

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

Efeito larvicida da própolis em *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae).

Discente: MATHEUS HENRIQUE SILVA SAMPAIO

Orientação: Prof. Dra. Raquel B. Moroni.

Co-orientação: Prof. Dr. Júlio Mendes.

UBERLÂNDIA/MG.

Junho de 2019

MATHEUS HENRIQUE SILVA SAMPAIO

Efeito larvicida da própolis em *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae).

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para recebimento do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientação: Prof. Dra. Raquel B. Moroni.
Co-orientação: Prof. Dr. Júlio Mendes.

UBERLÂNDIA/MG.
Junho de 2019

Agradecimentos

Do começo eu agradeço a Deus por estar comigo sempre, me ouvindo e não ter largado minha mão nos momentos que mais precisei e por me ter proporcionado um sonho de ingressar numa federal. Desde que entrei no curso tive altos e baixos com ameaças de largar o curso por não conseguir me encaixar no mesmo, e nem por isso o instinto de sair de vez do curso se aflorou na qual eu pudesse agir dessa forma.

Agradeço aos meus orientadores Prof.^a Dr.^a Raquel B. Moroni e Prof. Dr. Júlio Mendes por terem me proporcionado essa oportunidade e paciência para efetuar esse trabalho. Digo que foi num momento que eu realmente não sabia o que fazer, não tinha noção do que trabalhar e ao menos um tema em mente para realizar. Tive o primeiro contato com a Prof.^a Raquel que me recebeu muito bem e me entregou literaturas para que pudesse conhecer mais com o que ela trabalhava e se realmente teria interesse naquilo. Por fim a literatura me proporcionou um grande interesse e acabei agarrando o tema. E não menos importante sou grato pelo Prof. Dr. Fábio T. Moroni por ter me auxiliado na execução dos experimentos.

Agradeço ao Prof. Dr. Roberto Chang, do Laboratório de Química de Produtos Naturais do IQ/UFU pela liberação do uso desse laboratório para a confecção dos extratos, como também, ao senhor Cláudio F. L. da Silva, do Apiário Girassol, pela doação das amostras da própolis bruta.

Minha família tinha consciência de que eu não me encontrava no curso, mas desde sempre acreditou que eu podia gostar de algo e que eu pudesse caminhar de forma mais agradável. Então, desde que comentei sobre o que iria ser meu TCC eles me ajudaram até na coleta dos ovos.

Meus amigos não poderiam ficar de fora, eles são meu diário praticamente. Assim como minha família, eles estão comigo a todo o momento e sabem de tudo que me deixa ou não frustrado. Me ouvem, me acolhem, me consolam, me aconselham e até mesmo pedem ajuda. Agradeço de coração ao meu grupo “Black’s & White” que estão comigo desde o Ensino Fundamental e também aos meus novos e queridos amigos que obtive desde que entre na faculdade, sendo eles da minha turma e também de outros cursos.

Um último agradecimento vai para uma pessoa que conheci ano a uns anos, foi uma época que eu estava passando por várias dificuldades tanto familiar quanto acadêmica e nem por isso fui ignorado. Sempre tive o apoio e escutava conselhos, tinha ali outra força que me estimulava e empurrava para que pudesse dar cara a tapa e enfrentar de frente todas as dificuldades na qual estava passado. Tenho por essa pessoa um apreço e amor muito grande.

RESUMO

Aedes aegypti Linnaeus (Diptera: Culicidae) é originário da África, descrito no Egito, o qual vem acompanhando o homem em sua permanente migração. Trata-se de uma espécie que apresenta distribuição mundial e sua capacidade de reprodução em recipientes artificiais, como recipientes frequentes em domicílios urbanos, por exemplo, facilitou sua propagação passiva nas últimas décadas. É um inseto holometábolo, além de ser um vetor de doenças graves. A utilização de inseticidas químicos convencionais resultou em grandes avanços no controle de pragas de importância agrônômica, veterinária e na saúde pública. O amplo espectro de ação e o alto poder residual desses produtos facilitam seu uso e aumentam sua efetividade. Por outro lado, espécies alvo continuamente expostas aos inseticidas convencionais podem desenvolver resistência aos mesmos. Diversos estudos têm demonstrado a ação da própolis contra vários microrganismos, dentre eles: vírus, bactérias e protozoários e sua capacidade de repelir ou matar alguns insetos e ácaros. Considerando as características peculiares da própolis, o presente trabalho teve como objetivo geral verificar o potencial do extrato de própolis contra *A. aegypti*. Os ovos de *A. aegypti* foram obtidos através de ovitrampas, posteriormente foram encaminhados ao laboratório, onde foram acompanhados do desenvolvimento até o estágio de larvas. Em seguida, as larvas foram submetidas à ação de soluções de etanol, tween e própolis em diferentes concentrações. A ação larvicida foi avaliada dentro do período de 24h, com intervalos de observação de 30 min, 60 min, 120 min e 24h. Os dados foram submetidos ao teste de comparações múltiplas de Tukey, sendo adotado o nível de significância de 5%. Para o cálculo da mortalidade corrigida, foi utilizada a fórmula de Abbott. Após as análises estatísticas foi verificado que o diluente etanol na concentração de 5% é adequado para uso no experimento. O extrato hidroetanólico da própolis bruta, adicionado na concentração de 5% na solução do bioensaio, apresentou ação larvicida contra populações de *A. aegypti* do município de Uberlândia, Minas Gerais, nas condições experimentais do estudo.

