

Carlos R S Caser¹, Glauco A Carlos¹, Wagner Gasperazzo¹, Zilma M A Cruz² & Ary G Silva³

Atividade biológica das folhas secas de Neem, *Azadirachta indica*, sobre larvas de *Aedes aegypti*.⁴

Biological activity of dried leaves from Neem tree, *Azadirachta indica*, on the *Aedes aegypti* larvae.

Resumo O objetivo deste trabalho foi produzir evidências experimentais para a utilização do extrato aquoso de folhas secas do neem, *Azadirachta indica*, como inseticida natural para *Aedes aegypti*, o vetor da dengue. Isto se justifica, pois os inseticidas de amplo espectro disponíveis exterminam indiscriminadamente os insetos, assim como, aqueles benéficos ao homem. Outro problema ligado a eles é o fato dos insetos adquirirem resistência, demandando aplicações de quantidades cada vez maiores causando danos ecológicos e poluição ao meio ambiente. Os resultados mortalidade de larvas de 3^o e 4^o estágio, sob efeito de concentração 0,4% e 0,8%, indicam o efeito inseticida do extrato aquoso de folhas secas *A. indica* em relação às larvas de 3^o e 4^o estágios não tratadas. O bioensaio mostrou um resultado promissor para o controle de *A. aegypti* em condições laboratoriais, logo são promissores estes resultados como indicativos para o emprego do neem como inseticida natural a ser utilizado no combate a dengue. Há necessidade, entretanto, de mais experimentos para comprovar a inexistência de demanda de extração com solventes orgânicos para o emprego das folhas secas de neem no controle do *A. aegypti*.

Palavras-chave Dengue, inseticidas naturais, bioensaio, Insecta.

Abstract This paper aimed to produce experimental evidences on the possibility of the use the dried leaf of the

neem tree, *Azadirachta indica*, aqueous extract as a natural insecticide to *Aedes aegypti*, the vector of Dengue. It is justified by the fact that the available wide range insecticides exterminate indiscriminately dangerous as well as useful insects to mankind. Another problem of wide range insecticides is the growing resistance shown by insects to them, what had been leading to the demands of higher concentrations at each application. The larval mortality of *A. aegypti* at the 3rd and 4th stages exposed to extract concentrations of 0.4% and 0.8% suggest a consistent perspective for its use as insecticide, when compared to the mortality of non-treated ones. The bioassay had shown wide possibilities to the use of dried leaves extract of neem tree as a natural insecticide to control dengue. In spite of that, some other trials should be done to consolidate the methodology of water instead of organic solvent extraction of dried leaves of *A. indica* in the natural control of *A. aegypti*.

Keywords Dengue, natural insecticides, bioassay, Insecta.

Introdução

As pragas de insetos consomem uma fatia enorme da produção total de alimentos no mundo. Também são vetores para uma enorme variedade de doenças que assolam a humanidade. O contínuo uso de inseticidas sintéticos tem gasto bilhões de dólares da economia mundial. Hoje os mais utilizados são os fosforados, os piretróides e os organoclorados, este último largamente utilizado no combate a insetos em áreas urbanas (Martinez, 2002).

Atualmente os organoclorados são empregados no combate a insetos vetores de doenças importantes na área de saúde pública, como no combate ao mosquito transmissor da dengue. Esses inseticidas possuem amplo espectro de atividades e exterminam indiscriminadamente os insetos considerados pestes, assim como, aqueles benéficos ao homem. Sem contar com o fato dos insetos adquirirem

1 Curso de Graduação em Farmácia. Centro Universitário Vila Velha (UVV). Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Ed. Biomédicas, Boa Vista, Vila Velha-ES, CEP: 29102-770.

2 Centro Universitário Vila Velha, Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicologia, Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, 29102-770, Vila Velha, ES. zilma.vix@terra.com.br.

3 Centro Universitário Vila Velha, Laboratório de Ecologia Vegetal, Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, 29102-770, Vila Velha, ES. arygomes@uvv.br.

4 Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Farmácia do Centro Universitário Vila Velha.

resistência aos inseticidas de tal forma que sempre haverá necessidade de aplicações de quantidades cada vez maiores causando danos ecológicos e poluição ao meio ambiente (Salehzadeh et al., 2002).

