

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E
SUSTENTABILIDADE AGROPECUÁRIA

Potencial inseticida de *Azadirachta indica* e *Trichilia pallida*
(Meliaceae) sobre *Aedes aegypti* (L.) (Dip.: Culicidae):
Quantificação e perfil químico de metabólitos secundários

Autora: Deizeluci de Fátima Pereira Zanella
Orientador: Prof^a. Dr^a. Antonia Railda Roel
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosemary Matias

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
2017

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E
SUSTENTABILIDADE AGROPECUÁRIA

Potencial inseticida de *Azadirachta indica* e *Trichilia pallida*
(Meliaceae) sobre *Aedes aegypti* (L.) (Dip.: Culicidae):
Quantificação e perfil químico de metabólitos secundários

Autora: Deizeluci de Fátima Pereira Zanella
Orientador: Prof^a. Dr^a. Antonia Railda Roel
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosemary Matias

"Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTORA EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SUSTENTABILIDADE AGROPECUÁRIA, no Programa de Pós-Graduação *Strict Sensu* em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração: "Saúde, Ambiente e Sustentabilidade".

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
2017



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
Inspira o futuro

Potencial inseticida de *Azadirachta indica* e *Trichilia pallida* (Meliaceae) sobre *Aedes aegypti* (L.) (Dip.: Culicidae): Quantificação e perfil químico de metabólitos secundários

Autor(a): Deizeluci de Fátima Pereira Zanella
Orientadora: Profa. Dra. Antonia Railda Roel
Coorientadora: Profa. Dra. Rosemary Matias

TITULAÇÃO: Doutora em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária
Área de Concentração: Sustentabilidade Ambiental e Produtiva.

APROVADA em 12 de maio de 2017.

Profa. Dra. Antonia Railda Roel - UCDB
(Orientadora)

Profa. Dra. Rosemary Matias - UNIDERP
(Coorientadora)

Prof. Dr. Francisco Eduardo Torres - UEMS

Prof. Dr. Lucas Castro Torres - UCDB

Profa. Dra. Bianca Obes Corrêa - UNIDERP

Profa. Dra. Karla Rejane de Andrade Porto - UNIP

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB, Campo Grande, MS, Brasil)

Z28p Zanella, Deizeluci de Fátima Pereira
Potencial inseticida de *Azadirachta indica* e *Trichilia pallida*
(Meliaceae) sobre *Aedes aegypti* (L.) (Dip.: Culicidae): quantificação e
perfil químico de metabólitos secundários / Deizeluci de Fátima Pereira
Zanella; organizadora Antonia Railda Roel; coorientadora Rosemary
Matias. -- 2017
102 f.

Tese (doutorado em ciências ambientais e sustentabilidade
agropecuária) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande ,
2017.

Inclui bibliografias.

1. Plantas inseticidas 2. Insetos vetores – Controle 3. *Azadirachta*
indica I. Roel, Antonia Railda II. Matias, Rosemary III. Título.

CDD: 632.95

Dedico este trabalho a meus amores, Alexandre, pelo seu apoio, sua compreensão e seu amor, para que mais esta etapa fosse concluída, e aos meus filhos Anelise, Ricardo e Mariana, pelo carinho e pelo incentivo na conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por todas as bênçãos concedidas durante este curso.

À minha família, Alexandre, Anelise, Ricardo e Mariana, pelo apoio e compreensão de minha ausência em muitos momentos, esperam que todas as minhas renúncias possam ser justificadas.

Aos meus pais Pedro e Maria quem devo tudo que sou e tive, graças ao maravilhoso exemplo de união, amor e perseverança. Ao meu querido irmão José Carlos, que juntamente com meus pais, tiveram paciência e confiança em mim.

Ao meu cunhado Renato pelas análises químicas e minha cunhada Camila, pela ajuda no uso do computador.

As minhas amigas e colegas Lígia e Nathalie (Naná), lhes agradeço de coração por todos os momentos, bons e ruins que passamos juntas. Por terem tornados esses anos mais leves e divertidos.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Antonia Railda Roel, pela liberdade e confiança a mim depositada ao longo do presente trabalho, e ainda por ter me permitido a participação como docente, espero ter alcançado as suas expectativas. Agradeço também pela amizade e apoio nos momentos difíceis. Serei sempre grata por ter muitas vezes me incentivado, sou grata ainda pelos ensinamentos, oportunidades, paciência, carinho e dedicação.

Agradeço à Prof.^a Dra. Rosemary Matias pelas revisões, ensinamentos, correções e sugestões acerca da presente tese e por ser um exemplo de pesquisadora e educadora.

A Prof.^a Dra. Karla Rejane de Andrade Porto, pelo grande incentivo e auxílio durante a execução nos experimentos em laboratório.

Agradeço à Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) e ao Programa de Pós Graduação *Stricto sensu* em Ciências Ambientais e Sustentabilidade pelo ^{iv} de qualidade oferecido.

Aos amigos do mestrado e doutorado, especialmente Ricardo Peruca, Priscilla, Luiz Carlos, Jenifer, Natacha e Vitor Hugo, pelos momentos agradáveis que juntos passamos.

Aos técnicos de laboratório do setor de Biosaúde da UCDB. Obrigada por sempre ter me recebido com paciência e dedicação quando precisei.

Agradeço à Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), pelo suporte financeiro a conclusão deste trabalho.

Agradeço ainda à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

A todos aqueles que de modo direto ou indireto contribuíram para a realização dese trabalho.

Meus agradecimentos.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Deizeluci de Fátima Pereira Zanella, filha de Pedro Pereira Lopes e Maria Bergamim Pereira, nasceu em Santa Cecília do Pavão, Paraná em 13 de junho de 1963.

Concluiu a graduação em Química pela Universidade Estadual de Mato Grosso no ano de 1990, passando a atuar profissionalmente na área. Em 1994 concluiu especialização *Latu sensu* em Metodologia do Ensino Superior pelas Faculdades Integradas de Fátima do Sul, cursando na sequência diversos aprimoramentos profissionais na área.

No ano 2007 concluiu o Programa de Pós Graduação *Stricto sensu* em Química, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, realizando estudos na área de química.

No ano de 2013 iniciou o Programa de Pós Graduação *Stricto sensu* em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária, em nível de Doutorado, na Universidade Católica Dom Bosco, realizando estudos na área de químicas de plantas inseticidas contra *Aedes aegypti*.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	Xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi

	PÁGINA
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	3
2.1. Inseticidas Botânicos no controle de insetos	3
2.1.2. Estudos com plantas inseticidas e os efeitos nos insetos	4
2.2 A Produção de substâncias secundárias pelas plantas e a Sazonalidade na composição química.....	5
2.3. Família Meliaceae	6
2.3.1 <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.....	7
2. 3.2 <i>Trichilia pallida</i> Sw.	9
2.4 O Panorama Epidemiológico, Distribuição Geográfica e Controle da Dengue .	10
2.4.1. Outras doenças causadas por <i>A. aegypti</i>	12
3. OBJETIVO	14
3.1 Objetivo Geral	14
3.2 Objetivos Específicos.....	14
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15

CAPÍTULO 1	PÁGINA
Influência da sazonalidade nos teores de azadiractina e no potencial inseticida em <i>Aedes aegypti</i> L. (1762) (Culicidae) do extrato etanólico de <i>Azadirachta indica</i> A. Juss (Meliaceae).....	25
RESUMO.....	26

SECÇÃO EXPERIMENTAL.....	28
Coleta e identificação da espécie vegetal	28
Obtenção do extrato etanólico	28
Prospecção Fitoquímica e Perfil Cromatográfico	29
Bioensaios com <i>A. aegypti</i>	30
RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
Prospecção fitoquímica e perfil cromatográfico em HPLC-DAD.	31
Bioensaio com <i>A. aegypti</i>	37
Referências	42

CAPÍTULO 2

PÁGINA

Análise sazonal do potencial inseticida do Óleo de <i>Azadirachta indica</i> A. Juss (Meliaceae) cultivada em área de cerrado sobre <i>Aedes Aegypti</i> L. (1762) (Culicidae) e nos teores de azadiractina	47
Resumo.....	48
Introdução	49
Material e Métodos.....	51
Coleta e identificação da espécie vegetal	51
Obtenção dos óleos dos frutos de <i>A. indica</i>	51
Análise Cromatográfica.....	52
Bioensaios.....	53
Resultados	54
Conclusões.....	57
Referências	58

CAPÍTULO 3

PÁGINA

Atividade Inseticida do extrato etanólico de folhas e caule de <i>Trichilia pallida</i> Sw. (Meliaceae) sobre <i>Aedes aegypti</i> L. (1762) (Culicidae).....	62
Resumo.....	63
1. Introdução.....	64
2. Material e Métodos	65
Análise fitoquímica Clássica.....	65
Determinação de compostos fenólicos e flavonoides.....	66

Análise Espectrofotometria UV/visível e Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE)	66
Bioensaio com <i>Aedes aegypti</i>	67
3. Resultados.....	68
Prospecção Fitoquímica.....	68
Ensaio com <i>Aedes aegypti</i>	71
4. Discussão	74
5. Conclusão.....	77
6. Referências Bibliográficas	77

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1: Principais fatores que podem influenciar no acúmulo de metabólitos secundários nas plantas.....	6
Figura 2: <i>Azadirachta indica</i> . (A) Árvore, (B) Folhas e (C) Frutos.	8
Figura 3: <i>Trichilia pallida</i> . (A) Folhas (B) Frutos	10
Figura 4: Probabilidade de ocorrência de dengue mundial.	11
CAPÍTULO 1	
Figura 1: Frequência (%) das classes de metabólitos secundários do extrato etanólico de <i>Azadirachta indica</i> , coletados em épocas de água e seca.....	33
Figura 2: Cromatograma obtido por HPLC-DAD (220 nm) para os compostos majoritários do extrato etanólico de folhas de Nim (<i>Azadirachta indica</i>) coletadas em épocas de águas: (A) tR= 19,13 min, (B) tR= 40,66 min.....	33
Figura 3: Cromatograma obtido por HPLC-DAD (220 nm) para os compostos majoritários do extrato etanólico de folhas de Nim (<i>Azadirachta indica</i>) coletadas em épocas de seca: (A) tR= 20,18 min, (B) tR= 40,17 min.	34
CAPÍTULO 2	
Figura 1: Cromatogramas obtido por UHPLC-MS/MS (A) do composto majoritário azadiractina no óleo NOA (período das águas); (B) do padrão de azadiractina e (C) do composto majoritário azadiractina do óleo NOS (período de seca).....	54

CAPÍTULO 3

Figura 1: Frequência dos metabólitos secundários encontrados nos extratos etanólicos das folhas e caules de <i>Trichilia pallida</i>	69
Figura 2: Cromatograma obtido por HPLC-DAD para os compostos majoritários do extrato etanólico das folhas <i>Trichilia pallida</i> , Campo Grande, 2015.....	70
Figura 3: Cromatograma obtido por HPLC-DAD para os compostos majoritários do extrato etanólico dos caules <i>Trichilia pallida</i> , Campo Grande, 2015.....	71

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1	PÁGINA
Tabela 1: Dados meteorológicos mensais: temperatura média, precipitação total, umidade média e radiação solar média, Nov/2014 a Set/2015 (posto meteorológico do Inmet/Sepaf/Agraer/Cemtec-MS, Campo Grande, MS, Brasil).....	30
Tabela 2: Concentração letal (CL) para larvas de <i>Aedes aegypti</i> em diferentes concentrações do extrato etanólico da folha de <i>Azadirachta indica</i> , coletada em época das águas (NFA) e seca (NFS), após 24 h de exposição.....	37
Tabela 3: Avaliação de dosagens dos extratos etanólico das folhas de <i>Azadirachta indica</i> coletadas em época das águas (NFA) e da seca (NFS), sobre o desenvolvimento e mortalidade de <i>Aedes aegypti</i> L. (Culicidae)	38
CAPÍTULO 2	
Tabela 1: Dados meteorológicos mensais: temperatura média, precipitação total, umidade média e radiação solar média, Novembro a Janeiro (período chuvoso) e Julho-Setembro (período seca) em 2015, do posto meteorológico do Inmet/Sepaf/Agraer/Cemtec-MS, Campo Grande, MS, Brasil.....	51
Tabela 2: Avaliação de dosagens do óleo das sementes do Nim, coletados em período chuva (NOA) e período de seca (NOS), sobre o desenvolvimento e mortalidade larval e pupal de <i>Aedes aegypti</i> L. (Culicidae).....	56
CAPÍTULO 3	
Tabela 1: Quantificação de fenóis totais e flavonoides dos extratos etanólicos das folhas e caules de <i>Trichilia pallida</i>	70

Tabela 2: Efeito dos Extratos etanólicos dos caules e folhas de <i>Trichila pallida</i> no desenvolvimento e mortalidade de <i>Aedes aegypti</i> (Culicidae).....	73
---	----

LISTA DE ABREVIATURA(S)

µg - Microgramas

AGRAER - Agência de Desenvolvimento Agrário e Extensão Rural

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CCD - Cromatografia Camada Delgada

CEPAER - Centro de Capacitação e Pesquisa

CF - compostos fenólicos

CL – Concentração Letal

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

cm – centímetro

DMSO – dimetilsulfóxido

F – Flavonoides

FT – Fenóis Totais

g - gramas

h – horas

HPLC-DAD - cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos

Kg - kilogramas

mg – Miligramas

Min – Minuto

ml – mililitro

MS – Mato Grosso do Sul

NaHCO₃ - bicarbonato de sódio

NFA - Nim folha época das águas

NFS - Nim folha época de seca)

nm – Nanômetro

NOA - Nim óleo época das águas

NOS - Nim óleo época de seca

°C – Graus Celsius

pH - Potencial Hidrogeniônico

Ppm – partes por milhão

t_R - tempos de retenção

UCDB - Universidade Católica Dom Bosco

UEMS - Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

UHPLC-MS/MS: *ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry*

Uniderp - Universidade Anhanguera

UV – Ultravioleta

RESUMO

O *Aedes aegypti* L. (Culicidae), importante vetor de doenças como a Dengue, febre Chikungunha e vírus Zika, apresenta resistência a inseticidas sintéticos. Objetiva-se estudar outros métodos de controle, como substâncias químicas ativas derivadas de plantas da família Meliaceae, a qual possui espécies com potencial inseticida reconhecido pela ciência, como a *Azadiracta indica* e *Trichilia pallida*. Extrato etanólico de caules, folhas e óleo das sementes dessas plantas, coletadas em época das águas e da seca, foram testados quanto a atividade inseticida sobre larvas de *A. aegypti*. Os bioensaios utilizando extratos etanólicos obtidos de folhas coletadas na época das águas, apresentaram produção maior de azadirachtina. O extrato etanólico de folhas de *A. indica* coletados em ambas as épocas nas concentrações de 1 e 0,5, mg mL⁻¹ provocou mortalidade total das larvas. O óleo dos frutos de *A. indica* coletados na época das águas causou mortalidade total das larvas nas concentrações de 1,0 a 0,125 mg mL⁻¹. Para os testes com os extratos etanólicos de caules e folhas de *T. pallida* a concentração de 1,0 mg mL⁻¹ foi eficiente em ambos extratos, causando a mortalidade total das larvas. Nas menores concentrações (0,5 a 0,0625 mg mL⁻¹) houve aumento do ciclo, em relação a testemunha. Os estudos sobre identificação dos metabólitos secundários foi feitos por Análise de Espectrofotometria UV/visível e Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE). Essas análises confirmam a presença de compostos fenólicos, flavonoides, triterpenos, cumarinas e alcaloides para folhas de *A. indica* e caules e folhas de *T. pallida*.

Palavras-chave: plantas inseticidas, controle de insetos vetores, azadirachtina.