Palavras-chaves: Ação, larvicida; Própolis; *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

Aedes aegypti Linnaeus (Diptera: Culicidae) is originating from Africa, described in Egypt, which has been accompanying man in his permanent migration. It is a species that is distributed worldwide and its reproduction capacity in artificial containers, as frequent containers in urban houses for example, has facilitated its passive propagation in recent decades. It is a holometable insect, besides being a vector of serious amplydiseases. The use of chemicals resulted in great advances for the control of pests with agronomic, veterinary and public health importance. The extensive spectrum of action and the high residual power of these insecticides make them easy to use and increase their effectiveness. On the other hand, target species continuously exposed to conventional insecticides may develop resistance. Several studies have shown the action of propolis against various microorganisms, including viruses, bacteria and protozoa and their ability to repel or kill some insects and mites. Considering this peculiar characteristics of propolis, the general objective of this work is to verify the potential of the propolis extract against *A. aegypti*. The eggs of *A. aegypti* were obtained through ovitraps and sent to the laboratory where the development was monitored until larvae stage. Then, the larvae were submitted to hydroethanolic and tweenolic crude extracts of propolis at different concentrations. The larvicidal action was evaluated for 24h, with observation periods of 30min, 60min, 120min and 24h. The statistical analysis of the data were done by Tukey's test of multiple comparisons, considering a 5% significance level, and for the calculation of corrected mortality the formule Abbott was used. The diluent ethanol at a concentration of 5% was found to be suitable for use in the experiment. The hydroethanolic extract of crude propolis, added at a concentration of 5% in the bioassay solution, showed larvicidal action against populations of *A. aegypti* from the city of Uberlandia, Minas Gerais, under the experimental conditions of the study.

Keywords: Action, Larvicide; Propolis; *Aedes aegypti*.

Sumário

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 6 |
| 2. OBJETIVO..... | 8 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 9 |
| a) Área de estudo..... | 9 |
| b) Coletas de ovos de <i>A. aegypti</i> no campo..... | 9 |
| c) Criação de <i>A. aegypti</i> para a realização dos ensaios. | 10 |
| d) Própolis de <i>Apis mellifera</i> Linnaeus (Hymenoptera: Apidae)..... | 10 |
| e) Preparação de extratos da própolis..... | 11 |
| f) Ensaio de ação larvicida da própolis. | 11 |
| g) Análise estatística..... | 12 |
| 4. RESULTADOS..... | 14 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 17 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 19 |
| 7. REFERÊNCIAS..... | 20 |

1. INTRODUÇÃO

Aedes aegypti Linnaeus (Diptera: Culicidae) é um inseto originário da África, onde existem populações selvagens e domésticas. Originalmente descrito no Egito, o que lhe conferiu seu nome específico (*aegypti*), ele tem acompanhado o homem em sua permanente migração (BRAGA; VALLE, 2007). *A. aegypti* é uma espécie que apresenta distribuição mundial em regiões tropicais a temperadas. A capacidade de reprodução em recipientes artificiais facilitou sua propagação passiva nas últimas décadas através das principais rotas de transporte (VEZZANI; CARBAJO, 2008).

São dípteros adaptados ao ambiente urbano e utiliza os recipientes mais frequentes no domicílio ou peridomicílio para parte do seu desenvolvimento. É um inseto holometábolo, passando pelas fases de ovo, larva (L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto. A fêmea ovipõe de 70 a 120 ovos por postura, é antropofílica e tem hábitos diurnos, alimentando-se e depositando seus ovos, preferencialmente ao amanhecer e no período vespertino próximo ao crepúsculo. As fêmeas são atraídas pelos hospedeiros vertebrados por meio de estímulos visuais, olfatórios e correntes de convecção (RIFFELL et al., 2015).

A. aegypti pertence à família Culicidae, a qual é de grande interesse na saúde pública, devido à existência de um grande número de insetos hematófagos, vetores de doenças. *A. aegypti* é vetor de doenças graves, ou seja, do vírus da Febre Amarela, Zika, Chikungunya e da Dengue. A dengue é considerada uma enfermidade reemergente, além de ser considerada uma das doenças virais mais importantes transmitidas por artrópodes. A dengue é a arbovirose mais comum e de ampla distribuição no mundo.

A respeito do controle de *A. aegypti*, os principais são: biológico, químico e mecânico. O controle mecânico tem por objetivo identificar e eliminar locais que tenham água parada acumulada nos criadouros. O controle químico é feito com a utilização por meio de UVB (fumacê) para o controle dos insetos adultos e aplicação direta de larvicida nos criadouros. O controle biológico consiste no uso de algumas espécies de peixes que ingerem larvas e pupas, além de fungos e os nematódeos. (BRAGA; VALLE, 2007).

A resistência de *A. aegypti* aos inseticidas químicos convencionais - organofosforados e piretróides - utilizados no controle, vem sendo monitorada e registrada em vários países (RAWLINS; WAN, 1995; VAUGHAN et al., 1998; WIRTH; GEORGHIOU, 1999; RODRIGUES et al. 2002; DUSFOUR et al. 2011). A partir do início da década de 2000 tem havido aumento no número de registros de resistência deste mosquito a esses inseticidas também aqui no Brasil (CAMPOS; ANDRADE, 2003; MACORIS et al., 2003; CARVALHO et al., 2004; CUNHA et al., 2005; NUNES et al. 2016).

