratório
- Analisar quimicamente o(s) óleo(s) de maior eficácia a fim de relatar seus componentes

6 CAPÍTULO 1

Atividade inseticida de plantas sobre dípteros vetores de zoonoses

Plant insecticidal activity on dipterans zoonosis vectors

Periódico: Revista Brasileira de Plantas Mediciniais (Submetido em Setembro de 2008)

ATIVIDADE INSETICIDA DE PLANTAS SOBRE DÍPTEROS VETORES DE ZONOSES

MACIEL, M.V^{1.*}; MORAIS, S.M¹; BEVILAQUA, C.M.L¹.; AMÓRA, S.S.A¹.

¹Universidade Estadual do Ceará/ Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias
Av. Paranjana, 1700, CEP 60740-000 Fortaleza, Ceará, Tel/fax: 8531019840.

* michellinevet@gmail.com

RESUMO: Os insetos são importantes transmissores de doenças. Algumas destas doenças passaram a ser transmitidas em áreas periurbanas ou urbanas, devido ao aparecimento ou reaparecimento de seus respectivos vetores. As estratégias de controle das doenças transmissíveis por vetores biológicos são de difícil execução, principalmente quando associadas à existência de reservatórios domésticos e silvestres e aos aspectos ambientais. O uso de inseticidas direcionado ao combate de formas adultas do inseto tem sido praticado. Entretanto, o amplo uso dos inseticidas sintéticos desde a descoberta do DDT para o controle de pragas domésticas e da agricultura, como também de vetores que transmitem doenças ao homem, levou a uma maior preocupação em relação à toxicidade e impacto ambiental destes agentes. Além disso, a resistência a inseticidas tornou-se uma preocupação crescente na agricultura, economia e na saúde pública. Um grande número de diferentes espécies de plantas representando diferentes áreas geográficas ao redor do mundo tem se mostrado capaz de causar efeitos tóxicos e agudos sobre insetos. Esta revisão fez uma abordagem sobre o possível controle de dípteros, vetores de zoonoses, através da utilização de plantas com propriedades inseticidas.

Palavras-chave: dípteros, fitoquímicos, terpenos, alcalóides, fagorrepelentes

ABSTRACT: **Plant insecticidal activity on dipteran zoonosis vectors.** Insects are important disease transmitters. Some of these diseases passed to be transmitted naturally in peri-urban or urban areas due to the emergence or resurgence of their vectors in those areas. The control strategies of transmissible diseases by biological vectors are quit difficult specially when associated to the existence of domestic and wild reservoirs, and to the environmental aspects as well. The use of insecticides to the control of the adult forms of the insect has been practiced. However the wide use of the synthetic insecticides since the discovering of DDT for the control of domestic and agricultural plagues, as well as vectors that transmit diseases to man has brought a larger concern in relation to the toxicity and environmental impact of those agents. Besides the resistance to insecticides became a growing concern in agriculture, economy and in the public health. A great number of different species of plants representing different geographical areas around the world has been able to cause poisonous and sharp effects on insects. This review is an approach on the possible diptera control, zoonosis vectors through the use of plants with insecticide properties.

Keywords: diptera, phytochemicals, terpenes, alkaloids

INTRODUÇÃO

Os mosquitos transmitem doenças para aproximadamente 700 milhões de pessoas anualmente (Fradin & Day, 2002). Existem mais de 3.000 espécies de mosquitos descritas, embora ainda se desconheça a biologia da grande maioria delas e os meios para combater os meios para combaterem muitas daquelas sabidamente prejudiciais ao homem (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994). Algumas doenças passaram a ser transmitidas em áreas periurbanas ou urbanas, graças à emergência ou re-emergência de seus vetores nessas áreas. Atualmente no Brasil, as principais doenças vetoriais sujeitas a controle são: dengue, malária, leishmanioses, doença de Chagas e as filaríases. Em razão da importância epidemiológica e do grau de participação do vetor no processo de transmissão, torna-se necessária a distinção nítida dos diferentes tipos de vetores envolvidos na disseminação de doenças de vertebrados (Côrtes, 1993).

As estratégias de controle das doenças transmissíveis por vetores biológicos são complexas principalmente quando associadas à existência de reservatórios domésticos e silvestres e aos aspectos ambientais. Entretanto, o amplo uso dos inseticidas sintéticos desde a descoberta do DDT para o controle de pragas domésticas e da agricultura, como também de vetores que transmitem doenças ao homem, levou a uma maior preocupação em relação à toxicidade e impacto ambiental (Mulla & Tianyun, 1999). O surgimento de insetos resistentes a estes compostos estimula o aumento na aplicação de inseticidas, causando danos ao ambiente (Nogueira e Palmério, 2001). Desta forma, a resistência a inseticidas tornou-se um problema constante na agricultura, economia e na saúde pública (Parimi et al., 2003). Além disso, o custo para o desenvolvimento de inseticidas químicos é alto e tem aumentado ao longo dos anos devido à necessidade de novas moléculas e formulações mais adequadas, o que tem feito crescer o interesse pela pesquisa de inseticidas alternativos (Almeida, 2001).

Metabólitos secundários de plantas são conhecidos por suas propriedades inseticidas em muitos casos as plantas têm uma história de uso para remédios caseiros e ainda para matar ou repelir insetos (Broussalis et al., 1999). O incentivo às investigações sobre interações plantas/insetos nas últimas décadas desvenda o uso potencial dos metabólitos de plantas ou aleloquímicos como agentes para esta finalidade (Pavela, 2004). Fitoquímicos obtidos de plantas com potencial no controle de insetos podem ser usados como uma alternativa às substâncias sintéticas ou adicionados a outros inseticidas nos programas de controle de vetores. Dependendo do tipo de atividade estas substâncias podem ser usadas como inseticidas, levando à morte larvas e adultos, ou como repelentes para proteção pessoal

(ICMR Bulletin, 2003). O Brasil apresenta enorme riqueza botânica, com 56 mil espécies de plantas das 256 mil existentes no mundo, possuindo um grande potencial como fonte de compostos biologicamente ativos provenientes de plantas medicinais. A utilização de plantas ou seus extratos com atividade inseticida tem aplicação importante na saúde pública e na agropecuária (Matias *et al.* 2002).

PLANTAS COM PROPRIEDADES INSETICIDAS

Durante os primeiros 50 anos do século XX, predominaram os produtos inseticidas naturais de origem orgânica e inorgânica (Viegas-Júnior, 2003). Na década de 1950, Maranhão (1954) relacionou cerca de 2.000 plantas com propriedades inseticidas, distribuídas em 170 famílias, com atividade tóxica para diversos insetos. Os inseticidas comerciais de origem vegetal foram obtidos, principalmente a partir de cinco famílias botânicas: Solonaceae, Compositae, Leguminosae, Chenopodiaceae e Liliaceae, das quais foram extraídos, respectivamente, a nicotina, piretro, timbó, heléboro e anabasina (Maranhão, 1954). Schumutterer (1990) citou as famílias Meliaceae, Asteraceae, Labiaceae, Aristolochiaceae e Annonaceae, como principais fontes de princípios ativos inseticidas. Sabe-se que as plantas, como organismos que co-evoluem com insetos e outros microrganismos, são fontes naturais de substâncias inseticidas e estas por sua vez, são produzidas pelo vegetal em resposta a um ataque patogênico (Simas *et al.* 2004). Estas defesas são de natureza química, e normalmente, envolvem substâncias do metabolismo secundário, as quais são chamadas de fitotoxinas ou aleloquímicos (Pinto *et al.*, 2002). A Tabela I apresenta as fontes vegetais, classes químicas ativas e princípios ativos de plantas inseticidas, segundo Matias *et al.* (2002).

TABELA I: Fontes vegetais, classes químicas ativas e princípios ativos de plantas inseticidas.

Fontes vegetais	Classe química ativa	Princípios ativos
<i>Nicotiana tabacum</i>	Alcalóides nicotínicos	Nicotina Normonicotina
<i>Chrysanthemum cinerariifolium</i>	Piretróides	Piretrina I Piretrina II
<i>Derris</i> spp.	Rotenóides	Rotenona
<i>Quassia amara</i>	Quassinóides	Quassina
<i>Stemona japonica</i>	Alcalóides	Estemofolina
<i>Azadirachta indica</i>	Limonóides	Azadiractina
<i>Cymbopogon nardus</i>	Terpenoides	Citronelal

O emprego de substâncias extraídas de plantas, na qualidade de inseticidas, tem inúmeras vantagens quando comparado aos sintéticos: os inseticidas naturais são obtidos de recursos renováveis e são rapidamente degradáveis; o desenvolvimento da resistência dos insetos a essas substâncias, compostas da associação de vários princípios ativos é um processo lento; estes pesticidas são de fácil acesso e obtenção e não deixam resíduos em alimentos, além de apresentarem baixo custo de produção (Roel, 2001). Dentre as desvantagens de se usar inseticidas botânicos, temos: Toxicidade; necessidade de sinergistas (Alguns inseticidas botânicos rapidamente se degradam ou são metabolizados por enzimas desintoxicantes de alguns insetos-alvo, desta forma, o inseticida pode somente atordoar o inseto e não causar sua morte); baixa persistência; carência de pesquisas e dificuldades de registro (Menezes, 2005).

Na busca pelo desenvolvimento de novos agentes ativos baseados em produtos naturais, esforços são feitos para selecionar, isolar, e desenvolver fitoquímicos com atividade pesticida (Mulla & Tianyun, 1999). Várias são as estratégias capazes de determinar a atividade de produtos de origem natural contra insetos. De uma maneira geral, a pesquisa inicia-se com extratos brutos de plantas preparados com diversos solventes, tais como hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e água. Em seguida, os extratos ativos são fracionados através de métodos cromatográficos e as frações obtidas são testadas novamente, repetindo-se o processo até a obtenção do(s) composto(s) ativo(s) (Nogueira e Palmério, 2001).

Os extratos obtidos com solventes orgânicos contêm uma complexa mistura de compostos ativos. Se uma concentração letal excepcionalmente baixa é detectada, o extrato

pode ser fracionado para extrair o componente químico responsável pelo efeito. Frações isoladas de um mesmo extrato podem ter diferentes atividades larvicidas, pois contêm diferentes fitoquímicos. No entanto, alguns compostos, quando testados de forma isolada, apresentam baixa eficácia, sugerindo efeito sinérgico entre as substâncias presentes no extrato, indicando que a associação destas substâncias é a responsável pela mortalidade obtida nos testes realizados (Shaalan *et al.* 2005). É importante ressaltar que, para o uso de inseticidas botânicos, diversos aspectos devem ser levados em consideração: extração, conservação dos extratos, dosagem eficiente, estabilidade, toxicidade e custo. Todos estes aspectos são avaliados quando se identifica as principais substâncias contidas no inseticida (Nogueira e Palmério, 2001).

A escolha do bioensaio mais apropriado para determinar a atividade inseticida depende dos hábitos dos insetos a serem combatidos (Simões *et al.* 2000). Em termos gerais, larvas de três espécies de mosquitos de importância em saúde pública, pertencentes aos gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* são utilizadas para triagem de fitoquímicos, devido a sua susceptibilidade em maior ou menor grau a estes compostos. A bioatividade de um fitoquímico contra larvas de mosquitos pode variar significativamente dependendo da espécie, parte utilizada e idade da planta, bem como o solvente usado na extração (Shaalan *et al.* 2005). O uso de grupos homogêneos de larvas dos mosquitos para estudos de laboratório é de fundamental importância para determinar a atividade de compostos sintéticos, IGRs, inseticidas de origem bacteriana e produtos naturais (WHO, 2005). A seleção da espécie de mosquito também é de fundamental importância já que ocorrem variações dentro do próprio gênero e espécie (Shaalan *et al.* 2005).

Em geral, larvas de *Aedes* são mais robustas e menos susceptíveis a inseticidas e extratos botânicos do que as larvas de *Culex*, por exemplo. Já a susceptibilidade das larvas de *Anopheles* pode variar desde que elas podem ser mais ou menos susceptíveis que as larvas de *Culex* e *Aedes* aos derivados botânicos e inseticidas. *Aedes aegypti* é o inseto mais comumente usado para a triagem de substâncias com ação inseticida por ser menos susceptível e de fácil colonização em laboratório (Shaalan *et al.* 2005). A Tabela II apresenta algumas plantas e suas respectivas atividades inseticidas sobre mosquitos vetores de zoonoses.

TABELA II: Efeito de atividade inseticida de algumas plantas sobre mosquitos potencialmente vetores de zoonoses.

Plantas	Óleo/extrato /concentração	Inseto	Ação	Referência
<i>A. indica</i>	Óleo de sementes (50mg/L)	<i>A. aegypti</i>	Inibição de emergência de insetos	Sinniah <i>et al.</i> 1994
<i>Ocimum gratissimum</i> <i>Ocimum americanum</i> <i>Lippia sidoides</i> <i>Cymbopogon citratus</i>	Óleo essencial (CL ₅₀ 60 ppm) Óleo essencial (CL ₅₀ 67 ppm) Óleo essencial (CL ₅₀ 63 ppm) Óleo essencial (CL ₅₀ 69 ppm)	<i>A. aegypti</i>	Mortalidade de larvas	Cavalcanti <i>et al.</i> 2004
<i>Mentha piperita</i>	Óleo essencial (3mL/m ²)	<i>A. aegypti</i> <i>A. stephensi</i> <i>Cx. quinquefasciatus</i>	100% Mortalidade larval	Ansari <i>et al.</i> 2000
<i>Pinus longifolia</i>	Oleo essencial (200 ppm)	<i>A. aegypti</i> <i>A. stephensi</i> <i>Cx. quinquefasciatus</i>	100% Mortalidade larval	Ansari <i>et al.</i> 2005
<i>Apium graveolens</i>	Oleo essencial (120mg/L)	<i>A. aegypti</i>	96,2% de mortalidade larval	Choochote <i>et al.</i> 2004
<i>Ageratum conyzoides</i>	Oleo essencial (500 µg/L)	<i>A. aegypti</i>	100% de mortalidade larval	Mendonça <i>et al.</i> 2005
<i>Croton zenhtneri</i> <i>Croton nepetaefolius</i> Croton argyrophyloides <i>Croton sonderianus</i>	Óleo essencial (CL ₅₀ 28 ppm) Óleo essencial (CL ₅₀ 84 ppm) Óleo essencial (CL ₅₀ 102 ppm) Óleo essencial (CL ₅₀ 104 ppm)	<i>A. aegypti</i>	Mortalidade de larvas	Morais <i>et al.</i> 2006

Plantas	Óleo/extrato /concentração	Inseto	Ação	Referência
<i>Copaifera langsdorff</i> <i>Aegiphila ihotskiana</i>	Oleo essencial (500µg/L)	<i>A. aegypti</i>	100% de mortalidade larval	Mendonça <i>et al.</i> 2005
<i>Lippia sidoides</i>	Óleo essencial puro	<i>A. aegypti</i> <i>An. stephensi</i>	100% de mortalidade Diminuição de 45% na eclosão de ovos	Carvalho <i>et al.</i> 2003
<i>Rhinacanthus nasutus</i>	Fração éter de petróleo de folhas	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	Diminuição de 50% na eclosão de ovos	Muthukrishman & Pushpalatha, 2001
<i>Melia azedarach</i>	Extrato metanólico de sementes (2%)	<i>A. stephensi</i>	92 e 90% de mortalidade pupas e adultos	Nathan <i>et al.</i> 2005
<i>Calophyllum inophyllum</i>	Fração acetato de etila de sementes (0.33mg/L)	<i>An. stephensi</i>	aumento de 50% no do período de desenvolvimento	Muthukrishman <i>et al.</i> 1999

Dentre os testes realizados com fitoquímicos, os óleos essenciais de vegetais são os mais utilizados como atraentes ou repelentes de insetos (Bowman, 2006). Em muitas plantas são encontradas substâncias geralmente voláteis que podem ser detectadas pelas antenas ou tarsos de insetos. Entre essas, estão os monoterpenos (citronelal, linalol, mentol, pinenos, mentona, carvona e limoneno), os sesquiterpenos (farnesol, nerolidol), os fenilpropanóides (safrol, eugenol) e muitos outros compostos (Simões & Sptizer, 2004). Muitas espécies de plantas da Família Lamiaceae são tóxicas para insetos, como as do gênero *Ocimum* spp (Palsson & Jaenson, 1999). Extratos de plantas incluindo *Ocimum basilicum*, *O. gratissimum*, *O. americanum*, *Cymbopogon nardus*, *Alpinia galanga*, *Syzygium aromaticum* e *Thymus vulgaris*, *Mentha*, *Eucalyptus maculata citriodon*, *Tagetes* e *Lantana camara* (Ansari *et al.* 2005) têm sido estudadas como possíveis repelentes de mosquitos. Os monoterpenos limoneno, terpinoleno, citronelol e citronelal e cânfora (Figura 1) são os mais comuns constituintes de alguns óleos que têm sido relatados com propriedades repelentes sobre vários insetos (Jantan & Zaki, 1998).

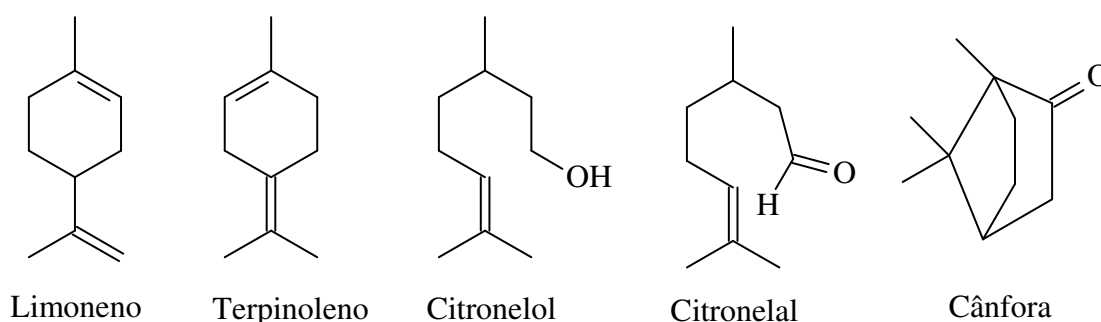


FIGURA 1: Estruturas químicas dos principais constituintes presentes em óleos essenciais repelentes de insetos.

Alguns fitoquímicos apresentam atividade deterrente. Uma substância deterrente é aquela que impede a alimentação do inseto, levando-o à morte. Esta ação já foi descrita para a rotenona (Simões, 2000).

Os reguladores de crescimento de insetos formam um grupo de inseticidas de nova geração que causam modificações fisiológicas e morfológicas durante o desenvolvimento do inseto. Este grupo é mais conhecido pela sigla IGR (Insect Growth Regulator). Os IGRs surgiram na década de 1970 como um novo grupo de inseticidas de ação mais específica e

menor toxicidade para os mamíferos do que os outros inseticidas pois atuam seletivamente ao interromper o desenvolvimento e crescimento ao invés de promover a intoxicação direta (Silva & Mendes, 2002). Estes produtos são mais seguros e eficientes dentre os inseticidas disponíveis. Sua segurança reside no fato de que os hospedeiros mamíferos não possuem hormônios juvenis ou receptores destes hormônios. Extratos botânicos possuem substâncias reguladoras do crescimento que podem atuar sobre o período de desenvolvimento, crescimento, emergência de adultos, fecundidade, fertilidade e eclosão de ovos dos insetos (Shalan *et al.* 2005). Os IGR mais utilizados no controle de mosquitos pertencem ao grupo das benzoil-fenil-uréias (BPU, inibidores de síntese de quitina) ou são compostos quimicamente relacionados ao hormônio juvenil natural de insetos, designados como análogos de hormônio juvenil (AHJ) (Slama *et al.*, 1974 citado por Braga & Valle, 2007). No Brasil, Coelho *et al.*, (2006) adicionaram azadirachtina à dieta de larvas de *Lu. longipalpis* em laboratório, e verificaram que nas concentrações de 0,1µg de azadirachtina/mg de dieta, houve aumento significativo da mortalidade larvar quando comparado ao grupo controle. A concentração de 10g de azadirachtina/mg foi a que promoveu um maior percentual de mortalidade das larvas ($74,4 \pm 8,3\%$). As concentrações de 0,1 e 1,0µg de azadirachtina/mg de dieta bloquearam a muda das larvas do inseto, que permaneceram no terceiro estágio até o final do experimento. Além disso, a adição simultânea de ecdisona (1µg/mg/dieta) à dieta reverteu os efeitos inibidores desta substância. Concluiu-se que a azadirachtina é um potente inibidor do crescimento de larvas *Lu. longipalpis*. Já os fagorrepelentes, do inglês “antifeedants”, são substâncias naturais que têm a propriedade de interromper o repasto sanguíneo, podendo este efeito ser temporário ou permanente. Os fagorrepelentes geralmente agem sobre o sistema nervoso central dos insetos e são específicos para determinadas espécies (Pinto *et al.*, 2002). Plantas da família Meliaceae são conhecidas por conter uma variedade de compostos com atividade inseticida, fago-inibidora, e reguladora do crescimento (Nakatani *et al.* 2004), estas últimas devido à presença dos limonóides (Nathan *et al.* 2005). Estes compostos podem ser encontrados em todos os tecidos das plantas desta família, no entanto, diversas partes das plantas podem individualmente produzir diferentes tipos de limonóides (Matias *et al.*, 2002). Existe uma grande diversidade de limonóides isolados da família Meliaceae, entre eles, as azedarachinas, sendaninas e trichilinas, além dos que apresentam o anel C-seco. Os limonóides com anel C-seco restringem-se aos gêneros *Azadirachta* e *Melia* sp. (Champagne *et al.* 1992). Estes compostos possuem o anel C do núcleo dos tetranotriterpenóides aberto como pode ser observado na azadiractina, que é o maior representante desta classe (Mulla & Tianyun, 1999). A azadirachtina (Figura 2), um triterpeno

isolado de *A. indica* e *M. azedarach* é um exemplo de fagorrepelente (Pinto *et al.* 2002). Mulla & Tianyun (1999) relataram diversos trabalhos mostrando a atividade fagoinibidora de várias formulações do “neem” (nome popular de *A. indica*), sobre mosquitos dos gêneros *Anopheles* e *Culex*.