ABSTRACT

Aedes aegypti L. (Culicidae), an important vector of diseases such as Dengue, fever Chikungunha fever and virus Zika, is resistant to synthetic insecticides. The objective of this study is to study other control methods, such as active chemical substances derived from plants of the family Meliaceae, which has species with insecticidal potential recognized by science, such as *Azadiracta indica* and *Trichilia pallida*. The ethanolic extract of stems, leaves and seed oil of these plants were collected during rain and drought seasons and tested for their insecticidal activity in *A. aegypti* larvae. Bioassays using ethanolic extracts obtained from leaves collected during the water season, presented higher production of azadirachtin. The ethanolic extract of leaves of *A. indica* collected in both epochs at concentrations of 1,0 and 0,5 mg mL⁻¹ caused total larval mortality. The oil of the fruits of *A. indica* collected during the time of the waters caused total mortality of the larvae in the concentrations of 1,0 to 0,125 mg mL⁻¹. For the tests with ethanolic extracts of *T. pallida* stems and leaves the concentration of 1,0 mg mL⁻¹ was efficient in both extracts, causing the total mortality of the larvae and in the lower concentrations (0,5 to 0,0625 mg mL⁻¹), there was an increase in the cycle, in relation to the control. Studies on the identification of secondary metabolites were analyzed by UV/Visible Spectrophotometry Analysis and High Performance Liquid Chromatography (HPLC). These analyzes confirm the presence of phenolic compounds, flavonoids, triterpenes, coumarins and alkaloids for leaves of *A. indica* and stems and leaves of *T. pallida*.

Key words: Insecticidal plants, vector control, azadirachtin

1. INTRODUÇÃO

A busca de novas formas de controle de insetos vêm se destacando, uma vez que os inseticidas químicos sintéticos comumente causam danos ambientais e provocam o surgimento de populações de insetos resistentes. O desenvolvimento de inseticidas de origem vegetal pode ser uma alternativa no controle de insetos que causam danos a agricultura e aos vetores de doenças que acometem o homem e animais domésticos. Estes são menos persistentes no ambiente e causam portanto menores impactos ambientais e em organismos não alvo.

Algumas espécies de plantas têm demonstrado ter potencial inseticida para o controle de *Aedes aegypti* L. (Culicidae), vetor de vírus que causam doenças como Dengue, Febre Chikungunya e Zika vírus. Doenças estas que geram problemas graves e mortalidade no Brasil e no mundo, com controle do vetor nem sempre eficiente. O panorama epidemiológico das doenças citadas é grave, em razão do número crescente de casos incidentes e prevalentes.

Dentre as famílias botânicas com potencial inseticida destaca-se a Meliaceae, com espécies nativas de uso popular e com estudos científicos químicos e de atividade biológica como a *Trichilia pallida*, uma espécie nativa do Cerrado brasileiro.

Além disso, temos ainda o Nim (*Azadirachta indica*), uma planta de origem asiática onde é amplamente utilizada pela população e alvo de estudos químicos, medicinais e inseticidas. No Brasil, foi introduzida como ornamental, em 1986, e por seu uso inseticida foi disseminada em diferentes regiões. Em Mato Grosso do Sul é cultivada em região de Cerrado para fins de pesquisa, principalmente para obtenção do óleo de Nim reconhecido como inseticida natural.

As propriedades inseticidas das plantas são atribuídas aos seus metabólitos secundários, que desempenham papel importante na defesa contra herbívoros. A produção destas substâncias está na dependência especialmente das condições edafoclimáticas, do local de cultivo. Portanto, a eficiência inseticida é variável

dependendo da época de coleta do material vegetal e das condições em que a planta foi cultivada.

Dessa forma, buscou-se, por meio desta pesquisa, identificar e quantificar as classes de metabólitos secundários do extrato etanólico das folhas e óleo dos frutos de *A. indica* e avaliando o potencial inseticida coletadas nas épocas das águas (altas temperaturas e precipitação) e da seca (temperatura mais baixa e menor precipitação) por meio de bioensaios sobre *A. aegypti*. Além disso, buscou-se ainda investigar os extratos etanólicos das folhas e caules de *Trichilia pallida* quanto ao perfil químico e o efeito inseticida sobre o ciclo biológico.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O aumento do número de casos de Dengue, Febre Chikungunya e Zika vírus no Brasil, doenças de grande impacto sobre os sistemas público e privado de saúde, transformou o controle dos vetores em um alvo de muitas pesquisas de caráter urgente e sustentável. Estas doenças se configuram como as principais enfermidades emergentes e reemergentes (HONÓRIO et al., 2015) que atingem o Brasil.

Busca-se assim uma alternativa de controle eficiente e com menor periculosidade ambiental no potencial inseticida de plantas de ocorrência local e introduzidas, coletadas em épocas distintas, por meio de ensaios biológicos sobre o inseto transmissor, *A. aegypti*, assim como a análise quantitativa e qualitativa de seus metabólitos secundários.

2.1. Inseticidas Botânicos no controle de insetos

O emprego de alternativas naturais, como os inseticidas botânicos, se deu como uma possibilidade de controle de insetos a partir do aumento da resistência dos vetores aos produtos sintéticos. Levando em consideração que o Brasil tem ampla biodiversidade da flora e fauna, torna-o um expressivo alvo de pesquisas científicas na busca por moléculas com ação inseticida (FUNARI, 2013).

Segundo Isman (2013), pesquisas envolvendo os inseticidas de origem botânica aumentaram significativamente nos últimos anos, especificamente nos últimos 30 anos. O autor menciona também que no ano de 1980 havia menos de 2% de materiais científicos publicados sobre o assunto, porcentagem que expandiu substancialmente, ultrapassando 21%, até o presente momento.

Os inseticidas botânicos representam uma classe de substâncias elaboradas a partir de plantas, extratos e óleos, os quais possuem inúmeros componentes químicos e aplicações industriais. Nesse sentido, as plantas apresentam uma ampla

variedade de metabólitos secundários que podem ser úteis no controle de vetores de doenças (ISMAN, 2008).

Os metabólitos secundários são compostos extremamente úteis para defesa e proteção, especialmente para plantas, susceptíveis às mudanças ambientais. Algumas das funções exercidas pelos metabólitos secundários incluem a proteção contra herbívoros, insetos e infecção microbiana, atração de polinizadores, agentes alelopáticos, proteção contra raios UV, entre outras (DEWICK, 2009).

Dentre os metabólitos secundários destacam-se os alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais (CASTRO, 2004). Entretanto, a produção destes compostos ocorre em diferentes órgãos e/ou partes das plantas, como raízes, folhas, flores, frutos, sendo que sua concentração nos tecidos também depende de variados fatores, como temperatura, luminosidade, pluviosidade entre outros (MACÍAS, 2007; BORELLA et al., 2010).

Por serem substâncias úteis para defesa e proteção de plantas, os compostos secundários atuam por diferentes mecanismos de ação, os quais são responsáveis por provocar efeitos deletérios, levando-se em consideração a classe de substância secundária (EMERY et al., 2011). Essas substâncias afetam a preferência e comportamento alimentar, taxa de crescimento e desenvolvimento do inseto (FÜRSTENBERG-HÄGG et al. 2013).

Os óleos de andiroba, citronela, eucalipto, assim como o extrato de alho, rotenona e especificamente o nim (*A. indica*), são exemplos de inseticidas botânicos à base de plantas. Tais exemplos possuem uma ampla série de formulações comercializadas com a finalidade de controlar e/ou eliminar mais de 400 espécies de vetores e insetos (MUREITHI, 2008; NTALLI; MENKISSOGLU-SPIROUDI, 2011).

2.1.2. Estudos com plantas inseticidas e os efeitos nos insetos

Muitos trabalhos desenvolvidos com extratos de plantas no controle de insetos pragas agrícolas e transmissores de doenças, especificamente com o óleo essencial de *A. indica* (Meliaceae), mostraram ação repelente de *A. aegypti*, *Culex* e *Anopheles* (TJAHJANI, 2008; SOPHIA, 2009; AARHI, 2010). Dahiya (2016) comprovou após a quantificação do óleo das sementes de *A. indica*, que a azadiractina sendo o seu constituinte principal, inibiu a formação de microgametas parasitas de *Plasmodium berghei*, transmissor da malária em roedores.

Estudos com extratos de éter de petróleo de *Chloroxylon swietenia* King e *Melia azedarach* A. Juss, ambas pertencentes a família Meliaceae, foram testadas com larvas de *A. aegypti* no 4º instar, observaram maior taxa de mortalidade na concentração de 0,2 µg/ml (SAKTHIVADIVEL, 2008).

Estudos feitos com óleos essenciais de tomilho, cravo e cascas de laranjas (EZEONU, 2001) e substâncias químicas de óleos essenciais como eugenol, cineol e citronelal (HUMMELBRUNNER & ISMAN 2001) em testes laboratoriais observaram a repelência contra o *A. aegypti*.

Cavalcanti et al, (2004), relataram no estudo de óleos essenciais de nove plantas diferentes e comuns no Nordeste do Brasil, o efeito inseticida sobre larvas de *A. aegypti*, onde os óleos essenciais mais ativos foram os de *Ocimum gratissimum* (Labiadae) (CL50 60 ppm), *Ocimum americanum* (Labiadae) (CL50 67 ppm), *Lippia sidoides* (Verbenaceae) (CL50 63 ppm) e *Cymbopogon citratus* (Gramineae) (CL50 69 ppm).

De acordo com Coelho et al., (2009), observaram a mortalidade de 90 % das larvas de *A. aegypti* na concentração de 500 µg mL⁻¹ na fração de diclorometano das folhas de *Kielmeyera coriacea* Mart. (Clusiaceae). Também Dill et al., (2012) verificou que nas concentrações de 0,05 e 0,1 µg mL⁻¹ do extrato bruto de *Annona coriacea* (Annonaceae) sobre larvas de *A. aegypti* a mortalidade larval de 73 e 87,5% no intervalo entre 7 e 24 horas.

2.2 A Produção de substâncias secundárias pelas plantas e a Sazonalidade na composição química

Um fator essencial a ser considerado em uma pesquisa envolvendo espécies botânicas são as condições ambientais no momento da coleta, como o solo, umidade, precipitação e temperatura. A sazonalidade repercute diretamente sobre a biossíntese de metabólitos secundários nas plantas, que depende da síntese e de fatores genéticos, fisiológicos e ambientais (FREITAS, 2004).

O ambiente em que a planta se encontra, pode mudar a rota metabólica, motivando a biossíntese de diferentes compostos. Dentre estes fatores, podem-se ressaltar as interações da planta produtora com os demais organismos vivos presentes no meio, tais como outras plantas, através da alelopatia; insetos e microrganismos, por meio de indução por estímulos mecânicos ou ataque de

patógenos; idade da folha e estágio de desenvolvimento, luminosidade, pluviosidade, nutrição, local, época e horário de coleta, técnicas de colheita e pós-colheita e até a poluição atmosférica (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A elevada produção de metabólitos secundários sob altos níveis de radiação solar é elucidada devido ao fato de que as reações biossintéticas são dependentes de suprimentos de esqueletos carbônicos, realizados por processos fotossintéticos e de compostos energéticos que participam da regulação dessas reações (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Tal fator é condicionante para as pesquisas científicas cujo objetivo é determinar as características químicas de diferentes espécies botânicas, fator significativamente estudado por Gobbo-Neto; Lopes (2007). Os autores enfatizam em suas pesquisas que os fatores ambientais podem influenciar consideravelmente quantitativamente e qualitativamente os constituintes químicos presentes nas plantas (Figura 1).

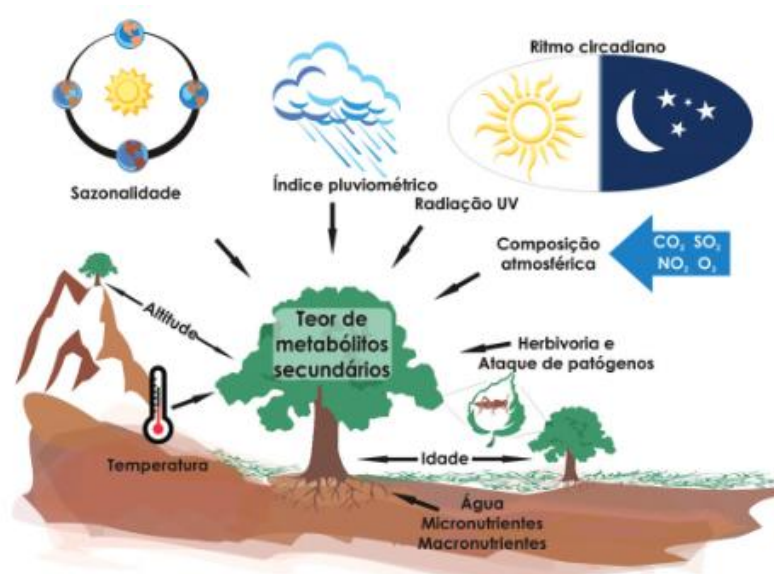


Figura 1: Principais fatores que podem influenciar no acúmulo de metabólitos secundários nas plantas.

Fonte: Gobbo-Netto; Lopes (2007).

2.3. Família Meliaceae

A família Meliaceae pertence à ordem Sapindales (CRONQUIST, 1988) a qual apresenta cinco gêneros e 120 espécies distribuídos por toda a região Neotropical.

São arbóreas, de grande porte (medindo em média de 20 a 30 metros de altura), as folhas são geralmente grandes, sem estípulas, às vezes, com pulvinos na base e as flores são pequenas, actinomorfas, reunidas em inflorescências paniculadas (KLEIN, 1984).

Em relação ao ponto de vista econômico, esta família merece destaque, pois algumas espécies produzem madeiras nobres como o mogno, cedro-branco, santa-bárbara, o cedrilho e a canjerana de qualidades elevadas graças as facilidades de culturas em florestas artificiais. Podem ocorrer também em Floresta Ombrófila Densa da Encosta Atlântica, mesmo em altitudes elevadas. A sua maior concentração está no Sul do Brasil, podendo ser amplamente distribuída por todo país por ser uma espécie nativa (KLEIN, 1984).

Esta família destaca-se por ser uma das mais utilizadas e estudadas no mundo, devido sua rica fonte de aleloquímicos (MARTINEZ, 2002). A família Meliaceae é caracterizada pela presença de substâncias conhecidas como limonoides, (SOARES et al, 2014). Esses metabólitos secundários com estruturas diversificadas apresentam amplas atividades biológicas, principalmente inseticidas (AMBROZIN, 2006).

Diversas pesquisas já foram feitas para avaliar o efeito inseticida de extratos etanólicos, aquosos e frações de Meliaceae sobre várias pragas de diversas culturas com o objetivo de isolar e avaliar a atividade inseticida de substâncias de tal família (ROEL et al. 2000a, b. THOMAZINI et al. 2000, TRINDADE et al. 2000, BRUNHEROTTO & VENDRAMIM 2001, VENDRAMIM & THOMAZINI 2001, GONÇALVES-GERVÁSIO & VENDRAMIM 2007, SOARES 2014).

2.3.1 *Azadirachta indica* A. Juss.

A *Azadirachta indica* pertence à família Meliaceae, é conhecida como “nim” ou “nime”, pertence à ordem dos Rutales, subordem Rutinaea, subfamília Mliioideae, tribo Meliae. Esta espécie pode variar de 15 a 20 metros de altura, com tronco semirreto a reto, de 30 a 80 cm de diâmetro, relativamente curto e duro, com fissuras e escamas, de coloração marrom avermelhada (MOSSINI & KEMMELMEIER, 2005). O diâmetro da copa varia de 8 a 12 metros, podendo atingir até 15 metros em árvores isoladas (MARTINEZ, 2002). Suas flores são pequenas, brancas, bissexuadas, brotam em feixes axiais, arranjando-se em inflorescências com 25 cm de comprimento. Os frutos são lisos, glabros, elipsóides, com 1,5 cm x 2 cm de

comprimento, de cor amarelada quando maduros, a polpa apresenta sabor adocicado (Figura 2).