Também há estudos demonstrando que substâncias originárias de plantas podem ser eficientes contra esse mosquito (KUMAR et al. 2011; ANHOLETI et al. 2015). Mais recentemente, outras duas estratégias de controle têm sido testadas para auxiliar no controle deste mosquito: liberação de machos estéreis para auxiliar na redução da população do inseto e liberação de fêmeas infectadas com a bactéria do gênero *Wolbachia*. Essas fêmeas apresentam capacidade reduzida de se infectarem com os vírus da Febre Amarela, Zika, Chikungunya e da Dengue (WILKE et al. 2009; MOREIRA et al 2009; FRENTIU et al. 2014; ALIOTA et al. 2016). Os inibidores de desenvolvimento de insetos (IGRs) e moléculas derivadas do *Bacillus thuringiensis* são comumente utilizados em vários países no controle de insetos, inclusive de *A. aegypti*. Particularmente no Brasil, os IGRs e *Bacillus thuringiensis* estão entre os larvicidas propostos pela FUNASA para serem usados em localidades onde há registros de resistência aos organofosforados, que são comumente utilizados como larvicidas (FUNASA, 2001). Dentre os IGRs se destacam o Piriproxifeno, um larvicida que apresenta eficácia comprovada contra larvas e pupas (RESENDE; GAMA, 2006).

Os extratos vegetais são utilizados como fonte de inseticidas naturais e bioensaios são conduzidos utilizando larvas de terceiro e quarto estádios ou comparando os efeitos dos extratos vegetais no desenvolvimento larval (RODRIGUES NETO et al. 2018). Rhizophoraceae é uma família com espécies que possuem uma substância denominada tanino. O ácido tânico é um tanino hidrolisável, produzido pelo metabolismo secundário de plantas e pertence à grande categoria de ácidos fenólicos. Estudos mostraram ação promissora do ácido tânico contra larvas culicídeos (RODRIGUES NETO et al. 2018).

Apis mellifera Linnaeus chegou ao território brasileiro e nas Américas juntamente com conquistadores espanhóis e portugueses, no período colonial. No Brasil, é possível identificá-la em todos os ambientes, seja em territórios urbanos, agrícolas e naturais, preservados ou não. É possível percebê-la por todo território, não existe lugar onde não ocorra *A. mellifera* (MINUSSI; ALVES-DOS-SANTOS, 2007).

A própolis é uma complexa mistura de substâncias que as abelhas coletam de várias plantas, elaboram e depositam em seus ninhos, com o objetivo de vedar a colmeia para evitar a entrada de outros insetos, manter a temperatura interna e impedir a entrada de bactérias e fungos. Sua constituição é de 47% de resina contendo vitaminas, sais minerais, compostos fenólicos como flavonoides, ácidos graxos, álcoois aromáticos e ésteres, 30% de ceras, 5% de pólen, 4-15% de substâncias voláteis e matérias estranhas e 13% de substâncias desconhecidas, além de elementos inorgânicos (cobre, manganês, ferro, cálcio, alumínio, vanádio e silício) (LONGHINI et al, 2007). Pesquisadores relatam que o potencial biológico da própolis se deve a um sinergismo que ocorre entre os muitos constituintes (MARCUCCI, 1996). A grande quantidade de compostos bioativos da própolis apresenta consideráveis potenciais repelente e inseticida, além de serem relativamente seguros e biodegradáveis (KARERU et al, 2013). Entretanto, são necessários mais estudos sobre sua efetividade como inseticida e/ou repelente e pesquisas sobre sua ação em mosquitos ainda são incipientes.

Esses registros evidenciam a importância da busca por alternativas de controle deste mosquito que, além de eficientes, apresentem maior especificidade e sejam seguras para o ser humano, outros animais e ao meio ambiente. Diante disso, o uso de substâncias com modos de ação diferentes dos inseticidas químicos convencionais são elementos de suma importância no programa de controle deste mosquito e das doenças por ele transmitidas.

2. OBJETIVO

Analisar o potencial do extrato da própolis como larvicida contra *A. aegypti*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

a) Área de estudo

O município de Uberlândia (MG) está localizado na região do Triângulo Mineiro. O clima de Uberlândia é do tipo AW segundo Köppen, com inverno seco e verão chuvoso, com temperatura média nos meses mais frios igual ou superior a 18°C. A temperatura média é relativamente uniforme ao longo do ano, com amplitudes que atingem até 14°C (SCHIAVINI, 1992).

A pesquisa foi realizada no Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia localizado na região Norte da cidade de Uberlândia (18°53'01"S, 48°15'34"W), sendo caracterizado por arborização diversificada, presente nas alamedas e jardins, além de uma horta experimental. A região é compreendida pelo Bioma Cerrado, em seu entorno encontram-se residências, arborização urbana, eucaliptal e pastagens (CASTRO; FRANCHIN; JÚNIOR, 2010).

b) Coletas de ovos de *A. aegypti* no campo.

Os ovos do mosquito foram coletados com armadilhas do tipo “ovitrampa” (VAN BREUGEL et al., 2015) em áreas abertas no Campus Umuarama (UFU), sendo codificadas com as letras de A a H (Fig 1). Em seguida, os ovos foram levados para o Laboratório de Entomologia, localizado no Depto de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas/UFU.



Figura 1 – Armadilhas tipo ovitrampa montadas em diferentes pontos do campus Umuarama/UFU em Uberlândia-MG.

As ovitrampas foram constituídas de um recipiente plástico de coloração preta com abertura de 16 cm de diâmetro e 12 cm de altura, e uma paleta de aglomerado de madeira do tipo “Duratex”, de 20 cm de comprimento por 2,5 cm de diâmetro. O recipiente foi preenchido até a metade de sua capacidade com água potável e a paleta foi inserida em seu interior e mantida em posição diagonal, se apoiando na lateral de sua abertura. A parte rugosa da paleta ficou voltada para baixo, protegida da incidência direta de luz solar, superfície e ambiente propícios à postura de ovos pelas fêmeas do mosquito.

c) Criação de *A. aegypti* para a realização dos ensaios.