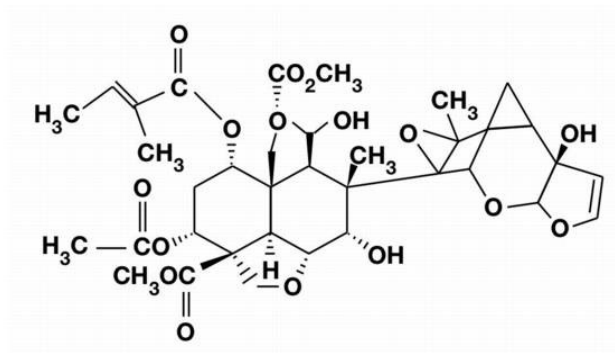


FIGURA 2: Estrutura química da azadirachtina (Isman, 2006).

Outras famílias de plantas apresentam substâncias fagorrepelentes. As famílias Papilionaceae, Loganiaceae e Fabaceae são ricas em rotenonas e rotenóides. A rotenona (Figura 3) é um produto inseticida obtido de raízes de diversas plantas (Simões, 2000). A rotenona foi inicialmente usada pelos nativos da América do Sul com a finalidade de paralisar peixes e trazê-los à superfície. Esta substância é um componente inseticida das raízes de *Derris* sp, planta pertencente ao gênero *Lonchocarpus* e de vários arbustos leguminosos (Bowman, 2006). Luitgards-Moura *et al.* (2002) utilizaram extratos aquosos do caule de *Derris amazonica* e folhas de *Antonia ovata* em experimentos com adultos de *Lu. longipalis* e verificaram que após 72 horas de exposição à *D. amazônica* houve um percentual de mortalidade de 100% das fêmeas destes insetos na concentração de 250mg/mL. Os machos foram mais susceptíveis (80% de mortalidade) ao extrato das folhas de *A. ovata* na mesma concentração. Estes resultados demonstram as possibilidades da utilização de plantas no controle de insetos.

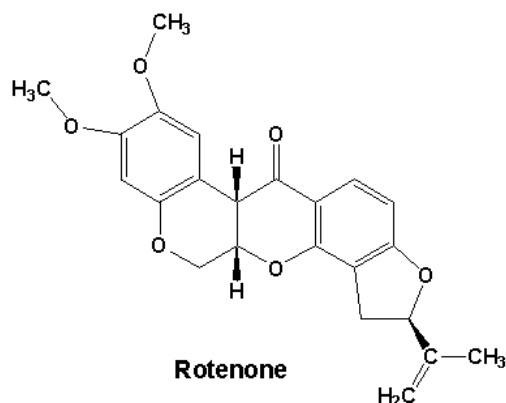


FIGURA 3: Estrutura química da Rotenona (Isman, 2006)

Um outro tipo de ação inseticida é através do bloqueio da neurotransmissão. Algumas substâncias inseticidas agem rapidamente paralisando e matando os artrópodes por interromperem o transporte de íons sódio e potássio nas membranas de células nervosas, bloqueando a neurotransmissão ao longo do axônio e da sinapse (Bowman, 2006). É o caso dos piretróides e piretrinas (Figura 4). Estas substâncias formam um grupo de inseticidas derivados de plantas da família Asteraceae já utilizados há algum tempo. Sua ação sobre os insetos é caracterizada pela rápida morte, particularmente em insetos voadores, hiperatividade e convulsões. Desta forma, o mecanismo de ação destes inseticidas é qualitativamente similar ao DDT e outros organoclorados. *Pyrethrum* refere-se ao óleo extraído das folhas secas de *Tanacetum cinerariaefolium* (Asteraceae) (Isman, 2006).

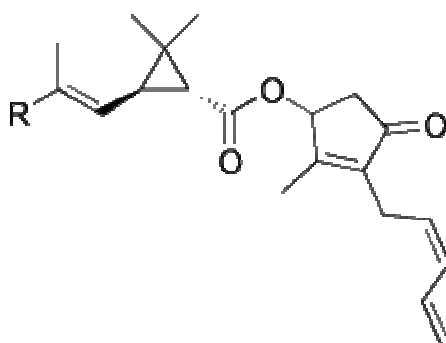


FIGURA 4: Estrutura química da piretrina I (Isman, 2006).

O flebotômico *Phlebotomus papatasi* transmite *Leishmania major*, que causa leishmaniose cutânea em vastas regiões do Velho Mundo. Além de sangue este mosquito também se alimenta de plantas. Num estudo sobre dieta foi observado que uma noite de alimentação com *Solanum jasminoides*, *Ricinus communis*, ou *Bougainvillea glabra* diminuiu

drasticamente o período de vida dos flebótomos. No entanto em regiões endêmicas para *L. major* em lugares de grande incidência do inseto, o número de *P. papatasi* em armadilhas próximas de *B. glabra* foi oito vezes menor (62 contra 502 mosquitos capturados) que nos lugares do controle. Estes resultados implicam que *B. glabra* garante proteção contra o mosquito da areia, reduzindo o risco de leishmaniose. Os autores sugerem que esta e outras plantas ornamentais são danosas para o mosquito da areia e podem ser úteis para combatê-los (Schlein *et al.* 2001).

Um grande número de diferentes espécies de plantas representando diversas áreas geográficas ao redor do mundo tem apresentado compostos capazes de causar efeitos tóxicos e agudos sobre insetos (Shaalán *et al.*, 2005). Entretanto, Isman (1997), relatou algumas barreiras para a comercialização destes fitoquímicos. Dentre estas temos: (1) a escassez de recursos botânicos, sendo necessária a produção de inseticidas botânicos em larga escala para a comercialização, a menos que a planta em questão seja extremamente abundante na natureza ou já tenha sido produzida para outras finalidades; (2) padronização dos extratos e controle de qualidade, baseado nos ingredientes ativos; e (3) dificuldades de registro destes fitoquímicos. Esta situação pode impedir muitos pesticidas botânicos de alcançar a esfera comercial em países onde existe grande demanda destes produtos. Apesar disso, a busca de novos inseticidas constitui-se um campo de investigação aberto, amplo e contínuo. A grande variedade de substâncias presentes na flora continua sendo um enorme atrativo na área de controle de insetos, principalmente levando-se em consideração que apenas uma pequena parcela destas plantas foi investigada com tal finalidade (Simões, 2000).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A. Banco de microrganismos entomopatogênicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v.21, p. 30-33, 2001.
- ANSARI, M.A. *et al.* Larvicidal and insect repellent activities of pine (*Pinus longifolia*, Family: Pinaceae) oil. **Journal Veterinary Borne Disease**, v. 42, p. 95 – 99, 2005.
- ANSARI, M.A. *et al.* Larvicidal and repellent actions of *Dalbergia sissoo* Roxb. (F. Leguminosae) oil against mosquitoes. **Bioresource Technology**, v.73, p. 207-211, 2000.
- BOWMAN, D.D. **Parasitologia Veterinária de Georgis**. 8ed, Barueri, SP: Manole, 2006. 422p.

- BRAGA, I.A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: Inseticidas, mecanismo de ação e resistência. *Epidemiol.serv.saúde*, v.16, p. 279-293, 2007.
- BROUSSALIS, A.M. et al. Argentine plants as potential source of insecticidal compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v.67, p.219-223, 1999.
- CARVALHO, A.F.U.et al. Larvicidal activity of the essencial oil from *Lippia sidoides* Cham against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, p. 569-571, 2003.
- CAVALCANTI, E.S.B.et al. Larvicidal activity of essencial oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 541- 544, 2004.
- CHAMPAGNE, D.E. et al. Biological activity of limonoids from the Rutales. **Phytochemistry**, v.31, p. 377–394, 1992.
- CHOOCHOTE, W. Potential of crude extract of celery, *Apium graveolens* L., against the insect *Aedes aegypti* (L) (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector Ecology**, v. 29, p. 340 - 346, 2004.
- COELHO, C.A.A.; ARAUJO, S.N.; FEDER, M.N.; SILVA, C.E.; GARCIA, E.S.; ZAMBUJA, P.; SALABERT, M.G.; RANGEL, E.F. Effects of azadirachtin on the development and mortality of *Lutzomyia longipalpis* larvae (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Journal of Medical Entomology*, v. 43, p. 262-266, 2006.
- CONSOLI, R.A.G.B.; LOURENÇO DE OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994.228p.
- CÔRTEZ, J.A. **Epidemiologia: conceitos e princípios fundamentais**. São Paulo: Livraria Varela, 1993, 286p.
- FRADIN, M.S.; DAY, J.F. Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. **The New England Journal of Medicine**, v.347, p. 13-18, 2002.
- GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectives. **Revista Brasileira Epidemiologia** v. 7, p. 338 - 949, 2004.
- ICMR BULLETIN. **Prospects of using products in the control of insect vectors**, v. 33, p. 1 – 10, 2003.
- ISMAN, M.B. Botanical Insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review Entomology**, v.51, p. 45-66, 2006.
- ISMAN, M.B. Neem and other botanical insecticides: Barriers to commercialization. *Phytoparasitica*, v.25, p. 339-344, 1997.

- JANTAN, I.; ZAKI, Z.M. Development of environment-friendly insect repellents from the leaf oils of selected Malaysian plants. **Review of Biodiversity and Environmental Conservation**, article VI, 1998.
- LUITGARDS – MOURA, J.F. et al. Preliminary assays indicate that *Antonia ovata* (Loganiaceae) and *Derris amazônica* (Papilionaceae), ichthyotoxic plants used for fishing in Roraima, Brazil, have an insecticide effect on *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 737 - 742, 2002.
- MARANHÃO, Z.C. Plantas inseticidas. **Revista da Agricultura**, v.29, p. 113 – 121, 1954.
- MATIAS, R. et al. *Melia azedarach*, uso popular x estudos químicos e farmacológicos: breve revisão. **Ensaio e Ciência**: ed. UNIDERP, Campo Grande, v.6, p. 91-121, 2002.
- MENDONÇA, F.A.C. et al. Activities of some brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, v.76, p. 629-636, 2005.
- MENEZES, E.L.A. Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. 58p.
- MORAIS, S.M. et al. **Journal of the American Mosquito Control Association** v. 22, p. 161-4, 2006.
- MULLA, M.S. & TIANYUN, S. Activity and biological effects of neem products against arthropods of medicinal and veterinary importance. **Journal of the American Mosquito Control Association**. v. 15, p. 133-152, 1999.
- MUTHUKRISHMAN, J. et al. Inhibition of juvenile hormone biosynthesis in *Gryllus bimaculatus* by *Glycosmis pentaphylla* leaf compounds. **Phytochemistry**, v.50, p. 249-254, 1999.
- MUTHUKRISHMAN, J.& PUSHPALATHA, E. Effects of plant extracts on fecundity and fertility of mosquitoes. **Journal Applied Entomology**, v.125, p. 31-35, 2001.
- NAKATANI, M. et al. Limonoids from *Chukrasia tabularis*. **Phytochemistry**, v.65, p.2833–2841, 2004.
- NATHAN, S.S.; SAVITHA G.; GEORGE, D.K.; NARMADHA, A.; SUGANYA, L.; CHUNG, P. G. Efficacy of *Melia azedarach* L. extract on the malarial vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). **Bioresource Technology**, v.97, p.1316-1323, 2006.
- NOGUEIRA, M.A.S.; PALMÉRIO, M. **Practice oriented results on use and production of plant extracts and pheromones in integrated and biological pest control**. University of Uberaba, 2001.
- PALSSON, K.; JAENSON, T.G.T. Plant products used as mosquito repellents in Guinea Bissau, West Africa. **Acta Tropica**, v.72, p. 39-52, 1999.

- PARIMI, S. et al. Toxicity of insecticide-bait mixtures to insecticide resistant and susceptible western corn rootworms (Coleoptera: Crysomelidae). **Crop Protection**, v.22, p.781-786, 2003.
- PAVELA, R. Insecticidal activity of certain medicinal plants. **Fitoterapia**, v.75, p. 745-749, 2004.
- PINTO, A.C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, p.45-61, 2002.
- ROEL, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. *Revista Internacional do Desenvolvimento Local*. v.1, p. 43-50, 2001.
- SCHLEIN, Y.; JACOBSON, RL; MULLER, G.C. Sand fly feeding on noxious plants: a potential method for the control of leishmaniasis **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, p. 300-303, 2001.
- SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review Entomology**. v.35, p. 271–297, 1990.
- SHAALAN, E.A.S. et al. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. **Environment International**, v. 31, p. 1149 - 1166, 2005.
- SILVA JJ, MENDES J. Effect of diflubenzuron on stages of *Hematobia irritans* (L.) (Diptera, Muscidae) in Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.679 - 682, 2002.
- SIMAS, N.K. et al. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamun* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química nova**, v.27, p. 46-49, 2004.
- SIMÕES, C. M. O. et al. Plantas medicinais populares no Rio Grande do Sul. 3ª ed. Porto Alegre: UFRGS, 2000.
- SIMÕES, C. M.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. da UFSC, 2004.586p
- SINNIAH B, SINNIAH D, IBRAHIM J. Effect of neem oil and mosquito larvae. **Mosq Borne Dis Bull**. . v.1, p.90– 3, 1994.
- VIEGAS-JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, p. 390 - 400, 2003.

6 CAPÍTULO 2

Atividade inseticida dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Coriandrum sativum* sobre
Lutzomyia longipalpis

(Insecticidal activity of *Lippia sidoides* and *Coriandrum sativum* oils on the sandfly
Lutzomyia longipalpis)

**Atividade inseticida dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Coriandrum sativum* sobre
Lutzomyia longipalpis
(Insecticidal activity of *Lippia sidoides* and *Coriandrum sativum* oils on the sandfly
Lutzomyia longipalpis)**

Michelline do Vale Maciel^{1*}; Selene Maia de Moraes²; Claudia Maria Leal Bevilaqua¹,
Rafaella Albuquerque e Silva³; Renata Simões Barros¹; Raimundo Nonato de Sousa³;
Lindemberg Caranha de Sousa³; Edy Sousa de Brito⁴, Manoel Andrade de Souza-Neto⁴

¹Universidade Estadual do Ceará/ Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias,
Laboratório de Doenças Parasitárias, ²Laboratório de Química em Produtos
Naturais/Universidade Estadual do Ceará, ³Laboratório de Entomologia do Núcleo de
Controle de Vetores da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, ⁴Embrapa Agroindústria
Tropical

Endereço para Correspondência:

Av. Paranjana, 1700, CEP 60740-000 Fortaleza, Ceará, Brasil

Fax: + 55 85 31019840 Tel: + 55 85 31019853

* michellinevet@gmail.com

Resumo

A Leishmaniose Visceral é uma doença crônica causada por protozoários do gênero *Leishmania* pertencentes ao complexo *Leishmania (Leishmania) donovani*. No Brasil, o agente etiológico é *Leishmania chagasi* e *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor da doença na América latina, e somente no Brasil é responsável por 90% dos casos da doença. Modelos matemáticos referentes a três métodos de controle sugerem que o uso de inseticidas e a vacinação dos cães são as melhores soluções para o problema comparado a eutanásia dos animais soropositivos. Neste trabalho, os efeitos dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Coriandrum sativum* foram avaliados sobre as fases de ovo, larva e adulto de *Lu. longipalpis*, e a análise química dos óleos testados. Os insetos foram coletados no município de Sobral no Estado do Ceará, Brasil. Cinco tratamentos com diferentes concentrações foram realizados, utilizando 3 controles negativos, (água destilada, dimetilsulfóxido (3%) e Tween 80 (3%)), e controle positivo com cipermetrina (0,196mg/ml). Os testes foram realizados em potes de plásticos revestidos com gesso e utilizando uma ração de fezes de coelho e folha de mandioca. Os ovos, larvas e adultos foram aspergidos com os óleos. As larvas eclodidas foram observadas por 10 dias consecutivos e as larvas tratadas até a pupação. A mortalidade dos insetos foi observada após 24, 48 e 72 horas. Os constituintes majoritários dos óleos foram 2,6-Dimetilocta-2,7-dien-6-ol (beta-linalol) (73,21%) (*Coriandrum sativum*), e Timol (59,65%) (*Lippia sidoides*). Estes resultados demonstram as boas possibilidades do uso de plantas como uma alternativa ao controle de *Lu. longipalpis*.

PALAVRAS-CHAVE: Flebotomíneo, Plantas inseticidas, Leishmaniose

Abstract

Visceral leishmaniasis is a chronic disease caused by protozoa of the *Leishmania* genus belonging to the *Leishmania (Leishmania) donovani* complex. In Brazil, the causative agent is *L. chagasi* and *Lutzomyia longipalpis* is the main vector of this disease in Latin America, and, in Brazil alone it is responsible for 90% of disease cases. Mathematical models of the three methods of control suggest

that insecticide spraying and dog vaccination are better solutions to the problem than the euthanasia of serologically positive dogs. In this work, the effects of *Lippia sidoides* and *Coriandrum sativum* essential oils were evaluated on egg, larva and adult phases of *Lutzomyia longipalpis*. The insects were collected in the municipality of Sobral in the State of Ceará, Brazil. Five treatments with different concentrations were performed along with three negative controls, distilled water and dimetilsulfóxido (3%)/Tween 80 (3%), and a positive control, cypermethrin (0.196 mg/ml). The tests were carried out in plastic pots internally coated with plaster and filled with a substrate made of rabbit feces and crushed cassava leaves. The eggs, larvae and adults were sprayed with the oils. The hatched larvae were counted for 10 consecutive days and observed until pupation. Insect mortality was observed after 24, 48 and 72 hours. The major constituents of the oils were, 2,6-Dimethylocta-2,7-dien-6-ol (β -linalool) (73,21%) (*C. sativum*), and Thymol (59,65%) (*L. sidoides*). These results demonstrate good potential for the use of plants as an alternative control strategy for *Lu. longipalpis*.

KEYWORDS: Sandfly, Insecticidal plants, Leishmaniasis

Introdução

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma zoonose caracterizada por evolução crônica e sistêmica e quando não tratada pode levar a morte em 90% dos casos. Nas Américas o agente etiológico desta doença é *Leishmania chagasi*. A transmissão é feita por vetores pertencentes à família Psychodidae, gênero *Lutzomyia*, sendo que no Brasil, o principal vetor é *Lutzomyia longipalpis* (Desjeux, 2004).

As estratégias de controle da doença incluem diagnóstico precoce e o tratamento dos casos humanos, identificação e eliminação dos reservatórios, controle vetorial e educação ambiental (Ministério da Saúde, 2006). Modelos matemáticos, referentes a três métodos de controle, sugerem que o sacrifício dos cães sorologicamente positivos, é muito menos provável de resolver o problema da LV do que a borrifação com inseticida ou a vacinação dos cães (Lainson & Rangel, 2005). Além disso, a borrifação como medida de controle vetorial é mais bem aceita pelos proprietários de cães do que a eutanásia de seus animais (Oliveira, 2008). Entretanto, a resistência adquirida e a poluição ambiental, devido à aplicação repetida de inseticidas sintéticos persistentes, têm aumentado o interesse por novos produtos químicos (Viegas-Júnior, 2003).

Muitos trabalhos têm sido realizados avaliando a atividade biológica de componentes de vegetais contra um grande número de patógenos e artrópodes e diversas plantas têm sido descritas com potencial inseticida (Shaalan et al., 2005).

Óleos essenciais obtidos de plantas têm sido considerados fontes potenciais de substâncias biologicamente ativas. Estas substâncias são geralmente voláteis e podem ser detectadas pelas antenas ou tarsos de insetos. Os óleos essenciais são misturas complexas de numerosas moléculas, e seus efeitos biológicos são o resultado de um sinergismo entre todas as moléculas ou de seus constituintes majoritários de acordo com análise por cromatografia a gás. Na maioria dos casos, só os componentes principais dos óleos essenciais como terpineol, eugenol, timol, carvacrol, carvone, geraniol, linalol, citronello, nerol, safrole, eucaliptol, limonene, cinnamaldehyde são avaliados, pois geralmente, atribui-se a estes constituintes o efeito biológico do óleo (Ipek et al., 2005).

Os monoterpenos fazem parte da classe mais simples dos terpenóides, sendo constituídos por 10 átomos de carbono, ou seja, duas unidades de isopreno. São componentes da maioria dos óleos essenciais. O maior interesse nestes compostos é o seu uso como perfumes e flavorizantes em alimentos, porém apresentam efeitos inseticidas e farmacológicos (Prado, 2007). As propriedades naturais inseticidas de alguns monoterpenos fazem deles uma alternativa no desenvolvimento de inseticidas biodegradáveis, seguros e efetivos (Grodnitzky & Costs, 2002).

Coriandrum sativum L. pertence à família Apiaceae. Esta família é conhecida por apresentar monoterpenos em seus óleos essenciais (Martins et al., 2008). O monoterpeno linalol é o constituinte químico majoritário de *C. sativum* (Burdok & Carabin, 2009). *Lippia sidoides* pertence à família Verbanaceae, é conhecida popularmente como alecrim-pimenta ou alecrim-bravo (Matos, 2002) e tem sido descrita na literatura como possuidora de várias propriedades, tais como, leishmanicida (Façanha et al., 1995) e larvicida sobre *Aedes aegypti* (Cavalcanti et al., 2004). Esta planta tem como constituinte majoritário o monoterpeno timol (Costa et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade inseticida dos óleos essenciais de *C. sativum* e *L. sidoides* sobre as três fases de desenvolvimento de *Lu. longiplapis* em laboratório.

Material e métodos

Estabelecimento da colônia de Lu. longiplapis

O estabelecimento e a manutenção da colônia de flebotomíneos foram baseados em métodos desenvolvidos por Smith (1925) citado por Sherlock & Sherlock (1972) com algumas modificações. Os insetos adultos foram capturados através de armadilhas luminosas do tipo CDC e encaminhados

para o Laboratório de Entomologia do Núcleo de Endemias do Estado do Ceará, onde foram mantidos em gaiolas teladas, em BOD a temperatura de 27°C e 80% de umidade relativa. Os adultos foram alimentados utilizando-se hamsters anestesiados (10 mg/kg de ketamina e 2 mg/kg de xilazina por via intramuscular). Após 4 dias, as fêmeas foram inseridas com o auxílio de um capturador de Castro em potes plásticos (4 x 4,5 cm) revestidos com gesso previamente umedecidos com água destilada para postura. Os ovos foram transferidos para novos potes plásticos revestidos com gesso, acondicionando-os em uma cuba forrada com areia umedecida por 4 dias. Após a eclosão das larvas, adicionou-se o substrato para alimentação, composto por fezes de coelho e folhas trituradas de mandioca até o período de pupação. Os adultos foram soltos dentro das gaiolas, dando continuidade ao ciclo.