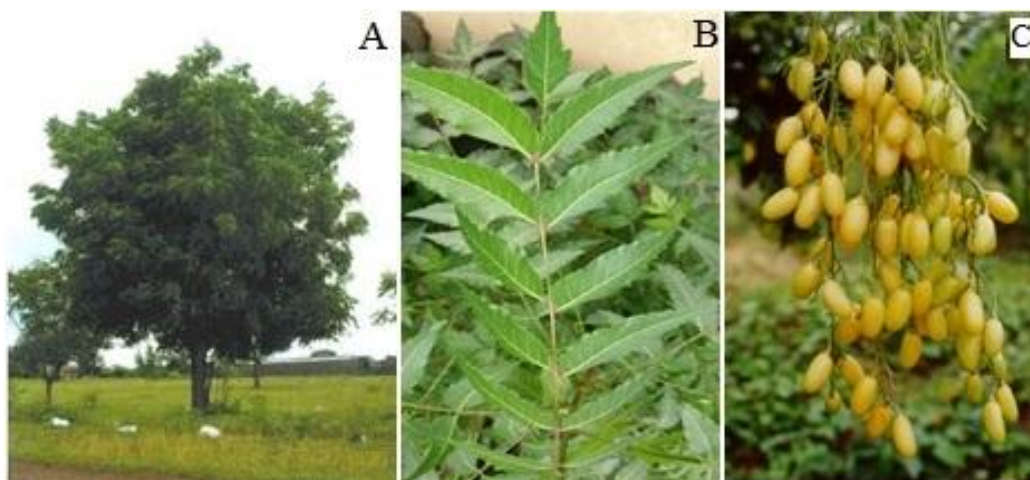


Figura 2: *Azadirachta indica*. (A) Árvore, (B) Folhas e (C) Frutos.

Fonte: www.123rf.com/photo_10393796_neem-azadirachta-indica-tree

A *A. indica* é usada há séculos no Sudeste da Ásia, principalmente na Índia, como planta medicinal (MARTINEZ, 2002), como uso ornamental urbano, bem como na proteção de ambientes externos contra exposição solar intensa (LOCKE, 1995).

A espécie foi introduzida no Brasil em 1984, e frequentemente, é encontrada em quase todas as regiões do país, principalmente nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste (MARTINEZ, 2003).

As sementes e as folhas são usualmente empregadas no controle de pragas. Os frutos podem aparecer após 3-5 anos do plantio, com produção superando 25 kg/planta a partir do quinto ano. A produção de frutos ocorre principalmente entre julho e setembro, podendo ocorrer uma segunda floração entre novembro e janeiro. (SCHMUTTERER, 1990, MARTINEZ, 2002).

Os inseticidas à base de Nim são biodegradáveis, portanto não deixam resíduos tóxicos nem contaminam o ambiente. Estes apresentam ação repelente, antialimentar, interferência nas funções bioquímicas e fisiológicas, reguladora de crescimento promovendo inibição da síntese de quitina e inseticida, além de atividade acaricida, fungicida e nematicida (SCHMUTTERER, 1990, MARTINEZ, 2003, SILVA, 2009).

Há relatos na literatura sobre o efeito inseticida do Nim envolvendo principalmente, lagartas e besouros, sendo várias espécies de lepidópteros, coleópteros, homópteros, dípteros e heterópteros testadas com resultados positivos.

Rahman (2001) demonstrou efeito larvicida do Nim contra o mosquito *Culex quinquefasciatus*, enquanto El Hag (2001) verificou efeito sobre a habilidade de eclosão dos ovos e desenvolvimento larval do mosquito *Culex pipiens*, efeitos dependentes da dose e tempo de exposição. Produtos de Nim também mostram potencial considerável no controle de pragas em grãos estocados, um bom exemplo é o tratamento com óleo de Nim em sacos de juta prevenindo a penetração de pragas no período de armazenamento (SCHMUTTERER, 1990).

O principal produto dessa espécie é o óleo retirado das sementes, o qual contém inúmeros compostos ativos, sendo a azadiractina o mais importante deles (NEVES, 2004). O óleo e seus isolados inibem o desenvolvimento de fungos em homens e animais. O óleo é composto basicamente de triglicerídeos de oleico, esteárico, linoleico e palmítico, sendo usado principalmente em lamparinas, sabões e outros produtos não comestíveis (MOSSINI & KEMMELMEIER 2005, CARVALHO 2008).

2. 3.2 *Trichilia pallida* Sw.

O gênero *Trichilia*, é constituído por aproximadamente 230 espécies, sendo distribuídas principalmente na América Tropical. A espécie *Trichilia pallida* Swartz (Figura 3) pertence à família Meliaceae, conhecida popularmente como “baga-de-morcego” ou “catiguá”, é amplamente distribuída do México à Argentina, no Brasil, pode ser encontrada em bosques nativos desde a Amazônia até o Paraná (KLEIN, 1984; SOARES-SILVA; BARROSO, 1992).

Esta espécie botânica destaca-se por possuir substâncias com atividade inseticida (MIKOLAJCZAK; REED, 1987; XIE, 1994; RAMÍREZ, 2000; WHEELER; 2001), propriedade significativamente estudada por diversos pesquisadores, como Rodriguez; Vendramim (1996) e Roel; Vendramim (1999), os quais determinaram atividade inseticida da planta contra a lagarta-do-cartucho. Nesse sentido, ramos, folhas e caules da *T. pallida* são empregados em estudos com a finalidade inseticida; o efeito de extratos aquosos de ramos e folhas de *T. pallida* foi estudado por Thomazini et al. (2000) e Souza; Vendramim (2000a) sobre o desenvolvimento de *Tuta absoluta*, e sobre a mosca-branca *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B, criada em tomateiro.

Outros estudos com *Trichilia pallida*, foram feitos por Rodriguez; Vendramim (1996), Roel; Vendramim (1999), Thomazini (2000) e Souza; Vendramim (2000a), onde determinaram atividade inseticida contra lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) e contra a mosca-branca (*Bemisia tabaci*).

Segundo Manvudza et al. (2013), larvas do 3º instar de *Anopheles arabiensis* submetidas a concentrações de 500 µg/ml⁻¹ em extratos etanólicos das folhas de *Trichilia emetica Vahl* (Meliaceae), apresentaram 58% de mortalidade das larvas.

Em estudos feito por Garcez et. al, 2009, testaram extratos etanólicos de *Trichilia catinga* (Meliaceae), sobre larvas de *A. aegypti* no 3º instar, onde obtiveram por resultado um CL₅₀ > 1000 µg/ml.



Figura 3: *Trichilia pallida*. (A) Folhas (B) Frutos
Fonte: www.tramil.net/fototeca/imageDisplay

2.4 O Panorama Epidemiológico, Distribuição Geográfica e Controle da Dengue

A Dengue é uma doença típica de regiões tropicais e subtropicais, viral sistêmica de proporções endêmica e epidêmica (BHATT et al., 2013), cujo agente causador é um arbovírus, pertencente à família Culicidae, divididos em quatro sorotipos distintos (DEN1, DEN2, DEN3 e DEN4) (BASTOS et al., 2012). Esta família abrange aproximadamente 3.600 espécies, distribuídas em 38 gêneros e duas subfamílias: Anophelinae e Culicinae (FORATTINI, 2002). A subfamília Culicinae é distribuída em 35 gêneros, dos quais 22 são encontrados nas Américas e 12, exclusivos. Estes são eficientes transmissores de arbovírus causadores de

doenças como dengue, febre amarela e ainda encefalites rígidas (CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

A distribuição da Dengue no mundo ocorre essencialmente nas regiões nas Américas, África e Ásia (Figura 4), fato relacionado ao clima caracterizado por altos níveis de precipitação e temperaturas, o que favorece a multiplicação e dissiminação do mosquito transmissor (BHATT et al., 2013).

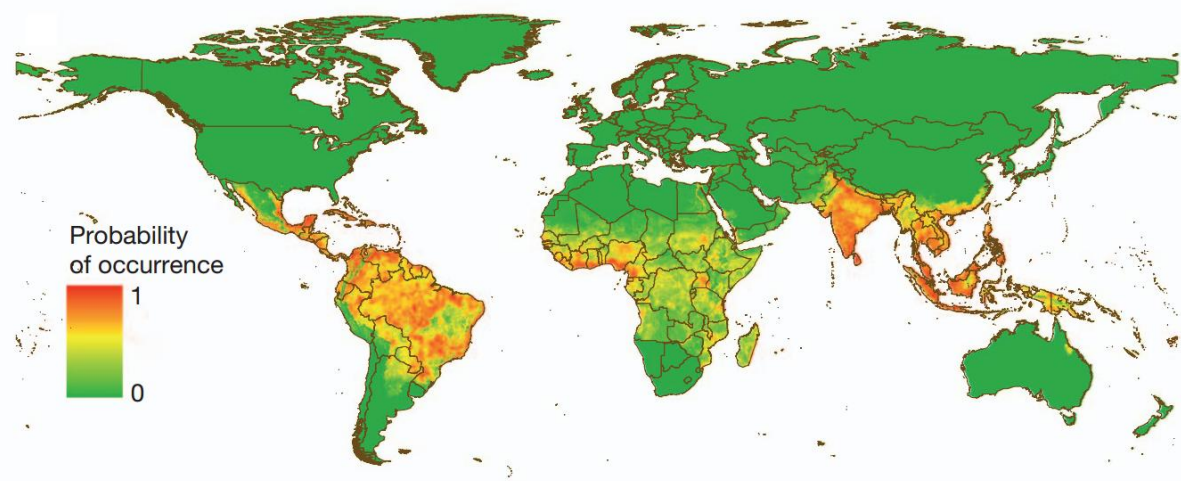


Figura 4: Probabilidade de ocorrência de dengue mundial.
Fonte: BHATT et al. (2013).

Segundo Bhatt et al. (2013) outros fatores podem culminar na propagação do vetor *A. aegypti*, como o aumento do desmatamento, o crescimento da população humana, com grandes mudanças demográficas, a expansão e alteração desordenadas do ambiente urbano, com infraestrutura sanitária deficiente, a expansão acentuada do intercâmbio comercial entre múltiplos países e consequente aumento no número de viagens aéreas, marítimas e fluviais, favorecendo a dispersão dos vetores e dos agentes infecciosos.

Diante da expressividade e importância da Dengue no Brasil e no mundo, as autoridades fazem uso de métodos de controle sintéticos, principalmente os organofosforados, carbamatos e piretróides. Estes promovem o surgimento de resistência, culminando em populações resistentes de insetos e vetores, o que reduz a eficiência dos inseticidas de origem sintética (DUSFOUR et al., 2011), além de que podem ocasionar graves danos ambientais provocados pelo uso intensivo desses produtos sintéticos (MENEZES, 2005). Entretanto, o impacto na natureza que os inseticidas sintéticos, o desenvolvimento de populações de mosquitos resistentes a

esses, justificam a necessidade de buscar alternativas de controle de vetores mais sustentáveis e menos agressivas ao ambiente.

A domesticação do *A. aegypti* está associada a inúmeros fatores, especificamente com comercialização de escravos, período no qual se deu a expansão do mosquito por meio das navegações das grandes embarcações que da África partiram em direção aos vários continentes. Este fato permitiu a propagação do vetor para regiões tropicais e subtropicais (BROWN et al., 2014; IOC, 2016), bem como regiões temperadas (POWELL; TABACHNICK, 2013; IOC, 2016).

Segundo IOC (2016) a primeira epidemia na América do Sul, se deu no Peru em meados do século 19, concomitantemente registros de surtos nos Estados Unidos da América (EUA), Colômbia, Caribe e Venezuela.

Ressalta-se que no ano de 1955 o Brasil erradicou uma das principais doenças ocasionadas pelo vetor (dengue) por meio dos métodos de controle e combate da febre amarela. No entanto, devido à negligência de tais medidas, a doença retornou de modo mais intenso, e atualmente o vetor encontra-se disseminado por todo o território brasileiro (IOC, 2016).

2.4.1. Outras doenças causadas por *A. aegypti*

A Febre Chikungunya é uma doença infecciosa aguda causada pelo vírus chikungunya (CHIKV), da família *Togaviridae* e do gênero *Alphavirus* (ANDRIES et al., 2015), sendo estes transmitidos por fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* no ato da alimentação (HONÓRIO et al., 2015). A doença é considerada uma grande ameaça a qual surgiu em meados dos anos de 1952/1953 na África, ilhas do Oceano Índico, Ásia, Europa, e nas Américas. Fato que gerou um número significativo de infecções (COFFEY; FAILLOUX; WEAVER, 2014).

Embora Andries et al., 2015 mencionaram que a doença teve maior repercussão entre os anos de 2014/2015, a qual se expandiu consistentemente pelo Oceano Índico, Ásia, no Pacífico Sul, Sul da Europa, Caribe e América Central. Sua rápida disseminação está associada a fatores semelhantes aos da Dengue, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais.

Assim como a Dengue e febre Chikungunya, o Zika vírus é considerado umas das mais recentes infecções, causada pelo Zika vírus, o qual pertence à família Flavivirus e é transmitido, pelos mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus* (CAMPOS;

BANDEIRA; SARDI, 2015; TILAK, 2016). Além disso, a doença pode ser transmitida por fluidos corpóreos, especialmente por meio do contato sexual, bem como por meio de transfusão sanguínea (TILAK, 2016).

Uma das maiores preocupações relativas ao Zika vírus é quanto ao seu potencial de desenvolvimento de más formações congênitas, tais como a síndrome de Guillain-Barré e outras síndromes neurológicas, além de doenças autoimunes (TILAK, 2016). Os sintomas típicos deste processo infeccioso são dores nas articulações, edema de extremidades, febre, erupções maculopapulares, cefaléia, dor retro-orbitária, vertigens, dores musculares e distúrbios digestivos (DUFFY et al., 2009; ZANLUCA et al., 2015).

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Identificar classes de compostos secundários de *A. indica* e *T. pallida*, coletadas em época das águas e época de seca e suas atividades inseticidas sobre *A. aegypti*.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar a preparação do extrato etanólico de caules e folhas de *T. pallida*, folhas de *A. indica* e extração de óleos dos frutos de *A. indica*;
- Realizar a prospecção fitoquímica clássica dos extratos etanólicos das espécies coletadas;
- Avaliar as classes de compostos secundários majoritárias por UV-visível e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) dos extratos etanólicos e óleos;
- Quantificar os fenóis totais e flavonoides dos extratos etanólicos das espécies selecionadas;
- Avaliar o efeito inseticida dos extratos etanólicos e óleos em larvas de *A. aegypti*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARHI, N.; MURUGAN, K. Larvicidal and repellent activity of *Vetiveria zizanioides* L, *Ocimum basilicum* Linn and the microbial pesticide spinosad against malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston (Insecta: Diptera: Culicidae). **Journal of Biopesticides**, n. 3, v. 1, p. 199-204, 2010.

AMBROZIN, A. R. P.; LEITE, A. C.; BUENO, F. C.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; BUENO, O. C.; SILVA, M. F. G. F.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI JR., M.; J. Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.17, n.3, 2006.

ANDRIES, A. C.; DUONG, V.; LY, S.; CAPPELLE, J.; KIM, K. S.; TRY, P. L.; ROS, S.; ONG, S.; HUY, R.; HORWOOD, BARNARD, D. R. Repellency of essential oils to mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v.36, p.625-629, 1999.

BASTOS, M. D.; DE FIGUEIREDO, R. M. P.; RAMASAWMY, R.; ITAPIREMA, E.; GIMAQUE, J. B. L.; SANTOS, L. O.; FIGUEIREDO, L. T. M.; MOURAO, M. P. G. Simultaneous circulation of all four dengue serotypes in Manaus, State of Amazonas, Brazil in 2011. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.45, p. 393-394, 2012.

BHATT, S.; GETHING, P. W.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; FARLOW, A. W.; MOYES, C. L.; DRAKE, J. M.; BROWNSTEIN, J. S.; HOEN, A. G.; SANKOH, O.; MYERS, M. F.; GEORGE, D. B.; JAENISCH, T.; G. R. WINT, W.; SIMMONS, C. P.; SCOTT, T. W.; FARRAR, J. J.; HAY, S. I. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504-507, 2013.

BORELLA, J.; PASTORINI, L. H.; TUR, C. M. Atividade alelopática de extratos aquosos de folhas de *Rollinia sylvatica* sobre a germinação e crescimento inicial do rabanete. **Revista Biociências Unitau**, v. 16, p. 2, 2010.