As ovitrampas foram verificadas periodicamente e as paletas eram transportadas até o laboratório de Entomologia/DEPAR/ICBIM/UFU para verificação de oviposturas, seguindo indicações de metodologia de SILVA & MENDES, 2007. Os ovos considerados viáveis foram transferidos para recipientes de vidro transparente contendo água destilada. Foram colocados uma média de 50 ovos em cada um dos frascos de vidro. Foi adicionada à superfície da água do frasco uma pequena porção (\pm um grama) de ração para roedores. Em seguida, a abertura de cada frasco foi recoberta por um pedaço de tecido organdi que ficou fixado a ele com o auxílio de um elástico. Após este procedimento, os frascos foram transferidos para uma estufa para BOD (Biologic Oxygen Demand) mantida a 26°C e fotoperíodo de 12 horas. Nos dias subsequentes, os frascos foram analisados diariamente e novas porções de ração foram adicionadas na superfície da água de cada um deles. A ração serviu de alimento para as larvas eclodidas. Esse procedimento foi mantido até o terceiro dia após a colocação dos ovos nos frascos. No terceiro dia, as larvas de terceiro estágio foram utilizadas para a verificação da ação larvicida da própolis.

d) Própolis de *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera: Apidae).

Amostras de própolis foram obtidas em um apiário comercial, da cidade de Uberlândia, MG. As amostras foram transportadas para o laboratório e armazenadas a -20°C até o uso.

e) Preparação de extratos da própolis.

A própolis na concentração de 100mg/ml foi dissolvida em dois solventes diferentes (solução alcoólica a 70% e solução de Tween 80 a 10 %) obtendo respectivamente os extratos etanólicos (EEP) e tweenólicos (ETP), conforme descritos abaixo. Os extratos foram obtidos no laboratório de Química de Produtos Naturais (IQ/UFU).

e.1) Extrato etanólico da própolis (EEP). A extração das substâncias químicas a própolis verde ocorreu segundo método proposto por Franchi Jr et al. (2011). Cem gramas de própolis bruta foram triturados em um moinho (Cadence-Brasil) e depois peneiradas. Na sequência, a própolis bruta pulverizada foi dissolvida em etanol 80%, sendo homogeneizada, a 60°C, por trinta minutos. Em seguida, o material foi centrifugado e o sobrenadante armazenado a -20°C até o uso. Na sequência, o material foi filtrado em papel de filtro e o etanol submetido ao rotaevaporador até a completa secagem, a 40°C. Finalmente, o material foi seco por liofilização e ressuscitado em etanol 70% na concentração de 1mg/ml, obtendo-se o EEP. Este extrato foi armazenado em frasco âmbar a -20°C, até o momento do uso (E1).

e.2) Extrato tweenólico da própolis (ETP). Um procedimento semelhante para a obtenção do EEP foi realizado, sendo diferenciado na ressuspensão da amostra na concentração conhecida (1mg/ml), que nesse caso foi utilizado solução aquosa de Tween 80 a 10%.

Após a obtenção dos extratos, os mesmos foram testados contra as larvas de *A. aegypti*, adicionando os mesmos na água contida nos frascos de plástico, com volume final de 20 ml. A partir desses extratos foram realizadas as diluições em água diretamente nas concentrações a serem testadas.

f) Ensaio de ação larvicida da própolis.

O primeiro experimento foi realizado no período de 4/05/18 a 11/05/2018 e o segundo realizado no período de 18/2/19 a 21/2/19 (Figuras 2 e 3). A concentração dos extratos de própolis testados EEP e ETP e dos controles negativos (água, etanol 70% e tween 10%) foi 50 ppm (0,05 ml/l) e controle positivo (Piriproxifeno) foi

0,05 ppm. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo: GA (EEP); GB (ETP); GC (apenas água); GD (apenas etanol 70%); GE (apenas Tween 10%) e GF (Piriproxifeno comercial). Em cada um dos frascos, foi colocado cinco larvas de terceiro estágio de *A. aegypti*. Em seguida, os frascos foram transferidos e mantidos em estufa para BOD a 26°C e fotoperíodo de 12 horas. Em cada frasco, foram adicionadas pequenas porções da mesma ração usada para alimentar as larvas até o estágio III. Após 30 minutos, 60 minutos, 120 minutos e 24 horas de manutenção na estufa, as larvas foram examinadas para verificação de sua viabilidade. Foram consideradas inviáveis (mortas) as larvas que se mantiverem imóveis ao serem tocadas com um bastão dentro do frasco.

g) Análise estatística

Primeiramente foram feitas comparações entre os diluentes (água, etanol 10% e etanol 5%) para verificar diferenças entre tais diluentes (controles). Em seguida, foram realizadas comparações entre a água (controle negativo), etanol 5% mais própolis, Piriproxifeno (controle positivo) e Tween 5% mais própolis para verificar diferenças entre soluções com diferentes diluentes e controles positivo e negativo. Posteriormente foram feitas comparações entre água (controle negativo), etanol 5% (controle negativo) e etanol 5% mais própolis. Nas comparações em que a ANOVA constatou diferenças significativas, foi aplicado o teste de comparações múltiplas de Tukey “a posteriori” (ZAR, 1999). Para todos os testes foi adotado o nível de significância de 5%. Para o cálculo da mortalidade corrigida, foi utilizada a fórmula de Abbott (ABBOTT, 1925).

