

ANÁLISE DE EXTRATOS VEGETAIS COM POTENCIAL INSETO-LARVICIDA: Caracterização Química de Biocontroladores Utilizados em Vetores de Transmissão

COLÉGIO ESTADUAL LICEU DE MARACANAÚ - CE

João Batista de Castro David Junior; Maria das Graças França Sales (Orientadora) = jackdivavida@yahoo.com.br; Rinaldo do Santos Araújo (Co-Orientador)

RESUMO

Atualmente a doença causada pelo vírus da dengue cresce provocando grandes epidemias causando danos à população mundial como um todo. Os métodos de controle do *Aedes aegypti* tornam-se ineficazes diante da resistência desenvolvida pelos insetos, além dos inseticidas poluírem o meio ambiente, se utilizados inadequadamente. Portanto geram uma necessidade de identificação de métodos alternativos, eficazes e biodegradáveis, de inseto-larvicidas para o combate a essa praga. O objetivo do trabalho é desenvolver um método de controle do *A. aegypti* que supere os métodos convencionais em três principais aspectos: eficácia, custo e poluição ambiental. Primeiro caracterizou-se os princípios ativos dos extratos aquosos de *Azadirachta indica* (Nim); *Carapa guianensis* (Andiroba); *Mentha crisper* (Hortelã) e *Nicotiana tabacum* (Tabaco) analisados em Cromatografia gasosa com detector de espectrometria e massa (CG/SM). Os extratos foram avaliados em larvas de 3º estágio de *A. aegypti* em condições de laboratório. O extrato produzido com as folhas de Nim mostrou-se mais eficaz portanto o extrato foi concentrado para diminuir a diluição e aumentar a eficácia. Os extratos foram também avaliados sobre a postura de ovos por fêmeas de *Aedes aegypti*. A postura das fêmeas foi realizada no substrato controle e diferiu estatisticamente dos substratos teste, nos quais houve considerável diminuição. Esses substratos são uma boa alternativa no controle preventivo dessa praga em colônias dos mosquitos da dengue devido ao seu efeito inseto-larvicida, de baixo custo e alta disponibilidade. A partir de análises de custo de produção e efetividade, constatamos que o biocontrolador natural produzido a partir do extrato das folhas de Nim é tão efetivo como os produzidos sinteticamente, pois trazem em sua composição metais e semimetais que poluem e permanecem indefinidamente no ambiente. O produto desenvolvido conseguiu atingir seus objetivos, resultando em uma plataforma de pesquisa para futuras melhorias.

PALAVRAS-CHAVE: Extratos vegetais - Inseto-larvicida – Baixo custo

ABSTRACT

Nowadays, the disease caused by dengue virus grows causing major epidemics and bringing damage to the world population as a whole. The methods of control of *Aedes aegypti* become ineffective in the face of resistance developed by the insects, and the pesticides pollute the environment if used improperly. Therefore we need to identify alternative methods, effective and biodegradable, insect-larvicides to combat this plague. The objective of this study is to develop a method of control of *A. aegypti* that surpasses conventional methods in three main aspects: effectiveness, cost and

environmental pollution. First it is characterized the active ingredients of the aqueous extracts of *Azadirachta indica* (Neem), *Carapa guianensis* (Andiroba), *Mentha crispa* (mint) and *Nicotiana tabacum* (Tobacco). They are analyzed by gas chromatography with detector mass and spectrometry (GC / MS). The extracts were evaluated in 3rd stage larvae of *A. aegypti* in laboratory conditions. The extract produced from the leaves of Neem was more effective. Then it was concentrated to reduce dilution and increase efficiency. The extracts were also evaluated on egg-laying by females of *Aedes aegypti*. The females posture performed on the control substrate differed significantly from the test substrate, were a decreased occurred. These substrates are a good alternative for the preventive control of this pest in colonies of dengue mosquitoes because of its effect insect larvicide, low cost and high availability. From the analysis of production cost and effectiveness, we find that the natural biocontrol produced from the extract of neem is as effective as those produced synthetically. They bring into their composition semimetals and metals that pollute and remain indefinitely in the environment. The product developed was able to achieve its goals, resulting in a research platform for future improvements.