BROWN, J. E.; EVANS, B. R.; ZHENG, W.; OBAS, V.; BARRERA-MARTINEZ, L.; EGIZI, A.; ZHAO, H.; CACCONI, A.; POWELL, J. R. Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. **Evolution**, v. 68, n. 2, p. 514-525, 2014.

BRUNHEROTTO, R.; VENDRAMIM, J. D. Bioatividade de extratos aquosos de *Melia azedarach* L. sobre o desenvolvimento de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em tomateiro. **Neotropical Entomology**, v. 30 p. 455-459, 2001.

CAMPOS, G. S., BANDEIRA, A. C., & SARDI, S. I. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1885-6. 2015.

CAO-LORMEAU, V. M.; ROCHE, C.; TEISSIER, A.; ROBIN, E.; BERRY, A. L.; MALLET, H. P. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. **Emerging Infectious Diseases journal**, v. 20, p. 1085-6, 2014.

CARVALHO, G. A.; SANTOS, N. M.; PEDROSO, E. C.; TORRES, A. F. Eficiência do óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) no controle de *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758) e *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hemiptera: Aphididae) em couve-manteiga *Brassica oleracea* Linnaeus var. *acephala*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 2, p. 181-186, 2008.

CASTRO, H. G. de; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Metabólitos secundários – contribuição ao estudo das plantas medicinais**. 2. ed. Visconde do Rio Branco: SUPREMA, 113 p. 2004.

CAVALCANTI, E. S. B.; MORAIS, S. M. de.; LIMA, M. A. A., SANTANA, E. W. P.. Larvicidal Activity of Essential Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n.5, p. 541-544, 2004.

COELHO, A. A. M.; PAULA, J. E.; ESPÍNDOLA, L. S. Atividade larvívica de extratos vegetais sobre *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), em condições de laboratório. **BioAssay**, v. 4, p. 3, 2009.

COFFEY, L. L.; FAILLOUX, A.; WEAVER, S. C. Chikungunya Virus-Vector Interactions. **Viruses**, v. 6, n. 11, p. 4628-4663, 2014.

CONSOLI, R.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Editora Fiocruz, p. 225, 1994.

CRONQUIST, A., **The evolution and classification of flowering plants**. Lawrence, Printed by Allen Press, Inc., p. 555, 1988.

DAHIYA, N.; CHIANESE, G.; ABAY, S. M.; TAGLIATELA-SCAFATI, O.; ESPOSITO, F.; LUPIDI, G.; BRAMUCCI, M.; QUASSINTI, L.; CHRISTOPHIDES, G.; HABLUETZEL, A.; LUCANTONI, L. In vitro and ex vivo activity of an *Azadirachta indica* A. Juss. Seed kernel extract on early sporogonic development of *Plasmodium* in comparison with azadirachtin A, its most abundant constituent. **Phytomedicine**, v. 23, p. 1743–1752, 2016.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products – A biosynthetic approach**. 3 ed. John Wiley and Sons. p. 46, 2009.

DILL, E. M.; PEREIRA, M. J. B.; COSTA, M. S. Efeito residual do extrato de *Annona coriacea* sobre *Aedes aegypti*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.79, n.4, p.595-601, 2012.

DUFFY, M. R.; CHEN, T. H.; HANCOCK, W. T.; POWERS, A. M.; KOOL, J. L.; LANCIOTTI, R. S. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, p. 2536-43, 2009.

DUSFOUR, I.; THALMENSY, V.; GABORIT, P.; ISSALY, J.; CARINCI, R.; GIROD, R. 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, p.346– 352, 2011.

EL HAG, E. A.; RAHMAN, A-E.; EL-NADI, H.; ZAITOON, A. A. Effects of methanolic extracts of neem seeds on egg hatchability and larval development of *Culex pipiens* mosquitoes. **Indian Veterinary Journal**, v. 78, p. 199–201, 2001.

EMERY, F. S.; BIANCHI, G.; BIANCHI, R. C. **Química no Cotidiano**. 1. ed. SBQ. Rio de Janeiro, 2011.

EZEONU, F. C.; CHIDUME, G. I.; UDEDI, S. C. Insecticidal properties of volatile extracts of orange peels. **Bioresource Technology**, v.76, p. 273-274, 2001.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia**. São Paulo: Editora da USP; v.2, 864p, 2002.

FREITAS, M. S. M.; MARTINS, M. A.; CARVALHO, A. J. C.; CARNEIRO, R. F. V. Crescimento e produção de fenóis totais em carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC] em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares, na presença e na ausência de adubação mineral. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, p. 30-34, 2004.

FUNARI, S. C.; GAMBOA, I. C.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1605-1609, 2013.

FÜRSTENBERG-HÄGG, J.; ZAGROBELNY, M.; BAK, S. Plant defense against insect herbivores. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, p. 10242-10297, 2013.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, R. F.; SILVA, L. M. G. E; HAMERSKI, L. Larvicidae activity against *Aedes aegypti* of some native to the West-Central region of Brasil. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6647 – 6650, 2009.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374, 2007.

GONÇALVES, G. R. C. R.; VENDRAMIM, J. D. Bioatividade do extrato aquoso de sementes sobre *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) em três formas de aplicação. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 28-34, 2007.

HONÓRIO, N. A.; CÂMARA, D. C. P.; CALVET, G. A.; BRASIL, P. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.31, n. 5, 2015.

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

IOC. Instituto Oswaldo Cruz. **Dengue**. Disponível em: <<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/longatraje.html>>. Acesso em: 18 julho de 2016.

ISMAN, M. B; GRIENESEN, M. L. Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v.1, p. 1-6, 2013.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides: for richer, for poorer. **Pest management science**, v. 64, n. 1, p. 8-11, 2008.

KLEIN, R. M. **Meliáceas**. In: Reitz, R. Editora Flora Ilustrada Catarinense – I Parte. Itajaí, 138, 1984.

LOCKE, J.C. “Fungi” In: “**The Neem Tree**”. Edited By H. Schmutterer, VHC, p. 118-26, 1995.

MACÍAS, F.A. Allelopathy. A natural alternative for weed Control. **Pest Management Science**, v. 63, n. 4, p. 327-48, 2007.

MARTINEZ, S. S. **O Nim - *Azadirachta indica* - Natureza, usos múltiplos, produção.** Londrina: Instituto Agronômico do Paraná, 2002.

MARTINEZ, S. S. O Uso do Nim no Café e em outras Culturas. **Revista Agroecologia Hoje**, v. 4, p. 13-14, 2003.

MAVUNDZA, E. J.; MAHARAJ, R.; CHUKWUJEKWU, J. C.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. Larvicidal activity againts *Anopheles arabiensis* of 10 South African plants that are traditionally used as mosquito repellents. **South African Journal of Botany**, v. 88, p. 86-89, 2013.

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

MIKOLAJCZAK, K. L.; REED, D. K. Extractives of seeds of the Meliaceae: Effects on *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), *Acalymma vittatum* (F.), and *Artemia salina* Leach. **Journal of Chemical Ecology**, v. 13, p. 99-111, 1987.

MOSSINI, S. A. G.; CARLOS KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 24, n. 1, p. 139-148, 2005.

MUREITHI, J. G. Use plant pesticides to control crop pests. Kenya Agricultural Research Institute, Kenya. 2008.

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

NTALLI, N. G.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. **Pesticides of botanical origin: a promising tool in plant protection, pesticides—formulations, effects, fate.** In M. Stoytcheva (ed.). p. 1–24. 2011.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 11-17, 2013.

RAHMAN, M. M.; HOSSAIN, M. I.; AMEEN, M. Evaluation of neem oil, seed and seed cake extracts against *Culex quinquefasciatus* Say larvae of Dhaka City. **Bangladesh Journal of Zoology**, v. 29(1), p. 29-36, 2001.

RAMÍREZ, M. C.; TOSCANO, R. A.; ARNASON, J. S.; OMAR, C. M.; CERDA-GARCÍA-ROJAS, C. M.; MATA, R. Structure, conformation and absolute configuration of new antifeedant dolabellanes from *Trichilia trifolia*. **Tetrahedron**, v. 56, p. 5085-5091, 2000.

RODRÍGUEZ, H. C.; VENDRAMIM, J. D. Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Manejo Integrado de Pragmas**, p. 14-22, 1996.

ROEL, A. R.; VENDRAMIM, J. D. Desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) em genótipos de milho tratados com extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* (Swartz). **Scientia Agricola**, v. 56, p. 581-586, 1999.

ROEL, A. R.; VENDRAMIM, J. D.; FRIGHETTO, R. T. S.; FRIGHETTO, N. Atividade tóxica de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* (Swartz) (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, p. 799-808. 2000a.

ROEL, A. R.; VENDRAMIM, J. D.; FRIGHETTO, R. T. S.; FRIGHETTO, N. Efeito do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* (Swartz) (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivência da lagarta-do-cartucho. **Bragantia**, v. 59, p. 53-58, 2000b.

SAKTHVADIVEL, M.; THILAGAVATHY, D. Evaluation of certain insecticidal plants for the control of vector mosquitoes viz. *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. **Applied Entomology and Zoology**, v. 43, p. 57-63, 2008.

SCHMUTTERER, H. Properties and Potential of Natural Pesticides from the Neem Tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**, v. 35, p. 271-97, 1990.

SILVA, A. B.; BATISTA, J. L.; BRITO, C. H. Atividade inseticida do nim (*Azadirachta indica* A. Juss). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 4, n. 4, p. 7-15, 2009.

SOARES, A. de O.; FERREIRA, A. G. L.; SOARES, L. R.; CORSINO, J.; GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S. Estudo químico das folhas de *Trichilia silvatica* (Meliaceae). **Química Nova**, v. 37, 2014.

SOARES-SILVA, L. H.; BARROSO, G. M. **Fitossociologia do estrato arbóreo da floresta na porção norte do parque Estadual Mata dos Godoy**, Londrina- PR, Brasil. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA (SBPC) PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, Anais 8., Ouro Preto-São Paulo, p.101-112, 1992.

SOPHIA, N.; PANDIAN, R. S. Screening of the efficacy of phytochemical repellents against the filarial vector mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. **Current Biotica**, v. 3, p. 14-31. 2009.

SOUZA, A. P.; VENDRAMIM, J. D. Atividade ovicida de extratos aquosos de meliáceas sobre a mosca-branca *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) biótipo B em tomateiro. **Scientia Agricola**, v. 57, n.3, p. 403-406, 2000a.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Trad. ELIANE ROMANO SANTAREM et al. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 719 P. 2004.

THOMAZINI, A. P. B. W.; VENDRAMIM, J. D.; LOPES, M. T. R. Extratos aquosos de *Trichilia pallida* e a traça-do-tomateiro. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 1, Piracicaba, 2000.

TILAK, R.; RAY, S.; TILAK, V. W.; & MUKHERJI, S. Dengue, chikunguny and the missing entity–Zika fever: a new emerging threat. **Medical Journal Armed Forces India**, v.72, n.2, p.157-163, 2016.

TJAHJANI S. Efficacy of several essential oils as *Culex* and *Aedes repellents*. **ASEAN Congress of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 3, p.3337. 2008.

TRINDADE, R. C. P.; et al. Extrato metanólico da amêndoa da semente de nim e a mortalidade de ovos e lagartas da traça-do-tomateiro. **Scientia Agricola**, v. 57, p. 407-413, 2000.

VENDRAMIM, J. D.; THOMAZINI, A. P. B. W. Traça Tuta absoluta (Meyrick) em cultivares de tomateiro tratadas com extratos aquosos de *Trichilia pallida* Swartz. **Scientia Agricola**, v. 58, p. 607-611, 2001.

WHEELER, D. A. M. B.; et al. Screening of Costa Rican *Trichilia* species for biological activity against the larvae of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 347-358, 2001.

XIE, Y. S.; et al. Biological activity of extracts of *Trichilia* species and the limonoid hirtin against *Lepidoptera larvae*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 22, p. 129-136, 1994.

ZANLUCA, C.; MELO, V. C.; MOSIMANN, A. L.; SANTOS, G. I.; SANTOS, C. N.; LUZ, K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 569-72, 2015.

Capítulo 1

(Artigo submetido a revista: Phytomedicine – Journal)

Influência da sazonalidade nos teores de azadiractina
e no potencial inseticida em *Aedes aegypti* L. (1762) (Culicidae) do extrato etanólico
de *Azadirachta indica* A. Juss (Meliciaceae)

Deizeluci de Fátima Pereira Zanella^{a,b,*}, Antonia Railda Roel^{a,c}, Ligia Aurélio Bezerra Maranhão Mendonça^c, Karla Rejane de Andrade Porto^d, Nathalie Nogueira Pará^c, Ricardo Dias Peruca^a, Renato Zanella^e, Rosemary Matias^f

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agrícola, Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Campo Grande - MS, Brasil.

^bDepartamento de Química, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), Campus Aquidauana, Aquidauana - MS, Brasil.

^cPrograma de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Campo Grande - MS, Brasil.

^dPrograma de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade do Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande - MS,

^eDepartamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria - RS, Brasil.

^fPrograma de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional, Universidade Anhanguera-Uniderp, Campo Grande, MS.

*Correspondente autor. E-mail: deizelucipz@hotmail.com Tel: 55-067-999283325.
Fax: 55-067-3312-3302.

RESUMO

No Brasil, para o controle de *Aedes aegypti* L. (Culicidae), principal transmissor da dengue, vem sendo utilizado o óleo e extratos de Nim (*Azadirachta indica*), em substituição aos produtos sintéticos. Objetiva-se avaliar o potencial inseticida de plantas cultivadas no Mato Grosso do Sul foram feitos extratos etanólicos de folhas de cinco exemplares coletadas nas épocas de chuva e seca e realizado análises químicas e ensaios sobre larvas de *A. aegypti* (3^o instar), totalizando 100 larvas por tratamento, em quatro repetições, nas concentrações de 1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,062 mg mL⁻¹ dos extratos etanólicos. Após o período de 24 h determinou-se as concentrações letais (CL) até o final do ciclo. Empregando HPLC-DAD e UHPLC-MS/MS constatou-se teores superiores de azadiractina, de compostos fenólicos e flavonoides nas folhas coletadas em época de chuva em relação à época da seca. Os extratos etanólicos provocam efeitos deletérios as larvas do mosquito, causando alongamento das fases e mortalidade larval e pupal, diminuindo drasticamente ou eliminando a formação de adultos, com maior eficiência do extrato etanólico da época das chuvas. Conclui-se que a sazonalidade influencia nos teores de compostos fenólicos, flavonoides, azadiractina e nos efeitos inseticida mais intensos no período de chuva que os da época da seca.

Palavras-chave: plantas inseticidas, ingredientes ativos vegetais, controle de vetores de doenças, Nim.

A dengue, doença tropical, é arbovirose reemergente de maior relevância no mundo, transmitida pelo *Aedes aegypti* L. (Culicidae). No Brasil, a doença é considerada um grave problema de saúde pública e de difícil controle. O inseto também transmite Febre Amarela, vírus Zika, Febre Chikungunha que preocupam a população mundial (SVS, 2016). Entre os fatores que favorecem o avanço destas epidemias, no território brasileiro, está o uso contínuo de inseticidas sintéticos, os quais provocam o surgimento de populações resistentes do inseto, além dos efeitos acumulativos sobre o meio ambiente e à saúde humana (GHOSH, 2012).

Nesse contexto, verifica-se que o emprego de extratos vegetais mostra-se como uma alternativa para o controle desse vetor (PROMSIRI et al., 2006). Dentre os fitoconstituintes descritos por seu potencial inseticida estão os produtos a base de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae)) (KIKUCHI et al., 2011). O Nim possui compostos bioativos com destaque para azadiractina, um limonoide tipo tetranortriterpenoide (GOVINDACHARI, 1992, SATDIVE, 2007). A classe de limonoides com mais de 300 compostos identificados apresenta inúmeras ações inseticidas como: efeito antialimentar, efeito repelente de postura de ovos, efeito regulador do crescimento, interferência nas funções bioquímicas e fisiológicas, efeitos sobre a reprodução e morte (GOVINDACHARI, 1992; MOSSINI, 2005).