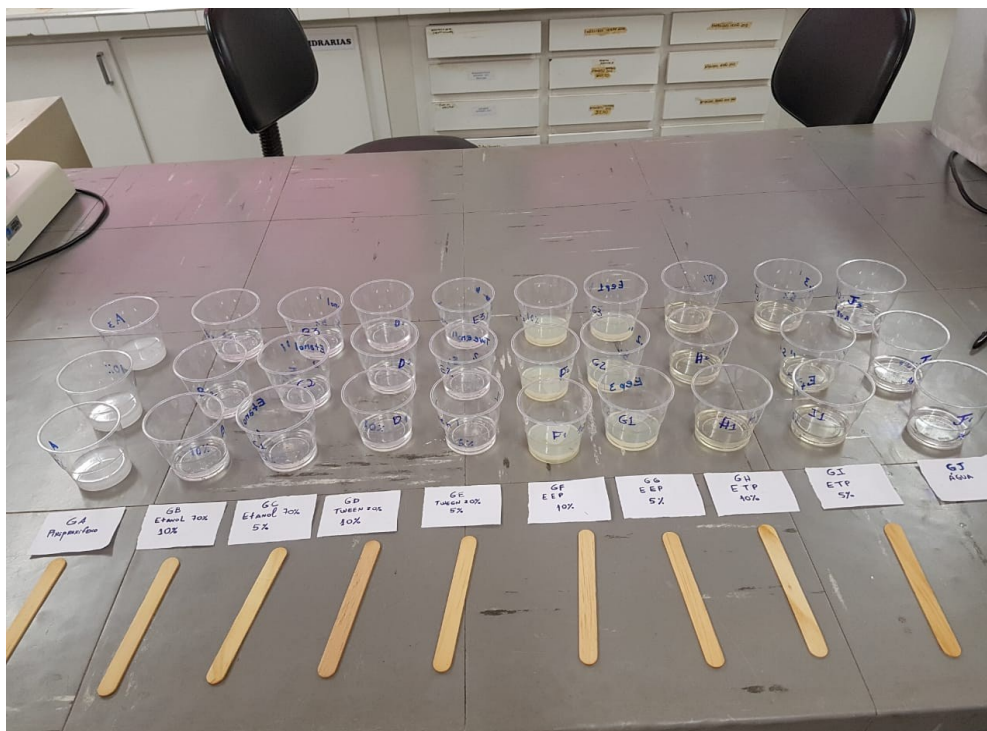


Figura 2 – Primeiro experimento sobre a ação larvicida da própolis.



Figura 3 – Segundo experimento sobre a ação larvicida da própolis.

4. RESULTADOS

Os resultados do primeiro experimento indicaram que tanto as soluções que continham somente o solvente Tween quanto a que continha o extrato tweenólico de própolis não agiram sobre as larvas de *Aedes aegypti*. Por outro lado, a solução contendo Piriproxifeno (controle positivo) mostrou ser altamente efetiva contra as larvas. Também chama atenção o fato de a solução água com etanol 10% (um dos controles negativos com etanol) ter causado alta mortalidade das larvas (Tabela 1).

A solução com 10% de solução etanólica da própolis apresentou ação larvicida a partir de 60 minutos. Ao final do experimento, 24 horas após seu início foi verificado a mortalidade de 60% das larvas na solução etanólica da própolis a 5% (Tabela 1).

No segundo experimento, a solução de Extrato Tweenólico da Própolis a 5% causou taxa de mortalidade de 7% no tempo de 24 horas. Por outro lado, a solução com 5% de Extrato Etanólico da Própolis começou a causar mortalidade nas larvas a partir de 30 minutos, sendo observada uma mortalidade de 53,8% das larvas no final do experimento (Tabela 2).

Quando os dados dos dois experimentos foram agrupados (Tabela 3) e analisados de forma conjunta, foi verificado que a solução com 5% de Extrato Etanólico da Própolis provocou mortalidade a partir de 30 minutos, sendo que ao final das 24 horas, causou 60% de mortalidade nas larvas.

Ao comparar os diluentes (controles negativos), foi verificado que o etanol na concentração de 10% provocou a mortalidade de 93,3% das larvas, enquanto a solução de etanol a 5% demonstrou ter pouco efeito sobre as larvas, não diferindo estatisticamente da água pura (Tabela 4). Os resultados descritos acima demonstram que solução de etanol 5% (controle negativo) foi o diluente mais adequado para verificação da ação larvicida da própolis (Tabela 4).

Quando a mortalidade causada pela solução de etanol 5% + própolis foi comparada com a observada na solução de Tween 5% + própolis, a primeira mostrou ser significativamente mais efetiva (Tabela 5) e essa mesma mortalidade também diferiu significativamente das observadas nos frascos contendo somente os solventes (água pura e solução de etanol 5%, os controles negativos (Tabela 6).

Tabela 1 – Mortalidade em diferentes tempos de exposição, referente ao primeiro experimento da ação larvicida da própolis.

| Soluções | Tempo de exposição | | | |
|----------------------|--------------------|--------|---------|-------|
| | 30 min | 60 min | 120 min | 24h |
| Piriproxifeno | 73% | 80% | 100% | 100% |
| Etanol 10% | 0% | 53,3% | 93,3% | 93,3% |
| Etanol 5% | 0% | 0% | 0% | 0% |
| Tween 10% | 0% | 0% | 0% | 0% |
| Tween 5% | 0% | 0% | 0% | 0% |
| EEP 10% | 0% | 53,3% | 66,6% | 80% |
| EEP 5% | 0% | 0% | 0% | 60% |
| ETP 10% | 0% | 0% | 0% | 0% |
| ETP 5% | 0% | 0% | 0% | 0% |
| Água | 0% | 0% | 0% | 0% |

EEP: solução do extrato etanólico da própolis. ETP: solução do extrato tweenólico da própolis. Experimento realizado em triplicata (n=5). * mortalidade corrigida de acordo com Abbott (1925).