Obtenção do óleo da planta

O óleo dos frutos secos de *C. sativum* foi obtido através de arraste a vapor de acordo com o método descrito por Craveiro et al. (1976). A planta foi pesada antes do processamento para determinar o rendimento do óleo. O cálculo do rendimento foi feito pela seguinte fórmula: $\text{Rendimento} = \frac{\text{Quantidade de óleo obtida na extração}}{\text{Quantidade de planta pesada antes da extração}} \times 100$.

O óleo essencial de *Lippia sidoides* foi adquirido da empresa de produtos naturais, PRONAT, que cultiva a planta e obtém o óleo essencial por arraste a vapor conforme procedimento descrito acima.

Análise dos óleos por cromatografia de gás acoplada/espectrometria de massas (GC/MS)

A composição química dos óleos essenciais usados neste estudo foi determinada através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa no PADETEC da Universidade Federal do Ceará. Os óleos essenciais foram analisados usando um instrumento da Hewlett-Packard modelo 5971 GC/MS sob as seguintes condições: coluna capilar de sílica fundida Dimethylpolysiloxane DB-1 (30 m x 0,25 mm); gás de arraste: He (1 mL/min); temperatura do injetor: 250 °C; temperatura do detector: 200 °C; temperatura da coluna: 35-180 °C a 4 °C/min e depois 180-25 °C at 10 °C/min; espectro de massa: por impacto eletrônico a 70 eV. A identificação dos constituintes foi feita por procura em biblioteca de espectros de massa do computador, tempos de retenção e comparação visual dos espectros de massa obtidos com os publicados na literatura (Adams, 2001).

Ensaio sobre ovos

Os ensaios com ovos, larvas e adultos foram constituídos por 5 tratamentos com diferentes concentrações dos óleos de *C. sativum* e *L. sidoides* e realizados a temperatura de 27°C e 80 % de umidade relativa, acompanhados por controle com água destilada, controle negativo com o diluente Tween 80 a 3% ou DMSO (3%), a depender do óleo da planta a ser testada, visando uma melhor diluição do óleo empregado e positivo com 196µg/ml de cipermetrina. Para cada concentração testada foram utilizadas 3 repetições e 3 réplicas. Cada repetição constituiu-se de 30 ovos. Os ovos foram pipetados com 1 ml do óleo. Os potes contendo ovos foram vedados até a eclosão das larvas de *Lu. longipalpis*. As concentrações utilizadas foram: 5; 10; 20; 40 e 80 mg/ml para o óleo de *C sativum* e 2,5; 5; 10; 20 e 40 mg/ml para o óleo de *L. sidoides*. Três dias após o tratamento com os óleos iniciou-se a avaliação do número de larvas eclodidas em cada pote/concentração por 10 dias consecutivos.

Ensaio com larvas

O teste foi realizado nas mesmas condições descritas para os ovos. Potes contendo 40 ovos de *Lu. longipalpis* foram acondicionados adequadamente até a eclosão das larvas que foram contadas 6 dias pós-eclosão. Se o número de larvas fosse inferior a 30, novas larvas provenientes dos potes iniciais eram adicionadas, até chegar a 30 indivíduos. Em seguida, pipetaram-se os potes com os óleos. Cada repetição constituiu-se de 30 larvas. As concentrações utilizadas neste teste foram de 5; 10; 20; 40; 80mg/ml para o óleo de *C sativum* e 0,075; 0,15; 0,3; 0,6 e 1,2 mg/ml para o óleo de *L. sidoides*. As larvas foram observadas até a pupação.

Ensaio com adultos

O ensaio foi realizado com 30 insetos adultos por pote, sendo 15 machos e 15 fêmeas, quatro dias após o repasto das fêmeas do inseto, quando os potes foram previamente borrifados com os óleos de *C. sativum* e *L. sidoides*. As concentrações utilizadas neste teste foram de 0,3; 0,6; 1,2; 2,5 e 5 mg/ml para o óleo de *C sativum* e 0,15; 0,3; 0,6; 1,2 e 2,5 mg/ml para o óleo de *L. sidoides*. Neste experimento, os parâmetros observados foram: mortalidade dos insetos às 24; 48 e 72 horas após contato com óleo, número de ovos obtidos e de larvas eclodidas.

Análise dos dados

Os dados obtidos foram transformados pela fórmula: $\log(x + 1)$ e submetidos à análise de variância one-way e comparados pelo teste de Tukey, com 5% de probabilidade, usando o programa Prism 3.0. A CE_{50} e CE_{90} foram calculadas pelo método de Probita usando o programa SPSS 8.0 para Windows.

Resultados

A extração do óleo dos frutos secos de *C. sativum* apresentou um rendimento de 0,24%.

Os principais constituintes dos óleos essenciais estão apresentados nas Tabelas 1 e 2. Os constituintes majoritários de *L. sidoides* foram: timol (59,65%), cariofileno (10,60%), Cimeno (9,08%) e Mirceno (5,43%). Em relação ao óleo de *C. sativum* obteve-se: alfa-pineno (4,20%), Cânfora (4,25%), γ - Terpineno (3,10%) e 2,6-Dimetilocta-2,7-dien-6-ol (beta-linalol) (73,21%).

Os resultados do teste com ovos do inseto estão dispostos na tabela 3. O óleo de *C. sativum* apresentou eficácia de $96,88 \pm 1,45\%$ na concentração de 80 mg/ml. Entretanto, o óleo de *L. sidoides* foi mais eficaz ($94,59 \pm 1,59\%$) com metade da dose. A CE_{50} dos óleos foi de 16,15 (12,64- 20,31) e 6,35 (4,36 – 8,60) e a CE_{90} foi de 54,13 (39,44 – 89,39) e 36,41 (23,11 – 83,58) para *C. sativum* e *L. sidoides* respectivamente.

Os resultados do teste com larvas estão descritos na Tabela 4. O óleo de *C. sativum* obteve eficácia de $79,77 \pm 2,2\%$ na maior concentração utilizada (80 mg/ml). Entretanto, o óleo de *L. sidoides* foi $100 \pm 0,0\%$ eficaz na concentração de 1,2 mg/ml. A CE_{50} dos óleos foi de 28,80 (21,85 – 39,69) e 0,25 (0,20 – 0,31) e a CE_{90} de 54,13 (39,44 – 89,39) e 0,79 (0,58 – 1,28) para *C. sativum* e *L. sidoides* respectivamente.

Os resultados do teste com insetos adultos estão descritos nas tabelas 5, 6 e 7. Após 24 horas de observação o óleo de *C. sativum* apresentou eficácia de $99,23 \pm 1,32\%$ na concentração de 5mg/ml. O óleo essencial de *L. sidoides* foi mais eficiente e eliminou $100 \pm 0,0\%$ dos insetos adultos na concentração de 2,5mg/ml. Não foram observadas variações na eficácia adulticida em relação ao tempo de observação ($P > 0,05$). Às 24 horas de observação, a CE_{50} dos óleos foi de 1,10 (0,85 – 1,42) e 0,54 (0,42 – 0,68) e a CE_{90} foi de 4,23 (2,93 – 7,67) e 1,86 (1,33 – 3,18) para *C. sativum* e *L. sidoides* respectivamente. Não houve diferença estatística em relação à mortalidade de machos e fêmeas do inseto ($P > 0,05$). Com relação ao número de ovos obtidos a partir de fêmeas submetidas à ação do óleo de *C. sativum*, não foram observadas diferenças estatísticas entre o grupo tratado e controle. Da mesma forma, não houve diferença estatística no número de larvas eclodidas a partir da oviposição das fêmeas submetidas à ação deste óleo. O óleo essencial de *L. sidoides* foi mais efetivo

que o *C. sativum* em todas as fases de desenvolvimento do inseto ($P < 0,001$). Em todos os ensaios, os resultados apresentaram efeito dose-dependente.

Discussão

Atualmente, os inseticidas naturais têm sido cada vez mais requisitados, apresentando inúmeras vantagens quando comparados aos sintéticos, pois são obtidos a partir de recursos renováveis e são rapidamente degradados, não deixando resíduos em alimentos e no ambiente. O desenvolvimento destes compostos requer tempo e também um estudo sistematizado que preencha requisitos, tais como seletividade contra inimigos naturais, baixa toxicidade em mamíferos, biodegradabilidade e ausência de fitotoxicidade, além dos requisitos econômicos para que sua produção em alta escala seja viável (Vieira et al. 2001). Compostos orgânicos bioativos produzidos por vegetais incluem repelentes, deterrentes alimentares e de oviposição, inibidores de crescimento, esterilizantes e toxinas, que formam uma vasta defesa química contra insetos e microrganismos invasores (Cavalcante et al., 2006).

Óleos essenciais tem sido objeto de diversos estudos sobre insetos por serem combinações voláteis, naturais, complexas caracterizadas por um odor forte, formados por metabólitos secundários de plantas (Bakkali et al., 2008). Neste trabalho, os óleos essenciais de *C. sativum* e *L. sidoides* apresentaram efeito inseticida sobre as três fases de *Lu. longipalpis* em laboratório. Os monoterpenos linalol e timol foram os constituintes majoritários destes óleos. Em geral, óleos essenciais de origem botânica têm como constituintes majoritários os monoterpenos. Estas substâncias têm chamado atenção devido a suas propriedades inseticidas, repelentes e fago-inibidoras (Kethoh et al., 2005). Na maioria dos casos, atribui-se aos principais componentes dos óleos essenciais o efeito biológico do óleo (Ipek et al., 2005). Entretanto vale salientar que, um problema muito comum na pesquisa de atividade medicinal é que mesmo simples extratos ou outros produtos derivados de plantas podem conter uma mistura de vários compostos que estão sujeitos à variação de concentração de acordo com mudanças ambientais (Taylor et al., 2001).

No teste ovicida, resultados superiores foram obtidos quando se testou 1,8 cineol sobre ovos do piolho *Pediculus humanus capitis* obtendo-se $67 \pm 1,7\%$ de eficácia na dose de 1 mg/cm^2 (Yang et al., 2004). Stamopoulos et al., (2007) ao testar a atividade fumigante de cinco monoterpenóides sobre o coleóptero *Tribolium confusum* obtiveram CE_{50} de 183,5; 109,4; 1108; 466 e 278 $\mu\text{l/l}$ para o linalol, terpinen-4-ol, geraniol, 1,8-cineol e limoneno respectivamente. Poucas pesquisas têm sido feitas com fitoquímicos sobre a eclosão de ovos de insetos devido esta fase ser mais impermeável aos produtos testados (Shaalan et al. 2005). Dentre as hipóteses feitas para explicar uma maior

“tolerância” dos ovos aos inseticidas ou fitoquímicos, está na ação neurotóxica destes compostos. Na fase de ovo esta atividade só seria aparente quando o sistema nervoso do embrião começa a se desenvolver. Outra explicação seria a menor permeabilidade da superfície externa do ovo, no início da embriogênese (Stamopoulos et al., 2007).

Em relação ao teste de larvas do inseto, resultados superiores foram obtidos por Silva et al., (2008) ao testar o óleo essencial de *Lippia gracilis* sobre larvas de *A. aegypti*. A CE_{50} encontrada foi de $98 \pm 1,99$ ppm. Costa et al. (2005) avaliaram a ação do óleo de *L. sidoides* sobre as larvas de *A. aegypti* obtendo mortalidade de 100% na concentração de 250 ppm. O óleo essencial da semente de *C. sativum* testado sobre larvas do mosquito *Ochlerotatus caspius* mostrou CE_{50} de $156\mu\text{g/ml}$ ($109.1 - 436.5$), enquanto a CE_{50} do linalool puro sobre as larvas foi de $155.73\mu\text{g/ml}$ ($141.85 - 172.74$) (Knio et al., 2008). Poucos são os estudos realizados com flebotomíneos. No entanto, Coelho et al. (2006) adicionaram azadirachtina à dieta de larvas de *Lu. longipalpis* verificando que nas concentrações de 0,1; 1,0; e 10.0 μg de azadirachtina/mg, houve aumento significativo da mortalidade larval quando comparados ao grupo controle. Concentrações de 0,1 e 1,0 μg de azadirachtina/mg na dieta bloquearam a muda das larvas do inseto, que permaneceram no terceiro estágio até o final do experimento. A bioatividade de fitoquímicos contra larvas de mosquitos pode variar significativamente dependendo da espécie, parte utilizada e idade da planta, bem como do solvente usado na extração e da espécie de mosquito envolvida (Shalan et al., 2005).

Quando os insetos adultos foram submetidos a diferentes concentrações dos óleos essenciais de *C. sativum* e *L. sidoides* observou-se que as concentrações de 5 mg/ml e 2,5 mg/ml apresentaram eficácia de $99,23 \pm 1,32\%$ e $100 \pm 0,0\%$ respectivamente. Resultados inferiores, CE_{50} de 233 e 212 mg/mL, foram obtidos ao testar os extratos aquosos de *Antonia ovata* e *Derris amazonica* respectivamente, sobre adultos de *Lu. longipalpis*, após 48 horas de observação (Luitgards-Moura et al., 2002). Resultados superiores, CE_{50} de 90.5 ppm foram descritos para o óleo essencial de *L. turbinata* sobre adultos de *Culex quinquefasciatus* (Gleiser & Zygadlo, 2007). Rozman et al. (2007) testaram a atividade fumigante de vários compostos químicos sobre o besouro *Rhyzopertha dominica* e dentre estes, observaram que o linalool foi um dos mais eficazes sobre este inseto, com 100% de mortalidade na dose de $0,1\mu\text{l}/720\text{ml}$. Grodnitzky & Coats, (2002) testaram o timol sobre *Musca domestica* e obtiveram CE_{50} de $0.22\mu\text{mol}/\text{mosca}$ ($0.20 - 0.24$).

Monoterpenos podem apresentar atividade inseticida fumigante, de contato e ingestão sobre insetos e outros patógenos. Estas substâncias podem ser tóxicas pela penetração na cutícula do inseto, pela via respiratória e por via digestiva (Prates et al., 1998). Entretanto, existem poucas informações sobre o mecanismo da ação inseticida dos óleos essenciais. Uma das hipóteses cogitadas seria a inalação das substâncias químicas dos óleos através dos espiráculos dos insetos

(Yang et al., 2005). Outra hipótese seria a de que monoterpenos podem atuar sobre outros sítios vulneráveis, como citocromo P450 (Lee et al., 2001). Além disso, sabe-se que alguns terpenóides agem como inibidores da acetil-colinesterase e outros como substâncias neurotóxicas aos insetos, entretanto, o real mecanismo de ação destes óleos ainda necessita ser elucidado (Tsukamoto et al., 2005).

Neste estudo, os óleos essenciais de *C. sativum* e *L. sidoides* foram avaliados mostrando-se eficazes sobre as três fases de desenvolvimento de *Lu. longipalpis* em laboratório. Os resultados deste estudo podem contribuir para a redução no uso de inseticidas sintéticos, pois demonstram boas possibilidades da utilização destes óleos como alternativas na estratégia de controle do vetor da Leishmaniose visceral.

Referências bibliográficas

- ADAMS, R.P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Quadrupole Mass Spectroscopy, 4th edition. Allured, Illinois, 2001. 804p.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology, v.46, p.446-475, 2008.
- BURDOCK, G.A.; CARABIN, I.G. Safety assessment of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil as a food ingredient. Food and Chemical Toxicology, v. 47, p. 22-34, 2009.
- CABRERA, M.A.A. Ciclo enzoótico de transmissão da *Leishmania (Leishmania) chagasi* Cunha & Chagas, 1937 no ecótopo peridoméstico em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro- RJ. Estudo de Variáveis Preditoras.1999. 90p. Tese de Mestrado – Curso de Pós Graduação em Saúde Pública, Rio de Janeiro, 1999.
- CAVALCANTE, G. M.; MOREIRA, A. F. C.; VASCONCELOS, S. D. Potencialidade inseticida de extratos aquosos de essências florestais sobre mosca-branca. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 41, p. 9-14, 2006.
- CAVALCANTI, E.S.B.; MORAIS, S.M.; LIMA, M.A.A.; SANTANA, E.W.P. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 99, p. 541-544, 2004.
- COELHO, C.A.A.; ARAUJO, S.N.; FEDER, M.N.; SILVA, C.E.; GARCIA, E.S.; ZAMBUJA, P.; SALABERT, M.G.; RANGEL, E.F. Effects of azadirachtin on the development and mortality of *Lutzomyia longipalpis* larvae (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Journal of Medical Entomology, v. 43, p. 262-266, 2006.

- COSTA, J.G.M.; RODRIGUES, F.F.G.; ANGELICO, E.C.; SILVA, M.R.; MOTA, M.L.; SANTOS, N.K.A.; CARDOSO, A.L.H.; LEMOS, T.L.G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 15, p. 304-309, 2005.
- CRAVEIRO A.A.; MATOS F.J.A.; ALENCAR, J.W. A simple and inexpensive steam generator for essential oils extraction. Journal of Chemical education, v.53, p.652, 1976.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases, v.27, p. 305-318, 2004.
- FAÇANHA, M. C. C., CAVALCANTE, I. F., TEIXEIRA, M. J., MATOS, F. J. A., SOUSA, A. Q., POMPEU, M. M. L. Terapia da Leishmaniose experimental com constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras, São Paulo, SP, 1995. In: Anais da X Reunião Anual da Federação da Sociedade de Biologia Experimental, São Paulo, 1995, p. 270-270.
- GLEISER, R.M.; ZYGADLO, J.A. Insecticidal properties of essential oils from *Lippia turbinata* and *Lippia polystachya* (Verbenaceae) against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Parasitology Research, v. 101, p. 1349-1354, 2007.
- GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Revista Brasileira de Epidemiologia, v.7, p.338 - 349, 2004.
- GRODNITZKY, J.; COATS, J.R. QSAR evaluation of monoterpenoids insecticidal activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 50, p. 4576-80, 2002.
- IPEK, E.; ZEYTIÑOGLU, H.; OKAY, S.; TUYLU, B.A.; KURKCUOGLU, M.; HUSNU CAN BASER, K. Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. Food Chemistry, v. 93, 551–556, 2005.
- KETOH, G.K.; KOUMAGLO, H.K.; GLITHO, I.A. Inhibition of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) development with essential oil extracted from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. (Poaceae), and the wasp *Dinarmus basalis* (Rondani) (Hymenoptera: Pteromalidae). Journal of Stored Products Research, v. 41, p. 363–371, 2005.
- KHAUL, S.M.; SHARMA, R.S.; DEY, K.P.; RAI, R.N.; VERGHESE, T. Impact of DDT indoor residual spraying on *Phlebotomus argentipes* in a kala-azar endemic village in eastern Uttar Pradesh. Bulletin of the World Health Organization, v. 72, p. 79 - 81, 1994.
- KNIO, K.M.; USTA, J.; DAGHER, S.; ZOURNAJIAN, H.; KREYDIYYEH. Larvicidal activity of essential oils extracted from commonly used herbs in Lebanon against the seaside mosquito, *Ochlerotatus caspius*. Bioresource Technology, v.99, p. 763-768, 2008.

- LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 100, p. 811 - 827, 2005.
- LEE, S.E.; LEE, B.H.; CHOI, W.S.; PARK, B.S.; KIM, J.G.; CAMPBELL, B.C. Fumigant toxicity of volatile natural products from Korean spices and medicinal plants towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L). Pest Management Science, v.57, 548–553, 2001.
- LUITGARDS – MOURA, J.F.; BERMUDEZ, E.G.C.; ROCHA, A.F.I.; TSOURIS, P.; ROSA-FREITAS, M.G. Preliminary assays indicate that *Antonia ovata* (Loganiaceae) and *Derris amazônica* (Papilionaceae), ichthyotoxic plants used for fishing in Roraima, Brazil, have an insecticide effect on *Lutzomyia longipalpis* (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.97, p. 737-742, 2002.
- MARTINS, M.B.G.; MARCONI, A.P.; CAVALHEIRO, A.J.; RODRIGUES, S.D. Caracterização anatômica e química da folha e do sistema radicular de *Hydrocotyle umbellata* (Apiaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia, v.18, p. 402 – 414, 2008.
- MATOS, F. J. de A. Farmácias Vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. 4ª ed. Fortaleza, Ceará, 2002. 267p.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2006, 120p.
- OLIVEIRA, C.L.; MORAIS, M.H.F.; MACHADO-COELHO, G.L.L. Visceral leishmaniasis in large brazilian cities: challenges for control. Cadernos de Saúde Pública, v. 24, p. 2953-58, 2008.
- PRADO, G.P. Caracterização química e bioatividade do óleo essencial de *Cunila angustifolia* Benth (Lamiaceae) sobre *Alphitobius diaperius* (Panzer, 1797) (Coleóptera: Tenebrionidae). 2007. 60p. Dissertação de Mestrado – Curso de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Universidade Comunitária Regional de Chapecó.
- PRATES, H.T.; SANTOS, J.P.; WAQUIL, J.M.; FABRIS, J.D.; OLIVEIRA, A.B. & FOSTER, J.E. Insecticidal activity of monoterpenes against *Ryzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). Journal of Stored Products Research, v.34, p. 243-249, 1998.
- RANGEL, E.F.; VILELA, M.L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) e urbanização da leishmaniose visceral no Brasil. Cadernos de Saúde Pública v.24, p.2948-2952, 2008.
- ROZMAN, V.; KALINOVIC, I.; KORUNIC, Z. Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored-products insects. Journal of Stored Products Research, v.43, p.349-355, 2007.