A atividade de extratos vegetais tem sido testada contra larvas de espécies de mosquitos (Sivagnaname & Kalyanasundaram, 2004). Inseticidas a base de “neem” provavelmente terão seu uso aumentado num futuro próximo (El-Shazly & El-Sharnoubi, 2000), pois é visto como uma alternativa ambientalmente segura e de baixo custo como defensivo agrícola para países em desenvolvimento, quando comparados aos pesticidas sintéticos (Salehzadeh & et al., 2002).

O propósito deste trabalho foi, através de uma pesquisa experimental em laboratório, determinar a possibilidade de combater o *Aedes aegypti* utilizando extrato aquoso de folhas secas de neem, *Azadirachta indica* A. Juss, verificando assim, as possibilidades de aplicação como de inseticida natural ao vetor da dengue.

Métodos

As folhas de neem utilizadas no bioensaio foram coletadas na Escola Agrotécnica de Santa Teresa, ES. Tendo o máximo de cuidado ao retirar os ramos de neem com as folhas, que eram acondicionadas em sacos plásticos pretos. As características botânicas do neem foram descritas a partir de observações de campo na Escola Agrotécnica englobando o hábito e as características da folha.

Após esta fase os ramos de folhas foram lavados em água corrente para remoção de sujidades. Em seguida, foi posto para secar ao sol por cinco dias, em uma cobertura plástica, até que os ramos de folhas apresentassem aspecto quebradiço, evidenciando assim, sua desidratação.

Para o experimento se procedeu a anti-sepsia da bancada e dos materiais onde teriam contato direto com as folhas secas de neem, com álcool etílico 70° GL. As folhas foram então separadas dos ramos.

No laboratório foi pesado 4g de folhas secas de neem, seguido da trituração das mesmas com uso do gral e pistilo, em 10mL de água desionizada. Após, trituração inicial foi acrescido de mais 10mL de água desionizada e filtrado. O extrato aquoso posto em béquer e acrescido de mais 80 ml de água, perfazendo 100 mL de extrato aquoso (Martinez, 2002).

Para o bioensaio foram utilizadas 100 larvas de *Aedes aegypti*, em 3° e 4° estágio, capturadas vivas e armazenadas em 100 mL de água natural. Foram preparadas duas baterias de 5 tubos com 10 larvas cada. O controle foi feito com um tubo que não recebeu o extrato aquoso. Numa das baterias, o extrato aquoso foi diluído em quatro tubos na razão de 1:9, correspondendo a uma proporção de 0,4% de folhas de

neem. Na outra bateria, outros quatro tubos receberam uma diluição do extrato aquoso na razão de 2:8, correspondendo a uma proporção de 0,8% de folhas de neem.

A mortalidade das larvas tratadas e comparadas com o branco, confrontada com o branco, representou o resultado objetivo em período de 24h, 48h e 72h.

Análise estatística dos dados

A hipótese de nulidade de que o extrato aquoso do neem não era capaz de provocar a mortalidade das larvas de *A. aegypti* foi testada por análise de regressão logística binária (Hosmer & Lemeshow, 1989). A análise de regressão logística e a determinação de seus respectivos parâmetros diagnósticos foram realizadas no programa estatístico MINITAB, versão 13,0.

Resultados

Características botânicas gerais do neem

Os indivíduos que serviram para as coletas apresentaram-se como árvores com cerca de 6 m de altura. Suas folhas têm coloração verde escuras, imparipenadas, compostas e sem estípulas. Seus frutos são bagas ovaladas, sendo seu comprimento variando em torno de 1,5 a 2 cm.

O ensaio biológico

Após 24 horas, todas as larvas estavam vivas em todos os tratamentos. Após 48 horas, no tratamento com concentração de 0,8% de extrato, foram observadas 27 larvas mortas em 40. No tratamento com 0,4% de extrato, 19 entre 40 larvas morreram. As larvas não tratadas com o extrato apresentaram duas mortes em 20. Após 72 horas, nas larvas tratadas com concentração de 0,8% de extrato observou-se 36 larvas mortas em 40. Entre as larvas tratadas com 0,4% de extrato observou 26 mortes em 40. Entre as larvas não tratadas observou-se quatro mortas em 20 (Tabela 1).