Tabela 2 – Mortalidade em diferentes tempos de exposição, referente ao segundo experimento da ação larvicida da própolis

| Soluções | Tempo de exposição | | | |
|----------------------|--------------------|--------|---------|-------|
| | 30 min | 60 min | 120 min | 24h |
| Piriproxifeno | 100% | 100% | 100% | 100% |
| EEP 5% | 7% | 7,17% | 7,17% | 53,8% |
| ETP 5% | 0% | 0% | 0% | 7% |
| Água | 0% | 0% | 0% | 0% |

EEP: solução do extrato etanólico da própolis. ETP: solução do extrato tweenólico da própolis. Experimento realizado em triplicata (n=5). * mortalidade corrigida de acordo com Abbott (1925).

Tabela 3 – Mortalidade* das diferentes soluções nos dois experimentos referentes à ação da própolis em larvas de *Aedes aegypti*.

| Soluções | Tempo de exposição | | | |
|----------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|
| | 30 min | 60 min | 120 min | 24h |
| Piriproxifeno | 5,5(76,6%) | 6(80%) | 7,5(100%) | 7,5(100%) |
| Etanol 5% | 0 | 1(6,6%) | 1(6,6%) | 1(6,6%) |
| Tween 5% | 0 | 0 | 0 | 0 |
| EEP 5% | 0,5(3,3%) | 0,5(3,3%) | 0,5(3,3%) | 9(60%) |
| ETP 5% | 0 | 0 | 0 | 0,5(3,3%) |
| Água | 0 | 0 | 0 | 0 |

EEP: solução do extrato etanólico da própolis. ETP: solução do extrato tweenólico da própolis. * mortalidade corrigida de acordo com Abbott WS. 1925.

Tabela 4 – Ação dos diferentes diluentes em larvas de *Aedes aegypti*.

| Diluentes | Mortalidade** (%) | F-ratio | P |
|------------|-------------------|---------|-------|
| Água | 0(A)* | 6.196 | 0.011 |
| Etanol 10% | 93,3(B) | | |
| Etanol 5% | 6,6(A) | | |

* Letras distintas indicam que são estatisticamente diferentes entre si ao nível de 5% de significância ($p > 0,05$). F: indica se houve alguma diferença geral entre as médias. ** observação no tempo de 24h baseado no efeito acumulado da mortalidade corrigida.

Tabela 5 – Ação larvicida de soluções etanólica e tweenólica da própolis

| Controles/Soluções | Mortalidade** (%) | F-ratio | P |
|----------------------|-------------------|---------|-------|
| Água | 0(A)* | 46.798 | 0.000 |
| Etanol 5% + própolis | 60(B) | | |
| Piriproxifeno | 100(C) | | |
| Tween 5% + própolis | 3,3(A) | | |

* Letras distintas indicam que são estatisticamente diferentes entre si ao nível de 5% de significância ($p > 0,05$). F: indica se houve alguma diferença geral entre as médias.

Tabela 6 – Ação larvicida da solução tweenólica da própolis.

| Controles/Soluções | Mortalidade** (%) | F-ratio | P |
|----------------------|-------------------|---------|-------|
| Água | 0(A)* | 5.008 | 0.022 |
| Etanol 5% | 6,6(A) | | |
| Etanol 5% + própolis | 60(B) | | |

* Letras distintas indicam que são estatisticamente diferentes entre si ao nível de 5% de significância ($p > 0,05$). F: indica se houve alguma diferença geral entre as médias.

5. DISCUSSÃO

O piriproxifeno causou mortalidade na totalidade das larvas expostas a este inseticida (controle positivo). Tal fato corrobora os trabalhos que validam o uso comercial desse inseticida que faz parte do grupo dos alternativos aos organofosforados (PIRES, 2015; FONSECA et al., 2019). Entre os controles negativos, a ocorrência de mortalidade significativa causada pela solução etanólica 10% demonstrou a inadequação do uso do solvente nesta concentração para verificação da ação larvicida do extrato de própolis. Esta seria uma alta concentração de etanol, comparada a empregada por Carvalho et al. (2004), onde foi utilizado 1 ml de etanol absoluto em 250 ml de água destilada como controle negativo. Ao verificar esse fato, as soluções foram diluídas até a concentração de 5%, para garantir que não haveria efeito interveniente do veículo utilizado na elaboração dos extratos. Por outro lado, as soluções tweenólicas com extrato da própolis não se mostraram efetivas contra as larvas de *A. aegypti*, indicando a ineficiência deste diluente/solvente, nas concentrações testadas, na verificação da ação larvicida do extrato da própolis.

O extrato etanólico da própolis utilizado no bioensaio possibilitou a mortalidade de um percentual significativo de larvas, corroborando com bioensaios realizados por Silva et al. (2004), utilizando frações de *Magonia pubescens* na concentração de 36ppm para obter a CL50%, isto é a concentração que provoca a morte de 50% das larvas de *A. aegypti*.

É possível inferir a interação dos taninos com dois locais de ação na larva do inseto. Rey et al. (1999) trataram larvas de dípteros com taninos e verificaram lesões histopatológicas, primariamente sobre o epitélio do intestino de todas as larvas e secundariamente sobre o ceco e túbulos Malpighianos. Os autores também concluíram que os efeitos histopatológicos diferem qualitativamente, ao longo do intestino das larvas, e quantitativamente, de acordo com a concentração da substância utilizada e o táxon da espécie. Valotto et al. (2010) estudaram as alterações morfo-histológicas em larvas de *A. aegypti* causadas pelo tanino condensado ou catéquico isolado de *Magonia pubescens* e definiram como os principais efeitos tóxicos celulares do tanino catéquico sobre larvas como sendo: elevada vacuolização e ausência dos limites citoplasmáticos, formação vesicular apical com liberação de conteúdo citoplasmático, aumento do espaço intercelular e desprendimento de células da membrana basal.