- SHAALAN, E.A.S.; CANYON, D.; YOUNES, M.W.F.; ABDEL-WAHAB,H; MANSOUR,A.H. A review of botanical phytochemicals with insectocidal potential. *Environment International*, v. 31, p. 1149 - 1166, 2005.
- SHERLOCK, I. A.; SHERLOCK, V. A. Métodos práticos para criação de flebotomíneos em laboratório. *Revista Brasileira de Biologia*, v.32, p.209-217, 1972.
- SILVA, W.J.; DORIA, G.A.A.; MAIA, R.T.; NUNES, R.S.; CARVALHO, G.A.; BLANK, A.F.; ALVES, P.B.; MARÇAL, R.M.; CAVALCANTI, S.C.H. Effects of essential oil on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 3251-3255, 2008.
- STAMOPOULOS, D.C.; DAMOS, D.; KARAGIANIDOU, G. Bioactivity of Five monoterpenoid vapours to *Tribolium confusum* (du Val) (Coleóptera: tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research*, v.43, p. 571-577, 2007.
- TAYLOR, J. L. S., RABE, T., MCGAW, L. J., JÄGER, A.K., VAN STADEN, J. Towards the scientific validation of traditional medicinal plants. *Plant Growth Regulation*, v. 34, p. 23-37, 2001.
- TSUKAMOTO, T.; ISHIKAWA, Y.; MIYAZAWA, M. Larvicidal and adulticidal activity of alkylphthalide derivates from rhizome of *Cnidium officinale* against *Drosophila melanogaster*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p. 5549-5553, 2005.
- VIEGAS-JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*, v. 26, p. 390 - 400, 2003.
- VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; ANDREI, C. C. Plantas inseticidas. In: SIMÕES, C. M. VIEIRA, P. C.; MAFEZOLI, J.; BIAVATTI, M. W. Inseticidas de origem vegetal. In: FERREIRA, J. T. B.; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C. **Produtos naturais no controle de insetos**. São Carlos: Ed. da UFSCar, 2001. 176 p.
- YANG, P., YAJUN, M.A.; ZHENG, S. Adulticidal activity of five essential oils against *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Journal of Pesticide Science*, v.30, p.84-89, 2005.
- YANG, Y.C.; CHOI, H.Y.; CHOI, W.S.; CLARK, J.M.; AHN, Y.J. Ovicidal and adulticidal activity of *Eucalyptus globulus* leaf oil terpenoids against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Journal of Agriculture Food Chemistry*, v.52, p.2507-2511, 2004.

Tabela 1: Composição percentual relativa do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides*

Constituintes	<i>Lippia sidoides</i> (%)
Alfa – tujeno	1,48
Alfa – pineno	0,51
Mirceno	5,43
Alfa – Terpineno	1,43
Cymeno	9,08
Limonene	1,01
β – ocimeno	0,27
γ – Terpineno	3,83
Tymol, metil éter	1,79
Timol	59,65
Alfa – copaeno	0,66
Cariofilleno	10,60
Aromadendreno	0,53
Alfa – humuleno	0,56
Dihydroaromadendreno	0,91
Alfa-Murolene	0,45
δ – cadinene	0,35
Caryofillene oxide	0,72
n.i.*	0,46

*Não identificado

Tabela 2: Composição percentual relativa do óleo essencial dos frutos secos de *Coriandrum sativum*

Constituintes	<i>Coriandrum sativum</i> (%)
A- pinene	4,20
Camphene	0,56
Beta-pinene	0,42
Beta-mycene	0,65
1-Methyl-2-iso-propylbenzene (o-Cymene)	0,94
(+) Limonene	1,86
Γ -Terpinene	3,10
α - Terpinolen	0,50
2,6-Dimethylocta-2,7-dien-6-ol (beta-linalol)	73,21
Camphor	4,25
Borneol	0,98
Trans-geraniol	0,38
Geraniol acetate	2,19
Methyl oleate	0,38

Tabela 3: Eficácia (média ± desvio padrão) do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* e do óleo essencial dos frutos secos de *Coriandrum sativum* sobre ovos de *Lutzomyia longipalpis*

	<i>Lippia sidoides</i>		<i>Coriandrum sativum</i>	
	Concentração (mg/ml)	% eficácia	Concentração (mg/ml)	% eficácia
	40	94,59 ± 1,59 ^{aA}	80	96,88 ± 1,45 ^{aB}
	20	65,51 ± 0,56 ^{bA}	40	66,40 ± 3,43 ^{bA}
	10	47,77 ± 0,77 ^{cA}	20	43,55 ± 2,56 ^{cA}
	5	24,63 ± 1,31 ^{dA}	10	17,18 ± 4,28 ^{dB}
	2,5	2,9 ± 1,55 ^{eA}	5	0,0 ± 0,0 ^{eB}
Cipermetrina	196 (µg/ml)	100 ± 0,0 ^{aA}	196 (µg/ml)	100 ± 0,0 ^{aA}
Tween 80	-	-	3%	0,85 ± 1,47 ^{eA}
DMSO	3%	0,0 ± 0,0 ^{eA}	-	-
Água		0,32 ± 0,55 ^{eA}		0,50 ± 0,87 ^{eA}

Letras minúsculas comparam a eficácia entre linhas. Letras maiúsculas comparam a eficácia entre colunas. (P>0,01). Letras diferentes indicam diferença significativa (P<0,01).

Tabela 4: Eficácia (média \pm desvio padrão) do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* e do óleo essencial dos frutos secos de *Coriandrum sativum* sobre larvas de *Lutzomyia longipalpis*

	<i>Lippia sidoides</i>		<i>Coriandrum sativum</i>	
	Concentração (mg/ml)	% eficácia	Concentração (mg/ml)	% eficácia
	1,2	100 \pm 0,0 ^{aA}	80	79,77 \pm 2,2 ^{aB}
	0,6	73,37 \pm 0,83 ^{bA}	40	58,24 \pm 0,93 ^{cB}
	0,3	56,27 \pm 2,10 ^{cA}	20	37,20 \pm 1,58 ^{dB}
	0,15	32,30 \pm 1,59 ^{dA}	10	24,17 \pm 2,11 ^{eB}
	0,075	4,54 \pm 1,11 ^{eA}	5	3,40 \pm 1,38 ^{fA}
Cipermetrina	196 (μ g/ml)	100 \pm 0,0 ^{aA}	196 (μ g/ml)	100 \pm 0,0 ^{bA}
Tween 80	-	-	3%	1,75 \pm 0,87 ^{fA}
DMSO	3%	1,75 \pm 1,70 ^{eA}		
Água		1,25 \pm 1,08 ^{eA}		1,37 \pm 1,20 ^{fA}

Letras minúsculas comparam a eficácia entre linhas. Letras maiúsculas comparam a eficácia entre colunas. (P>0,01). Letras diferentes indicam diferença significativa (P<0,01).

Tabela 5: Eficácia (média \pm desvio padrão) do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* e do óleo essencial dos frutos secos de *Coriandrum sativum* sobre adultos de *Lutzomyia longipalpis* após 24 horas de observação.

	<i>Lippia sidoides</i>		<i>Coriandrum sativum</i>	
	Concentração (mg/ml)	% eficácia	Concentração (mg/ml)	% eficácia
	2,5	100 \pm 0,0 ^{aA}	5	99,23 \pm 1,32 ^{aA}
	1,2	69,17 \pm 5,69 ^{bA}	2,5	66,55 \pm 3,5 ^{bA}
	0,6	46,68 \pm 1,36 ^{cA}	1,2	46,57 \pm 4,5 ^{cA}
	0,3	31,61 \pm 1,31 ^{dA}	0,6	30,33 \pm 5,7 ^{dA}
	0,15	4,61 \pm 1,33 ^{eA}	0,3	7,34 \pm 1,8 ^{eA}
Cipermetrina	196 (μ g/ml)	100 \pm 0,0 ^{aA}	196 (μ g/ml)	100 \pm 0,0 ^{aA}
Tween 80	-	-	3%	0,89 \pm 0,78 ^{eA}
DMSO	3%	0,49 \pm 0,59 ^{eA}		
Água		0,59 \pm 0,59 ^{eA}		0,49 \pm 0,43 ^{eA}

Letras minúsculas comparam a eficácia entre linhas. Letras maiúsculas comparam a eficácia entre colunas. (P>0,01). Letras diferentes indicam diferença significativa (P<0,01).

Tabela 6: Eficácia (média ± desvio padrão) do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* e do óleo essencial dos frutos secos de *Coriandrum sativum* sobre adultos de *Lutzomyia longipalpis* após 48 horas de observação.

	<i>Lippia sidoides</i>		<i>Coriandrum sativum</i>	
	Concentração (mg/ml)	% eficácia	Concentração (mg/ml)	% eficácia
	2,5	100 ± 0,0 ^{aA}	5	100 ± 0,0 ^{aA}
	1,2	68,42 ± 4,66 ^{bA}	2,5	70,46 ± 2,59 ^{bA}
	0,6	49,98 ± 3,40 ^{cA}	1,2	51,20 ± 2,46 ^{cA}
	0,3	30,30 ± 1,66 ^{dA}	0,6	29,88 ± 2,77 ^{dA}
	0,15	4,12 ± 2,26 ^{eA}	0,3	7,81 ± 3,2 ^{eB}
Cipermetrina	196 (µg/ml)	100 ± 0,0 ^{aA}	196 (µg/ml)	100 ± 0,0 ^{aA}
Tween 80	-	-	3%	0,40 ± 0,40 ^{eA}
DMSO	3%	1,20 ± 1,48 ^{eA}		
Água		1,20 ± 1,48 ^{eA}		0,48 ± 0,30 ^{eA}

Letras minúsculas comparam a eficácia entre linhas. Letras maiúsculas comparam a eficácia entre colunas. (P>0,01). Letras diferentes indicam diferença significativa (P<0,01).

Tabela 7: Eficácia (média ± desvio padrão) do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* e do óleo essencial dos frutos de *Coriandrum sativum* sobre adultos de *Lutzomyia longipalpis* após 72 horas de observação.

	<i>Lippia sidoides</i>		<i>Coriandrum sativum</i>	
	Concentração (mg/ml)	% eficácia	Concentração (mg/ml)	% eficácia
	2,5	100 ± 0,0 ^{aA}	5	100 ± 0,0 ^{aA}
	1,2	72,66 ± 3,53 ^{bA}	2,5	70,07 ± 2,58 ^{bA}
	0,6	48,58 ± 0,47 ^{cA}	1,2	45,25 ± 3,53 ^{cA}
	0,3	16,83 ± 1,56 ^{dA}	0,6	23,76 ± 0,61 ^{dB}
	0,15	3,32 ± 0,21 ^{eA}	0,3	6,00 ± 1,54 ^{eA}
Cipermetrina	196 (µg/ml)	100 ± 0,0 ^{aA}	196 (µg/ml)	100 ± 0,0 ^{aA}
Tween 80	-	-	3%	0,76 ± 1,32 ^{eA}
DMSO	3%	0,76 ± 1,32 ^{eA}		
Água		0,86 ± 0,73 ^{eA}		0,86 ± 0,73 ^{eA}

Letras minúsculas comparam a eficácia entre linhas. Letras maiúsculas comparam a eficácia entre colunas. (P>0,01). Letras diferentes indicam diferença significativa (P<0,01).

6 CAPÍTULO 3

Atividade inseticida do óleo de *Eucalyptus* spp sobre o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*

Insecticidal activity of *Eucalyptus* spp. essential oils on the sandfly *Lutzomyia longipalpis*

Periódico: Veterinary Parasitology (Submetido em Janeiro de 2009)

**Insecticidal activity of *Eucalyptus* spp. essential oils on the sandfly
*Lutzomyia longipalpis***

M.V. Maciel^{a*}, S.M. Morais^b, C.M.L. Bevilaqua^a, R.A. Silva^c, R. S. Barros^a, R.N. Sousa^c, L.C. Sousa^c, E.S. Brito^d, M.A. Souza-Neto^d

^{a*} Ceará State University, Postgraduate Program in Veterinary Science, Laboratory of Parasitic Diseases, Av. Paranjana, 1700, CEP 60740-000, Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Ceará State University, Laboratory of Natural Products Chemistry, Ceará, Brazil.

^c Ceará State Health Secretariat, Entomology Laboratory of the Center for Vector Control, Ceará, Brazil

^d Embrapa Tropical Agroindustry Research Unit, Ceará, Brazil

Corresponding author: Tel.: + 85 3101 9853; Fax: +55 3101 9840

*E-mail address: michellinevet@gmail.com

Abstract

The chemical composition of essential oils from three species of plants belonging to the genus *Eucalyptus* were determined and, their insecticidal effects on egg, larva and adult phases of *Lutzomyia longipalpis* were assessed. The insects were collected in the municipality of Sobral in the State of Ceará, Brazil. Five treatments with different concentrations were performed along with two negative controls, distilled water and Tween 80 (3%), and a positive control, cypermethrin (0.196 mg/ml). The tests were carried out in plastic pots internally coated with sterile plaster and filled with a substrate made of rabbit feces and crushed cassava leaves. The eggs, larvae and adults were sprayed with the oils. The hatched larvae were counted for 10 consecutive days and observed until pupation. Insect mortality was observed after 24, 48 and 72 hours. The major constituents of the oils were Z-citral and alpha-citral (*E. staigeriana*), citronellal (*E. citriodora*) and 1,8-cineole (*E. globulus*). The *Eucalyptus* essential oils constitute alternative natural products for the control of *L. longipalpis* since the median effective concentration (EC₅₀) values revealed relevant action as compared with other natural products, some chemical constituents are already known for their insecticidal activity and these oils are produced in commercial scale in Brazil.

Keywords: *Eucalyptus*; *Lutzomyia longipalpis*; Essential oils; Insecticides; Insect control

1. Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is a serious chronic disease caused by protozoa of the *Leishmania* genus belonging to the *Leishmania (Leishmania) donovani* complex. In Brazil, the causative agent is *L. chagasi* (Gontijo and Melo, 2004). Sandflies, which are vectors for several species of *Leishmania*, comprise more than 40 species of *Phlebotomus* in the Old World and 30 *Lutzomyia* species in the Americas (Alexander and Maroli, 2003). *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) is the main

vector of this disease in Latin America, and, in Brazil alone it is responsible for 90% of disease cases (Lainson and Rangel, 2005).

Vector control using insecticides has been recommended by the World Health Organization (Gontijo and Melo, 2004). Mathematical models of the three methods of control (Dye, 1996) suggest that insecticide spraying and dog vaccination are better solutions to the problem than the euthanasia of serologically positive dogs (Tesh, 1995). In addition, acquired resistance and environmental pollution due to the repeated application of persistent synthetic insecticides have led to increased interest in new natural chemicals (Viegas-Júnior, 2003).

In this context, screening of natural products has received the attention of researchers around the world, but seems to be particularly important for public health in developing countries. Since many diseases transmitted by insects (e.g., malaria, dengue, yellow fever, leishmaniasis, Chagas disease, etc.) are endemic in developing countries, the search for insecticides and repellents of botanical origin has been driven by the need to find new products that are effective, but also safer and cheaper than current products (De Paula et al., 2004). Additionally, people in our country like and sometimes prefer natural products than synthetics (Yaghoobi-Ershadi et al., 2006).

Many secondary plant metabolites are known for their insecticidal properties, and in many cases plants have a history of use as home remedies to kill or repel insects (Broussalis et al., 1999). In recent decades, research on the interactions between plants and insects has revealed the potential use of plant metabolites or allelochemicals for this purpose (Pavela, 2004). It is known that some chemical constituents of essential oils have insecticidal properties (Sptizer, 2004). In some studies, essential oils obtained from commercial sources were used. Specific compounds isolated from plant extracts or essential oils were tested for fumigation purposes (Rajendran and Sriranjini, 2008).

The Myrtaceae family comprises about 100 genera with approximately 3,000 species of plants (Denardi and Marchiori, 2005). *Eucalyptus* is one of the most cultivated genera in the world, including more than 700 species belonging to this family. Various biological properties have already

been attributed to the genus *Eucalyptus*, among them larvicidal activity on culicids (Cheng et al., 2008), insecticidal activity against beetles (Brito et al., 2006), and repellent action against *Phlebotomus papatasi* (Yaghoobi-Ershadi et al., 2006). In Brazil, the main species of *Eucalyptus* used to produce commercial essential oils are *E. staigeriana*, *E. citriodora* and *E. globulus* (Vitti and Brito, 2003). Since there have not been any reports about the use of these *Eucalyptus* oils against *L. longipalpis*, the aim of this study was to evaluate the insecticidal activity of commercial essential oils of *E. staigeriana*, *E. citriodora* and *E. globulus* on the developmental stages of *L. longipalpis* in the laboratory.

2. Materials and Methods

2.1. Laboratory rearing of sandflies

The establishment and maintenance of the sandfly colony was based on the methods of Smith (1925), as cited by Sherlock & Sherlock (1972), with some modifications. The vectors were captured in the municipality of Sobral, an endemic visceral leishmaniasis area in the State of Ceará, Brazil, using CDC traps and then brought to the entomology laboratory of the Vector Control Center (Health Secretariat of Ceará State). The insects were kept in nylon tulle cages inside a BOD incubator at a temperature of 27°C and 80% relative humidity (RH). The adult females were fed with anesthetized hamsters (10 mg/kg of Ketamine and 2 mg/kg of Xylazine by intramuscular injection). After 4 days, 25 females were placed for egg-laying in plastic pots that were internally coated with sterile plaster to maintain moisture and filled with a substrate prepared from rabbit feces and crushed cassava leaves. Afterwards, several eggs were transferred to similar pots for hatching, and the

formed larvae were maintained in this substrate until pupation. When the adults emerged, they were transferred to cages to continue the cycle.

Five treatments with three replicates were performed using different plant oil concentrations in all tests, as well as two negative controls, distilled water and Tween 80 (3%) and a positive control, cypermethrin (0.196 mg/ml).

In vitro tests on L. longipalpis eggs

Aqueous solutions of plant oils were used at concentrations of 20, 10, 5, 2.5 and 1.2 mg/ml for *E. staigeriana* and 40, 20, 10, 5 and 2.5 mg/ml for both *E. citriodora* and *E. globulus*. Tests were performed at $\pm 27^{\circ}\text{C}$ and 80% RH using 30 eggs sprayed with 1 ml of each oil solution. The hatched larvae were counted for 10 days.

In vitro tests on L. longipalpis larvae

Thirty eggs were transferred to plastic pots internally coated with sterile plaster containing a thin layer of food substrate for hatching. Six days after hatching, the larvae were sprayed with oil solutions in the following concentrations: 5, 4, 3, 2 and 1 mg/ml for *E. staigeriana*; 6.5, 3.5, 1.6, 0.8 and 0.4 mg/ml for *E. citriodora* and 40, 35, 30, 25 and 20 mg/ml for *E. globulus*. The larvae were observed until pupation.

In vitro tests against L. longipalpis adults

Each oil concentration (1ml), cypermethrin or Tween 80 was applied to the inner surface and bottom of each pot using a pipette. Thirty adult *L. longipalpis* specimens (15 males and 15 females)

were placed inside of the pots after the application of the oils, and the concentrations used were 5, 2.5, 1.2, 0.6 and 0.3 mg/ml for *E. staigeriana* oil and 10, 8, 6, 4 and 2 mg/ml for *E. citriodora* and *E. globulus* oils. In this experiment, the parameters observed were insect mortality after 24, 48 and 72 hours, mortality rate differences between female and male insects and the number of eggs obtained from females subjected to the oils.

GC and GC/MS analysis of essential oils

The *Eucalyptus* oils were purchased from Dierberger Óleos Essenciais Química Ltda. The oils were analyzed by gas chromatography (GC) using a Varian CP-3800 gas chromatograph coupled to a computer equipped with a STAR WORKSTATION. The instrument was equipped with a 30-m fused silica capillary column (CP-Sil 8CB, Varian) with an internal diameter of 0.25 mm and a film thickness of 0.25 μm . The hydrogen carrier gas had a delivery rate of 1.5 ml/min (controlled constant flow). The capillary injector operated at 250°C in the split mode (1:100) and the flame ionization detector (FID) ran at 250°C. The oven temperature program was 35°C during injection, then increased from 35 to 180°C at the rate of 4°C/min, increased again to a final temperature of 280°C at a rate of 17°C/min and remained at 280°C for 10 min.

Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) was performed on a Hewlett-Packard 5971 instrument with a dimethylpolysiloxane DB-1 coated fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm) and He as the carrier gas (1 ml/min). The injector temperature was 250°C and the detector temperature was 200°C. The column temperature program was 35-180°C at 4°C/min, then 180-250°C at 10°C/min. For MS, the electron impact was 70 eV. Compounds were identified by their GC retention time, expressed by Kovat's index, which was calculated by the Van den Dool and Kratz equation using a hydrocarbon homologous series and by comparison of test compound mass spectra

with those present in the National Institute for Standard Technology computer data bank (NIST; 62,235 compounds) and published spectra (Adams, 2001).

2.5. Statistical analyses

The data were processed with the formula $\log(x + 1)$, subjected to one-way variance analysis and compared by the Tukey test with 5% probability, using the Prism 3.0 program. The median effective concentration (EC_{50}) values were calculated by using Probit SPSS 8.0 for Windows.

3. Results

The constituents of the commercial *Eucalyptus* oils are shown in Table 1. The major constituents of *E. staigeriana* oil were (+) limonene (28.82%), Z-citral (10.77%) and E-citral (14.6%); *E. citriodora* contained β -citronellal (57.53%) and *E. globulus* contained 1,8-cineole (83.89%). All the *Eucalyptus* oils studied were effective against the egg, larval and adult phases of *L. longipalpis*. However, *E. staigeriana* oil was the most effective on all three phases of the insect, followed by *E. citriodora* and *E. globulus* oils, respectively.

All tested oils inhibited egg hatching (Table 2). *E. staigeriana* oil was the most effective, since *E. citriodora* and *E. globulus* oils at a concentration of 40 mg/ml presented effectiveness of 94.68% and 92.73%, respectively, but *E. staigeriana* oil was 90.29% effective with 20 mg/ml ($P > 0.05$). The EC_{50} values of *E. staigeriana*, *E. citriodora* and *E. globulus* oils were 3.6 mg/ml (2.28 - 5.23), 9.44 mg/ml (2.47 - 35.25) and 9.23 mg/ml (6.73 - 12.59), respectively.

The results of the assays with insect larvae are shown in Table 3. *E. globulus* oil showed 100% effectiveness at 40 mg/ml, while *E. citriodora* and *E. staigeriana* oils showed this result at

lower concentrations, 6.5 and 5 mg/ml, respectively ($P>0.05$). *E. citriodora* oil was superior to *E. globulus* oil at all tested concentrations ($P<0.001$). The EC_{50} values of *E. staigeriana*, *E. citriodora* and *E. globulus* oils were 2.63 mg/ml (1.69 - 3.67), 1.78 mg/ml (1.41 - 2.26) and 25.29 mg/ml (17.12 - 30.14), respectively.

Insecticide effects on adult sandflies after 24, 48 and 72 hours of observation are shown in Tables 4, 5 and 6. Of all the compounds tested, *E. staigeriana* was the best. After 24 hours, the *E. citriodora* and *E. globulus* oils at a concentration of 10 mg/ml were 88.13% and 95.50% effective, respectively, while *E. staigeriana* oil was 99.62% effective at a concentration of 5 mg/ml ($P>0.05$). After 48 hours, *E. citriodora* oil was more effective than *E. globulus* oil at a concentration of 8 mg/ml ($P<0.01$). This difference persisted at 72 hours of observation.