Keywords: VEGETABLE EXTRACT – INSECT-LARVICIDE – LOW COST

1. INTRODUÇÃO

Os inseticidas e larvicidas inorgânicos e organossintéticos são altamente tóxicos para os seres humanos e outros mamíferos, especialmente nos níveis de dosagem requeridos para torná-los efetivos. Além disso, metais e semimetais tóxicos utilizados nos inseto-larvicidas, não são biodegradáveis (DUQUE, 2004): uma vez lançados no ambiente, permanecem indefinidamente na água, no solo ou em sedimentos, podendo integrar-se à cadeia alimentar. Em um relatório publicado pela Organização Mundial de Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1996), estima-se que, a cada ano, milhões de pessoas sofrem de doenças agudas, algumas fatais, derivadas de exposições de curto prazo aos inseticidas.

Diante desses dados, fica evidente que os inseticidas e larvicidas sintéticos são de fato, um perigo a humanidade e causadores de danos ao meio ambiente.

1.1. Dengue

Denomina-se dengue a enfermidade causada por um arbovírus da família flaviviridae, gênero Flavivírus, que inclui quatro tipos imunológicos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 (CASTRO, 2004). A infecção por um deles dá proteção permanente para o mesmo sorotipo e imunidade parcial e temporária contra os outros três.

“Atualmente, a dengue é a arbovirose mais comum que atinge o homem sendo responsável por cerca de 100 milhões de casos por ano, em população de risco esse índice pode chegar a três bilhões de seres humanos” (SERUFO, 1993) .

“A febre hemorrágica da dengue (FHD) e síndrome de choque de dengue (SCD) atinge 500 mil pessoas por ano, apresenta taxa de mortalidade de 10% para pacientes hospitalizados e 30% para pacientes não tratados” (CASTRO, 2004).

2. OBJETIVO

Foram objetivos desta pesquisa:

Desenvolver um inseto-larvicida orgânico, naturalmente produzido para ser utilizado como inseticida e larvicida do vetor transmissor da dengue superando os métodos convencionais em custo-produção, tornando-se mais barato e acessível. É necessário que este larvicida tenha taxa de biodegradação total e seja atóxico aos seres humanos, nos níveis requeridos para torná-lo eficaz.

Introduzir o biocontrolador em pequenos bairros e vilarejos para verificar a sua eficiência na redução dos casos de dengue.

3. METODOLOGIA

A pesquisa foi desenvolvida em laboratório (sala controlada) à temperatura de 25 ± 1 °C, umidade relativa de $74\% \pm 5\%$ e foto fase de 12 horas.

Para o preparo dos extratos foram utilizados folhas e ramos das plantas (Quadro 1), coletadas nas primeiras horas do dia e selecionadas por critério de saúde. As plantas selecionadas foram todas encontradas na cidade de Maracanaú – CE.

Logo após a coleta, as partes dos vegetais foram liquidificadas em água destilada. Foram preparadas suspensões contendo 40 g de cada espécie vegetal triturada num liquidificador industrial com 1L de água destilada, permanecendo em repouso por 168 horas (sete dias) com o propósito de extrair os compostos hidrossolúveis. Decorrido esse tempo, coou-se usando tecido tipo “voile”, obtendo-se extratos na concentração (massa/volume) de 10%, posteriormente a solução foi coada com papel filtro e algodão.