Segundo Forattini (2002), as larvas de *A. aegypti* retiram alimento do meio aquático por filtração, predação e raspagem. As estruturas bucais nas larvas devem estar integras para possibilitar a alimentação, que fornecerá energia para sustentar o metabolismo do inseto. Sendo assim, a alteração da integridade da estrutura desses órgãos por complexação com taninos também pode comprometer a sobrevivência das mesmas.

Mayworm et al. (2016) quantificaram várias amostras da própolis brasileira e concluíram que todas apresentaram reação positiva para protoantocianidinas (taninos condensados). A própolis verde apresentou a maior concentração de taninos, com 33% na sua composição química. Dessa forma, é possível considerar a influência tóxica dessas substâncias em alguns órgãos das larvas do inseto.

No entanto, os extratos aquosos dissolvidos em Tween 80 não apresentaram efeito larvicida. Essa variação, possivelmente pode ser resultado da diferença de quantidade de fenóis totais extraídos pelos dois tipos de extração. Segundo Miguel et al. (2014), a maior quantidade de compostos ocorre quando se utiliza soluções hidroalcoólicas, quando comparado aos extratos aquosos. Nesse caso, nas soluções aquosas, pode haver concentrações de taninos muito diluídas e ineficazes para exercer algum efeito tóxico sobre as larvas.

Outros compostos que podem ser considerados como importantes na ação larvicida são diterpenos. Geris et al. (2008) avaliaram a ação larvicida de três frações do óleo-resina de *Copaifera reticulata* e identificaram que as frações do ácido 3- β -acetoxylabdan-8 (17)-13-dien-15-oico e ácido alepterolico foram letais para larvas de *A. aegypti* de terceiro estágio, sendo respectivamente que as concentrações que matam 50% das larvas (LC₅₀) mutuamente variaram de 0,8 a 87,3 ppm. Segundo Lima et al. (2006), compostos como (diterpenos, norriterpenos e sesquiterpenos) são relatados como inibidores de alimentação e crescimento para vários gêneros de insetos.

Segundo Aminimoghadamfarouj e Nematollahi (2017) a própolis apresenta uma grande quantidade de diterpenóides. No entanto, de acordo com Matsuno (1995) devido a características apolares, os extratos aquosos da própolis apresentam quantidades negligenciáveis de diterpenos, ou seja, apenas traços quando comparados aos extratos alcoólicos.

Portanto, novos estudos necessitam ser realizados para elucidar o mecanismo larvicida da própolis. No futuro, serão necessárias observações das estruturas de filtração por microscopia óptica e eletrônica para realizar análises histopatológicas das lesões causadas pelas substâncias da própolis, presentes em solução. Outros experimentos importantes a serem realizados seriam as construções de curvas dose-efeito e a definição da dose letal mediana das frações enriquecidas, ou purificadas sobre as larvas de *A. aegypti*.

6. CONCLUSÕES

O extrato hidroetanólico da própolis bruta, adicionado na concentração de 5% na solução do bioensaio, apresentou ação larvicida contra populações de *A. aegypti* do município de Uberlândia, Minas Gerais, nas condições experimentais do estudo.

O fato da solução testada não ter causado mortalidade em 100% das larvas indica a necessidade de estudos adicionais visando aumentar a efetividade do extrato hidroetanólico da própolis.

7. REFERÊNCIAS

- ABBOTT, Walter S. et al. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **J. Econ. Entomol**, v. 18, n. 2, p. 265-267, 1925.
- ALIOTA, Matthew T. et al. The wMel strain of Wolbachia reduces transmission of Zika virus by *Aedes aegypti*. **Scientific reports**, v. 6, p. 28792, 2016.
- AMINIMOGHADAMFAROUJ, Noushin; NEMATOLLAHI, Alireza. Propolis diterpenes as a remarkable bio-source for drug discovery development: a review. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 6, p. 1290, 2017.
- ANHOLETI, Maria C. et al. Biocontrol evaluation of extracts and a major component, clusianone, from *Clusia fluminensis* Planch. & Triana against *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 5, p. 629-635, 2015.
- BRAGA, Ima Aparecida; VALLE, Denise. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e serviços de saúde**, v. 16, n. 2, p. 113-118, 2007.
- BRAGA, Ima Aparecida; VALLE, Denise. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 295-302, 2007.
- BRAGA, Ima Aparecida; VALLE, Denise. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e serviços de saúde**, v. 16, n. 4, p. 179-293, 2007.
- BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, n. 5, p. 1-9, 2017.
- CARVALHO, Maria do Socorro Laurentino de et al. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, p. 623-629, 2004.
- CASTRO, W. S.; FRANCHIN, A. G.; JÚNIOR, O. Marçal. Reprodução de *Glaucidium brasilianum* (Gmelin, 1788) em área urbana de Uberlândia, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 18, n. 1, p. 55-58, 2010.
- DA-CUNHA, Marcella Pereira et al. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 441-444, 2005.
- DUSFOUR, Isabelle et al. Multiple insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations compromises the effectiveness of dengue vector control in French Guiana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 346-352, 2011.

FONSECA, Eduardo Oyama Lins et al. Estudo experimental sobre a ação de larvicidas em populações de *Aedes aegypti* do município de Itabuna, Bahia, em condições simuladas de campo. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 28, p. e2017316, 2019.

FORATTINI, O. P. Culicidologia Médica, Edusp. **Brazil: São Paulo**, 2002.