Tabela 1 Ensaio biológico da atividade do extrato aquoso das folhas secas de *Azadirachta indica* sobre larvas de *Aedes aegypti* em 3° e 4° estágios.

Tempo de incubação (h)	Número Acumulado de Larvas Mortas (N)		
	0%	0,4%	0,8%
24	0 (20)	0 (40)	0 (40)
48	2 (20)	19 (40)	27 (40)
72	4 (20)	26 (40)	36 (40)

Quando foi testado um modelo simplificado de regressão logística, utilizando a concentração do extrato

aquoso como hipótese de explicação para a mortalidade às larvas, o valor de G altamente significativo (Tabela 2) indicou que as concentrações mais altas tendem a produzir mais mortalidade nas larvas, com um alto impacto na capacidade de predição do número de larvas mortas, devido à amplitude de variação das taxas de risco.

Para verificar se algo mais, além da concentração do extrato aquoso afetou a resposta de mortalidade, foi testado um novo modelo, em que o tempo de exposição ao extrato aquoso foi a variável utilizada como fator causal para a mortalidade das larvas. Novamente o valor de G foi altamente significativo (Tabela 2), indicando que a mortalidade também é afetada pelo tempo de exposição ao extrato aquoso. Porém, a mortalidade acumulada nos tratamentos nunca foi menos que três vezes maior que a acumulada no controle (Tabela 1), além do fato das taxas de risco terem convergido para um, e do valor absoluto do coeficiente do tempo foi muito inferior a um (Tabela 2), o que significa que o tempo de exposição ao extrato aquoso, isoladamente, contribui pouco para explicar a mortalidade das larvas.

No próximo modelo, tempo e concentração foram testados quanto às suas contribuições independentes para explicar a mortalidade das larvas. Novamente, o valor de G foi altamente significativo, evidenciando que independentemente, tempo e concentração afetam a mortalidade das larvas, mas as o impacto da concentração na predição da mortalidade das larvas ainda foi maior, uma vez que a amplitude entre valores mínimos e máximos das taxas de risco associadas ela ainda foram muito amplos, enquanto o coeficiente associado ao tempo foi inferior a um (Tabela 2).

Diante disto, foi testado o modelo saturado, incluindo o papel da interação de concentração e tempo de exposição ao extrato. O valor de G continuou altamente significativo (Tabela 2). Porém, a contribuição isolada da concentração perdeu nível de significância, e a contribuição isolada do tempo de exposição permaneceu muito menor que um. A interação do tempo de exposição com a concentração foi altamente significativa com valor cerca de 10 vezes superior ao do tempo isoladamente, mas ainda assim, as taxas de risco foram inexpressivamente diferentes de um (Tabela 2).

Tabela 2 Regressão logística binária entre a concentração e o tempo de exposição ao extrato aquoso de folhas de *Azadirachta indica* A. Juss e a mortalidade de larvas de *Aedes aegypti*.

Modelos	Coeficiente	Erro Padrão	Z	p	Taxa de risco e limites (95%)		
					Taxa	Inferior	Superior
Concentração do extrato aquoso							
Constante	-1,71	0,28	-6,19	0,000			
Concentração	2,39	0,46	5,24	0,000	10,93	4,47	26,76
G = 31,20, p < 0,01, gl = 1; Hosmer χ^2 = 15,84; p = 0,07; gl = 1							
Tempo de exposição extrato aquoso							
Constante	-4,24	0,49	-8,17	0,000			
Tempo	0,07	0,01	8,50	0,000	1,08	1,06	1,09
G = 102,67, p < 0,01, gl = 1; Hosmer χ^2 = 22,21, p < 0,01; gl = 1							
Concentração +Tempo de exposição extrato aquoso							
Constante	-7,00	0,79	-8,92	0,000			
Concentração	3,79	0,63	6,04	0,000	44,24	12,94	151,22
Tempo	0,09	0,01	8,47	0,000	1,09	1,07	1,12
G = 149,89, p < 0,01, gl = 2; Hosmer χ^2 = 19,83, p < 0,01; gl = 4							
Interação de Concentração e Tempo de exposição extrato aquoso							
Constante	-4,06	1,15	-3,54	0,000			
Concentração	-1,75	2,04	-0,86	0,390	0,17	0,00	9,41
Tempo	0,04	0,02	2,00	0,040	1,04	1,0	1,08
Concentração*Tempo	0,10	0,04	2,69	0,007	1,11	1,03	1,19
G = 149,89, p < 0,01, gl = 2; Hosmer χ^2 = 19,83, p < 0,01; gl = 4							

Legenda: Z: valor padronizado do coeficiente pela curva normal reduzida; p: nível de significância, *: teste significativo; gl: graus de liberdade.