QUADRO 1– Listagem das Plantas Utilizadas Para Estudo e Comparação

Nome Científico	Nome comum	Família	Partes vegetais Utilizadas
<i>Azadirachta indica</i>	Nim	Meliaceae	Folhas
<i>Carapa guianensis</i>	Andiroba	Meliaceae	Folhas
<i>Mentha crispa</i> L.	Hortelã	Lamiaceae	Folhas + Ramos
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Fumo	Solanaceae	Folhas

Fonte: o autor

3.1. Determinação dos Princípios ativos contidos em cada extrato

Os princípios ativos de *Azadirachta indica*, *Carapa guianensis*, *Mentha crispa* L., *Nicotiana tabacum* L. presente nos extratos de cada uma das plantas selecionadas foi identificado em cromatografia gasosa com detector de espectrometria e realizada com um Cromatógrafo Carlo Erba (Itália) modelo FTV série 4300. Utilizou-se uma coluna capilar de sílica com fase ligada Supelcowax 10, de 30m x 0,25 mm d.i., encontrado no laboratório de tecnologia química do Instituto Federal de educação Ciência e Tecnologia do Ceará, a temperatura inicial foi 60°C, mantendo-se isotérmico por um minuto, e aumento de 3°C/min até chegar a 240°C permanecendo por nove minutos, hélio ultra puro foi usado como gás de arraste. Fluxo de um mL/min: temperatura do injetor 220°C e interface 280°C. Para identificar os componentes químicos presentes em cada extrato. Os extratos das plantas serão utilizados para testes em laboratório.

3.2. Testes de Eficácia do Extrato no Combate as Larvas de Dengue Bioensaio - Fase 1

Para cada extrato foram utilizados 40 recipientes plásticos com capacidade de 150 mL dispostos em dez fileiras, nove filas para teste e uma para controle, foram adicionadas 20 larvas ativas de 3º estágio nas seguintes etapas.

TABELA 1 - Concentrações do Teste com as Larvas de *Aedes aegypti*.

FILEIRA TESTE	CONCENTRAÇÃO %	ÁGUA ml	EXTRATO ml
1	10	90	10
2	15	85	15
3	20	80	20
4	25	75	25
5	30	70	30
6	35	65	35
7	40	60	40
8	45	55	45
9	50	50	50
FILEIRA CONTROLE			
1	0	100	0

Fonte: o autor

3.3. Extração da *azadractina* com Extrator de Soxhlet – Fase 2

A extração de soxhlet teve o objetivo de realizar um comparativo de eficácia entre os métodos de extração utilizados pelo projeto.

Inicialmente a amostra de 50 folhas verdes de Nim foi macerada com o auxílio de um macerador comum, colocada no cilindro poroso e sobre ela colocou-se um pedaço de algodão, que evita que a amostra flutue enquanto é adicionado o solvente extrator. Como solvente utilizou-se 50 mL de Álcool etílico 96º GL. Depois de montada a aparelhagem, semelhante à Figura 1, colocou-se o cilindro poroso em seu devido lugar e iniciou-se o processo da extração (vale à pena salientar que no balão, destinado ao aquecimento do solvente extrator, foram colocadas pérolas de vidro que evitam o aquecimento turbulento e tumultuoso do solvente). O processo durou 60 minutos. Depois de completa extração o solvente com o extrato solubilizado foi submetido a uma destilação à pressão reduzida, em um rotoevaporador, para o isolamento do princípio ativo do solvente.

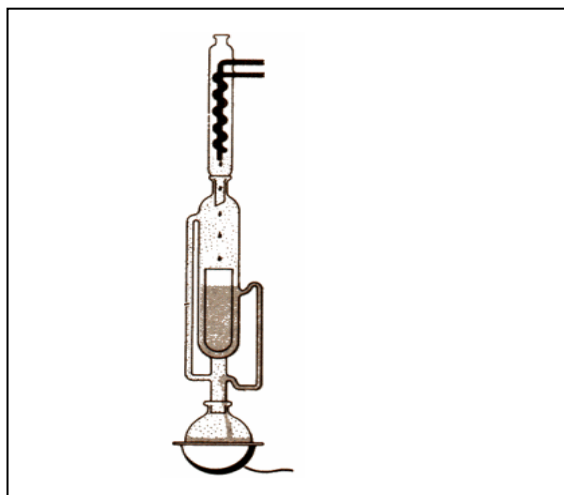


FIGURA 1: Esquematização do Extrator de Soxhlet
Fonte: STENIO, RD (2009)

3.4 Bioensaio Fase 2

A segunda fase dos bioensaios constou da realização de testes para avaliar a eficácia do extrato de Nim solubilizado em soxhlet e compará-los ao bioensaio um e aos métodos convencionais.