There were no statistical differences in the mortality rates of male and female insects ($P>0.05$). The EC_{50} values of the *E. staigeriana*, *E. citriodora* and *E. globulus* oils were 0.59 mg/ml (0.37-0.82), 5.04 mg/ml (2.26 - 8.78) and 7.78 mg/ml (6.54 - 13.28), respectively. The effectiveness of the oils persisted through the whole observation period, but had a tendency to diminish. However, this difference was only statistically significant at the 2.5 mg/ml ($P<0.01$) and 1.2 mg/ml ($P<0.001$) concentrations for *E. staigeriana*. There were no statistically significant differences in the number of eggs obtained from females or in larvae hatched from the eggs of the females subjected to the *Eucalyptus* spp. oils ($P>0.05$).

4. Discussion

Visceral leishmaniasis is a zoonosis of great importance for public health and veterinary medicine. *L. longipalpis* is the main vector of this disease in Brazil. With the expansion of endemic

areas and the significant increase in the number of cases, VL is considered by the World Health Organization to be a priority among tropical diseases (Gontijo and Melo, 2004).

In highly endemic areas, such as the states of Northeastern Brazil, attempts have been made to control VL on three fronts: patient treatment, sacrifice of infected dogs and spraying of insecticides (Lainson and Rangel, 2005). Currently, residual insecticides are sprayed on house walls as well as inside chicken coops, pigsties and stables (Cabrera, 1999). In Brazil, these actions have always been sporadic and have failed to eradicate this disease, with reinfestation and resurgence of human and canine cases of VL (Gontijo and Melo, 2004). The first case of insecticide resistance was reported in Bihar, India, where *Phlebotomus papatasi* survived exposure to DDT at doses of 4% and 8% (Khaul et al., 1994).

Acquired resistance and environmental pollution due to repeated applications of persistent synthetic insecticides have created interest in discovering new natural insecticide products (Viegas-Júnior, 2003). The use of plants with insecticidal activity has several advantages over the use of synthetic products: natural insecticides are obtained from renewable resources and quickly degrade, the development of insect resistance to these substances is slow, the substances do not leave residues in the environment, they are easily obtained by farmers and they cost less to produce (Roel, 2001). The effects of essential oils on insects have been the subject of several studies. These oils are formed by a complex mixture of volatile constituents originating from the secondary metabolism of plants and are characterized by a strong scent (Bakkali et al., 2008).

The components in essential oils vary not only with plant species but also in relation to climate, soil composition, part of the plant and age of the plant. Many essential oils are composed of a variety of terpenoid compounds (De Paula et al., 2004). These substances are usually volatile and can be detected by the antennae or tarsi of insects. The major terpenoids contained in essential oils are monoterpenoids (citronellal, linalol, menthol, pinene, mentone, carvone and limonene), sesquiterpenoids (farnesol, nerolidol) and phenylpropanoids (safrol, eugenol), among other

compounds (Sptizer, 2004). The great majority of the literature on the effects of terpenoids on insects has reported growth inhibition, impaired maturation, reduced reproductive capacity, appetite suppression and death of predator insects by starvation or direct toxicity (Viegas-Júnior, 2003). The monoterpene limonene demonstrated insecticidal activity by penetrating the cuticle of the insect (contact effect), by respiration (fumigant effect) and through the digestive system (ingestion effect) (Prates et al., 1998).

The essential oils of *Cymbopogon citratus*, *Lippia sidoides*, *Ocimum americanum* and *Ocimum gratissimum* showed good larvicidal activity against *Aedes aegypti*. The main constituents of these oils are the monoterpenoids geranial and citral for *C. citratus*, thymol for *L. sidoides*, E-methyl-cinnamate for *O. americanum* and eugenol and 1,8-cineole for *O. gratissimum* (Cavalcante et al., 2006). The essential oil of *Myroxylum balsamum* presented good larvicidal activity against *A. aegypti* larvae, and the monoterpenes beta- and alpha-pinene were the main constituents (Simas et al., 2004).

The egg phase of *L. longipalpis* was the most resistant to the *Eucalyptus* oils, needing higher doses to obtain a better effect. Similar results were obtained with the compound 1,8-cineole on eggs, larvae and adults of *Tribolium confusum*. One hypothesis to explain the greater tolerance of the eggs is that the neurotoxic action of this compound acts only after nervous system of the embryo begins to grow. Another possible explanation is the lesser permeability of the egg surface at the beginning of embryogenesis (Stamopoulos et al., 2007). The constituents of *Eucalyptus* spp. oils were also tested on lice. 1,8-cineole acted on eggs of the louse *Pediculus humanus capitis*, obtaining 67% effectiveness at a concentration of 1 mg/cm² (Yang et al., 2004).

The essential oil of *E. staigeriana* was the most effective on *L. longipalpis* larvae, followed by *E. citriodora* and *E. globulus*. These essential oils and the emulsified concentrate were tested against larvae and engorged females of the tick *Boophilus microplus*, in search of an acaricide less damaging to the environment. Citronellal, the main component of *E. citriodora* oil, and 1,8-cineole

in *E. globulus* were considered responsible for their acaricidal action. *E. staigeriana* essential oil showed the best acaricidal action, and several substances acted in synergy against *B. microplus* (Chagas et al., 2002).

Studies performed with sandflies and plant insecticides are few. The compound azadirachtin added to the *L. longipalpis* larvae diet at 0.1, 1.0 and 10.0 µg concentrations increased larval mortality compared to a control group (Coelho et al., 2006). Concentrations of 0.1 and 1.0 µg/g azadirachtin in the diet prevented the larvae from hatching. The bioactivity of phytochemicals against mosquito larvae can vary significantly in relation to plant species, part and age, as well as the solvent used in the extraction and the mosquito species involved (Shalan et al., 2005).

E. staigeriana oil was the most effective on adult insects, promoting mortality of $99.62 \pm 0.66\%$ at a concentration of 5 mg/ml. *E. citriodora* and *E. globulus* oils were similarly effective at all tested concentrations, except for 8 mg/ml after 48 and 72 hours. Lower efficacy was shown by aqueous extracts of *Antonia ovata* and *Derris amazonica* on *L. longipalpis* adults after 48 hours of observation (Luitgards-Moura et al., 2002). The EC₅₀ values were 233 and 212 mg/ml, respectively. However, when testing 1,8-cineole on males and females of *Musca domestica* and *Chrysomya megacephala*, EC₅₀ values obtained of 118 µg/fly (males, *Musca*) 177 µg/fly (females, *Musca*), 197 µg/fly (males, *Chrysomya*) and 221 µg/fly (females, *Chrysomya*). With a topical application of 1,8-cineole on *M. domestica* adults, males were more susceptible than females (Sukontason et al., 2004).

Essential oils from *Citrus sinensis* was the most effective of five oils tested on adult *Culex pipiens quiquefasciatus* (Yang et al., 2005). Chemical analysis of this oil showed that E-citral and Z-citral were the major constituents (69.27%); however, citral tested separately was more effective against the insect in a short period of time. The EC₅₀ values for *C. sinensis* oil and citral were, respectively, 0.0133% and 0.0012% (Yang et al., 2005). 1,8-cineole on 10-day-old adult males and females of the coleopteron *Tribolium confusum* obtained a EC₅₀ of 7.0 µl/l for both sexes. The same experiment performed with 40-day-old males and females showed a lower EC₅₀ (Stamopoulos et al.,

2007). These data can explain the effectiveness of *Eucalyptus* oils on the three phases of *L. longipalpis* development. However, little information exists about the mechanism of action of the essential oils. One of the hypotheses suggested is that oil inhalation can kill the insect (Yang et al., 2005). Besides this, it is known that some terpenoids inhibit acetylcholinesterase activity. Another hypothesis is that the monoterpenes act on other vulnerable sites, such as cytochrome P450 (Lee et al., 2001), but understanding the real mechanism of action of these oils will require further investigation (Tsukamoto et al., 2005).

In this study, three essential oils of *Eucalyptus* were tested and shown to be effective on the developmental phases of *L. longipalpis* in the laboratory. The chemical compositions were different for each oil, in accordance with literature data, and the main constituents were tested in other insects and showed good activities. *E. staigeriana* oil was the most effective on all insect phases, and this oil constitutes a viable alternative for control of the vector of visceral leishmaniasis.

Acknowledgements

. We would like to thank the Ceará State Health Secretariat, Entomology Laboratory of the Center for Vector Control and CAPES for a scholarship.

References

- Adams, R.P., 2001. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Quadrupole Mass Spectroscopy, 4th edition. Allured, Illionois, 804pp.
- Alexander, B., Maroli, M., 2003. Control of Phlebotomine sandflies. Med. Vet. Entomol. 17, 1-18.

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446-475.
- Brito, J.P., Oliveira, J.E.M., Bortoli, S.A., 2006. Toxicidade de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). *Revista de Biologia e Ciências da Terra.* 6, 96-103.
- Broussalis, A.M., Ferraro, G.E., Martino, V.S., Pinzón, R., Coussio, J.D., Alvarez, J.C., 1999. Argentine plants as potential source of insecticidal compounds. *J. Ethnopharmacol.* 67, 219-223.
- Cabrera, M.A.A., 1999. Ciclo enzoótico de transmissão da *Leishmania (Leishmania) chagasi* Cunha & Chagas, 1937 no ecótopo peridoméstico em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro- RJ. Estudo de Variáveis Preditoras. Tese de Mestrado, Rio de Janeiro, 90p.
- Cavalcante, G.M., Moreira, A.F.C., Vasconcelos, S.D., 2006. Potencialidade inseticida de extratos aquosos de essências florestais sobre mosca-branca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira.* 41, 9-14.
- Chagas, A.C.S., Passos, W.M., Prates, H.T., Leite, R.C., Furlong, J., Fortes, I.C.P., 2002. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.* 39, 247-253.
- Cheng, S.-S., Huang, C.-G., Chen, Y.-J., Yu, J.-J., Chen, W.-J., Chang, S.-T., 2008. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. *Biores. Technol.* 100, 452-456
- Coelho, C.A.A., Araújo, N.S., Feder, M.D., Da Silva, C.E., De Souza, E.G., Azambuja, P., Salabert, M.G., Rangel, E.F., 2006. Effects of azadirachtin on the development and mortality of *Lutzomyia longipalpis* larvae (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *J. Med. Entomol.* 43, 262-266.
- De Paula, J.P., Farago, P. V., Checchia, L.E.M., Hirose, K.M., Ribas, J.L.C., 2004. Atividade repelente do óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth (variedade eugenol) contra o *Anopheles braziliensis* Chagas. *Acta Farm. Bonaerense.* 23, 376-378.

- Denardi, L., Marchiori, J. N. C., 2005. Anatomia Ecológica de madeira de *Blepharocalyx salicifolius* (H. B. k.) Berg. *Ciência Florestal*. 15, 119-127.
- Dye, C., 1996. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55, 125-130.
- Gontijo, C.M.F., Melo, M.N., 2004. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 7, 338 – 349.
- Khaul, S.M., Sharma, R.S., Dey, K.P., Rai, R.N., Verghese, T., 1994. Impact of DDT indoor residual spraying on *Phlebotomus argentipes* in a kala-azar endemic village in eastern Uttar Pradesh. *Bull. WHO*. 72, 79-81.
- Lainson, R., Rangel, E.F., 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 100, 811 – 827.
- Lee, S.E., Lee, B.H., Choi, W.S., Park, B.S., Kim, J.G., Campbell, B.C., 2001. Fumigant toxicity of volatile natural products from Korean spices and medicinal plants towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L). *Pest Manag. Sci.* 57, 548-553.
- Luitgards-Moura, J.F., Bermudez, E.G.C., Rocha, A.F.I., Tsouris, P., Rosa-Freitas, M.G., 2002. Preliminary assays indicate that *Antonia ovata* (Loganiaceae) and *Derris amazonica* (Papilionaceae), ichthyotoxic plants used for fishing in Roraima, Brazil, have an insecticide effect on *Lutzomyia longipalpis* (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 97, 737-742.
- Pavela, R., 2004. Insecticidal activity of certain medicinal plants. *Fitoterapia*. 75, 745-749.
- Prates, H.T., Santos, J.P., Waquil, J.M., Fabris, J.D., Oliveira, A.B., Foster, J.E., 1998. Insecticidal activity of monoterpenes against *Ryzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). *J. Stored Prod. Res.* 34, 243-249.
- Rajendran, S., Sriranjini, V., 2008. Plant products as fumigants for stored-product insect control. *J. Stored. Prod. Res.* 44, 126-135.

- Roel, A.R., 2001. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. *Revista Internacional do Desenvolvimento Local*. 1, 43-50.
- Shaalán, E.A-S., Canyon, D., Younes, M.W.F., Abdel-Wahab,H., Mansour,A-H., 2005. A review of botanical phytochemicals with insectocidal potential. *Environ.Int.*31, 1149-1166.
- Sherlock, I. A., Sherlock, V. A., 1972. Métodos práticos para criação de flebotomíneos em laboratório. *Revista Brasileira de Biologia* 32, 209-217.
- Simas, N.K., Lima, E.C., Conceição, S.R., Kuster, R.M., Oliveira Filho, A.M., 2004. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Química Nova*. 27, 46-49.
- Spitzer, C.M.O.S.V., 2004. Óleos voláteis. In: Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A., Petrovick, P. R. (Eds.), *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre, pp. 467 - 495.
- Stamopoulos, D.C., Damos, D., Karagianidou, G., 2007. Bioactivity of five monoterpenoid vapours to *Tribolium confusum* (du Val) (Coleoptera: tenebrionidae). *J. Stored Prod. Res.* 43, 571-577.
- Sukontason, K.L., Boonchu, N., Sukontason, K., Choochote, W., 2004. Effects of eucalyptol on house fly (Diptera: Muscidae) and blow fly (Diptera: Calliphoridae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 46, 97-101.
- Tesh, R.B.,1995.Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies?. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53, 287-292.
- Tsukamoto, T., Ishikawa, Y., Miyazawa, M., 2005. Larvicidal and adulticidal activity of alkylphthalide derivates from rhizome of *Cnidium officinale* against *Drosophila melanogaster*. *J. Agric. Food Chem.* 53, 5549-5553.
- Viegas-Júnior, C., 2003. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*. 26, 390-400.

- Vitti, A.M.S., Brito, J.O., 2003. Óleo essencial de Eucalipto. IPEF, Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, Documentos Florestais, n. 17, p. 2-25.
- Yaghoobi-Ershadi, M.R., Akhavan, A.A., Jahanifard, E., Vantandoost, H., Amin, G.H., Moosavi, L., Ramazani, A.R.Z., Abdoli, H., Arandian, M.H., 2006. Repellency effect of Myrtle essential oil and DEET against *Phlebotomus papatasi*, under laboratory conditions. Iranian Journal Public Health. 35, 7-13.
- Yang, P., Ma, Y., Zheng, S., 2005. Adulticidal activity of five essential oils against *Culex pipiens quinquefasciatus*. J. Pest. Sci. 30, 84-89.
- Yang, Y.C., Choi, H.Y., Choi, W.S., Clark, J.M., Ahn, Y.J., 2004. Ovicidal and adulticidal activity of *Eucalyptus globulus* leaf oil terpenoids against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). J. Agric. Food Chem. 52, 2507-2511.

Table 1. Relative percentage composition of leaf essential oils of *Eucalyptus* species

Constituents	RI	<i>E. staigeriana</i>	<i>E. citriodora</i>	<i>E. globulus</i>
α -Pinene	928	3.27	0.8	4.15
Beta-pinene	973	2.15	-	-
Beta-myrcene	986	0.89	-	-
α -Phellandrene	1002	1.89	-	-
<i>o</i> -Cymene	1021	1.76	-	2.93
(+) Limonene	1025	28.82	-	8.16
1,8-cineole	1029	5.39	0.66	83.89
γ -Terpinene	1054	1.74	-	0.87
α - Terpinolene	1081	9.4	-	-
β -Linalool	1097	1.67	-	-
(-) Isopulegol	1145	-	6.46	-
Beta-citronellal	1149	0.8	57.53	-
? isopulegol	1155	-	3.45	-
4-Terpineol	1177	1.16	-	-
Alfa-terpineol	1192	1.07	-	-
<i>Cis</i> -geraniol	1221	1.95	-	-
β -citronellol	1223	-	2.39	-
Z-Citral	1235	10.77	-	-
<i>Trans</i> -geraniol	1247	4.2	-	-
E-Citral	1265	14.16	-	-

Table1 (continued)

Constituents	RI	<i>E. staigeriana</i>	<i>E. citriodora</i>	<i>E. globulus</i>
Methyl geranate	1317	3.66	-	-
Citronellyl acetate	1345	-	0.59	-
Nerol acetate	1354	1.4	-	-
Geraniol acetate	1374	3.86	-	-
β -Caryophyllene	1414	-	1.04	-
Linoleic acid methyl ester	2085	-	1.16	-
Oleic acid methyl ester	2091	-	0.35	-
Citronellyl acetate	1345	-	0.59	-

(-) means not detected

Table 2: Efficacy (mean percentage \pm SD) of three species of *Eucalyptus* on the eggs of *Lutzomyia longipalpis*

	<i>Eucalyptus staigeriana</i>		<i>Eucalyptus citriodora</i>		<i>Eucalyptus globulus</i>	
	Concentration (mg/ml)	% Efficacy	Concentration (mg/ml)	% Efficacy	Concentration (mg/ml)	% Efficacy
	20	90.29 \pm 2.95 ^{aa}	40	94.68 \pm 0.64 ^{aa}	40	92.73 \pm 1.56 ^{aa}
	10	47.31 \pm 0.38 ^{ba}	20	46.47 \pm 2.97 ^{ba}	20	57.17 \pm 1.70 ^{bb}
	5	26.19 \pm 1.78 ^{ca}	10	20.46 \pm 2.36 ^{cb}	10	22.55 \pm 2.36 ^{cAB}
	2.5	15.03 \pm 0.50 ^{da}	5	11.95 \pm 0.34 ^{da}	5	13.00 \pm 1.71 ^{da}
	1.2	2.85 \pm 1.38 ^{ega}	2.5	0.64 \pm 1.12 ^{efa}	2.5	0.32 \pm 0.56 ^{ega}
Cypermethrin	0.196	100.00 \pm 0.00 ^f	0.196	100.00 \pm 0.00 ^a	0.196	100.00 \pm 0.00 ^f
Tween 80	3%	2.10 \pm 1.85 ^g	3%	2.90 \pm 0.43 ^f	3%	1.80 \pm 0.75 ^g
Water		2.29 \pm 0.37 ^g		1.14 \pm 0.26 ^f		0.80 \pm 0.73 ^g

Small letters compare means in the lines and capital letters in the columns.

Table 3: Efficacy (mean percentage \pm SD) of three species of *Eucalyptus* on the larvae of *Lutzomyia longipalpis*

	<i>Eucalyptus staigeriana</i>		<i>Eucalyptus citriodora</i>		<i>Eucalyptus globulus</i>	
	Concentration (mg/ml)	% Efficacy	Concentration (mg/ml)	% Efficacy	Concentration (mg/ml)	% Efficacy
	5	100 \pm 0.00 ^{aA}	6.5	100 \pm 0.00 ^{aA}	40	100 \pm 0.00 ^{aA}
	4	73.44 \pm 1.64 ^{bA}	3.2	63.21 \pm 1.35 ^{bB}	35	78.47 \pm 3.20 ^{bA}
	3	51.43 \pm 4.34 ^{cA}	1.6	37.54 \pm 3.04 ^{cB}	30	59.22 \pm 2.36 ^{cC}
	2	26.07 \pm 3.47 ^{dA}	0.8	17.21 \pm 1.66 ^{dB}	25	47.02 \pm 2.23 ^{dC}
	1	5.32 \pm 1.45 ^{eA}	0.4	5.72 \pm 1.05 ^{efA}	20	30.39 \pm 5.41 ^{eB}
Cypermethrin	0.196	100 \pm 0.00 ^a	0.196	100 \pm 0.00 ^a	0.196	100 \pm 0.00 ^a
Tween 80	3%	2.71 \pm 1.14 ^f	3%	2.29 \pm 0.92 ^f	3%	1.60 \pm 0.78 ^f
water		2.84 \pm 0.92 ^f		1.13 \pm 0.64 ^f		1.47 \pm 0.65 ^f

Small letters compare means in the lines and capital letters in the columns.

Table 4: Efficacy (mean percentage \pm SD) of three species of *Eucalyptus* after 24 hours on adults of *Lutzomyia longipalpis*

	<i>Eucalyptus staigeriana</i>		<i>Eucalyptus citriodora</i>		<i>Eucalyptus globulus</i>	
	Concentration (mg/ml)	% Efficacy	Concentration (mg/ml)	% Efficacy	Concentration (mg/ml)	% Efficacy
	5	99.62 \pm 0.66 ^{aA}	10	88.13 \pm 20.56 ^{aA}	10	95.50 \pm 1.10 ^{aA}
	2.5	72.34 \pm 1.85 ^{bA}	8	68.14 \pm 2.60 ^{bA}	8	51.39 \pm 5.73 ^{bBA}
	1.2	40.50 \pm 2.87 ^{cA}	6	48.41 \pm 4.04 ^{cA}	6	33.70 \pm 0.37 ^{cA}
	0.6	12.48 \pm 0.98 ^{dA}	4	31.01 \pm 2.98 ^{dB}	4	18.70 \pm 2.43 ^{dAB}
	0.3	4.90 \pm 0.66 ^{efA}	2	10.60 \pm 0.87 ^{efA}	2	4.10 \pm 0.61 ^{efA}
Cypermethrin	0.196	100 \pm 0.00 ^a	0.196	100 \pm 0.00 ^a	0.196	100 \pm 0.00 ^a
Tween 80	3%	0.61 \pm 0.76 ^f	3%	1.11 \pm 1.11 ^f	3%	1.38 \pm 0.23 ^f
Water		0.49 \pm 0.42 ^f		0.50 \pm 0.43 ^f		0.48 \pm 0.45 ^f

Small letters compare means in the lines and capital letters in the columns.