Discussão

O extrato aquoso utilizado neste trabalho demonstrou atividade larvicida para *A. aegypti*, evidenciando a presença de substâncias ativas hidrossolúveis. São muitos os compostos ativos estudados do neem, dos quais os mais relevantes são a salanina, 14-epoxiazadiradiona, meliantrol, melianona, vilosinina, meliarpina e azadiractina. Destes, o limonóide ou tetranortriterpenóide azadiractina é considerado mais potente (Jones et al., 1989; Lee et al., 1991; Kraus, 1995).

A eficácia obtida para o extrato aquoso testado pode ser devida ao fato de que a azadiractina é solúvel em água, mas pode ser mais facilmente extraída com metanol. É encontrada em maior quantidade nas sementes do neem (Schneider & Ermel, 1987).

O extrato estudado foi obtido a partir da trituração seguida de maceração de folhas secas de *A. indica* em água deionizada. De maneira similar, outras partes da planta podem ser utilizadas. Os extratos de neem podem ser preparados com a simples trituração das sementes ou frutos frescos, em água, deixando-se a mistura descansar por 12 horas e filtrando-se o líquido e pulverizando-se sobre as áreas infestadas. O mesmo procedimento pode ser usado para folhas, frescas ou secas, embora a azadiractina aí ocorra em menor concentração (Martinez, 2002).

A mortalidade observada para larvas de *A. aegypti* foi afetada de maneira dose-dependente pela concentração do extrato aquoso de *A. indica*. O tempo de exposição ao tratamento exerceu influência sobre a mortalidade das larvas, mas apresentou uma contribuição inexpressiva para a sua predição. O controle de pragas pelo extrato do neem tem sido atribuído, em particular, à ação da azadiractina, inibindo a capacidade de alimentação e induzindo anomalias fisiológicas e celulares nos insetos. Nota-se também o comprometimento e desenvolvimento larvar dos mesmos, o que leva a um atraso no crescimento e posterior redução da fertilidade destes na fase adulta, quando não mata imediatamente os ovos, larvas e adultos. (Martinez & van Emden, 2001).

Os extratos de neem e, em especial, seu ingrediente ativo mais potente, a azadiractina, inibem a alimentação dos insetos, afetam o desenvolvimento das larvas e atrasam seu crescimento, reduzem a fertilidade e fecundidade dos adultos, alteram o comportamento, causando diversas anomalias nas células e na fisiologia dos insetos e causam mortalidade de ovos, larvas e adultos. A azadiractina atua de modo dose-dependente e a sensibilidade do inseto à ação anti-alimentar e inibição de crescimento depende, portanto, não apenas da espécie de inseto, mais também da concentração de azadiractina. De modo geral, a concentrações mais baixas, os insetos freqüentemente mostram alterações no desenvolvimento e a concentrações mais altas, pode haver

total inibição de alimentação (Warthen, 1989).

De modo geral a azadiractina afeta o desenvolvimento dos insetos de diferentes modos. Pela sua semelhança com o hormônio da ecdise, processo que possibilita ao inseto trocar o esqueleto externo e crescer, perturba essa transformação e, em altas concentrações pode impedi-la, causando a morte do inseto (Martinez & van Emden, 2002).

A azadiractina promove danos graves aos insetos ao interferir na ecdise. Visto que as larvas e ninfas de insetos dependem desse processo para se desenvolver e crescer, são especialmente afetados. Quando as concentrações mais altas são empregadas, os efeitos aparecem logo após o tratamento e a mortalidade é mais elevada. Em concentrações mais baixas, se a ecdise for completada, alterações no crescimento e anormalidades geralmente ocorrem nos estádios subsequentes (Martinez, 2001).