Para a realização dessa fase dos testes utilizou-se 560 larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* e 28 potes plásticos arranjados em sete fileiras – seis fileiras para teste e uma para controle – depois de vários testes, encontramos as concentrações ideais com concentração mínima e alta eficácia. Nas fileiras teste o extrato de Nim foi diluído em água desclorada nas concentrações de 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5% e 3%, na fileira controle utilizaram-se apenas água desclorada. Foram adicionadas 20 larvas ativas de 3º estágio de *A. aegypti* em cada amostra em cada concentração. As larvas ficaram expostas por 24 horas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Análise de Dados

4.1.1. Avaliação dos Extratos por Cromatografia Gasosa com Detector de Espectrometria em Massa

Amostra: Extrato Aquoso das Folhas Verdes de *Azadirachta indica*. A Figura 2 apresenta o resultado do exame com o espectrômetro e a Figura 3 representa possível o composto químico para o pico 57,74 no espectrômetro.

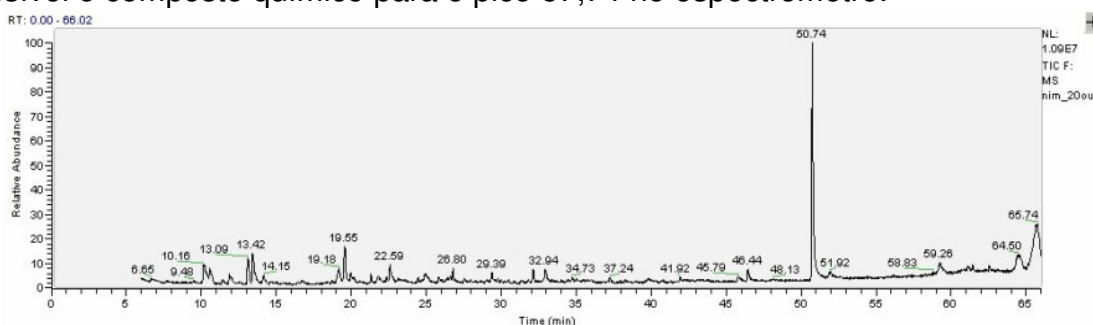


FIGURA 2: Espectrômetro do Extrato de *Azadirachta indica*
Fonte: IFCE, 2009

Pico 50,74 – Probabilidade 55,99%

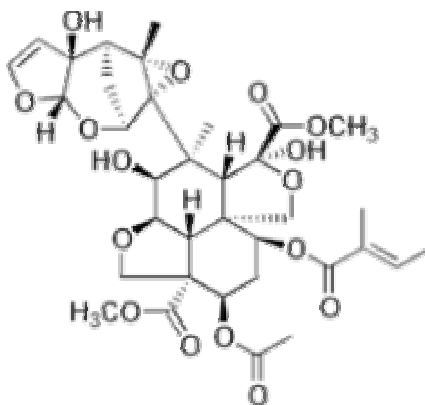


FIGURA 3: Estrutura do AZADRACHTINA
Fonte: IFCE, 2009

Amostra: Extrato Aquoso das Folhas Verdes de *Carapa guianenses*. A Figura 4 apresenta o resultado do exame com o espectrômetro, e a Figura 5 apresenta o possível composto químico encontrado no pico 51,98 com probabilidade de 54,78%.