Table 5: Efficacy (mean percentage \pm SD) of three species of *Eucalyptus* after 48 hours on adults of *Lutzomyia longipalpis*

	<i>Eucalyptus staigeriana</i>		<i>Eucalyptus citriodora</i>		<i>Eucalyptus globulus</i>	
	Concentration (mg/ml)	% Efficacy	Concentration (mg/ml)	% Efficacy	Concentration (mg/ml)	% Efficacy
	5	100.0 \pm 0.0 ^{aA}	10	100 \pm 0.0 ^{aA}	10	96.63 \pm 0.72 ^{aA}
	2.5	72.24 \pm 2.54 ^{bA}	8	70.14 \pm 2.27 ^{bA}	8	52.53 \pm 4.41 ^{bB}
	1.2	39.39 \pm 4.32 ^{cA}	6	48.70 \pm 3.35 ^{cB}	6	34.01 \pm 2.30 ^{cA}
	0.6	12.76 \pm 1.61 ^{dA}	4	29.79 \pm 3.52 ^{dB}	4	15.51 \pm 3.76 ^{dA}
	0.3	4.26 \pm 1.26 ^{efA}	2	6.84 \pm 1.70 ^{eA}	2	2.22 \pm 0.86 ^{efA}
Cypermethrin	0.196	100 \pm 0.00 ^a	0.196	100 \pm 0.00 ^a	0.196	100 \pm 0.00 ^a
Tween 80	3%	1.22 \pm 1.08 ^f	3%	0.0 \pm 0.0 ^f	3%	2.22 \pm 1.28 ^f
Water		0.81 \pm 0.02 ^f		1.39 \pm 0.63 ^f		1.38 \pm 0.48 ^f

Small letters compare means in the lines and capital letters in the columns.

Table 6: Efficacy (mean percentage \pm SD) of three species of *Eucalyptus* after 72 hours on adults of *Lutzomyia longipalpis*

	<i>Eucalyptus staigeriana</i>		<i>Eucalyptus citriodora</i>		<i>Eucalyptus globulus</i>	
	Concentration (mg/ml)	% Efficacy	Concentration (mg/ml)	% Efficacy	Concentration (mg/ml)	% Efficacy
	5	100.00 \pm 0.0 ^{aA}	10	100.00 \pm 0.0 ^{aA}	10	96.47 \pm 0.09 ^{aA}
	2.5	65.81 \pm 0.38 ^{bA}	8	70.07 \pm 2.58 ^{bA}	8	47.64 \pm 1.33 ^{bB}
	1.2	32.34 \pm 3.64 ^{cA}	6	45.25 \pm 3.53 ^{cB}	6	25.80 \pm 3.77 ^{cA}
	0.6	11.75 \pm 0.62 ^{dA}	4	23.76 \pm 0.61 ^{dB}	4	10.56 \pm 1.61 ^{dA}
	0.3	1.66 \pm 2.36 ^{efA}	2	7.13 \pm 2.90 ^{efA}	2	3.13 \pm 0.33 ^{efA}
Cypermethrin	0.196	100 \pm 0.00 ^a	0.196	100 \pm 0.00 ^a	0.196	100 \pm 0.00 ^a
Tween 80	3%	0.21 \pm 0.36 ^f	3%	0.37 \pm 0.32 ^f	3%	2.16 \pm 1.9 ^f
Water		1.65 \pm 0.77 ^f		3.00 \pm 1.7 ^f		1.65 \pm 0.77 ^f

Small letters compare means in the lines and capital letters in the columns.

6 CAPÍTULO 4

Atividade inseticida *in vitro* do óleo de sementes de *Azadirachta indica* sobre *Lutzomyia longipalpis*

In vitro insecticidal activity of *Azadirachta indica* seeds on the *Lutzomyia longipalpis*

Periódico: Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Submetido em Abril de 2009)

**ATIVIDADE INSETICIDA *IN VITRO* DO ÓLEO DE SEMENTES DE
AZADIRACHTA INDICA SOBRE *LUTZOMYIA LONGIPALPIS***

***IN VITRO* INSECTICIDAL ACTIVITY OF SEED *AZADIRACHTA INDICA* OIL ON
*LUTZOMYIA LONGIPALPIS***

MICHELLINE V. MACIEL.¹; SELENE M. MORAIS²; CLAUDIA MARIA LEAL
BEVILAQUA^{1*1}, RAFAELA A. SILVA.¹; RENATA S. BARROS¹; RAIMUNDO N.
SOUSA³; LINDEMBERG C.SOUSA³; LYEGHYNA K.A. MACHADO²; EDY S.BRITO⁴,
MANOEL A. SOUZA-NETO⁴

ABSTRACT

Lutzomyia longipalpis is the main vector of visceral leishmaniasis in Brazil. The objective was to evaluate the effect of oil seeds of *Azadirachta indica* on eggs, larvae and adults of the vector. The insects were captured in the field and kept in the laboratory to $\pm 27^\circ \text{C}$ and 80% relative humidity. Five treatments with different concentrations were performed using two negative controls, one with distilled water and another with tween 80 (3%) and a positive control with cypermethrin. The eggs were sprayed with the oil at different concentrations, evaluated the number of larvae hatching for 10 days. The mortality of larvae was observed to pupation and the adult mortality was observed after 24, 48, and 72 hours. Statistical analysis was performed by Tukey test at 5% probability. In the test the highest concentration of eggs obtained $65.16 \pm 3.24\%$ effectiveness. The test with larvae showed $67.75 \pm 2.21\%$ effectiveness at a concentration of 100mg/ml. In adults, the effectiveness of the concentration

¹Universidade Estadual do Ceará/ Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Laboratório de Doenças Parasitárias – Av. Paranjana, 1700, CEP 60740-000, Fortaleza, Ceará, Brazil. Fax: + 55 85 31019840 Tel: + 55 85 31019853.

Email: claudiamlb@yahoo.com.br.

²Laboratório de Química em Produtos Naturais/Universidade Estadual do Ceará.

³Laboratório de Entomologia do Núcleo de Controle de Vetores da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará.

⁴Embrapa Agroindústria Tropical

100mg/mL was $96.64 \pm 4.11\%$ after 24 hours. The phytochemical analysis revealed the presence of triterpenes. These results demonstrate the potential use of this oil in the control of the vector of the disease.

KEY-WORDS: neem - sandflies - oil - larva – adult

RESUMO

Lutzomyia longipalpis é o principal vetor da Leishmaniose visceral no Brasil. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do óleo de sementes de *Azadirachta indica* sobre ovos, larvas e adultos do vetor. Os insetos foram capturados no campo e mantidos no laboratório a $\pm 27^\circ\text{C}$ and 80% de umidade relativa. Cinco tratamentos com diferentes concentrações foram realizadas, usando dois controles negativos, um com água destilada e outro com tween 80 (3%) e um controle positivo com cipermetrina. Os ovos foram borrifados com o óleo em diferentes concentrações, avaliou-se o número de larvas eclodidas por 10 dias consecutivos. A mortalidade das larvas foi observada até a pupação e a mortalidade dos adultos foi observada após 24, 48, e 72 horas. A análise estatística foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. No teste de ovos a maior concentração obteve $65,16 \pm 3,24\%$ de eficácia. O teste com larvas apresentou $67,75 \pm 2,21\%$ de eficácia na concentração de 100mg/ml. Com adultos, a eficácia na concentração de 100mg/mL foi $96,64 \pm 4,11\%$, após 24 horas. A análise fitoquímica revelou a presença de triterpenos. Estes resultados demonstram as boas possibilidades do uso deste óleo no controle do vetor da doença.

PALAVRAS-CHAVE: Nim – flebotomíneos – óleo – larva – adultos

INTRODUÇÃO

As Leishmanioses estão entre as principais doenças transmitidas por vetores, sendo a Leishmaniose Visceral (LV) considerada a forma mais severa (SINGH, 2006). Com a expansão da área de abrangência da doença e o aumento significativo do número de casos, a LV passou a ser considerada pela OMS uma das prioridades dentre as doenças tropicais (GONTIJO & MELO, 2004). A transmissão é feita por vetores pertencentes à família Psychodidae, gênero *Lutzomyia*, sendo que no Brasil, o principal vetor é *Lutzomyia longipalpis* (DESJEUX, 2004). O padrão de transmissão da doença pode se modificar devido às alterações ambientais e, conseqüentemente, à adaptação do vetor, associado às migrações da população (BEJARANO et al., 2002).

As estratégias de controle das doenças transmissíveis por vetores biológicos são complexas principalmente quando associadas à existência de reservatórios domésticos e silvestres e aos aspectos ambientais. O uso de inseticidas tem sido direcionado principalmente contra as formas adultas do inseto vetor (GONTIJO & MELO, 2004). No entanto, o surgimento de insetos resistentes a estes compostos, aumenta a aplicação de inseticidas, causando danos ao ambiente (NOGUEIRA & PALMÉRIO, 2001). Desta forma, a resistência a inseticidas tornou-se um problema (VIEGAS-JÚNIOR, 2003). Além disso, o custo para o desenvolvimento de inseticidas químicos é alto e tem aumentado ao longo dos anos devido à necessidade de novas moléculas e formulações mais adequadas, o que tem feito crescer o interesse pela pesquisa de inseticidas alternativos (ALMEIDA, 2001).

A utilização de plantas ou seus extratos com atividade inseticida tem aplicação importante na saúde pública e na agropecuária (MATIAS et al., 2002). O Brasil é o país com maior riqueza botânica, com 56 mil espécies de plantas das 256 mil existentes no mundo, possuindo um grande potencial como fonte de compostos biologicamente ativos provenientes de plantas medicinais. Plantas da família Meliaceae são conhecidas por conter uma variedade de compostos descritos como inseticida, anti-alimentar, e regulador do crescimento (NAKATANI et al., 2004). Dentro desta família, destaca-se a *Azadirachta indica*, conhecida por “Nim”, que é considerada uma das mais importantes, devido a sua atividade sistêmica, eficiência em baixas concentrações e baixa toxicidade aos mamíferos (GALLO et al., 2002). O principal composto extraído dos frutos desta planta é a azadiractina, um limonóide que atua interferindo no funcionamento de glândulas endócrinas que controlam a metamorfose em insetos e também apresenta propriedade fago-inibidora (VIEIRA et al., 2001). Além disso, na agricultura têm sido realizadas muitas pesquisas, especialmente nas regiões tropicais, usando plantas para proteger a colheita e armazenamento de grãos dos insetos. E uma das plantas mais estudadas é a *Azadirachta indica* (BOEKE et al., 2004)

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade inseticida do óleo das sementes de *A. indica* sobre as três fases de desenvolvimento de *Lu. longipalpis* em laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

Estabelecimento da colônia de L. longipalpis

O estabelecimento e a manutenção da colônia de flebotomíneos foram baseados em SMITH (1925) citado por SHERLOCK & SHERLOCK (1972) com algumas modificações. Os insetos adultos foram capturados através de armadilhas do tipo CDC e encaminhados para o Laboratório de Entomologia do Núcleo de Endemias do Estado do Ceará (NUVET). Foram mantidos em gaiolas teladas, em BOD a temperatura de 27°C e 80% de umidade relativa. Os adultos foram alimentados utilizando-se hamsters anestesiados (10mg/kg de ketamina e 2mg/kg de xilazina por via intramuscular). Após 4 dias, as fêmeas foram inseridas com o auxílio de um capturador de Castro em potes plásticos (4 x 4,5cm) revestidos com gesso previamente umedecidos com água destilada para postura. Os ovos foram transferidos para novos potes plásticos revestidos com gesso, acondicionando-os em uma cuba forrada com areia umedecida por 4 dias. Após a eclosão das larvas, adicionou-se o substrato para alimentação, composto por fezes de coelho e folhas trituradas de mandioca até o período de pupação. Os adultos foram soltos dentro das gaiolas, dando continuidade ao ciclo.

Obtenção do óleo da planta

As sementes da planta foram coletadas no sítio Neem, localizado no município de Eusébio, Ceará. Para a obtenção do óleo as sementes foram trituradas em uma prensa, e o óleo coletado *in natura*.

Análise fitoquímica do óleo

Os testes fitoquímicos do óleo para fenóis, taninos, esteróides, triterpenóides e alcalóides foram realizados seguindo a metodologia descrita por MATOS, (1997), que investigam os tipo de metabólitos secundários presentes nos extratos de plantas. Estes se baseiam na adição de determinados reagentes à solução hidro-alcoólica do óleo da planta e a observação das mudanças de cor e formação de precipitados. No teste para esteróides e triterpenóides (Lieberman - Burchard), foi adicionado 1 mL de anidrido acético e em seguida com agitação três gotas de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado à solução de diclorometano do óleo. Coloração azul evanescente seguida de verde permanente seria indicativa da presença de esteróides. Coloração parda até vermelha indica triterpenóides.

Ensaio sobre ovos

Os ensaios com ovos, larvas e adultos foram constituídos por 5 tratamentos com diferentes concentrações do óleo de *A. indica* realizados a temperatura de 27°C e 80 % de umidade relativa e acompanhados por controle negativo com água destilada, controle negativo com o diluente Tween 80 a 3% e controle positivo com 196µg/ml de cipermetrina. Para cada concentração testada foram utilizadas 3 repetições e 3 réplicas. Cada repetição constituiu-se de 30 ovos. Os ovos foram borrifados com 1 ml do óleo. Os potes contendo ovos foram vedados até a eclosão das larvas de *Lu. longipalpis*. As concentrações utilizadas foram: 6,12; 12,5; 25; 50 e 100mg/ml. Três dias após o tratamento com os óleos iniciou-se a avaliação do número de larvas eclodidas em cada pote/concentração por 10 dias consecutivos.

Ensaio com larvas

O teste foi realizado nas mesmas condições descritas para os ovos. Potes contendo 40 ovos de *Lu. longipalpis* foram acondicionados adequadamente até a eclosão das larvas que foram contadas 6 dias pós-eclosão. Em seguida, foi feita a borrifação dos potes com as soluções dos óleos. Cada repetição constituiu-se de 30 larvas. As concentrações utilizadas neste teste foram de 6,12; 12,5; 25; 50 e 100mg/ml. As larvas foram observadas até a pupação.

Ensaio com adultos

O ensaio foi realizado com 30 insetos adultos por pote, sendo 15 machos e 15 fêmeas quatro dias após o repasto das fêmeas do inseto. Quando os potes foram previamente borrifados com as soluções dos óleos de *A. indica*. As concentrações utilizadas neste teste foram de 6,12; 12,5; 25; 50 e 100mg/ml. Neste experimento, os parâmetros observados foram: mortalidade dos insetos às 24; 48 e 72 horas após contato com óleo, e os números de ovos obtidos e o número de larvas eclodidas.

Análise dos dados

Os dados foram transformados pela fórmula: $\log(x + 1)$ e submetidos à análise de variância one-way e comparados pelo teste de Tukey, com 5% de probabilidade, usando o programa Prism 3.0. A CE₅₀ foi calculada pelo método de Probit usando o programa SPSS 8.0 para Windows.

RESULTADOS

Os testes fitoquímicos revelaram no óleo de sementes a presença de triterpenos. Os resultados do teste com ovos do inseto estão dispostos na Tabela 1. O óleo apresentou eficácia de $65,16 \pm 3,24\%$ na maior concentração. A partir da concentração de 12,5mg/ml não se observou efeito ovicida. A CL_{50} deste óleo foi de 35,44 (26,29 – 50,33).

Os resultados do teste com larvas estão descritos na Tabela 2. O óleo apresentou eficácia de $67,75 \pm 2,21\%$ na maior concentração. A CL_{50} deste óleo foi 60,98 (45,93 – 91,62).

Os resultados do teste com insetos adultos estão descritos na Tabela 3. O óleo apresentou eficácia de $96,64 \pm 4,11$ na concentração mais elevada após 24 horas de observação. Não foram observadas variações na eficácia aduicida em relação ao tempo. A CL_{50} deste óleo foi de 33,73 (18,87 – 73,18). Não houve diferença estatística em relação à mortalidade de machos e fêmeas do inseto ($P>0.05$). Com relação ao número de ovos obtidos a partir de fêmeas submetidas à ação do óleo de *A.indica*, não foram observadas diferenças estatísticas entre o grupo tratado e controle ($P>0.05$). Da mesma forma, não se verificaram diferenças estatísticas no número de larvas eclodidas a partir da oviposição das fêmeas submetidas à ação deste óleo ($P>0.05$). Em todos os ensaios, os resultados apresentaram efeito dose-dependente.

DISCUSSÃO

A Leishmaniose visceral é uma doença reemergente, que apresenta expansão geográfica e processo de urbanização em várias regiões do Brasil (DANTAS-TORRES et al., 2006). Medidas de controle da LV em vários países têm sido associadas ao controle do vetor. O uso de DDT residual na Índia para controlar malária resultou em uma diminuição significativa no número de casos da LV indicando que um controle efetivo pode ser alcançado. No entanto, faz-se necessário o desenvolvimento de novos inseticidas para o controle do vetor como também de um monitoramento das áreas borrifadas (COSTA, 2008). A necessidade de métodos mais eficazes e cada vez mais seguros no controle de insetos tem estimulado a busca de novos inseticidas em plantas (NOGUEIRA & PALMÉRIO, 2001). Estudos recentes têm estimulado a investigação sobre propriedades de compostos químicos derivados de plantas e concluíram que eles são seguros, degradáveis e alvo-específicos (TARE et al., 2004).

Nicotina (de *Nicotiana tabacum*), piretrinas (*Tanacetum cinerariifolium*) e a rotenona (das plantas do gênero *Derris* e *Lonchocarpus*) são bons exemplos de substâncias usadas para controlar pragas agrícolas. E neste campo as azadirachtinas pertencentes à planta *A. indica* uma árvore conhecida popularmente como Nim, tem merecido destaque (PASCUAL-VILLALOBOS & ROBLEDO, 1998).

A eficácia do óleo de sementes de *A. indica* sobre as três fases de desenvolvimento de *Lu. longipalpis* foi avaliada, demonstrando atividade inseticida sobre todas as fases testadas. No que se refere à atividade ovicida, resultados superiores a este trabalho foram encontrados por NATHAN et al., (2005) testaram extratos metanólicos de folhas e sementes de *Melia azedarach* e observaram que houve um declínio de quase 90% na taxa de eclosão de ovos do díptero *A. stephensi* tratados com o extrato de sementes desta planta. ABDEL-SHAIFY & ZAYED, (2002) observaram ao tratar ovos do carrapato *Hyalomma anatolicum excavatum* que houve um efeito deletério significativo sobre embrionamento dos ovos tratados com o composto Neem - Azal F. As taxas de eclosão variaram de 35, 34, 52 e 60% 15 dias após o tratamento, enquanto que o controle alcançou 72%.

Em relação ao ensaio larvicida, $67,75 \pm 2,21\%$ das larvas do inseto não chegaram à fase de pupa. Resultados superiores a este trabalho foram descritos quando OKUMU et al., (2007) testaram o óleo da semente do nim sobre larvas de *Anopheles gambiae* e obtiveram uma CE₅₀ de 10,7ppm. Da mesma forma, resultados superiores foram publicados por RAHUMAN et al., (2008) a se testar o acetato de gluanol, um triterpeno tetracíclico sobre as larvas dos mosquitos *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* e *Anopheles stephensi*. Estes autores obtiveram uma CE₅₀ de 14,55; 41,42 e 28,50 ppm para as três espécies de insetos respectivamente. Poucos são os estudos realizados com flebotomíneos, no entanto, COELHO et al., (2006) adicionaram azadirachtina à dieta de larvas de *Lu. longipalpis* em laboratório verificando que nas concentrações de 0,1, 1,0, e 10,0 µg de azadirachtina/mg, houve um aumento significativo da mortalidade larval quando comparados ao grupo controle não tratado. Concentrações de 0,1 e 1,0 µg de azadirachtina/mg na dieta bloquearam a muda das larvas do inseto, que permaneceram no terceiro estágio até o final do experimento.

No ensaio sobre adultos, na concentração de 100mg/ml houve uma mortalidade $96,64 \pm 4,11\%$ dos insetos após 24 horas de observação. Resultados inferiores a este trabalho foram obtidos por LUITGARDS-MOURA et al., (2002) ao testar os extratos aquosos de *Antonia ovata* e *Derris amazonica* sobre adultos de *Lu. longipalpis*, após 48 horas de observação, verificaram uma CL₅₀ de 233 e 212 mg/mL respectivamente. Resultados inferiores a este trabalho foram descritos por NATHAN et al., (2005), ao testar os extratos metanólicos de

folhas e sementes de *Melia azedarach* sobre *A. stephensi*. Estes autores obtiveram um percentual de mortalidade de adultos do inseto de $74,6 \pm 6,2$ e $90,9 \pm 7,0\%$ respectivamente.

Neste trabalho, a análise fitoquímica do óleo de sementes de *A. indica* revelou a presença de triterpenos. Os terpenos abrangem uma grande variedade de substâncias de origem vegetal e sua importância ecológica como defensivos de plantas está bem estabelecida, podendo ser classificados basicamente em monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos e dentre os triterpenos estão os limonóides (VIEGAS-JÚNIOR, 2003). Existe uma grande diversidade de limonóides isolados da família Meliaceae, entre eles azedarachinas, sendaninas e trichilinas, além dos que apresentam o anel C-seco, como a azadiractina que é o principal composto. Estes podem ser encontrados em todos os tecidos das plantas, no entanto, os órgãos podem individualmente produzir diferentes tipos de limonóides (NAKATANI et al., 1996).

Nim é capaz de se proteger contra grande número de pragas por meio de uma grande quantidade de compostos bioativos. Seus principais elementos químicos são uma mistura de 3 ou 4 compostos correlatos, que podem ser modificados em mais de 20 outros menores, porém não menos ativos. No geral, esses compostos pertencem à classe dos produtos naturais conhecidos por triterpenos, mais especificamente limonóides. De fato, pelo menos 9 limonóides de Nim têm demonstrado habilidade em bloquear o desenvolvimento de pragas agrícolas (MOSSINI & KEMMELMEIER, 2005).