A atividade da azadiractina como reguladora de crescimento foi demonstrada em vasta gama de insetos e esta relacionada com sua interferência no sistema neuroendócrino dos insetos. Os principais hormônios envolvidos na regulação do crescimento dos insetos são os hormônios da ecdise (ecdisona e 20-hidroxi-ecdisona) e o hormônio juvenil, produzidos, respectivamente, nas glândulas protorácicas e nos *corpora allata*, mediante estimulação por hormônios secretados no cérebro (Wigglesworth, 1972).

A ação da azadiractina parece alterar os teores de ecdisona e de outros hormônios ecdisteróides na hemolinfa, possivelmente por interferir síntese e liberação do hormônio protoracicotrópico (PTTH) do *corpus allatum*, que é o hormônio que estimula a produção de ecdisona pelas glândulas protorácicas. A azadiractina parece bloquear a liberação desse hormônio, causando o aumento da concentração do mesmo dentro do *corpus allatum*, o que resulta na redução de sua síntese pelas células neurosecretoras do cérebro, por um efeito de *feedback* (Rembold, 1995).

A ação neuro-hormonal da azadiractina depende da espécie de inseto e da concentração aplicada e resulta em várias alterações no crescimento e no desenvolvimento do inseto como redução do crescimento e prolongamento do período larval; aumento do número de instares larvais, causado alteração nos teores de hormônio juvenil; inibição da ecdise, deformidades e mortalidade (Mordue & Nisbet, 2000; Martinez & van Emden, 2001).

O extrato aquoso não é o único ativo contra larvas de *A. aegypti*. O extrato alcoólico também foi ativo, acarretando um distúrbio no crescimento e mortalidade das mesmas, comprovando a letalidade da azadiractina em contato com as amostras de larvas (Falesi et al., 2000).

O extrato etanólico de *A. indica* testado contra larvas do *A. aegypti*, demonstrou resultado satisfatório quanto à letalidade. Os ensaios de letalidade foram realizados de

acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo os extratos foram testados nos doses que variam de 0,0033 a 0,05 g% em meio aquoso por 24 e 48 h, em 25 ou 30°C, com ou sem alimentação das larvas. As concentrações letais (LC) LC₅₀, LC₉₅ e LC₉₉ foram determinadas. O extrato da semente provou letalidade para terças a quartas larvas instar. As larvas não-alimentadas do *A. aegypti* eram mais suscetíveis em ambas as temperaturas. As larvas não-alimentadas, sob temperatura de 30°C demonstraram uma letalidade mais elevada. As perspectivas eram de que resultados mais satisfatórios poderiam ser obtidos quando houvesse melhores técnicas para extração e purificação do princípio ativo (Wandscheer 2004).

De acordo com um estudo realizado por Siddiqui et al (2000), isolaram-se dois triterpenóides novos do extrato metanólico fresco de *Azadirachta*: 6 alpha-O-acetil-7-deacetilnimocinol [24, 25, 26,27-tetra-norapotirucalla-(apoeufa)-6 alpha-acetoxi-7 alpha-hidroxi-1, 14, 20,22-tetren-21,23-epoxi-3-ona] (1) e o meliacinol [alpha-24, 25, 26,27-tetranorapotirucalla-(apoeufa)-1 alpha-trimetilacriloxi-21,23-6, 28-diepoxi-16-oxo-17-oxa-14, 20, alpha 22-trien-3, alpha-alpha-diol 7] (2), tendo suas estruturas elucidadas com estudos de espectros. O primeiro composto mostrou toxicidade em quartas larvas instar do mosquito *Aedes aegypti* com valor de LC50 de 21. O segundo composto não teve nenhum efeito até 100 ppm.

Mitchell (1997) estudou em três espécies de inseto, dentre elas o *Aedes aegypti*, os efeitos do neem na atividade da ecdisona 20-mono-oxigenase (E-20-m), enzima responsável pela ecdise das larvas de insetos. Quatro compostos da árvore do neem demonstraram inibir, de forma dose-dependente, a atividade de E-20-m nas três espécies do inseto.

Nagpal (1995) em estudo com óleo de neem, embebeu madeira de forma esférica onde se reproduziriam os mosquitos *Anopheles stephensi* e *Aedes aegypti* em óleos de 5, 10 e de 20% (*Azadirachta indica*) diluído na acetona. O controle da reprodução foi mantido por 45 dias. As esferas embebidas no óleo do Neem a 5% produziram os melhores resultados entre outras concentrações testadas.