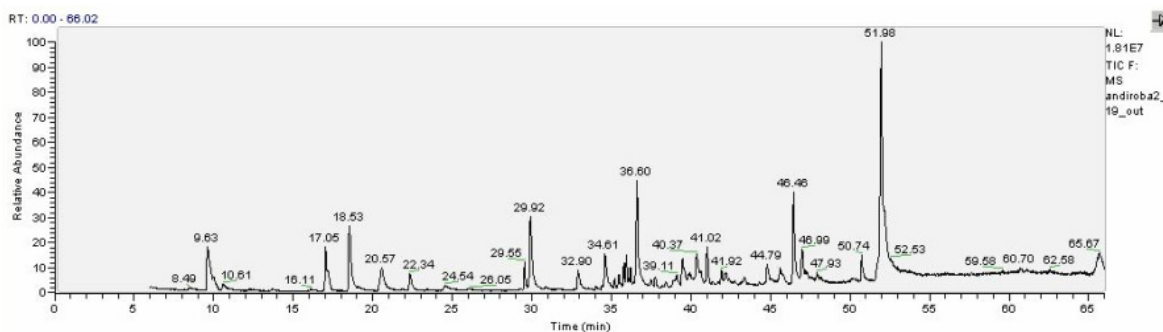


FIGURA 4: Espectrômetro do Extrato de *Carapa guianenses*
Fonte: IFCE, 2009

Pico 51,98 – Probabilidade 54,78%

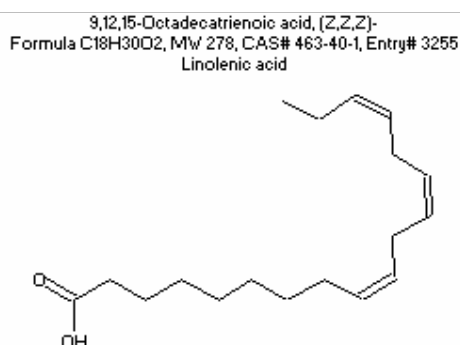


FIGURA 5: Estrutura do LINOLENIC
C₁₈H₃₀O₂
Fonte: IFCE, 2009

Amostra: Extrato Aquoso das Folhas Verdes de *Mentha crispa*. A Figura 6 apresenta o resultado do exame com o espectrômetro, e a Figura 7 apresenta o possível composto químico encontrado no pico 24,44 com probabilidade de 16,10%.

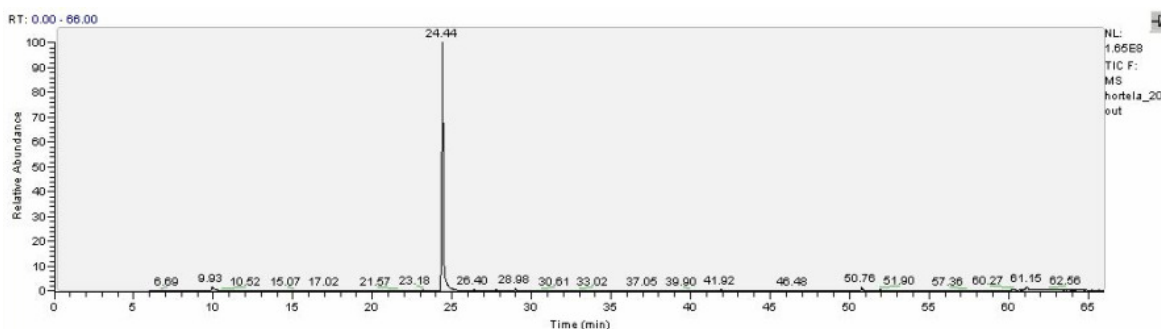


FIGURA 6: Espectrômetro do Extrato de *Mentha crispa*
Fonte: IFCE, 2009

Pico 24,44 - Probabilidade 16,10%

3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-
Formula C₁₀H₁₄O₂, Mw 166, CAS# 69745-70-6, Entry# 52755
2-Hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-3-cyclopenten-1-one #

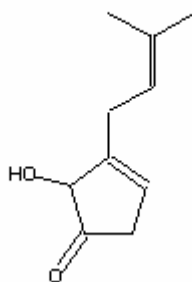


FIGURA 7: Estrutura do
CICLOPENTEN
C₁₀H₁₄O₂

Fonte: IFCE, 2009

Amostra: Extrato Aquoso das Folhas Verdes de *Nicotiana tabacum*. A Figura 8 apresenta o resultado do exame com o espectrômetro e a Figura 9 apresenta os possíveis compostos químicos encontrados no pico 23,77 com probabilidade respectivamente de 56,92% de alfa Nicotina e 41,32% de ser Nicotina.