Um grande número de novos triterpenóides com atividade biológica vem sendo isolados de extratos de sementes e folhas do Nim (LUO et al., 1999). Também têm sido identificados produtos derivados e produtos análogos do composto azadirachtina (RAMJI et al., 1998). Dos nove isômeros de azadirachtina descritos na literatura, azadirachtina A e B representam a maior concentração de metabólitos presentes nas sementes e são consideradas importantes para a comercialização da planta como biopesticida (SIDHU et al., 2003). A azadiractina A, isolada pela primeira vez por Butterworth e Morgan, e um grupo de outros limonóides estão intimamente associados à ação supressora de apetite ou inibidora de crescimento em insetos de *Azadirachta indica* e têm sido extensamente estudados, com o objetivo de se conhecer a química, biossíntese, toxicologia e o potencial inseticida deste grupo de compostos naturais (VIEGAS-JÚNIOR, 2003). A azadirachtina se concentra principalmente nos frutos, aumentando ao longo do desenvolvimento, sendo máxima no amadurecimento e durante o armazenamento, podendo sofrer variações de acordo com o modo de colheita, armazenamento, teores de umidade, presença de luz e temperatura (SCHMUTTERER, 1990). Esta substância não necessariamente age matando diretamente o

inseto como a maioria dos inseticidas. Ela atua sobre as sua reprodução e crescimento ou como toxina direta (ROY & SARAF, 2006). Ao que se sabe, um dos mecanismos de ação mais comuns da azadirachtina é através da inibição da síntese de quitina necessária para o desenvolvimento dos mosquitos (CASSIER & PAPILLON, 1991).

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que o óleo das sementes de *A. indica* possui atividade inseticida sobre as três fases de *Lu. longipalpis* em laboratório. Estes resultados podem indicar que compostos originários de plantas, como os limonóides presentes no Nin podem ser uma alternativa aos inseticidas químicos no controle do vetor da LV. Outros estudos devem ser realizados para comprovar a atividade das substâncias isoladas sobre o inseto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-SHAFY, S.; ZAYED, A.A. *In vitro* acaricidal effect of plant extract of neem seed oil (*Azadirachta indica*) on egg, immature, and adult stages of *Hyalomma anatolicum excavatum* (Ixodoidea: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, v. 106, p. 89-96, 2002.
- ALMEIDA, J. E. M.; FILHO, A. B. Banco de microrganismos entomopatogênicos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. n. 20. 2001.
- BEJARANO EE, URIBE S, ROJAS W, VELEZ ID. Phlebotomine sand flies (Díptera: Psychodidae) associated with the appearance of urban leishmaniasis in the city of Sincelejo, Colômbia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 645-647, 2002.
- BOEKE, S.J.; BOERSMA, M.G.; ALINK, G.M.; VAN LOON, J.J.A.; HUIS, A.V.; DICKE, M.; RIETJENS, I.M.C.M.; Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. *Journal of Ethnopharmacology*, v.94, p. 25-41, 2004.
- CASSIER, P., PAPILLON, M. Ultrastructural studies of the in vitro chitin and cuticle secretions in the wing pads of *Locusta*. *Canadian Journal of Zoology*, v.69, p. 29–38, 1991.
- COELHO, C.A.A.; ARAUJO, S.N.; FEDER, M.N.; SILVA, C.E.; GARCIA, E.S.; ZAMBUJA, P.; SALABERT, M.G.; RANGEL, E.F. Effects of azadirachtin on the development and mortality of *Lutzomyia longipalpis* larvae (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Journal of medical entomology*, v.43, p. 262-266, 2006.
- COSTA C.H.N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, v.24, p. 2959-2963, 2008.

- DANTAS-TORRES F, BRANDÃO-FILHO SP. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.39, p. 352-356, 2006.
- DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, v.27, p. 305-318, 2004.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D. ; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. Entomologia agrícola. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.
- GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira Epidemiologia*, v. 7, p. 338 - 949, 2004.
- LUITGARDS – MOURA, J.F.; BERMUDEZ, E.G.C.; ROCHA, A.F.I.; TSOURIS, P.; ROSA-FREITAS, M.G. Preliminary assays indicate that *Antonia ovata* (Loganiaceae) and *Derris amazônica* (Papilionaceae), ichthyotoxic plants used for fishing in Roraima, Brazil, have an insecticide effect on *Lutzomyia longipalpis* (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.97, p. 737-742, 2002.
- LUO, X., Y. MA, S. WU & D. WU. Two novel azadirachtin derivatives from *Azadirachta indica*. *Journal of Natural Products*, v. 62, p.1022-1024, 1999.
- MATIAS, R.; SOLON, S.; RESENDE, U.M.; GOMES,A.;KOLLER,W.W. *Melia azedarach*, uso popular x estudos químicos e farmacológicos: breve revisão. *Ensaio e Ciência*: ed. UNIDERP, Campo Grande, v.6, n.1, p. 91-121, 2002.
- MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2ed. Fortaleza: edições UFC, 1997, 141p.
- NAKATANI, M., ABDELGALEIL, S.A.M., SAAD, M.M.G., Huang, R.C., Doe, N., Iwagawa, T., Phragmalin limonoids from *Chukrasia tabularis*. *Phytochemistry*, v.65, 2833–2841, 2004.
- NAKATANI, M.; HUANG, R. C.; OKAMURA, H.; IWAGAWA, T.; TADERA, K. Salannal, a new limonoid from *Melia azedarach* Linn. *Chemistry Letters*, v. 995, 1995.
- NATHAN, S. S.; SAVITHA, G.; GEORGE, D.K.; NARMADHA, A.; SUGANYA, L.; CHUNG, P.G.; Efficacy of *Melia azedarach* L. extract on the malarial vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Bioresource Technology*, Article in press. 2005.
- NATHAN, S.S.; KALAIVANI, K.; MURUGAN, K. Effects of neem limonoids on the malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Acta Tropica*, v.96, p. 47-55, 2005.

- NOGUEIRA, M.A.S.; PALMÉRIO, M. Practice oriented results on use and production of plant extracts and pheromones in integrated and biological pest control. University of Uberada, 2001.
- OKUMU, F.O.; KNOLS, B. G.J.; FILLINGER, U. Larvicidal effects of a neem (*Azadirachta indica*) oil formulation on the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*, v.6, p. 63. doi:10.1186/1475-2875-6-63.
- PASCUAL-VILLALOBOS, M.J.; ROBLEDO, A. Screening for anti-insect activity in Mediterranean plants. *Industrial Crops and Products*, v. 8, p. 183-194, 1998.
- RAHUMAN, A.A.; VENKATESAN, P.; GEETHA, K.; GOPALAKRISHMAN, G.; BAGAVAN, A.; KAMARAJ, C. Mosquito larvicidal activity of gluanol acetate, a tetracyclic triterpenos derived from *Ficus racemosa* Linn. *Parasitology Research*, v.103, p. 333-339, 2008.
- RAMJI, N., K. VENKATAKRISHNAN & K.M. MADYASTHA. 11-epi-azadirachtin D: An epimeric azadirachtin analogue from *Azadirachta indica*. *Phytochemistry*, v.49, p. 265-267, 1998.
- ROY, A.; SARAF, S. Limonoids: Overview of significant bioactive triterpenos distributed in plants kingdom. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, v.29, p. 191-201, 2006.
- SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annual review of entomology*, v. 35, p. 271-297, 1990.
- SHERLOCK, I. A., SHERLOCK, V. A. Métodos práticos para criação de flebotomíneos em laboratório. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 32, p. 209-217, 1972.
- SIDHU, O.P., V.KUMAR & H.M. BEHL. Variability in neem (*Azadirachta indica*) with respect to azadirachtin content . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p. 910-915, 2003.
- SINGH S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian Journal Medicinal Research*, v. 123, p. 311-330, 2006.
- ROY, A.; SARAF, S. Limonoids: Overview of significant bioactive triterpenos distributed in plants kingdom. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, v.29, p. 191-201, 2006.
- TARE, V., DESHPANDE, S., SHARMA, R.N. Susceptibility of two different strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to plant oils. *Journal of Economic Entomology*, v.97, p.1734–1736, 2004.
- VIEGAS-JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*, v. 26, p. 390 - 400, 2003.

VIEIRA, P. C. & FERNANDES, J. B. **Plantas Inseticidas**. In: SIMÕES, C. M. O., coord. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS / Ed. Da UFSC, p.739-754, 821p, 1999.

VIEIRA, P. C.; MAFEZOLI, J.; BIAVATTI, M. W. Inseticidas de origem vegetal. In: FERREIRA, J. T. B.; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C. **Produtos naturais no controle de insetos**. São Carlos: Ed. da UFSCar, 2001. 176 p. (Série de Textos da Escola de Verão em Química, v. 3, 2001).

Tabela 1: Percentual de eficácia do óleo da semente de *Azadirachta indica* sobre ovos de *Lutzomyia longipalpis*

Concentração	% Eficácia
100	65,16 ± 3,24 ^a
50	30,36 ± 3,29 ^c
25	2,38 ± 2,31 ^d
12,5	0,0 ± 0,0 ^d
6,12	0,0 ± 0,0 ^d
Água	0,14 ± 0,44 ^d
Tween 80 (3%)	0,0 ± 0,0 ^d
Cipermetrina (196µg/ml)	100,0 ± 0,0 ^b

Letras minúsculas comparam a eficácia entre linhas (P>0.01)

Tabela 2: Percentual de eficácia do óleo da semente de *Azadirachta indica* sobre larvas de *Lutzomyia longipalpis*

Concentração	% Eficácia
100	67,75 ± 2,21 ^a
50	36,38 ± 2,71 ^c
25	24,73 ± 1,91 ^d
12,5	9,74 ± 3,07 ^e
6,12	0,0 ± 0,0 ^f
Água	0,0 ± 0,0 ^f
Tween 80 (3%)	0,0 ± 0,0 ^f
Cipermetrina (196µg/ml)	100,0 ± 0,0 ^b

Letras minúsculas comparam a eficácia entre linhas (P>0.01)

Tabela 3: Percentual de eficácia do óleo da semente de *Azadirachta indica* sobre adultos de *Lutzomyia longipalpis* após 24, 48 e 72 horas.

Concentração	% Eficácia		
	24hs	48hs	72hs
100	96,64 ± 4,11 ^{aA}	96,64 ± 3,51 ^{aA}	96,47 ± 3,70 ^{aA}
50	51,33 ± 6,94 ^{cA}	52,53 ± 4,79 ^{cA}	47,64 ± 4,68 ^{cA}
25	33,70 ± 2,21 ^{dA}	34,01 ± 4,07 ^{dA}	25,80 ± 5,45 ^{dA}
12,5	19,48 ± 2,14 ^{eA}	15,51 ± 4,00 ^{eA}	9,44 ± 4,18 ^{eA}
6,12	4,10 ± 2,95 ^{fA}	2,22 ± 2,05 ^{fA}	2,96 ± 3,21 ^{fA}
Água	0,49 ± 0,80 ^{fA}	2,22 ± 0,30 ^{fA}	1,36 ± 1,70 ^{fA}
Tween 80 (3%)	0,37 ± 0,56 ^{fA}	2,22 ± 0,86 ^{fA}	0,95 ± 2,20 ^{fA}
Cipermetrina (196µg/ml)	100, 0 ± 0,0 ^{bA}	100, 0 ± 0,0 ^{bA}	100, 0 ± 0,0 ^{bA}

Letras minúsculas comparam a eficácia entre linhas. Letras maiúsculas comparam a eficácia entre colunas. (P>0.01)

7 CONCLUSÕES GERAIS

Todos os óleos testados neste trabalho foram eficazes sobre as três fases de desenvolvimento de *Lu. longipalpis*.

O óleo essencial de *E. staigeriana* foi o mais efetivo na fase de ovo de *Lu. longipalpis* em laboratório.

O óleo essencial de *L. sidoides* foi o mais efetivo nas fases de larva de *Lu. longipalpis* em laboratório.

Os óleos essenciais de *L. sidoides*, *E. staigeriana* e *C. sativum* foram os mais eficazes sobre os adultos de *L. longipalpis* em laboratório.

Os prováveis princípios ativos dos óleos foram: (+) limoneno, Z-citral e o E-citral (*E. staigeriana*); β -citronelal (*E. citriodora*); 1,8-cineol (*E. globulus*), 6-Dimethylocta-2,7-dien-6-ol (β -linalool) (*C. sativum*), triterpenos (*A. indica*) e Timol (*L. sidoides*) respectivamente.

As diferentes composições químicas dos óleos devem ser a provável causa das diferenças nas atividades sobre *Lu. longipalpis*.

8 PERSPECTIVAS

O estudo químico com isolamento dos principais constituintes de *E. staigeriana*, *E. citriodora*, *E. globulus* e *L. sidoides* em combinação com a determinação das atividades destas substâncias sobre as três fases de *Lu. longipalpis* revelará os princípios ativos dos óleos. Ademais, novos testes de avaliação de segurança destas substâncias em animais de laboratório, assim como sua utilização no campo são necessários para demonstrar finalmente o uso eficaz e seguro dos óleos no controle do vetor da Leishmaniose visceral.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-SHAIFY, S.; ZAYED, A.A. *In vitro* acaricidal effect of plant extract of neem seed oil (*Azadirachta indica*) on egg, immature, and adult stages of *Hyalomma anatolicum excavatum* (Ixodoidea: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, v. 106, p. 89-96, 2002.

ADAMS, R.P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Quadrupole Mass Spectroscopy, 4th edition. Allured: Illinois, 2001. 804p.

AHARONI, A.; JONGSMA, M.A.; KIM, T.Y.; RI, MAN-BOK.; GIRI, A.P.; VERSTAPPEN, F.W.A.; SCHWAB, W.; BOUWMEESTER, H.J. Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants *Phytochemistry Reviews*, v.5, p.49-58, 2006.

ALENCAR José E. Calazar Canino. Contribuição para o Estudo da Epidemiologia no Brasil. Fortaleza: Imprensa Oficial, 1959. 342 p.

ALEXANDER, B.; MAROLI, M. Control of Phlebotomine sandflies. *Medical Veterinary Entomology*, v. 17, p. 1-18, 2003.

ALI, S. S.; KASOJU, N.; LUTHRA, A.; SINGH, A.; SHARANABASAVA, H.; SAHU, A.; BORA, U. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*, v. 41, p. 1-15, 2008.

ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A. Banco de microrganismos entomopatogênicos. *Revista de Biotecnologia Ciência, e Desenvolvimento*, Uberlândia, n. 20, p. 30-33, 2001.

ALVES, H.M. A diversidade química das plantas como fontes de fitofármacos. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, v.3, p. 1-6, 2001.

ANSARI, M.A.; MITTAL, P.K.; RAZDAN, R.K.; SREEHARI, U. Larvicidal and insect repellent activities of pine (*Pinus longifolia*, Family: Pinaceae) oil. *Journal Veterinary Borne Disease*, v. 42, p. 95 – 99, 2005.

ANSARI, M.A.; RAZDAN, R.K.; TANDON, M.; VASUDEVAN, P. Larvicidal and repellent actions of *Dalbergia sissoo* Roxb. (F. Leguminosae) oil against mosquitoes. *Bioresource Technology*, v.73, p. 207-211, 2000.

ANSARI, M.A.; RAZDAN, R.K. Relative efficacy of various oils in repelling insetoes. *Indian Journal Malariol*, v.3 2, p. 104, 1995.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 446-475, 2008.

BEJARANO, E. E.; URIBE, S.; ROJAS, W.; VELEZ, I.D. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with the appearance of urban leishmaniasis in the city of Sincelejo, Colômbia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 645-647, 2002.

BOEKE, S.J.; BOERSMA, M.G.; ALINK, G.M.; VAN LOON, J.J.A.; HUIS, A.V.; DICKE, M.; RIETJENS, I.M.C.M. Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. *Journal of Ethnopharmacology*, v.94, p. 25-41, 2004.

BOWMAN, D.D. **Parasitologia Veterinária de Georgis**. 8ed, Barueri, SP: Manole, 2006. 422p.

BRAGA, I.; GALARDO, A. K. R.; ZIMMERMAM, R.; MACHADO FILHO, M.R. Controle Seletivo de Vetores da malária (Guia para o nível Municipal). 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 1999. 56 p.

BRAGA, I.A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: Inseticidas, mecanismo de ação e resistência. *Epidemiol.serv.saúde*, v.16, p. 279-293, 2007.

BRAGA, R. Cajazeira. In: BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 3.ed. Mossoró : ESAM, 1976. 103p.

BRITO, J.P.; OLIVEIRA, J.E.M.; BORTOLI, S.A. Toxicidade de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 6, p. 96-103, 2006.

BROUSSALIS, A. M.; FERRARO, G. E.; MARTINO, V. S.; PINZÓN, R.; COUSSIO, J. D.; ALVAREZ, J. C.; Argentine plants as potential source of insecticidal compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 67, p. 219-223, 1999.

BURDOCK, G. A.; CARABIN, I. G. Safety assessment of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil as food ingredient. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, p. 22-34, 2009.

CABRERA, Maria Alice Airoso. Ciclo enzoótico de transmissão da *Leishmania (Leishmania) chagasi* Cunha & Chagas, 1937 no ecótopo peridoméstico em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro- RJ. Estudo de Variáveis Preditoras. 1999. 90p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública, 1999.

CAMARGO-NEVES, V.L.F.; RODAS, L.A.C.; PAULIQUÉVIS JÚNIOR, C. Avaliação da efetividade da utilização de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% para o controle da Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo: Resultados Preliminares. *Boletim Epidemiológico Paulista*. Ano 1. n. 12, 2004. ISSN 1806-4272.

CAMURÇA-VASCONCELOS, Ana Lourdes Fernandes. Avaliação da atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Croton zehntneri* sobre nematóides gastrintestinais de ovinos. 2006. 83f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, 2006.

CARVALHO, A.F.U.; MELO, V.M.M.; CRAVEIRO, A.A.; MACHADO, M.I.L.; M.B. BANTIM, M.B.; RABELO, E.F. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham against *Aedes aegypti* Linn. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.98, p. 569-571, 2003.

CASSIER, P.; PAPILLON, M. Ultrastructural studies of the in vitro chitin and cuticle secretions in the wing pads of *Locusta*. *Canadian Journal of Zoology*, v. 69, p.29–38, 1991.

CAVALCANTE, G. M.; MOREIRA, A. F. C.; VASCONCELOS, S. D. Potencialidade inseticida de extratos aquosos de essências florestais sobre mosca-branca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, p. 9-14, 2006.

CAVALCANTI, E.S.B.; MORAIS, S.M.; LIMA, M.A.A.; SANTANA, E.W.P. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, p. 541-544, 2004.

CHAGAS, A. C. S.; PASSOS, W. M.; PRATES, H. T.; LEITE, R. C.; FURLONG, J.; FORTES, I. C. P. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 39, p. 247-253, 2002.

CHAMPAGNE, D.E.; KOUL, O.; ISMAN, M.B.; SCUDDER, G.G.E.; NEIL TOWERS, G. H. ; Biological activity of limonoids from the Rutales. *Phytochemistry*, v.31, p. 377-394, 1992.

CHENG, S.S.; HUANG, C.G.; CHEN, Y.J.; YU, J. J.; CHEN, W.J.; CHANG, S.T. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. *Bioresource Technology*, v.100, p. 452-456, 2008.

CHOOCHOTE, W. Potential of crude extract of celery, *Apium graveolens* L., against the insect *Aedes aegypti* (L) (Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Ecology*, v. 29, p. 340 - 346, 2004.

COELHO, C.A.A.; ARAUJO, S.N.; FEDER, M.N.; SILVA, C.E.; GARCIA, E.S.; ZAMBUJA, P.; SALABERT, M.G.; RANGEL, E.F. Effects of azadirachtin on the development and mortality of *Lutzomyia longipalpis* larvae (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Journal of Medical Entomology*, v. 43, p. 262-266, 2006.

CONSOLI, R.A.G.B.; LOURENÇO DE OLIVEIRA, R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. 1ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994. 228p.

COOKSLEY, V. An integrative aromatherapy intervention for palliative care. *The International Journal of Aromatherapy*, v. 13, p. 128-137, 2003.

CÔRTEZ, J.A. Epidemiologia: conceitos e princípios fundamentais. São Paulo: Livraria Varela, 1993, 286p.

COSTA C.H.N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, v.24, p. 2959-2963, 2008.

COSTA, E.L.N.; SILVA, R.F.P.; FIUZA, L.M. Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. *Acta Biologica Leopoldensia*, v. 26, p. 173-185, 2004.

COSTA, J.G.M.; RODRIGUES, F.F.G.; ANGELICO, E.C.; SILVA, M.R.; MOTA, M.L.; SANTOS, N.K.A.; CARDOSO, A.L.H.; LEMOS, T.L.G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, p. 304-309, 2005.

CRAVEIRO A.A.; MATOS F.J.A.; ALENCAR, J.W. A simple and inexpensive steam generator for essential oils extraction. *Journal of Chemical Education*, v. 53, p. 652, 1976.

CRAVEIRO, A.A.; FERNANDES, A.G.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.D.; MACHADO, M.I.L. 1981. Óleos essenciais de plantas do nordeste. Fortaleza: EUFC, 1981. 209p.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.39, p. 352-356, 2006.

DE PAULA, J.P.; FARAGO, P. V.; CHECCHIA, L.E.M.; HIROSE, K.M.; RIBAS, J.L.C. 2004. Atividade repelente do óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth (variedade eugenol) contra o *Anopheles braziliensis* Chagas. *Acta Farmaceutica Bonaerense*. v. 23, p. 376-378, 2004.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Visceral Leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo*, v. 4, p. 98 - 212, 1962.

DENARDI, L.; MARCHIORI, J. N. C. Anatomia Ecológica de madeira de *Blepharocalyx salicifolius* (H. B. k.) Berg. *Ciência Florestal*. v.15, p.119-127, 2005.

DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, v.27, p. 305-318, 2004.

DHIRMAN, R.C.; MITTAL. P.K. A note on susceptibility status of *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) populations to insecticides. *Journal of Communicable Diseases*, v. 32, p. 65 - 66, 2000.

DIETZE, R.; BARROS, G. B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A.; COREY, R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clinical Infectology Diseases*, v. 25, p. 1240 - 1242, 1997.

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 55, p. 125-130, 1996.

EZEONU, F.C.; CHIDUME, G.I.; UDEDI, S.C. Insecticidal properties of volatile extracts of orange peels. *Bioresource Technology*, v. 76, p. 273, 2001.

FAÇANHA, M. C. C.; CAVALCANTE, I. F.; TEIXEIRA, M. J.; MATOS, F. J. A.; SOUSA, A. Q.; POMPEU, M. M. L. Terapia da Leishmaniose experimental com constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras, São Paulo, SP, 1995. In: Anais da X Reunião Anual da Federação da Sociedade de Biologia Experimental, São Paulo, 1995, p. 270-270.