No Brasil a árvore foi introduzida em 1986 e a partir da década de 1990 iniciaram os plantios comerciais em diversos estados brasileiros com o objetivo de empregar o óleo e/ou extratos dos frutos como matéria-prima para fabricação de inseticidas, fungicidas, medicamentos veterinários, cosméticos e compor sistemas agroflorestais (GOVINDACHARI, 1992; MARTINEZ, 2003; CARPANEZZI, 2010). Como inseticida é reconhecidamente eficiente no combate de insetos, pragas agrícolas e de transmissores de doenças, mas é necessário ainda investigar o efeito

dos extratos das folhas de plantas produzidas no Cerrado brasileiro, uma vez que as substâncias secundárias produzidas são influenciadas por diversos fatores dentre eles a localização geográfica e as condições climáticas (GOBBO-NETO, 2007).

Objetivou-se assim, investigar o extrato etanólico das folhas de *A. indica* cultivada em Campo Grande (MS) e avaliar a influência da sazonalidade local nos teores de azadiractina, e o efeito dessa no desenvolvimento e mortalidade de larvas de *A. aegypti* em condições laboratoriais.

SECÇÃO EXPERIMENTAL

Coleta e identificação da espécie vegetal

As folhas de *A. indica* foram coletadas, de cinco exemplares, em área de Cerrado na Fazenda Escola da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) (20°23'11.25 S / 54°36'18.1 W), no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. A coleta ocorreu na época das águas (janeiro de 2015), codificados como NFA (Nim folha época das águas) e de seca (agosto de 2015), codificadas como NFS (Nim folha época de seca) (Quadro 1). O material foi identificado pelo Prof. Dr. Arnildo Pott e um exemplar depositado no herbário da Universidade - Anhanguera Uniderp (8385).

Obtenção do extrato etanólico

As folhas foram secas em estufa, com circulação de ar (40 ± 2 °C) por sete dias, fragmentadas, trituradas em moinho elétrico e o pó de cada amostra submetido a extração com etanol, por maceração estática (26 a 30 °C ± 1 °C), seguida de filtração e eliminação do solvente em evaporador rotativo (Tecnal®, MA120) e para obtenção dos extratos etanólicos (NFA) e (NFS).

Prospecção Fitoquímica e Perfil Cromatográfico

Os extratos etanólicos de NFA e NFS foram submetidos à análise fitoquímica clássica (MATOS, 2009). As análises foram executadas em triplicatas e foi observado a alteração de cor e formação de precipitado. A leitura foi representada como: negativo (-), parcial (\pm), baixa (+), parcialmente moderado (++) moderado (\pm ++) e alta intensidade (+++), foi realizada em frequência de: 0, 10, 25, 50, 75 e 100% (FONTOURA et al., 2015).

Para quantificar os fenóis totais nos extratos de NFA e NFS utilizou-se o método Folin-Ciocalteu, com ácido gálico (10 a 350 mg mL⁻¹) como padrão ($y= 1,067x - 0,004$; $R^2= 0,982$). Os flavonoides foram determinados pelo método cloreto de alumínio e como padrão a quercetina ($y= 0,0633x - 0,0061$; $R^2= 0,999$) (DO et al., 2014).

A confirmação por HPLC/DAD das substâncias presentes nos extratos etanólicos de NFA e NFS e a determinação dos teores de azadiractina foram realizadas por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS) modelo Xevo TQ da Waters utilizando coluna Acquity UPLC BEH C₁₈ (50×2,1 mm d.i., 1,7 μ m tamanho de partícula) e fonte de ionização por eletronebulização (ESI) no modo positivo. As transições escolhidas para quantificação e confirmação da azadiractina foram 743 >725 m/z e 743 > 665 m/z, respectivamente. A separação cromatográfica foi realizada por eluição com gradiente e o composto azadiractina apresentou tempo de retenção de 2,1 min.

Os dados climáticos foram coletados na estação meteorológica da Inmet/Sepaf/Agraer/Cemtec-MS, em Campo Grande, MS (Tabela 1).

Tabela 1: Dados meteorológicos mensais: temperatura média, precipitação total, umidade média e radiação solar média, Nov/2014 a Set/2015 (posto meteorológico do Inmet/Sepaf/Agraer/Cemtec-MS, Campo Grande, MS, Brasil).

Mês /Amostragem	Temperatura Média (°C) (max-min)	Precipitação Total (mm) (max-min)	Umidade (%) (max-min)	Radiação Solar (kJ/m ²)(max-min)
Novembro/2014	25,0 (35,3-19,3)	161,0 (26,4-0,0)	76,2 (95,0-31,0)	1.712,0 (9.823,0-10,6)
Dezembro/2014	24,84.(33,50-18,70)	364,2.(87,40-0,0)	78,24.(95,0-40,0)	1.541,4 (9.820,0-0,01)
Janeiro/2015	25,7 (34,6-18,2)	245,8 (45,0-0,0)	72,1 (95,0-31,0)	1.647,1 (7.919,0-12,4)
Julho/2015	21,0 (32,5-9,0)	87,2 (24,8-0,0)	69,9 (96,0-21,0)	1.243,1 (9.000,0-0,27)
Agosto/2015	24,9 (37,1-14,1)	8,6 (8,6-0,0)	42,1 (92,0-16,0)	1.547,1 (3.146,0-24,1)
Setembro/2015	25,2 (36,7-10,2)	225,40 (81,6-0,0)	57,61 (96,0-12,0)	1.519,0(9.860,0-0,8)

Bioensaios com *A. aegypti*

Para este estudo foram utilizadas larvas no 3º ínstar, oriundas das colônias permanentes, criadas em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) e alimentadas com ração para gatos triturada (30% de proteína, 11% de lipídeos, 10% de umidade e de cinzas, 4% de fibras, 0,8% de fósforo e de 0,2 a 0,8% de cálcio), em recipientes de louça tampados com tela de nylon e elástico (SILVA, 1998). Os adultos foram alimentados com solução açucarada (8%), e três repastos semanais com pombo, durante 90 minutos. Para eclosão dos ovos foi utilizado um litro e meio com água desclorada, e pH corrigido entre 6,5 e 7,0, com bicarbonato de sódio (NaHCO_3).

Para o teste de avaliação da letalidade, expresso em Concentração Letal (CL), as larvas foram mantidas em solução por 24 horas, utilizando a proporção de uma larva/mL para 25 mL, com quatro réplicas, totalizando 100 larvas por tratamento.

As concentrações dos extratos etanólicos, solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO) foram dissolvidas em água, para obter a concentração de 1, 0,5, 0,25,

0,125 e 0,062 mg mL⁻¹. Foram utilizados como controle negativo, água com pH entre 6,5 -7,0 e como controle positivo solução de Rotenona. Após o período de 24 h o número de mortos foi observado por meio da estimulação com auxílio de uma pipeta de Pasteur. As concentrações letais (10, 50 e 90%) da população larval exposta (MCLAUGHLIN, 1991). A cada ensaio foram determinadas com uso do método de Probit, por meio do software Leora® (Polo 97355947870655352).

As larvas sobreviventes, após 24 horas de exposição aos tratamentos, foram acompanhadas até o final do ciclo biológico. Obtendo-se assim o efeito das dosagens subletais dos extratos no desenvolvimento e mortalidade larval e pupal de *A. aegypti*. Assim, os parâmetros observados foram: duração da fase larval, duração do jovem (larva +pupa), mortalidade larval e pupal.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento nas concentrações de 1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,062 mg mL⁻¹. Para os dados de duração da fase larval, em horas, foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA em teste de Tukey ($p < 0,05$) no programa Assistat 7.7 beta® INPI 0004051-2 (SILVA, 2016). Os dados de mortalidade após 24 h foram submetidos ao programa Polo-PC que utiliza o método de Probit definindo os valores das concentrações letais para 10, 50 e 90% da população exposta e os respectivos intervalos de confiança, estabelecendo assim os valores de CL₁₀, CL₅₀ e CL₉₀.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Prospecção fitoquímica e perfil cromatográfico em HPLC-DAD.

Os extratos etanólicos das folhas de *A. indica* coletadas dos mesmos exemplares independente da época de coleta, águas (NFA) e seca (NFS), apresentaram perfis químicos semelhantes na análise por HPLC-DAD, exceto para

flavonoides (Figura 1). Pela análise espectral na região do ultravioleta observou-se diferença entre os extratos etanólicos. A amostra NFA exibiu intensa absorção em 211 nm (absorbância (A)= 0,805), enquanto que em NFS a banda apresentou menor intensidade em 220 nm (A= 0,647). Esta região é característica de terpenoides, classe a qual pertence a azadiractina.

Os perfis cromatográficos entre 220 a 340 nm obtidos por HPLC-DAD confirmam os dados fitoquímicos (Figura 1). Na amostra NFA os picos majoritários ocorreram nos tempos de retenção (t_R) de 40,66 e 41,86 min (Figura 2), enquanto na amostra NFS os picos foram 19,48 e 20,18 min (Figura 3). Evidenciando na análise por HPLC-DAD que o tempo de retenção no perfil de absorção no ultravioleta ($\lambda_{\text{máx, MeOH}} = 220$ e 280 nm) não são concordantes, indicando a presença de compostos estruturais diferentes nas duas épocas de coleta. Logo, com base nessas informações, pode-se afirmar que ocorreu diferença entre os constituintes presentes nos extratos etanólicos para as diferentes épocas (Figuras 2 e 3). Para os flavonoides observaram-se duas bandas de absorção em ambas as amostras. Uma em 270 nm correspondente ao anel A do esqueleto básico e a banda em 370 nm, relacionada ao anel B. A maior intensidade apresentada pela amostra NFA (Figura 2) foi confirmada na análise fitoquímica (Figura 1).

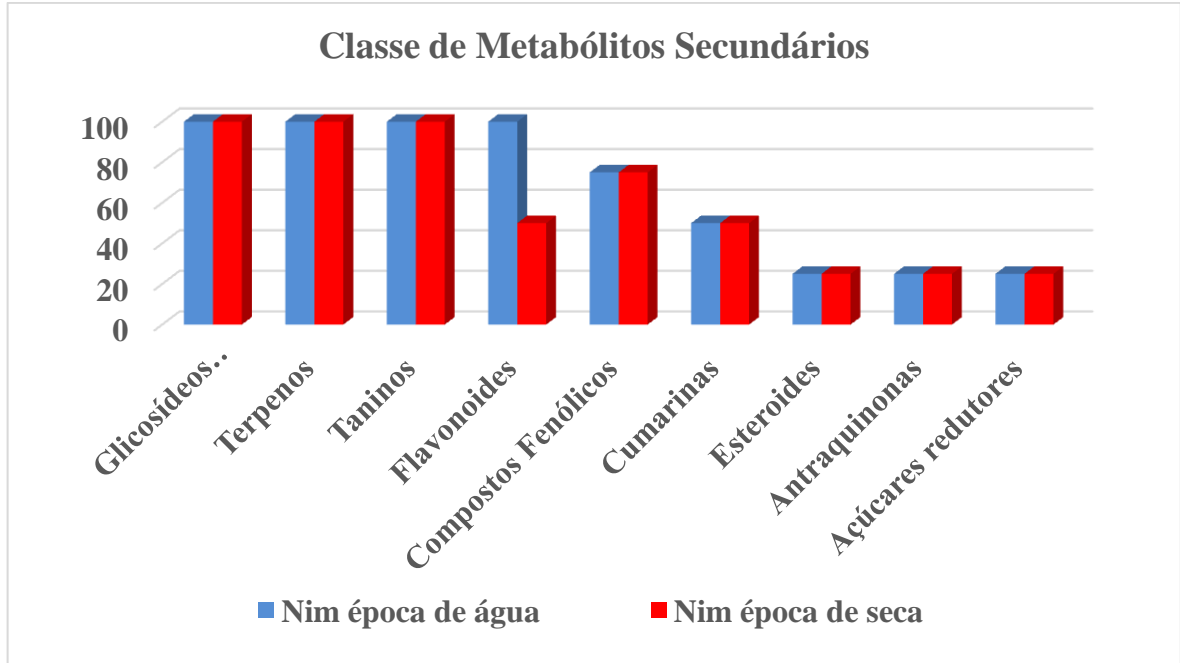


Figura. 1: Frequência (%) das classes de metabólitos secundários do extrato etanólico de *Azadiracta indica*, coletados em épocas de água e seca.

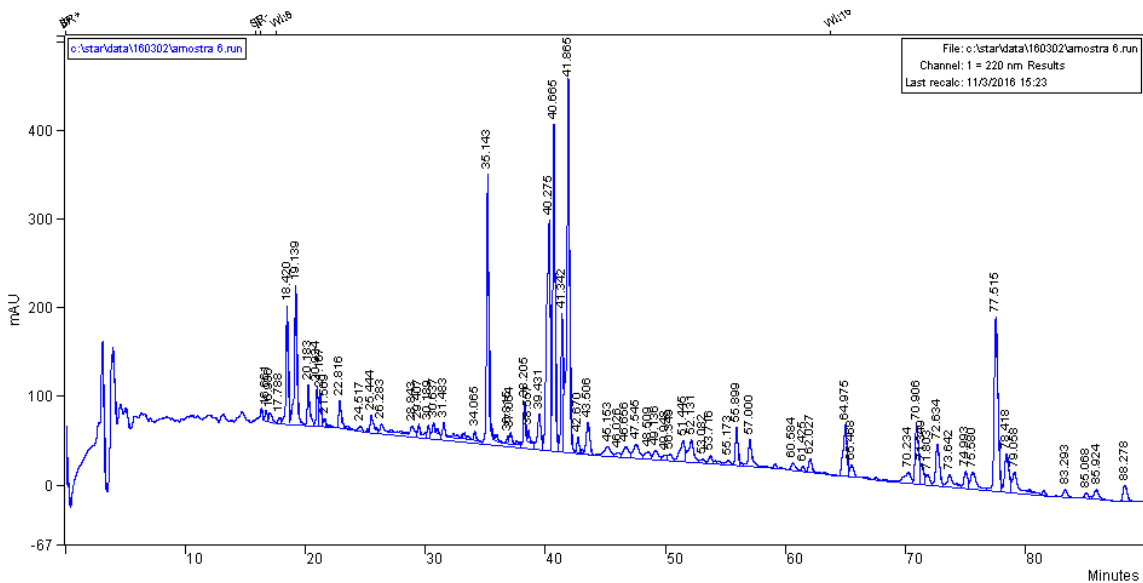


Figura 2: Cromatograma obtido por HPLC-DAD (220 nm) para os compostos majoritários do extrato etanólico de folhas de Nim (*Azadiracta indica*) coletadas em épocas de águas: (A) tR= 19,13 min, (B) tR= 40,66 min.

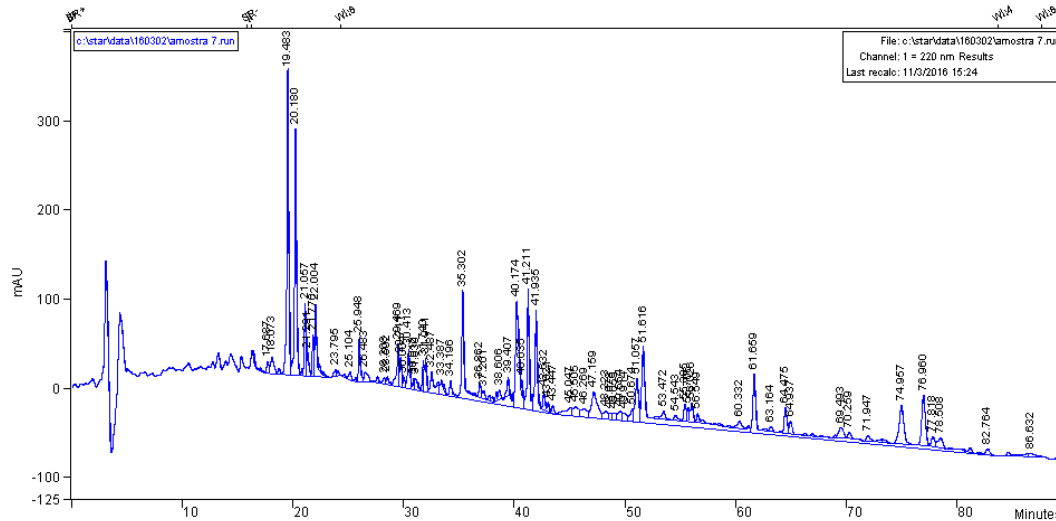


Figura 3: Cromatograma obtido por HPLC-DAD (220 nm) para os compostos majoritários do extrato etanólico de folhas de Nim (*Azadiracta indica*) coletadas em épocas de seca: (A) tR= 20,18 min, (B) tR= 40,17 min.