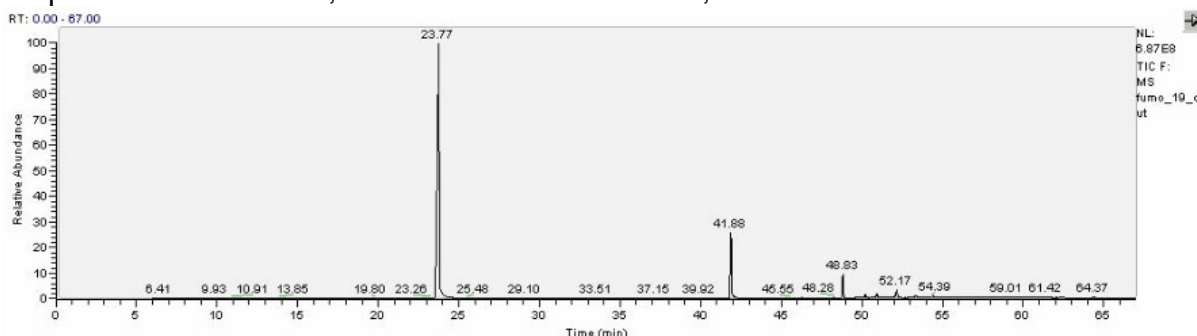
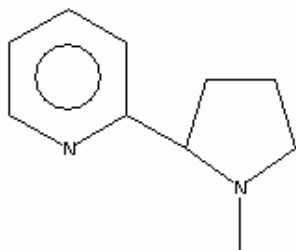


FIGURA 8: Espectrômetro do Extrato de *Nicotiana tabacum*
Fonte: IFCE, 2009

Pico 23,77 - Probabilidade 56,92%

Pyridine, 2-(1-methyl-2-pyrrolidinyl)-
Formula C₁₀H₁₄N₂, Mw 162, CAS# 23950-04-1, Entry# 42615
à-Nicotine



Probabilidade 41,32%

Pyridine, 3-(1-methyl-2-pyrrolidinyl)-, (S)-
Formula C₁₀H₁₄N₂, Mw 162, CAS# 54-11-5, Entry# 42616
Nicotine

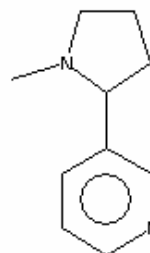


FIGURA 9: ESTRUTURA do à-Nicotina C₁₀H₁₄N₂ e Nicotina C₁₀H₁₄N₂

Fonte: IFCE, 2009

As cromatografias gasosas mostraram a probabilidade de cada extrato de conter as substâncias químicas mostradas nos espectrômetros. O extrato de Nim e Tabaco atingiram as expectativas contendo respectivamente azadrachtina e nicotina. Os extratos de Andiroba e Hortelã não foram condizentes com as bibliografias estudadas, pois os princípios ativos mais presentes foram linolenic para a Andiroba e ciclopenten para a Hortelã.

4.2. Testes com Larvas Resultado Fase 1

A mortalidade foi comprovada em larvas de 3ª estágio, quando essas foram tocadas com agulhas histológicas e não apresentaram movimentos, as de 4ª apresentaram maior resistência ao extrato. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

TABELA 2: Porcentagem de Mortalidade de Larvas Submetidas aos Biocontroladores Orgânicos