FRANCHI, Gilberto C. et al. Comparison of effects of the ethanolic extracts of Brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2012, 2012.

FRENTIU, Francesca D. et al. Limited dengue virus replication in field-collected *Aedes aegypti* mosquitoes infected with Wolbachia. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 2, p. e2688, 2014.

Fundação Nacional de Saúde. Dengue – Instruções para pessoal de combate ao vetor. Brasília: Funasa; GERE

Fundação Nacional de Saúde. Dengue – Programa Nacional de Controle da Dengue. Brasília: Funasa; 2002.

GERIS, Regina et al. Diterpenos de *Copaifera reticulata* Ducke com atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (L.)(Diptera, Culicidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 1, p. 26-28, 2008.

KARERU, Patrick; ROTICH, Zachaeus Kipkorir; MAINA, Esther Wamaitha. Use of botanicals and safer insecticides designed in controlling insects: the African case. In: **Insecticides-Development of Safer and More Effective Technologies**. IntechOpen, 2013.

KUMAR, Sarita; WAHAB, Naim; WARIKOO, Radhika. Bioefficacy of *Mentha piperita* essential oil against dengue fever mosquito *Aedes aegypti* L. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 1, n. 2, p. 85-88, 2011.

LIMA, Maria Goretti Araújo de et al. Effect of stalk and leaf extracts from Euphorbiaceae species on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 4, p. 211-214, 2006.

LONGHINI, Renata et al. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 388-95, 2007.

MACORIS, Maria de Lourdes G. et al. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 703-708, 2003.

MARCUCCI, Maria Cristina et al. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v. 19, n. 5, p. 529-536, 1996.

MATSUNO, Tetsuya. A new clerodane diterpenoid isolated from propolis. **Zeitschrift für Naturforschung c**, v. 50, n. 1-2, p. 93-97, 1995.

MAYWORM, Marco AS et al. Does propolis contain tannins?. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

MIGUEL, Maria Graça et al. Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of propolis (*Apis mellifera* L.) from Algarve, South Portugal. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 1, p. 16-23, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 16/2017. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, n. 15, 2017.

MINUSSI, Luiz Carlos; ALVES-DOS-SANTOS, Isabel. Abelhas nativas versus *Apis mellifera* Linnaeus, espécie exótica (Hymenoptera, Apidae). **Bioscience Journal**, v. 23, 2007.

MOREIRA, Luciano A. et al. A *Wolbachia symbiont* in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. **Cell**, v. 139, n. 7, p. 1268-1278, 2009.

NUNES, Renan Flávio de França et al. Characterization of Enzymatic profiles of *Aedes aegypti* strains from the State of Rio Grande do Norte, Brazil. **Ciência & saúde coletiva**, v. 21, p. 285-292, 2016.

PIRES, Bianca Maria Parreira. Avaliação de piriproxifeno como ferramenta para estratégias de controle vetorial de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) na Ilha da Madeira: estudo piloto na região do Paúl do Mar. Tese de Doutorado. Instituto de Higiene e Medicina Tropical. 2015.

RAWLINS, S. C.; WAN, J. O. Resistance in some Caribbean populations of *Aedes aegypti* to several insecticides. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 11, n. 1, p. 59-65, 1995.

RESENDE, Marcelo Carvalho de; GAMA, Renata Antonaci. Persistência e eficácia do regulador de crescimento pyriproxifen em condições de laboratório para *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 72-5, 2006.

REY, Delphine; PAUTOU, Marie-Paule; MEYRAN, Jean-Claude. Histopathological effects of tannic acid on the midgut epithelium of some aquatic Diptera larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 73, n. 2, p. 173-181, 1999.

RODRIGUES NETO, Ageu A. et al. Evaluation of embryotoxic and embryostatic effects of the aqueous extract of *Rhizophora mangle* and tannic acid on eggs and larvae of *Aedes aegypti*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 2, p. 2141-2148, 2018.

SCHIAVINI, Ivan et al. Estrutura das comunidades arbóreas de mata de galeria da Estação Ecológica do Panga (Uberlândia, MG). 1992.

SILVA, H. H. G. et al. 2004. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magoniapubescens*. **St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti***, p. 396-399.

SILVA, Juliana Junqueira da; MENDES, Júlio. Susceptibility of *Aedes aegypti* (L) to the insect growth regulators diflubenzuron and methoprene in Uberlândia, State of Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 6, p. 612-616, 2007.

VALOTTO, Cleyde Ferreira Barreto et al. Alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pelo tanino catéquico isolado da planta do cerrado *Magonia pubescens* (Sapindaceae). 2010.

VAN BREUGEL, Floris et al. Mosquitoes use vision to associate odor plumes with thermal targets. **Current Biology**, v. 25, n. 16, p. 2123-2129, 2015.

VAUGHAN, Ashley; CHADEE, Dave D.; FFRENCH-CONSTANT, RICHARD. Biochemical monitoring of organophosphorus and carbamate insecticide resistance in *Aedes aegypti* mosquitoes from Trinidad. **Medical and veterinary entomology**, v. 12, n. 3, p. 318-321, 1998.

VEZZANI, Darío; CARBAJO, Anibal E. *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and dengue in Argentina: current knowledge and future directions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 1, p. 66-74, 2008.

WILKE, André Barreto Bruno et al. Control of vector populations using genetically modified mosquitoes. **Revista de saúde pública**, v. 43, n. 5, p. 869-874, 2009.

WIRTH, MARGARET C.; GEORGHIOU, G. P. Selection and characterization of temephos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, British Virgin Islands. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 15, n. 3, p. 315-320, 1999.

ZAR, J. H. Biostatistical Analysis. 4th ed. 663 pp. 1999.