Para a quantificação da azadiractina nas duas amostras, foi empregado padrão de referência, com tempo de retenção de 2,1 min. O teor da azadiractina seguiu o mesmo padrão dos compostos fenólicos e flavonoides, onde se observou ser superior para as amostras de janeiro (NFA = 0,112 mg kg⁻¹) em relação as amostras de agosto (NFS= 0,001 mg kg⁻¹). Esses resultados indicam que a época de coleta interfere na produção de metabólitos secundários pois folhas coletadas na época das águas (janeiro) apresentaram maiores teores de compostos fenólicos, flavonoides e azadiractina, que as amostras coletadas na época da seca (agosto).

Nas amostras NFA os teores de compostos fenólicos e flavonoides (CF = 248,36 ± 0,244 mg g⁻¹ e FT= 94,67 ± 0,12 mg g⁻¹) foram superiores às amostras NFS (CF = 94,68 ± 0,12 mg g⁻¹ e FT= 34,49 ± 0,16 mg g⁻¹). O primeiro período (janeiro) da coleta foi marcado por temperaturas mais altas (25,7 °C), umidade (72,1%), precipitação pluviométrica (245,8 mm) e luminosidade (14 h de fotofase), em relação ao segundo período, de menor precipitação, umidade e luminosidade (10 h de fotofase) (junho, julho, agosto) (Tabela 1).

Na quantificação constatou-se o maior teor de compostos fenólicos, flavonoides e azaradictina para o período das águas em relação ao período de seca. A variação dos constituintes químicos relacionada com a sazonalidade já é descrita na literatura, que apontam que a época, as condições ambientais e a idade da planta são fatores que induzem a diferença na produção de metabólitos secundários (CARPANEZZI, 2010). Essa afirmação justifica a diferença dos constituintes químicos dos extratos etanólicos de folhas de Nim coletadas na época das águas (NFA) e folhas de Nim coletados na época das secas (NFS).

A coleta em janeiro, época com maiores temperaturas, chuvas, umidade e maior número de horas de luz por dia (Tabela 1), resultou em amostras com maiores teores de azadiractina. As plantas em condições de elevada radiação solar em geral produzem substâncias antioxidantes, como os compostos fenólicos e flavonoides, que agem como protetores contra a incidência de raios ultravioleta, principalmente no verão. É possível que este fator tenha influenciado os teores destes constituintes nas folhas coletadas no verão (GOBBO-NETO, 2007). Além disso, esse período apresenta uma amplitude de regime de luz ocorrendo uma maior absorção luminosa associada a resposta fotossintética da planta, com consequente maior produção de metabólitos secundários, como terpenoides que são sintetizados a partir da acetil CoA ou intermediários glicolíticos (TAIZ, 2004).

De acordo com Ribeiro et al. (2011), a azadiractina foi isolada de folhas de Nim coletadas em épocas diferentes, obtidas de plantas do Cerrado de Minas Gerais. Neste estudo, no período das águas o teor de azadiractina foi superior ao do período de seca. Os autores apontam que esta variação ocorre devido ao ciclo fisiológico da planta e ao déficit hídrico na época de seca, onde foram observadas menores concentrações de azadiractina (RIBEIRO, 2011). Essas informações

corroboram com o presente estudo, demonstrando que a sazonalidade interferiu no teor de azadiractina e nos efeitos biológicos sobre *A. aegypti*, no entanto menores concentrações do extrato de NFA causam efeitos deletérios no inseto semelhantes que as maiores concentrações de NFS.

De maneira geral, sabe-se que as substâncias secundárias possuem enorme diversidade estrutural, mas com distribuição restrita a certas famílias de plantas. Tal diversidade química torna essas substâncias peças fundamentais no processo adaptativo e co-evolutivo dos vegetais. O perfil fitoquímico de uma espécie e, inclusive de indivíduos, pode ser influenciada pelo ambiente a ele associado (DEY, 1997).

Os compostos fenólicos constituem um grupo quimicamente heterogêneo e devido a essa diversidade química apresentam uma variedade de funções nos vegetais, como: suporte mecânico, proteção contra radiação ultravioleta ou alelopatia. Contudo, sua produção está ligada com armazenamento de carbono, variando com o clima e a eficiência fotossintética da planta em cada estação (TAIZ, 2004; GOBBO-NETO, 2007). Com isto os efeitos sazonais como fotoperíodo, intensidade luminosa, temperatura e a pluviosidade interferem na diversidade e quantidades desta classe (GERSHENZON et al., 1997; TAIZ, 2004).

Os flavonoides, compostos fenólicos mais complexos, são conhecidos por suas propriedades antioxidantes e por atuar nos mecanismos de defesa das plantas contra insetos, fungos, vírus e bactérias e desempenham também importante papel de proteção contra os raios UV, os quais são mais intensos no verão (TAIZ, 2004). Logo, sugere que este fator tenha influenciado nos teores destes constituintes nas folhas de *A. indica* coletadas em janeiro, período de maior calor e com maior intensidade luminosa em relação as amostras de agosto.

Os altos níveis de radiação solar interferem também diretamente na produção dos terpenos cuja as reações biossintéticas são dependentes de suprimentos de esqueletos carbônicos, realizados por processos fotossintéticos e de compostos energéticos que participam da regulação dessas reações pela rota do ácido mevalônico e intermediários da glicose (TAIZ, 2004). Assim, no período de maior período de luminosidade no verão e de oferta de água houve interferência na produção dos limonoides em relação ao período de inverno (Tabela 1).

Bioensaio com *A. aegypti*

As concentrações letais obtidas CL₁₀, CL₅₀ e CL₉₀ foram usadas como indicativo de mortalidade para 10, 50 e 90% da população. Entretanto, pode-se observar todos os valores de toxicidade (Tabela 2), na qual a relação mostrou ter 100% de confiabilidade, R=1 para NFA e R=0,998 para NFS.

Tabela 2: Concentração letal (CL) para larvas de *Aedes aegypti* (Culicidae) em diferentes concentrações do extrato etanólico da folha de *Azadirachta indica* (Meliaceae), coletada em época das águas (NFA) e seca (NFS), após 24 h de exposição

Concentração Letal	mg mL ⁻¹	Faixa de Toxicidade (mg mL ⁻¹)
NFA		
CL ₁₀	0,0885	0,057 - 0,113
CL ₅₀	0,1810	0,151 - 0,211
CL ₉₀	0,3700	0,302 - 0,525
NFS		
CL ₁₀	0,0977	0,054 - 0,139
CL ₅₀	0,338	0,285 - 0,517
CL ₉₀	1,4302	0,913 - 3,157

Comparando as concentrações CL₁₀, CL₅₀, CL₉₀ do NFA e NFS observa-se que houve diferença para as mesmas. Pode-se afirmar que o extrato NFA apresentou valores menores de concentrações letais para as dosagens das CL₁₀,

CL₅₀ e CL₉₀, com 0,0885; 0,1810 e 0,3700 mg mL⁻¹ do que os do tratamento NFS que apresentou valores de 0,0977; 0,0338 e 1,4302 mg mL⁻¹, respectivamente. Esses resultados estarão corroborando com os resultados fitoquímicos e espectrais, que demonstra que folhas coletadas na época das chuvas em extrato etanólico provocam maior efeito inseticida em larvas de *A. aegypti* em dosagens menores.

Para determinar o efeito do extrato no desenvolvimento e mortalidade larval e pupal do inseto foram avaliadas as dosagens sub letais, acompanhando o desenvolvimento das larvas sobreviventes (Tabela 3).

Tabela 3: Avaliação de dosagens dos extratos etanólico das folhas de *Azadirachta indica* coletadas em época das águas (NFA) e da seca (NFS), sobre o desenvolvimento e mortalidade de *Aedes aegypti* L. (Culicidae)

Tratamentos	Duração larval (h)	Mortalidade larval (%)	Mortalidade pupal (%)	Adultos formados
Controle	218,16 c*	4	0	96
NFA (mg mL⁻¹)				
1	0	100	0	0
0,500	0	100	0	0
0,250	0	100	0	0
0,125	248,13 a	40	48	33
0,0625	245,67 a	45	50	36
NFS (mg mL⁻¹)				
1	0	100	0	0
0,500	0	100	0	0
0,250	245,33 ab	55	31	31
0,125	270,56 a	40	28	40
0,0625	222,46 bc	33	49	44
CV	19,39			

*Valores seguidos pelas mesmas letras não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,01).

Observou-se que o extrato etanólico de *A. indica*, das folhas coletadas na época das secas ou das águas causaram alongamento do ciclo em relação ao controle (218,16 h), em todas as concentrações sub letais do extrato etanólico de

NFA e nas 0,125 e 0,0625 mg mL⁻¹ do NFA. Sendo que o tratamento NFS 0,0625 mg mL⁻¹ a duração larval não diferiu do controle (Tabela 3).

Assim a duração larval observada após tratamento com extrato de NFA 0,125 e 0,0625 mg mL⁻¹ e NFS 0,250; 0,125 mg mL⁻¹ foram de 248,13; 245,67; 245,33; 270,55 h, respectivamente (Tabela 3), iguais entre si.

No grupo controle observou-se mortalidade larval de 4%, enquanto que para a concentração de 1; 0,500 mg mL⁻¹ nenhuma larva sobreviveu nos dois tipos de extratos, NFA e NFS e na concentração 0,250 mg mL⁻¹ de NFA. Os extratos de folhas coletadas na cheia, NFA, provocaram mortalidade de 100; 40 e 45%, para as dosagens de 0,250; 0,125 e 0,0625 mg mL⁻¹, respectivamente. Taxas de mortalidade larval menores foram observadas como efeito do extrato de folhas obtido da época da época seca, NFS, quando causaram 55; 40 e 33% de mortalidade, respectivamente para as mesmas dosagens citadas (Tabela 3).

Das larvas sobreviventes do grupo controle, nenhuma mortalidade na fase de pupa foi observado, emergindo 96 adultos. Com extrato etanólico de NFA, nas dosagens 0,125 e 0,0625 mg mL⁻¹, 48 e 50% das pupas morreram, com a emergência de 33 e 36 adultos, respectivamente de forma semelhante, resultou a atividade do extrato NFS, onde 31, 28 e 49% das pupas morreram, nas concentrações de 0,250 mg mL⁻¹, 0,125 e 0,0625 mg mL⁻¹, emergindo dessas 31, 40 e 44 adultos.

Observa-se assim, que os extratos etanólicos das folhas de *A. indica* (NFA e NFS) demonstraram atividade larvicida para *A. aegypti*, explicado pela presença de compostos bioativos, como terpenos e glicosídeos cardiotônicos, para ambos os extratos. Ressaltando-se maior intensidade para os flavonoides, para o período de chuva. Destas classes, os terpenóides, marcadores quimiotaxionômicos desta

espécie, tem a azadiractina (tetranortriterpenoide), como o mais potente fitoinseticida (CASER et al., 2007; PETROSKI, 2009) o que justifica também a atividade larvicida contra *A. aegypti*.

Os terpenoides possuem também uma diversidade de estruturas simples até as mais complexas como os limonoides, grupo químico de triterpenos, marcado quimiotaxinômico da espécie em estudo. Este grupo é reconhecido por atuar como fagodeterrente para alguns insetos e para planta exercer importante função de defesa aos herbívoros (GOBBO-NETO, 2007). A eficácia observada no combate das larvas de *A. aegypti* com o extrato etanólico da *A. indica* em diferentes concentrações (1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,062 mg mL⁻¹) pode ser atribuída à solubilidade da *azadiractina* em etanol. Limonóides são compostos polares e a extração empregando etanol e metanol tem demonstrando bom rendimento (DEOTA et al., 2000).

Resultados promissores no controle de *A. aegypti*, já foram descritos para *A. indica* com o extrato aquoso, contudo utilizaram concentrações superiores (4,0 a 8,0 mg mL⁻¹) (CASER et al., 2007) às do presente trabalho. Esse fato é explicado pela baixa afinidade que o solvente extrato, a água, tem com os terpenoides e conseqüentemente exigindo maiores concentrações para o controle. Os autores citam ainda o comprometimento e desenvolvimento do processo larval e na fertilidade dos adultos e ainda a indução da formação de anomalias fisiológicas e celulares em insetos, como observado em nossos estudos para o extrato etanólico.

Os efeitos de ingredientes ativos inseticidas de origem de plantas causam efeitos mortalidade quando submetidos as larvas e demais efeitos deletérios aos sobreviventes ao longo do desenvolvimento, dependendo da dosagem empregada. O aumento na duração da fase larval e mortalidade na fase de pupa podem ser

observados como o efeito da aplicação de inseticidas de plantas, indicando problemas para completar o desenvolvimento, comprometendo assim a formação de adultos, ou mesmo impedindo o aparecimento destes, diminuindo ou eliminando a capacidade reprodutiva.

Produtos a base de Nim indicam vários efeitos deletérios destes em insetos de importância agrícola, explicado pela complexidade de suas moléculas. Dentre os diferentes modos de ação em insetos a azadiractina destaca-se pela mortalidade de jovens e adultos, interferência na síntese do ecdisônio, inibição da biossíntese da quitina, bloqueio da ecdise, inibição do crescimento, deformação de pupas, deformação ou ausência de asas em adultos, redução da fecundidade, e longevidade dos adultos, não reconhecimento pela fêmea do feromônio do macho, não ocorrência de cópula e da comunicação sexual, esterilização, inibição da oviposição, redução na transmissão de viroses (MARTINEZ, 2003).

É possível notar a relevância do emprego *A. indica* como inseticida em prática sustentável de controle de insetos vetores. São de utilização mais segura, pois são biodegradados pela luz e calor, não permanecendo como resíduos tóxicos no ambiente e nos alimentos (MARTINEZ, 2003). Ressalta-se ainda que a planta apresenta comprovada atividade inseticida no controle de pragas agrícolas, além do potencial madeireiro (ROEL et al., 2010).

Os bioensaios utilizando extratos etanólicos obtidos de folhas coletadas na época das águas apresentaram produção maior de azadirachtina. O extrato etanólico de folhas de Nim coletados em ambas as épocas a 1 e 0,5, mg mL⁻¹ provocou mortalidade total das larvas de *A. aegypti*, assim como do extrato da época das águas na concentração de 0,25 mg mL⁻¹. Nas concentrações menores 0,25, 0,125 e 0,062 mg mL⁻¹ os extratos provocam efeitos deletérios com mortalidade

larval e pupal diminuindo a emergência de adultos. O fato comprova que a exploração desta espécie para fins inseticidas deve-se considerar a sazonalidade, pois há maior produção de metabólitos e maior atividade inseticida, na coleta na época das águas.

Referências

CARPANEZZI, A.; NEVES, E. **Balanço dos aspectos técnicos do cultivo do nim no Brasil**. Embrapa Florestas: Santo Antônio de Goiás, Documentos, v. 62, p. 1-12, 2010.

CASER, C. R. S.; CARLOS, G. A.; GAZPERAZZO, W.; CRUZ, Z. M. A.; SILVA, A. G. **Natureza onLine**, p. 519-524, 2007.

DEOTA, P. T.; UPADHYAY, P. R.; PATEL, K. B.; MEHTA, K. J.; KAMATH, B. V.; MEHTA, M. H. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 23, p. 2225-2235, 2000.

DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (Eds.). **Plant biochemistry**. Academicpress: London, p. 387-416, 1997.

DO, Q. D.; ANGKAWIJAYA, A. E.; TRAN-NGUYEN, P. L.; HUYNH, L. H.; SOETAREDJO, F. E.; ISMADJI, S.; JU, Y. H. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, p. 296-302, 2014.