	AMOSTRA	Nº DE LARVAS EXPOSTAS	NIM	ANDIROBA	HORTELÃ
CONCENTRAÇÃO DE 10% (FILA 1)	1	20	14	6	0
	2	20	17	7	0
	3	20	16	5	0
	4	20	16	6	0
CONCENTRAÇÃO DE 15% (FILA 2)	1	20	18	7	0
	2	20	17	9	0
	3	20	18	8	0
	4	20	18	8	0
CONCENTRAÇÃO DE 20% (FILA 3)	1	20	19	9	0
	2	20	20	9	0
	3	20	20	8	0
	4	20	20	10	0
CONCENTRAÇÃO DE 25% (FILA 4)	1	20	20	11	0
	2	20	20	11	0
	3	20	20	11	0
	4	20	20	11	0
CONCENTRAÇÃO DE 30% (FILA 5)	1	20	19	11	0
	2	20	20	12	0

	3	20	20	12	0
	4	20	20	13	0
CONCENTRAÇÃO DE 35% (FILA 6)	1	20	20	14	1
	2	20	20	14	2
	3	20	19	15	0
	4	20	20	13	1
CONCENTRAÇÃO DE 40% (FILA 7)	1	20	20	15	0
	2	20	20	15	1
	3	20	20	15	2
	4	20	20	15	0
CONCENTRAÇÃO DE 45% (FILA 8)	1	20	20	16	2
	2	20	20	14	3
	3	20	20	16	1
	4	20	20	18	2
CONCENTRAÇÃO DE 50% (FILA 9)	1	20	20	16	0
	2	20	20	16	2
	3	20	20	16	3
	4	20	20	16	3
CONTROLE	1	20	0	0	0
	2	20	0	0	0
	3	20	0	0	0
	4	20	0	0	0

Fonte: O autor

De acordo com a Tabela 2, percebe-se que os valores de mortalidade obtidos nos testes foram satisfatórios, pois o extrato em concentrações acima de 20%, ocorreu mortalidade de 100%. Nos testes um e dois, onde o extrato foi muito inferior a quantidade de água, houve uma porcentagem de mortalidade menor, isso prova a eficácia do extrato de Nim em larvas de 3º estágio. A Tabela 2 também indica que os valores de mortalidade obtidos nos testes de andiroba foram relevantes, pois o extrato na concentração de 50% atingiu 80% de mortalidade das larvas.

No teste realizado com o extrato de hortelã, só houve porcentagem de mortalidade das larvas submetidas às concentrações acima de 35% da concentração. Portanto a Tabela 2 indica as concentrações onde se obteve mortalidade das larvas de *Aedes aegypti*.

As larvas expostas às concentrações pré-determinadas do extrato de Tabaco permaneceram ativas após 24hs de exposição. Não obteve nenhuma porcentagem de mortalidade das larvas em nenhuma das concentrações, mesmo nas mais altas. Portanto o extrato produzido com as folhas de *Nicotina tabacum* mostrou-se inviável para o uso como larvicida.

Resultados do Teste com Larvas de *A. aegypti* Fase 2

TABELA 3 - Mortalidade das Larvas Expostas

	AMOSTRA	Nº DE LARVAS EXPOSTAS	MORTALIDADE DAS LARVAS
CONCENTRAÇÃO DE 0,5% (FILA 1)	1	20	10
	2	20	9
	3	20	10
	4	20	11
CONCENTRAÇÃO	1	20	12

DE 1% (FILA 2)	2	20	13
	3	20	12
	4	20	12
CONCENTRAÇÃO DE 1,5% (FILA 3)	1	20	14
	2	20	13
	3	20	15
	4	20	14
CONCENTRAÇÃO DE 2% (FILA 4)	1	20	16
	2	20	16
	3	20	17
	4	20	16
CONCENTRAÇÃO DE 2,5% (FILA 5)	1	20	18
	2	20	19
	3	20	20
	4	20	18
CONCENTRAÇÃO DE 3% (FILA 6)	1	20	20
	2	20	20
	3	20	19
	4	20	20
CONTROLE	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
	4	0	0

Fonte: O AUTOR

O teste realizado com o extrato solubilizado em soxhlet de Nim nas larvas de *Aedes aegypti* mostrou-se eficaz superando todas as expectativas e hipóteses do projeto. Após vários testes a surpreendente eficácia do extrato de Nim foi comprovada nas larvas de 3º estágio após 24 horas de exposição das larvas as concentrações pré-determinadas.