FONTENELLE, Raquel Oliveira dos Santos. Avaliação do potencial antifúngico de óleos essenciais de plantas do nordeste brasileiro frente a diferentes cepas de dermatófitos e leveduras. 2005, 102f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, 2005.

FRADIN, M.S.; DAY, J.F. Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *The New England Journal of Medicine*, v.347, p. 13-18, 2002.

GALLATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; RÊGO JÚNIOR, F. A.; OSHIRO, E. T.; CHANG M. R. Estudo de Flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista de Saúde Pública*. v. 31, p. 378-390, 1997.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D. ; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. Entomologia agrícola. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GIL, A.; DE LA FUENTE, E. B.; LENARDIS, A. E.; LOPEZ PEREIRA, M.; SUAREZ, S. A.; BANDONI, A.;VAN BAREN, C.; DI LEO LIRA, P.; GHERSA, C. M. Coriander essential oil composition from two genotypes grown in different environmental conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 2870–2877, 2002.

GIL, L. H. S.; BASANO, S. A.; SOUZA, A. A.; SILVA, M. G. S.; BARATA, I.; ISHIKAWA, E. A.; CAMARGO, L. M. A. Recent observations on the sandfly (Díptera: Psychodidae) fauna of the sate of Rondônia, Western Amazônica, Brazil: the importance of *Psychodopygus davisi* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 751 - 75, 2003.

GLEISER, R.M.; ZYGADLO, J.A. Insecticidal properties of essential oils from *Lippia turbinata* and *Lippia polystachya* (Verbenaceae) against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, v. 101, p. 1349-1354, 2007.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira Epidemiologia*, v. 7, p. 338 - 949, 2004.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, v. 35, p. 1169-1180, 2005.

GRAY, A.M.; FLATT, P. R. Insulin-releasing and insulin-like activity of the traditional anti-diabetic plant *Coriandrum sativum* (coriander). *British Journal of Nutrition*, v. 81, p. 203–209, 1999.

GRODNITZKY, J.; COATS, J.R. QSAR evaluation of monoterpenoids insecticidal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 4576-80, 2002.

GUERIN, P.J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S.L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M.K.; BRYCESON, A.D.M. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 2, p. 494-501, 2002.

HUMMELBRUNNER, L. A.; ISMAN, M. B.; Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the *Tobacco cutworm*, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 715-720, 2001.

ICMR BULLETIN. Prospects of using products in the control of insect vectors, v. 33, p. 1 – 10, 2003.

IPEK, E.; ZEYTIÑOGLU, H.; OKAY, S.; TUYLU, B. A.; KURKCUOGLU, M.; HUSNU CAN BASER, K. Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chemistry*, v. 93, p. 551–556, 2005.

ISMAN, M.B. Botanical Insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review Entomology*, v.51, p. 45-66, 2006.

ISMAN, M.B. Neem and other botanical insecticides: Barriers to commercialization. *Phytoparasitica*, v.25, p. 339-344, 1997.

ISMAN, M.B. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, v. 19, p. 603-608, 2000.

JANTAN, I.; ZARIDAH, M. Z. Development of Environment-Friendly Insect Repellents From The Leaf Oils of Selected Malaysian Plants. *ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation (ARBEC)* November–December 1999, p.1–7.

KAUL, S. M.; WATTAL, B.; BHATNAGAR, N.; MATHUR, K. K. Preliminary observations on the susceptibility status of *Phlebotomus argentipes* y *Phlebotomus papatasi* to DDT in two districts of North Bihar (India). *Journal of Communication Diseases*, v. 10, p. 208-211, 1978.

KETOH, G.K.; KOUMAGLO, H.K.; GLITHO, I.A. Inhibition of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) development with essential oil extracted from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. (Poaceae), and the wasp *Dinarmus basalis* (Rondani) (Hymenoptera: Pteromalidae). *Journal of Stored Products Research*, v. 41, p. 363–371, 2005.

KHAUL, S.M.; SHARMA, R.S.; DEY, K.P.; RAI, R.N.; VERGHESE, T. Impact of DDT indoor residual spraying on *Phlebotomus argentipes* in a kala-azar endemic village in eastern Uttar Pradesh. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 72, p. 79 - 81, 1994.

KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M.; FOCHEUX, C.; DEREURE, J.; PUECH, M. P.; CADIE`RGUES, M. C. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 11, p. 15–21, 1997

KISHORE, K.; KUMAR, V.; KESARI, S. Vector control in leishmaniasis. *Indian Journal Medical Research*, v.123, p. 467-472, 2006.

KNIO, K.M.; USTA, J.; DAGHER, S.; ZOURNAJIAN, H.; KREYDIYYEH. Larvicidal activity of essential oils extracted from commonly used herbs in Lebanon against the seaside mosquito, *Ochlerotatus caspius*. *Bioresource Technology*, v.99, p. 763-768, 2008.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, p. 811 - 827, 2005.

LOPES, B. R. J. **Manual de Sistemática Botânica**. Manágua:UMA/CENIDA. 1993, 180p.

LEE, S.E.; LEE, B.H.; CHOI, W.S.; PARK, B.S.; KIM, J.G.; CAMPBELL, B.C. Fumigant toxicity of volatile natural products from Korean spices and medicinal plants towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L). *Pest Management Science*, v.57, 548–553, 2001.

LUITGARDS – MOURA, J.F.; BERMUDEZ, E.G.C.; ROCHA, A.F.I.; TSOURIS, P.; ROSA-FREITAS, M.G. Preliminary assays indicate that *Antonia ovata* (Loganiaceae) and *Derris amazônica* (Papilionaceae), ichthyotoxic plants used for fishing in Roraima, Brazil, have an insecticide effect on *Lutzomyia longipalpis* (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 737-742, 2002.

LUO, X., Y. MA, S. WU & D. WU. Two novel azadirachtin derivatives from *Azadirachta indica*. *Journal of Natural Products*, v. 62, p.1022-1024, 1999.

MACEDO, Iara Tersia Freitas. Atividade anti-helmíntica de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp sobre nematóides gastrintestinais. 2008, 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, 2008.

MACÍAS, F.A.; OLIVEROS-BASTIDAS, A.; MARIN, D.; CARRERA, C.; CHINCHILLA, N.; MOLINILLO, J.M.G. Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation Studies and potential use as herbicide models. *Phytochemistry Reviews*, v.7, p. 179-194, 2008.

MARANHÃO, Z.C. Plantas inseticidas. *Revista da Agricultura*, v.29, p. 113 – 121, 1954.

MARTINEZ, S.S. O nim, *Azadirachta indica* – Natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: IAPAR, 2002, 142p.

MARTINS, M.B.G.; MARCONI, A.P.; CAVALHEIRO, A.J.; RODRIGUES, S.D. Caracterização anatômica e química da folha e do sistema radicular de *Hydrocotyle umbellata* (Apiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, p. 402 – 414, 2008.

MATIAS, R.; SOLON, S.; RESENDE, U.M.; GOMES, A.; KOLLER, W.W. *Melia azedarach*, uso popular x estudos químico e farmacológico: breve revisão. *Ensaio e Ciência*: Ed. UNIDERP, Campo Grande, v.6, n.1, p. 91-121, 2002. ISSN 1415-6938.

MATOS, F. J. A.; SOUSA, M. P.; MATOS, M. E. O.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A. Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais Brasileiras. 2ª ed. Fortaleza: Editora UFC, 2004, 448p.

MATOS, F. J. de A. Farmácias Vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. 4ª ed. Fortaleza, Ceará, 2002. 267p.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2ed. Fortaleza: edições UFC, 1997, 141p.

MATOS, F.J.A. Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. 2.ed. Ceará: UFC, 2000. 344p.

MENDONÇA, F.A.C; SILVA, K.F.S.; SANTOS, K.K.; RIBEIRO JÚNIOR, K.A.L.; SANT'ANA, A.E.G. Activities of some brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*, v.76, p. 629-636, 2005.

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

MENUT, C.; MOLANGUI, T.; LAMATY, G. E.; BESSIERE, J. M.; HABIBAMANA, J. B. Aromatic plants of tropical central Africa. 23. Chemical composition of leaf of *Eucalyptus goniocalyx* F. Muell. and *Eucalyptus patens* Beth. Grown in Rwanda. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 43, p. 1267–1271, 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2003, 120p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2006, 120p.

MIYAZAWA, M.; WATANABE, H.; KAMEOKA, H. Inhibition of acetylcholinesterase activity by monoterpenoids with a *p*-menthane skeleton. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v.45, 677-679, 1997.

MONTEIRO, E. M.; FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; COSTA, D. C.; BARATA, R. A.; PAULA, E. V.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; ROCHA, M. F.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 38, p. 147-152, 2005.

MORDUE-LUNTZ, A. J.; NISBET, A. J. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v.29, p. 615-632, 2000.

MORENO, J.E.; ALVAR J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, v.18, p. 399-405, 2002.

MULLA, M.S. & TIANYUN, S. Activity and biological effects of neem products against arthropods of medicinal and veterinary importance. *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 15, p. 133-152, 1999.

MULLER-RIEBAU, F.J.; BERGER, B.M.; YEGEN, O.; CAKIR, C. Seasonal variation in the chemical compositions of essential oils of selected aromatic plants growing in Turkey. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v.45, p. 4821-4825, 1997.

MUTHUKRISHMAN, J.& PUSHPALATHA, E. Effects of plant extracts on fecundity and fertility of mosquitoes. *Journal Applied Entomology*, v.125, p. 31-35, 2001.

MUTHUKRISHNAN J.; SEIFERT K.; HOFFMANN K.H.; LORENZ M.W. Inhibition of juvenile hormone biosynthesis in *Gryllus bimaculatus* by *Glycosmis pentaphylla* leaf compounds. *Phytochemistry*, v.50, p. 249-254, 1999.

NAKATANI, M.; ABDELGALEIL, S.A.M.; SAAD, M.M.G.; HUANG, R.C.; DOE, N.; IWAGAWA, T. Phragmalin limonoids from *Chukrasia tabularis*. *Phytochemistry*, v.65, 2833–2841, 2004.

NAKATANI, M.; HUANG, R. C.; OKAMURA, H.; IWAGAWA, T.; TADERA, K. Salannal, a new limonoid from *Melia azedarach* Linn. *Chemistry Letters*, n.11, p. 995-996, 1995.

NATHAN, S.S.; KALAIVANI, K.; MURUGAN, K. Effects of neem limonoids on the malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Acta Tropica*, v.96, p. 47-55, 2005.

NATHAN, S.S.; SAVITHA G.; GEORGE, D.K.; NARMADHA, A.; SUGANYA, L.; CHUNG, P. G. Efficacy of *Melia azedarach* L. extract on the malarial vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Bioresource Technology*, v.97, p.1316-1323, 2006.

NEVES, E.J.M. Importância dos fatores edafo-climáticos para o uso do nim (*Azadirachta indica* A. Juss) em programas florestais e agroflorestais nas diferentes regiões do Brasil. *Boletim de Pesquisa Florestal*, n.49, p.99-107, 2004.

NOGUEIRA, M.A.S.; PALMÉRIO, M. Practice oriented results on use and production of plant extracts and pheromones in integrated and biological pest control. University of Uberada, 2001.

OKUMU, F.O.; KNOLS, B.G.J.; FILLINGER U. Larvicidal effects of neem oil formulation on the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*, v. 63, p. 1-8, 2007.

OLIVEIRA, C. L.; MORAIS, M. H. F.; MACHADO-COELHO, G. L. L. Visceral leishmaniasis in large brazilian cities: challenges for control. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 24, p. 2953-58, 2008.

PALSSON, K.; JAENSON, T.G.T. Plant products used as mosquito repellents in Guinea Bissau, West Africa. *Acta Tropica*, v.72, p. 39-52, 1999.

PARIMI, S.; MEINKE L.J.; NOWATZKI T.M.; CHANDLER L.D.; WADE FRENCH B.; SIEGFRIED B.D. Toxicity of insecticide-bait mixtures to insecticide resistant and susceptible western corn rootworms (Coleoptera: Crysomelidae). *Crop Protection*, v.22, p.781-786, 2003.

PASCUAL-VILLALOBOS, M.J.; ROBLEDO, A. Screening for anti-insect activity in Mediterranean plants. *Industrial Crops and Products*, v. 8, p. 183-194, 1998.

PATHAK, N.; MITTAL, P.K.; SINGH, O.P.; VIDYA SAGAR.; VASUDEVAN, P. Larvicidal action of essential oils from plants against the vector insetoes *Anopheles stephensi* (Liston) *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Aedes aegypti* (L). *Interest Pest Control*, v. 42, p. 53, 2000.

PAVELA, R. Insecticidal activity of certain medicinal plants. *Fitoterapia*, v.75, p. 745-749, 2004.

PENNA, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. *Brasil Médico*, v. 48, p. 949-950, 1934.

PERES, L. E. P. Metabolismo Secundário. São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/USP, 2004. p. 1-10.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, v.25, p.45-61, 2002.

PRADO, Geisa Percio do. Caracterização química e bioativa do óleo de *Cunila angustifolia* Benth (Lamiaceae) sobre *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae). 2007. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências ambientais) – Universidade Comunitária Regional de Chapecó, 2007.

PRATES, H.T.; SANTOS, J.P.; WAQUIL, J.M.; FABRIS, J.D.; OLIVEIRA, A.B. & FOSTER, J.E. Insecticidal activity of monoterpenes against *Ryzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Stored Products Research*, v.34, p. 243-249, 1998.

- RAHUMAN, A.A.; VENKATESAN, P.; GEETHA, K.; GOPALAKRISHMAN, G.; BAGAVAN, A.; KAMARAJ, C. Mosquito larvicidal activity of gluanol acetate, a tetracyclic triterpenos derived from *Ficus racemosa* Linn. *Parasitology Research*, v.103, p. 333-339, 2008.
- RAJENDRAN, S.; SRIRANJINI, V. Plant products as fumigants for stored-product insect control. *Journal of Stored Products Research*, v. 44, p. 126-135, 2008.
- RAMJI, N.; VENKATAKRISHNAN, K.; MADYASTHA, K.M. 11-epi-azadirachtin D: An epimeric azadirachtin analogue from *Azadirachta indica*. *Phytochemistry*, v.49, p. 265-267, 1998.
- RANGEL, E. F.; VILELA, M. L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) e urbanização da leishmaniose visceral no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 24, p. 2948-2952, 2008.
- RANGEL, E.F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Ed. FIOCRUZ, 383p. 2003.
- REGNAULT-ROGER, C. The potencial of botanical essential oils for insect pest control. *Integrated Pest Management Reviews*, v. 2, p. 25-34, 1997.
- REY, L. Parasitologia. **Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na África**. 2a edição. Ed. Guanabara Koogan S.A . 1991. 731p.
- RICE, P.J.; COATS, J.R. Insecticidal properties of monoterpenoid derivatives to the house fly (Diptera: Muscidae) and red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae). *Pesticide Science*, v. 41, p.195 – 202, 1994.
- ROCHA, M. E. N.; SANTOS, C. L. O uso comercial e popular do eucalipto *Eucalyptus globulus* Labill – Myrtaceae. *Saúde & Ambiente em Revista*, v. 2, p. 23-34, 2007.
- ROEL, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. *Revista Internacional do Desenvolvimento Local*. v.1, p. 43-50, 2001.

ROY, A.; SARAF, S. Limonoids: Overview of significant bioactive triterpenos distributed in plants kingdom. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 29, p. 191-201, 2006.

ROZMAN, V.; KALINOVIC, I.; KORUNIC, Z. Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored-products insects. *Journal of Stored Products Research*, v. 43, p. 349-355, 2007.

SALZER, U. J. The analysis of essential oils and extracts (oleoresins) from seasonings – a critical review. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 9, p. 345–373, 1997.

SCHLEIN, Y.; JACOBSON, RL; MULLER, G.C. Sand fly feeding on noxious plants: a potential method for the control of leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 65, p. 300-303, 2001.

SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annual Review of Entomology*, v. 35, p. 271-297, 1990.

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

SHARMA, U. SINGH, S. Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. *Journal of Vector Borne Disease*, v.45, p. 255-272, 2008.

SHERLOCK, I. A., SHERLOCK, V. A. Métodos práticos para criação de flebotomíneos em laboratório. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 32, p. 209-217, 1972.

SIDHU, O.P.; KUMAR, V.; BEHL, H.M.. Variability in neem (*Azadirachta indica*) with respect to azadirachtin content . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p. 910-915, 2003.

SILVA, E. A.; ANDREOTTI, R.; HONER, M. R. Comportamento de *Lutzomyia longipalpis*, vetor principal da leishmaniose visceral americana, em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, p. 420-425, 2007.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M.; PACHECO, R. S.; FIUZA, V.O.; BRAZIL, R. P. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, p. 285-91, 2001.

SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S.M.; DUARTE, V.G.; MACHADO, M.I.L.; MATOS, F.J.A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 89, p. 277–283, 2003.

SILVA, J.J.; MENDES J. Effect of diflubenzuron on stages of *Hematobia irritans* (L.) (Diptera, Muscidae) in Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.97, p.679 - 682, 2002.

SILVA, W.J.; DORIA, G.A.A.; MAIA, R.T.; NUNES, R.S.; CARVALHO, G.A.; BLANK, A.F.; ALVES, P.B.; MARÇAL, R.M.; CAVALCANTI, S.C.H. Effects of essential oil on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 3251-3255, 2008.

SIMAS, N.K.; LIMA, E.C.; CONCEIÇÃO, S.R.; KUSTER, R.M.; OLIVEIRA FILHO, A.M. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Química Nova*, v. 27, p. 46-49, 2004.

SIMÕES, C. M. O. et al. Plantas medicinais populares no Rio Grande do Sul. 3ª ed. Porto Alegre: UFRGS, 2000.

SINGH, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian Journal of Medical Research*, v. 123, p. 311- 330, 2006.

SINNIAH, B.; SINNIAH, D.; IBRAHIM, J. Effect of neem oil and mosquito larvae. *Mosquito Borne Diseases Bulletin*, v.1, p.90– 3, 1994.

SOSA, M.E.; TONN, C.E. Plant secondary metabolites from Argentinean semiarid lands: bioactivity against insects. *Phytochemistry Reviews*, v. 7, p. 3-24, 2008.

SPITZER, CLAUDIA MARIA OLIVEIRA SIMÕES VOLKER. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. (Eds.), *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2004. cap. 18, p. 467 - 495.

STAMOPOULOS, D. C.; DAMOS, D.; KARAGIANIDOU, G. Bioactivity of Five monoterpenoid vapours to *Tribolium confusum* (du Val) (Coleoptera: tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research*, v. 43, p. 571-577, 2007.

SUKONTASON, K. L.; BOONCHU, N.; SUKONTASON, K.; CHOOCHOTE, W. Effects of eucalyptol on house fly (Diptera: Muscidae) and blow fly (Diptera: Calliphoridae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 46, p. 97-101, 2004.

TARE, V.; DESHPANDE, S.; SHARMA, R.N. Susceptibility of two different strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to plant oils. *Journal of Economic Entomology*, v.97, p.1734–1736, 2004.

TERZI, V.; MORCIA, C.; FACCIOLI, P.; VALE, G.; TACCONI, G.; MALNATI, M. In vitro antifungal activity of the tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil and its major components against plant pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, v. 44, p. 613–618, 2007.

TESH, R.B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies?. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 53, p. 287-292, 1995.

TSUKAMOTO, T.; ISHIKAWA, Y.; MIYAZAWA, M. Larvicidal and adulticidal activity of alkylphthalide derivatives from rhizome of *Cnidium officinale* against *Drosophila melanogaster*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 5549-5553, 2005.

TUNAZ, H.; UYGUN, N. Insect growth regulators for insect pest control. *Turkish Journal Agriculture Forestry* v. 28, p. 377-387, 2004.

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

VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. Plantas Inseticidas. In: SIMÕES, C. M. O., coord. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS / Ed. Da UFSC, p.739-754, 821p, 1999.

VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; ANDREI, C. C. Plantas inseticidas. In: SPITZER, CLAUDIA MARIA OLIVEIRA SIMÕES VOLKER. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. (Eds.), Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2004. cap. 18, p. 467 - 495.

VIEIRA, C.M.; MAFEZOLI, J.P.C.; BIAVATTI, M. W. Inseticidas de origem vegetal. In: FERREIRA, J. T. B.; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C. **Produtos naturais no controle de insetos**. São Carlos: Ed. da UFSCar, 2001. 176 p.

VITTI, A.M.S.; BRITO, J.O. Óleo essencial de Eucalipto. IPEF, Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, Documentos Florestais, n. 17, p. 2-25, 2003.

WERNECK, G.L.; COSTA, C.H.; WALKER, A.M.; DAVID, J.R.; WAND, M.; MAGUIRE, J.H. Multilevel modeling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Epidemiology and Infection* , v.135, p. 195-201, 2007.

WERNECK, G.L.; COSTA, C.H.; WALKER, A.M.; DAVID, J.R.; WAND, M.; MAGUIRE, J.H. Multilevel modeling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Epidemiology and Infection*, v.135, p. 195-201, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. New treatment for leishmaniasis is 95% effective. *Bulletin The World Health Organization*, v. 80, p. 688, 2002.

XIMENES, M.F.; SILVA, V.P.; QUEIROZ, P.V.; REGO, M.M.; CORTEZ, A.M.; BATISTA, L.M.M.; MEDEIROS, A.S.; JERONIMIO, S.M.B. Phlebotomine (Diptera: Psychodidae) and leishmaniasis in Rio Grande do Norte State Brazil: anthropic environment responses. *Neotropical Entomology*, v.36, p. 128-137, 2007.

YAGHOOBI-ERSHADI, M. R.; AKHAVAN, A. A.; JAHANIFARD, E.; VANTANDOOST, H.; AMIN, G.H.; MOOSAVI, L.; RAMAZANI, A.R.Z.; ABDOLI, H.; ARANDIAN, M.H. Repellency effect of Myrtle Essential Oil and DEET against *Phlebotomus papatasi*, under laboratory conditions. *Iranian Journal Public Health*, v. 35, p. 7-13, 2006.

YANG, P.; MA, Y.; ZHENG, S. Adulticidal activity of five essential oils against *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Journal of Pesticide Science*, v. 30, p. 84-89, 2005.

YANG, Y.C.; CHOI, H.Y.; CHOI, W.S.; CLARK, J.M.; AHN, Y.J. Ovicidal and adulticidal activity of *Eucalyptus globulus* leaf oil terpenoids against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Journal of Agriculture Food Chemistry*, v.52, p.2507-2511, 2004.