FONTOURA, F. M.; MATIAS, R.; LUDWIG, J.; OLIVEIRA, A. K. M.; BONO, J. A. M.; MARTINS, P. D. F. R. B.; GUEDES, N. M. R. Seasonal effects and antifungal activity from bark chemical constituents of *Sterculia apetala* (Malvaceae) at Pantanal of Miranda, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Amazonica** v. 45, n. 3, p. 283–292, 2015.

GERSHENZON, J.; MCCASKILL, D.; RAJAONARIVONY, J. I.; MIHALIAK, C.; KARP, F.; CROTEAU, R. **Analytical Biochemistry**, v. 200, p. 130-138, 1997.

GHOSH, A.; CHOWDHURY, N.; CHANDRA, G. Plant extracts as potential mosquito larvicides. **Indian Journal of Medical Research**, v. 135, p. 581-598, 2012.

GOBBO-NETO, N.; LOPES, N. P. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, **2007**.

GOVINDACHARI, T. R. Chemical and biological investigations on *Azadirachta indica* (theneemtree). **Current Science-Bangalore**, v. 63, p. 117-117, 1992.

KIKUCHI, T.; ISHII, K.; NOTO, T.; TAKAHASHI, N.; TABATA, K.; SUZUKI, T.; AKIHISA, T. **Journal of Natural Products**, v.74, p. 866-870, 2011.

MARTINEZ, S. **O nim – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. Instituto Agrônômico do Paraná: Londrina, 142 p, 2003.

MARTINEZ, S. S.; MENEGUIM, A. M. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecología**, v. 67, p. 58-62, 2003.

MATOS, F. J. DE A. **Introdução à fitoquímica experimental**. UFC, Ceará, p 257-309, 2009.

MCLAUGHLIN, J. M. **Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation.** In: Hostettmann, K. *Assays for Bioactivity.* Academic Press: San Diego, p. 2-32, 1991.

MOSSINI, S. A. G.; KEMMELMEIER, C. **Acta Farmacéutica Bonaerense** , v. 24, p. 139-148, 2005.

PETROSKI, R. J.; STANLEY, D. W. **Food Chemistry**, v. 57, p. 8171–8179, 2009.

PROMSIRI, S.; NAKSATHIT, A.; KRUATRACHUE, M. M.; THAVARA, U. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, p. 292-295, 2006.

RIBEIRO, P. E. A.; PRATES, H. T.; WAQUIL, J. M.; VIANA, P. A.; GUIMARÃES, D. P.; FORATO, L. A.; PIRES, C. H. P. **Isolamento de Azadiractina de sementes de nim (*Azadirachta indica*) para estudos de concentração na planta e bioensaios como inseticida natural.** In: XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Goiânia, p. 2258-2261, 2011.

ROEL, A. R.; MATIAS, R.; BEDNASKI, A. V.; COSTA, R. B. da; DOURADO, D. M.; PORTO, K. R. A. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 54, p. 505-510, 2010.

SATDIVE, R. K.; FULZELE, D. P.; EAPEN, S. **Journal of Biotechnology**, v. 128, p. 281-289, 2007.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Ministério da Saúde. *Boletim Epidemiológico.* – Ministério da Saúde, Brasília, v. 47, n. 8, p.1-7, 2016.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **Agricultural Research**, 39:3733-3740, 2016, [http://dx.doi: 10.5897/AJAR2016.11522](http://dx.doi.org/10.5897/AJAR2016.11522)

SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G.; LIRA, K. S. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. **Revista de Patologia Tropical**, v. 27, p. 53-63, 1998.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Artmed: Porto Alegre, p. 309-334, 2004.

Capítulo 2

(Artigo submetido a revista: Journal Research)

Análise sazonal do potencial inseticida do Óleo de *Azadirachta indica* A. Juss
(Meliaceae) cultivada em área de Cerrado sobre *Aedes Aegypti* L. (1762) (Culicidae)
e nos teores de azadiractina

Deizeluci de Fátima Pereira Zanella^{a,b*}, Antonia Railda Roel^a, Ligia Aurélio Bezerra Maranhão Mendonça^c, Karla Rejane de Andrade Porto^d, Nathalie Nogueira Pará^c; Renato Zanella^e; Rosemary Matias^f.

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agrícola, Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Campo Grande - MS, Brasil.

^bDepartamento de Química, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), Campus Aquidauana, Aquidauana - MS, Brasil.

^cPrograma de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Campo Grande - MS, Brasil.

^dPrograma de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade do Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande - MS,

^eDepartamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria - RS, Brasil.

^fPrograma de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional, Universidade Anhanguera-Uniderp, Campo Grande, MS.

*Correspondente autor. E-mail: deizelucipz@hotmail.com Tel: 55-067-999283325.
Fax: 55-067-3312-3302.

Conflitos de interesse:

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

Resumo

Conhecimento: No Brasil o *Aedes aegypti* L (Culicidae) é o transmissor da dengue, febre amarela, Chikungunya e vírus Zika, sendo essas arboviroses um grave problema de saúde pública e de difícil controle. O Nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) vem sendo cultivado no Brasil para uso como inseticida e a frutificação ocorre em duas épocas, verão (chuva) e inverno (seca). **Hipótese / Propósito:** Em substituição aos inseticidas sintéticos o uso do óleo de Nim cultivado é uma opção no controle de larvas do mosquito, logo foi avaliado a influência da sazonalidade nos teores de azadiractina dos frutos de Nim de plantas cultivadas no Mato Grosso do Sul, Brasil, e o potencial inseticida sobre *A. aegypti* L. (Culicidae). **Estudo Desenho / Métodos:** O óleo dos frutos de Nim colhido na época da chuva (NOC) e em época da seca (NOS) foram obtidos por extração em aparelho de Soxhlet e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD) e ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) utilizando o padrão de azadiractina. Para os bioensaios de atividade inseticida utilizou-se 100 larvas de *A. Aegypti*, terceiro instar, por tratamento, em quatro repetições, nas concentrações de 1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,062 mg mL⁻¹ dos óleos. Após o período de 24 h determinou-se as concentrações letais (CL) até o final do ciclo. **Resultados:** O constituinte majoritário nas amostras de óleo NOC e NOS e o padrão de azadiractina apresentaram o mesmo tempo de retenção (2,1 min), indicando ser este o principal constituinte. O teor de azadiractina no óleo NOC (8,101 mg kg⁻¹) foi superior ao da amostra de óleo NOS (0,114 mg kg⁻¹). Independente da época de colheita, o óleo de *A. indica*, mostrou-se um eficiente larvicida provocando alteração no desenvolvimento, mortalidade larval e pupal de *A. aegypti*, causando mortalidade total da fase larval nas concentrações de 1,0 a 0,125

mg mL⁻¹. **Conclusão:** o óleo de Nim obtido de plantas cultivadas no Cerrado em diferentes épocas é eficiente inseticida para o controle de *A. aegypti*.

Palavras-chave: Plantas inseticidas, controle de vetores, larvicida natural.

Introdução

O Nim, *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae), desde sua introdução no Brasil em 1986 despertou grande interesse especialmente com relação ao óleo extraído das sementes, o qual tem sido eficaz no controle de insetos e ácaros e ainda por seu potencial fungicida, bactericida e nematocida (MARTINEZ, 2002).

Estudos sobre os constituintes químicos secundários do Nim, evidenciaram mais de 300 compostos isolados das diferentes partes da planta, com destaque para a azadiractina, um tetranortriterpenoide (limonoide). Estes ingredientes ativos são comprovadamente eficientes no combate aos insetos, sendo utilizados com sucesso no controle integrado de pragas agrícolas nos trópicos e zonas temperadas (MARTINEZ, 2002; DELEITO, 2008).

Como inseticida, ao óleo de Nim, de modo geral é atribuído efeito antialimentar, de mortalidade e repelência dos insetos. Por ter função endócrina e neuroendócrina, afeta tanto a biossíntese do hormônio ecdisônio quanto do hormônio juvenil, acarretando alterações no desenvolvimento pós-embriônico, no ciclo reprodutivo dos insetos e anormalidades morfológicas. Por outro lado, possui baixa toxicidade ao homem e aos animais domésticos (MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005; NDIONE et al., 2007; MORGAN, 2009). Essas características são importantes para o controle de vetores de doenças em humanos, como para o *Aedes aegypti* L. (Culicidae). Esse inseto, transmissor do vírus da dengue, febre amarela, Chikungunya e vírus Zika no Brasil, é controlado por inseticidas químicos sintéticos

agressivos ao homem e ao ambiente. Os casos de dengue no território brasileiro ultrapassaram o caráter epidêmico devido a sua ocorrência, com notificações contínuas de casos independentes da estação tornaram-se também problema nacional e internacional, aumentando a necessidade de controlar de forma continuada o seu vetor.

Pesquisas indicam que produtos do Nim tem potencial como inseticida no controle do *A. aegypti*, provocador este de problemas epidemiológicos no Brasil e no mundo (NDIONE, 2007). Apesar de ser uma árvore originada da Índia, onde tem o melhor desenvolvimento sob as condições locais, a planta se adapta facilmente a solos pobres, de baixa precipitação e clima tropical. Em estudos recentes, desenvolvidos no Brasil, relata-se a influência da sazonalidade na concentração de azadiractina em frutos do Nim (RIBEIRO et al., 2011).

Assim, plantas de *A. indica* desenvolvidas no estado do Mato Grosso do Sul, sob condições ambientais diferentes, devem conter diferentes teores de ingredientes ativos, especialmente da azadiractina e conseqüentemente, efeitos distintos no desenvolvimento e mortalidade de *A. aegypti*. Portanto, estudos de atividade e dos metabólitos de plantas produzidas localmente, podem indicar uma alternativa sustentável de controle de um problema da saúde pública. Este método de controle deve ter menor custo e provocar menores efeitos indesejáveis ao ambiente, sendo foto e termodegradáveis.

Com isso, o objetivo do trabalho foi quantificar o óleo da semente de *A. indica* cultivada no Cerrado, como método de controle de *A. aegypti*, analisando os teores de azadiractina e a eficiência de controle dos insetos, relacionados a sazonalidade da coleta dos frutos.

Material e Métodos

Coleta e identificação da espécie vegetal

Os frutos maduros de Nim *A. indica* (Meliaceae) foram coletados de exemplares cultivados em área de Cerrado (20°23'11.25 S / 54°36'18.1 W), no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. Os períodos de coletas foram em janeiro de 2015, época das águas, e setembro de 2015, época de seca (Tabela 1). As amostras foram codificadas como NOA (Nim óleo época das águas) e NOS (Nim óleo época de seca), respectivamente. A identificação do material botânico foi feita pelo Prof. Dr. Arnildo Pott e um exemplar depositado no herbário da Universidade Anhanguera – Uniderp, em Campo Grande - MS, Brasil (registro 8385).

Tabela 1: Dados meteorológicos mensais: temperatura média, precipitação total, umidade média e radiação solar média, Novembro a Janeiro (período chuvoso) e Julho-Setembro (período seca) em 2015, do posto meteorológico do Inmet/Sepaf/Agraer/Cemtec-MS, Campo Grande, MS, Brasil.

Mês de Amostragem 2015	Temperatura Média (°C) (max-min)	Precipitação Total (mm) (max-min)	Humidade (%) (max-min)	Radiação Solar (kJ/m ²) (max-min)
Novembro- Janeiro	25.7 (34.6-18.2)	245.8 (45.0-0.0)	72.1 (95.0-31.0)	1,647.1 (7,919.0-12.4)
Julho- Setembro	25.2 (36.7-10.2)	225.40 (81.6-0.0)	57.61 (96.0-12.0)	1,519.0 (9,860.0-0.8)

Obtenção dos óleos dos frutos de *A. indica*.

As amostras, de cada período, foram selecionadas excluindo os frutos danificados e a secagem ocorreu em estufa com circulação de ar (40 ± 2° C) por 24 h. Em sequência foram moídas em liquidificador industrial.

Do pó dos frutos (casca, polpa e semente), 250 g de cada amostra foram submetidas, separadamente, a extração em aparelho de Soxhlet (MA487/6/250), com 200 mL de uma mistura de hexano/etanol (1:1) por 20 h sequencialmente, a

temperatura de 80° C, seguindo metodologia adaptada de Gómez (1995). O solvente foi reduzido em rota-evaporador a 60° C e o óleo separado da fase hexano/etanol foi armazenado em frasco âmbar, rotulado (Amostra NOA e Amostra NOS) e mantido em geladeira a 4° C ($\pm 2^\circ$ C).

Análise Cromatográfica

Para a identificação e quantificação da azadiractina nas amostras de óleo de Nim NOA e NOS utilizou-se cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS: *ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry*), empregando um cromatógrafo líquido Waters Acquity UPLC™ (Milford, EUA), detector espectrométrico de massas triplo quadrupolo Xevo TQ™, injetor, bomba binária, coluna Waters Acquity UPLC™ BEH C18 (50x2,1 mm d.i., 1,7 μ m de tamanho de partícula) mantida a 40° C e fonte de ionização por eletronebulização (ESI= *electrospray ionization*) no modo positivo. As condições do espectrômetro de massas foram: temperatura da fonte, 150° C; temperatura de dessolvatação 500° C; vazão do gás de dessolvatação 600 L h⁻¹; vazão do gás do cone, 80 L h⁻¹ e vazão do gás de colisão 0,15 mL min⁻¹. O sistema ESI-MS/MS foi operado no modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM, do inglês *selected reaction monitoring*). As transições SRM escolhidas para quantificação e confirmação da azadiractina foram 743 > 725 m/z e 743 > 665 m/z, respectivamente, e a contagem da área para os dois cromatogramas foi de $1,04 \times 10^7$ e azadiractina como padrão (A7430-Sigma-Aldrich).

A separação cromatográfica por UHPLC-MS/MS foi realizada por eluição gradiente com fase móvel (A) água:metanol (98:2, v/v) e (B) metanol, ambas contendo 5 mmol L⁻¹ de formiato de amônio e 0,1% (v/v) de ácido fórmico. O

gradiente iniciou em 5% B (mantendo por 0,25 min), aumentando até atingir 100% B em 1,5 min (mantendo por 1 min), diminuindo para 5% B mantido até 3 min. Empregou-se vazão de $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de 10 μL .

Bioensaios

Para ensaios com *A. aegypti*, larvas do 3º instar foram obtidas de colônias permanentes, criadas em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ \text{C}$) e alimentadas com ração para gatos triturada segundo descrito por de SILVA et al. (1998). Os adultos foram alimentados com solução açucarada (8%) e as fêmeas submetidas em três repastos semanais, com pombo, durante 90 min. Para eclosão dos ovos foi utilizado 1,5 L com água desclorada, com pH ajustado entre 6,5 e 7,0 pela adição de hidrogenocarbonato de sódio (NaHCO_3).

As soluções dos óleos dos frutos NOA e NOS, solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO), foram dissolvidas em água, para obter a concentração de 1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,062 mg mL^{-1} . Em recipientes de vidro foi adicionado 25 mL de cada uma dessas soluções com 25 larvas, considerada uma unidade experimental. Todos os experimentos foram acompanhados de uma série controle positivo contendo água desclorada. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento e 25 larvas por repetição, totalizando 100 larvas por tratamento.

Os parâmetros observados foram: duração da fase larval, mortalidade larval e pupal. Para os dados de duração das fases larval foram agrupados em horas e foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA de uma via e o pós-teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para comparação das médias no programa Assistat 7.7beta® INPI 0004051-2 (SILVA e AZEVEDO, 2016).

Resultados

De acordo com a análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e MS (CLAE) o óleo obtido dos frutos do Nim colhido na época das águas (NOA) e do obtido da época da seca (NOS) e o padrão de azadiractina apresentaram o mesmo tempo de retenção (2,1 min), sendo o constituinte majoritário nas amostras.

Com base nestes dados pode-se apontar que independente das épocas de colheita dos frutos as amostras possuem o mesmo marcador quimitaxinômico, a azadiractina (Figura 1). Contudo, na quantificação o óleo obtido do NOA apresentou maior concentração de azadiractina ($8,101 \text{ mg kg}^{-1}$) em relação ao obtido do NOS = $0,114 \text{ mg kg}^{-1}$).