A emulsão de óleo-água de Neem foi usada no habitat de mosquitos onde se encontravam as larvas imaturas de diferentes espécies. A aplicação da emulsão óleo-água do neem de 5% nos tanques resultou na redução 100% das larvas instar III e IV de *Anopheles stephensi* após 24 h, enquanto para *Culex quinquefasciatus* a redução foi de 51,6 e 91,2% na densidade larval após o 1º e 14º dia respectivamente. Similarmente, a aplicação da emulsão de 10% em locais onde se encontrava *A. aegypti* resultou na inibição completa da produção pupal (Batra et al., 1998).

O efeito de NeemAzal, um extrato da semente da

semente do neem, em larvas de *A. aegypti* demonstrou que a exposição contínua promoveu inibição e mortalidade no segundo, terceiro e quarto estágios de larvas instar. A sensibilidade para Neem Azal diminuiu com idade crescente das larvas. Para *A. aegypti* fêmea uma tendência foi observada: colocar poucos ovos com aumento da concentração de Neem Azal a que tinham sido expostos durante o desenvolvimento larval (Boschitz & Grunewald 1994).

A toxicidade de um inseticida do Neem, Neem-Azal-T/S, foi testada para larvas de mosquitos em uma lagoa poluída e em um córrego raso, situados em uma área cultivada em Giza, Egito. As amostras da água que continham as larvas foram coletadas desta área, e os testes de toxicidade foram conduzidos no laboratório expondo-os a uma série das concentrações do inseticida, usando a água da lagoa e do córrego na temperatura ambiente (28-31 graus C). O composto era tóxico a toda a espécie testada. As taxas de LC₅₀ foram determinadas. A ordem da tolerância dos organismos às concentrações diferentes do inseticida foi: larvas de *Bufo* (amphibia) > de *Aedes caspius* (Insecta) > de *Gambusia affinis* (Poeciliidae) > de *Cyclops* sp. e > *Daphnia magna* (Crustacea). Em uma concentração de 20 ppm, todos morreram dentro de 9 dias, enquanto todos os indivíduos restantes morreram dentro de 5 a 8 dias após a exposição a uma concentração de 10 ppm do inseticida de Neem Azal (El-Shazly & El-Sharnoubi, 2000).

A facilidade de extração das substâncias ativas do neem em água ou em alcoóis, aliada ao fato de não haver registros de toxicidade de neem para humanos abre amplos horizontes para sua utilização no controle do mosquito da dengue. Evidências neste sentido surgem do fato de que na África e no Caribe, as pessoas, principalmente crianças, comem frutos maduros de neem. Na Índia, folhas também são utilizadas no preparo de chá desde tempos remotos. As folhas também são consumidas como alimento na Índia, tanto por seres humanos como por animais domésticos (Hedge, 1993).

Os resultados mortalidade de larvas de 3º e 4º estágio, sob efeito de concentração 0,4% e 0,8%, indicam o efeito inseticida do extrato aquoso de folhas secas *A. indica* em relação às larvas de 3º e 4º estágios não tratadas. O bioensaio mostrou um resultado promissor para o controle de *A. aegypti* em condições laboratoriais, logo são promissores estes resultados como indicativos para o emprego do neem como inseticida natural a ser utilizado no combate a dengue. Há necessidade, entretanto, de mais experimentos para comprovar a inexistência de demanda de extração com solventes orgânicos para o emprego das folhas secas de neem no controle do *A. aegypti*.

Talvez, em futuro próximo, o combate aos insetos nocivos não se dê apenas pelos métodos convencionais. Não se pode combater as pragas no futuro utilizando apenas uma

estratégia. Para fazer um controle da população de algumas pragas há necessidade de desenvolver o uso de novos inseticidas naturais, para conjuntamente ou unilateralmente possam atuar de maneira eficaz. Logo, com a pesquisa sobre o neem e atuação de seu princípio ativo a azadiractina, que induzam mutações e esterilidade para as gerações de insetos nocivos a serem tratados pode ser mais bem implementado para controle, constituindo assim, uma nova estratégia ao combate ao *A. aegypti*, reduzindo sua população, e assim, diminuindo consideravelmente o número de novos casos de dengue que assolam todo o mundo.