A mortalidade das larvas foi confirmada quando as mesmas foram tocadas com agulhas histológicas e não apresentaram movimentos.

A Tabela 3 indica a mortalidade das larvas exposta às concentrações do extrato de Nim. A concentração de 0,5% obteve-se 50% de mortalidade das larvas, as mortalidades aumentaram de acordo com o aumento da concentração do extrato. As concentrações de 1%, 1,5%, 2%, 2,5% e 3%, obtiveram mortalidade das larvas respectivamente de 60%, 70%, 80%, 90% e mortalidade de 100%. A margem de erro é de ± 2 .

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que extratos produzidos naturalmente são alternativas eficazes, baratos e acessíveis de combate ao mosquito transmissor da dengue (*Aedes aegypti*) e as larvas do referido, sem degradar o meio ambiente, substituindo os produtos organossintéticos por agentes de controle específicos e biodegradáveis.

O extrato a partir das folhas de Nim mostrou-se um eficaz larvicida da espécie *Aedes aegypti*. Acima de 20% da concentração do biocontrolador a partir do Nim, obteve-se 100% da mortalidade das larvas de 3º estágio expostas por 24 horas. O extrato a partir das folhas verdes de Andiroba obteve resultados relevantes como larvicida, mas não alcançou níveis satisfatórios de mortalidade das larvas.

Na segunda fase do projeto o extrato produzido no extrator de soxhlet mostrou-se eficaz para larvas de *Aedes aegypti* em concentrações mínimas superando as expectativas do projeto. Com uma concentração mínima de 3% a mortalidade das

larvas foi total, mesmo em concentrações menores a mortalidade das larvas foi relevante.

Vale ressaltar que o projeto é sustentado em três principais aspectos: O social; o econômico e principalmente o ambiental. Social por que pensa-se no coletivo, a dengue hoje é um dos maiores problemas mundiais, são milhões de pessoas infectadas por ano, portanto pensa-se num todo para que haja uma melhor qualidade de vida no futuro. Econômico porque se utiliza para a produção do extrato aquoso das folhas secas de Nim, materiais de fácil acesso e manuseio para a população de baixa renda. Ambiental por ser um produto biodegradável, não causando nenhum dano à saúde humana ou animal e é ecologicamente correto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, S. M. e FERREIRA, D. T. **Santa Bárbara contra vaquinha**. Ciência Hoje, São Paulo, v. 11; n. 65, ago. 1990, p. 65- 67.

CASTRO, M.G. NOGUEIRA, R.M.R. **Dengue vírus detectado, usando reverse transcriptionpolymerase chain reação na saliva e progeny of experimentally Aedes albopictus infectado do Brasil**. Memórias Instituto Oswaldo Cruz,,99:809-814.2004.

DUQUE, J.E.L. **Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil**. Rev. Saúde Pública. 38: 842-843. 2004

IFCE. **Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia**: Laboratório de Tecnologia Química e Química Analítica. 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Fundação Nacional de Saúde**. Departamento de Operações. Coordenação de Controle de Doenças Transmitidas por Vetores. Manual de dengue: Vigilância Epidemiológica e Atenção ao Doente, 2ª edição, Brasília (DF); 1996.

SALLES, L.A. & RECH N.L. **Efeito de extratos de nim (*Azadiractha indica*) e cinamomo (*Melia azedarach*) sobre *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae)**. Rev. Bras. Agrociência. 5: 225-227. 1999

SERUFO, J.C. de Oca. **Isolação de dengue vírus tipo 1 de uma larva do *Aedes albopictus* no Campos Altos city**, Stado de Minas Gerais, Brasil. Memórias Instituto Oswaldo Cruz, n88: 1993 p503.