Referências

- Batra CP, Mittal PK, ADAK T & Sharma VP (1998) Efficacy of neem oil-water emulsion against mosquito immatures. **Indian Journal of Malariology** 35: 15-21.
- Boschitz C & Grunewald J (1994) The effect of NeemAzal on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Applied Parasitology** 35: 251-256.
- El-Shazly MM & El-Sharnoubi ED (2000) Toxicity of a neem (*Azadirachta indica*) insecticide aquatic organisms. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology** 30: 221-231.
- Falesi IC, Ferreira CAP & Carvalho R (2000) **Análise econômica da produção do nim indiano no estado do Pará**. Comunicado Técnico. Belém: EMBRAPA, Amazônia Oriental, 43: 4.
- Hedge NG (1993) Improving the productivity of neem trees. World Neem Conference, **Indian Journal of Entomology** 50: 147-150.
- Hosmer DW & Lemeshow S (1989) **Applied logistic regression**. New York: John Wiley.
- Jones PS, Ley SV, Morgan ED & Santafianos D (1989) The chemistry of the neem tree. In: Jacobson M (ed.) **Focus on phytochemical pesticides**, the neem tree. Florida: CRC, 1: 47-67.
- Kraus W (1995) Biologically active ingredients. In: Schmutterer H (ed.), **The neem tree: source of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes**. Weinheim: VCH, pp.35-88.
- Lee SM, Klocke JA, Barnby MA, Yasmasaki RB & Balandrin MF (1991). Insecticidal constituents of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* (Meliaceae). **ACS Symposium Series** 449: 293-304.
- Martinez SS & van Emden HF (2001) Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by azadirachtin. **Neotropical Entomology** 30: 113-125.
- Martinez SS (2002) **O Nin – Azadirachta indica: natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: Instituto Agronômico do Paraná.
- Mitchell MJ, Smith SL, Johnson S & Morgan ED (1997) Effects of the neem tree compounds azadirachtin, salannin, nimbin, and 6-desacetylnimbin on ecdysone 20-monoxygenase activity. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 35: 199-209.
- Mordue (Luntz) AJ, Cottee PK & Evans KA (1985) Azadirachtin: its effect on gut motility, growth and moulting in *Locusta*. **Physiological Entomology** 10: 431-437.
- Nagpal BN, Srivastava A & Sharma VP (1995) Control of mosquito breeding using wood scrapings treated with neem oil. **Indian Journal of Malariology** 32 64-69.
- Rembold H (1995) Biological effect of neem and their modes of action. Growth and metamorphosis. In Schmutterer H (ed) **The Neem tree: source of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes**. Weinheim: VCH, pp.177-194.
- Salehzadeh A, Jabbar A, Jennens L, Ley SV, Annadurai RS, Adams R & Strang RH (2002) The effects of phytochemical pesticides on the growth of cultured invertebrate and vertebrate cells. **Pest Management Science** 58: 268-276.
- Schneider B & Ermel K (1987).Quantitative determination of azadirachtin from neem seeds using high performance liquid chromatography. In: Schmutterer H & Ascher KRS (eds) **Natural pesticides from the neem tree and other tropical plants. Proceedings of the 3 International Neem Conference**. Nairobi: Eschborn, pp. 161-170.
- Siddiqui BS, Afshan F, Ghiasuddin-Faizi S, Naqvi SN & Tariq RM (2000) Two insecticidal tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica*. **Phytochemistry** 53: 371-376.
- Sivagnaname N & Kalyanasundaram M (2004). Laboratory evaluation of methanolic extract of *Atlantia monophylla* (Family: Rutaceae) against immature stages of mosquitoes and non-target organisms. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 99: 115-118.
- Wandscheer CB, Duque JE, Silva MA, Fukuyama Y, Wohlke JL, Adelman J & Fontana JD (2004) Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. **Toxicon** 44: 829-835.
- Warthen Jr JD (1989) Neem: organisms affected and reference list update. **Proceeding of the Entomological Society of Washington** 91: 367-388.
- Wigglesworth VB (1972) **The principles of insect physiology**. 7 ed. New York: John Wiley.