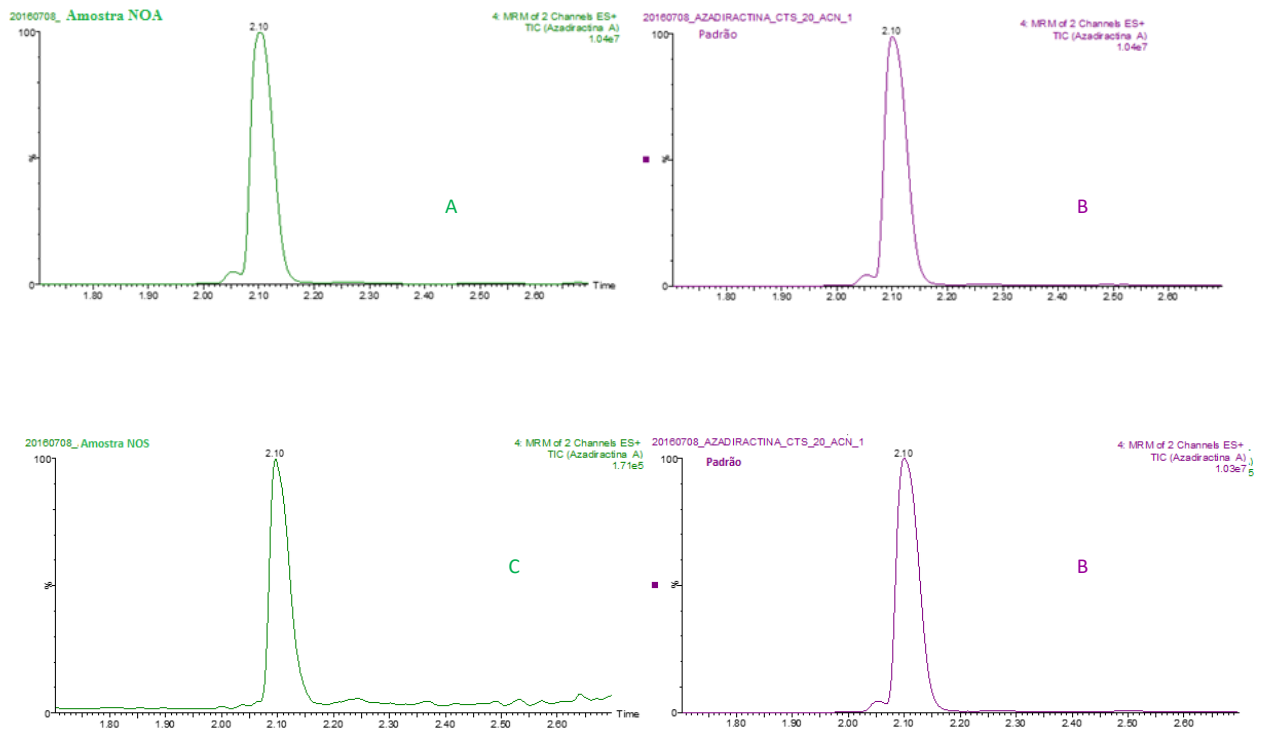


Figura 1: Cromatogramas obtido por UHPLC-MS/MS (A) do composto majoritário azadiractina no óleo NOA (período das águas); (B) do padrão de azadiractina e (C) do composto majoritário azadiractina do óleo NOS (período de seca).

Quando comparados os dados químicos com os dados meteorológicos, constata-se que no período das águas, considerado de chuva para a região de Campo Grande-MS, a precipitação pluviométrica foi de 159,8 mm, a temperatura média 25,2° C, a umidade relativa 74,06% e a luminosidade 14 horas de fotofase. No período de seca a precipitação pluviométrica foi de 45,4 mm, com temperatura média de 23,7 °C, umidade relativa de 56,5% e luminosidade de 10 h de fotofase (Tabela 1). Dentre os fatores abióticos que influenciam na diversidade e quantidade de metabólitos secundários está a sazonalidade (GOBBO NETO e LOPES, 2007).

Estes dados são importantes quando se utiliza extratos e/ou óleos de plantas para fins comerciais. Em se tratando de *A. indica*, uma planta asiática introduzida e cultivada em diferentes regiões do Brasil e especificamente em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, nota-se que a sazonalidade interfere na concentração de azadiractina, com maiores teores nas amostras de óleo do Nim, dos frutos colhidos em período de chuva (NOA= água) em relação ao período de seca (NOS= seca).

As amostras avaliadas não apresentaram mortalidade em 24 h de exposição, como determina o protocolo de determinação de Concentração Letal. Justificado pela ação de produtos de origem vegetal podem não se manifestar nesse período, mas em períodos mais longos. Entretanto, o óleo das sementes nas concentrações de 1; 0,5; 0,25; 0,125 mg mL⁻¹ dos frutos colhidos na época seca ou das chuvas provocou mortalidade larval total (Tabela 2).

Tabela2. Avaliação de dosagens do óleo das sementes do Nim, coletados em período chuva (NOA) e período de seca (NOS), sobre o desenvolvimento e mortalidade larval e pupal de *Aedes aegypti* L. (Culicidae).

Tratamentos mg mL ⁻¹	Duração larval (horas)	Mortalidade larval (%)	Mortalidade pupal (%)	Adultos formados (%)
NOA				
Testemunha	218,16a	0	4	96
1,000	-	100	-	-
0,500	-	100	-	-
0,250	-	100	-	-
0,125	-	100	-	-
0,0625	200,00a	88	100	-
NOS				
1,000	-	100	-	-
0,500	-	100	-	-
0,250	-	100	-	-
0,125	-	100	-	-
0,0625	205,50a	84	100	-
CV = 16,27				

Como resultado da exposição do produto na concentração de 0,0625 mg mL⁻¹ de frutos colhidos em ambos os períodos as larvas sobreviveram, onde o período larval foi semelhante ao do controle (218,16 h), com valores de 200,00 para NOA e 205,50 dias para NOS. As taxas de mortalidade larval na concentração de 0,0625 mg mL⁻¹ nas coletas de NOA e NOS foram 88 e 84%, respectivamente.

Das pupas formadas, 12 e 16 nos tratamentos NOA e NOS, na menor concentração (0,0625 mg mL⁻¹), nenhuma sobreviveu. Enquanto no controle, todas as larvas sobreviveram e somente quatro pupas morreram, resultando, portanto em 96 adultos emergidos.

Devido a complexidade da sua molécula ativa, especialmente azadiractina, o óleo do Nim de acordo com Martinez e Van Endem (2000), possui diferentes modos de ação em insetos como na mortalidade de jovens e adultos, interferência na síntese do ecdisônio, inibição da biossíntese da quitina, bloqueio da ecdise, inibição do crescimento, deformação de pupas, deformação ou ausência de asas em adultos, redução da fecundidade e longevidade dos adultos, não reconhecimento do

feromônio sexual, não ocorrência de cópula e da comunicação sexual, esterilização, inibição da oviposição e redução na transmissão de viroses.

A mortalidade na fase jovem, larva e pupa, pode ser justificada também por Anuradha et al. (2007), que constataram que a azadiractina induz a despolimerização da actina, causando severos defeitos na organização do citoesqueleto e conseqüentemente a morte. Além disso, Yu (2008) aponta que a azadiractina atua na inibição da síntese e liberação de hormônios ecdisteróides, levando a ecdise incompleta em insetos.

Outros pontos a serem abordados diz respeito à saúde humana e na segurança ambiental. Wan et al. (1996), destaca que a azadiractina é considerada de baixíssima toxicidade para mamíferos (ratos DL_{50} aguda é $> 5000 \text{ mg kg}^{-1}$), peixes e polinizadores. Visto que é rapidamente degradada pela luz solar e degradação microbiana, não é resistente em condições ambientais (THOMPSON, 2007).

Demonstra-se, portanto, o potencial inseticida sobre *A. aegypti* do óleo de Nim produzido no estado do Mato Grosso do Sul, em qualquer época de coleta dos frutos. Podendo contribuir, portanto, para o controle de transmissor da dengue de forma sustentável e mais segura ao ambiente.

Conclusões

O óleo de Nim, obtido dos frutos de plantas cultivadas no Cerrado, no período das águas possuem teores de azadiractina superiores ao período de seca.

Contudo, independente da época de colheita dos frutos mostrou-se um eficiente larvicida provocando alteração no desenvolvimento, mortalidade larval e pupal de *A. aegypti*, causando mortalidade total da fase larval nas concentrações de 1,0 a $0,125 \text{ mg mL}^{-1}$.

Referências

ANURADHA, A.; ANNDURAI, R.; SHAHIDHRA, L. S. Actin Cytoeskeleton as a putative target the nem limonoid azadirachtina. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, p. 627-634, 2007.

DELEITO, C. S. R.; BORJA, G. E. M. Neem (*Azadirachta indica*): an alternative for controlling flies associated with a neen al breeding. **Pesquisa Veterinária Brasileira** **28**. Nº6. Rio de Janeiro, 2008.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374, 2007.

MARTINEZ, S. M.; VAN ENDEM, H. F. Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* caused by azadirachtin. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.30, p.113-125, 2001.

MARTINEZ, S. S. **O Neem - *Azadirachta indica* Natureza, Usos Múltiplos**, Produção. Londrina, IAPAR, 142 p, 2002.

MAULDIN, R. E.; JOHNSTON, J. J.; RIEKENA, C. A. An improved method for analysis of cholecalciferol-treated baits. **Journal-AOAC International**, v. 82, p. 792-798, 1999.

MOSSINI, S. A. G.; KEMMELMEIR, C. A árvore Neem (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos usos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, p. 139-48, 2005.

MORGAN, E. D. Azadirachtin, a scientific gold mine. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 4096-4105, 2009.

NDIONE, R. D.; FAYE, O.; NDIAYE, M.; DIEYE, A.; AFOUTOU, J. M. Toxic effects of neem products (*Azadirachta indica* A. Juss) on *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 larvae. **African Journal of Biotechnology**, v.6, n.24, p.2846-2854, 2007.

RIBEIRO, P. E. A.; PRATES, H. T.; WAQUIL, J. M.; VIANA, P. A.; GUIMARÃES, D. P.; FORATO, L. A.; PIRES, C. H. P. Isolamento de Azadiractina de sementes de neem (*Azadirachta indica*) para estudos de concentração na planta e bioensaios como inseticida natural. In: XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Goiânia, p. 2258-2261, 2011.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **Agricultural Research**, 39:3733-3740, 2016, <http://dx.doi: 10.5897/AJAR2016.11522>

SILVA, H. H. G; SILVA I. G; LIRA, K. S. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. **Revista de Patologia Tropical**, v. 27, p. 51-63, 1998.

THOMPSON, D. G.; KREUTZWEISER, D. P. A review of the environmental fate and effects of natural "reduced risk" pesticides in Canada. Crop Protection Products for Organic Agriculture: Environmental, Health and Efficacy Assessment; Felsot, A. S., Racke, K. D., Eds.; **American Chemical Society**: Washington, DC, p. 245-274, 2007.

YU, S. J. **The toxicology and biochemistry of insecticides**. Boca Raton, CRC Press, 276p, 2008.

WAN, M. T.; WATTS, R. G.; ISMAN, M. B.; STRUB, R. An evaluation of the acute toxicity to juvenile Pacific northwest salmon of azadirachtin, neem extract and neem-based products. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 56, p.432–39, 1996.

CAPÍTULO 3

Atividade Inseticida do extrato etanólico de folhas e caule de *Trichilia pallida* Sw.

(Meliaceae) sobre *Aedes aegypti* L. (1762) (Culicidae)

Deizeluci de Fátima Pereira Zanella^{a,b*}, Antonia Railda Roel^a, Ligia Aurélio Bezerra Maranhão Mendonça^c, Karla Rejane de Andrade Porto^d, Nathalie Nogueira Pará^c; Renato Zanella^e; Rosemary Matias^f.

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agrícola, Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Campo Grande - MS, Brasil.

^bDepartamento de Química, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), Campus Aquidauana, Aquidauana - MS, Brasil.

^cPrograma de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Campo Grande - MS, Brasil.

^dPrograma de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade do Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande - MS,

^eDepartamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria - RS, Brasil.

^fPrograma de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional, Universidade Anhanguera-Uniderp, Campo Grande, MS.

* Correspondente autor. E-mail: deizelucipz@hotmail.com Tel: 55-067-999283325.

Fax: 55-067-3312-3302.

Resumo

No Brasil muitas espécies vegetais têm potencial inseticida, em especial algumas da família Meliaceae, como *Trichilia pallida*, conhecida como “baga-de-morcego” e “catiguá”. Objetivou-se avaliar o potencial inseticida dos caules e folhas de *T. pallida*, coletadas em Campo Grande – MS sobre *Aedes aegypti* e determinar os constituintes químicos, os quais foram submetidos a análise fitoquímica clássica e instrumental (CLAE) e determinado os teores de flavonoides e compostos fenólicos. Para os bioensaios foram utilizados 25 larvas de *A. aegypti* de terceiro estágio, nas concentrações de 1,0, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,062 mg mL⁻¹, com quatro repetições por tratamento. O efeito inseticida dos extratos e do grupo controle foi avaliado a cada 24 h até o final do ciclo biológico. As análises fitoquímicas demonstraram como grupos químicos prevalentes nos dois extratos os compostos fenólicos. Sendo observados em maior intensidade nos caules os compostos fenólicos, taninos e flavonoides. Nas folhas predominaram além dos compostos fenólicos, os glicosídeos. Constatou-se efeito larvicida no extrato do caule e observou-se interferência no ciclo biológico em todas as concentrações na emergência de adultos. Na concentração de 1 mg mL⁻¹ provocou mortalidade total e não resultou em nenhum adulto e nas concentrações de 0,5, 0,250, 0,125 e 0,0625 mg mL⁻¹ observou-se alongamento no ciclo biológico em relação a testemunha e mortalidade de 52, 42, 30 e 28 % das larvas. Em relação ao extrato das folhas ocorreu uma leve interferência no ciclo biológico em todas as concentrações, observou um alongamento do ciclo biológico nas concentrações de 0,5, 0,250 e 0,125 mg mL⁻¹ em relação a testemunha, indicando efeitos deletérios no ciclo biológico, com mortalidade abaixo de 60 %.

Palavras-chave: Controle de vetores, dengue, extratos vegetais, fitoinsenticidas, ciclo biológico, compostos fenólicos.

1. Introdução

A Dengue, Chikungunya e o vírus Zika, são doenças arbovirais e transmitidas por um único vetor denominado *Aedes aegypti*, pertencente à família Flaviviridae. É visto como um mosquito de ordem doméstica, antropofílico, possui atividade hematofágica diurna (BRAGA et al., 2007; SARMENTO et al., 2016).

Entre os principais métodos de controle deste vetor estão os inseticidas sintéticos, tais como organofosfatos e carbamatos. Porém, o uso contínuo destes produtos leva ao desenvolvimento de espécies de insetos resistentes e compromete na biodiversidade encontrada nos ecossistemas (BEZERRA et al., 2007; KOOU, 2014).

Os efeitos deletérios dos inseticidas sintéticos no ambiente e nos organismos não alvos têm despertado a busca de larvicidas alternativos, como os metabólitos secundários derivados de plantas (GARCEZ et al., 2013, BEZERRA-SILVA et al., 2015).

Muitas plantas do Cerrado brasileiro, tem potencial como inseticida, como espécies do gênero *Trichilia*, pertencente a família Meliaceae, rica em metabólitos secundários. Da Cunha et al. (2005) e Roel e Vendramim (2006) em estudos com *Trichilia pallida* apontaram que os extratos orgânicos e aquosos dessa planta apresentaram efeitos inseticidas em larvas de algumas espécies de lepidópteros, tais como *Spodoptera frugiperda* e *Tuta absoluta*. Da mesma forma, Baldin et al. (2007) relataram que os extratos aquosos de ramos e folhas desta causaram

elevada mortalidade para ninfas de *Bemisia tabaci* em tomateiro em casa de vegetação.

Considerando o potencial inseticida das espécies de Meliaceae e a necessidade de se encontrar opções de controle do *A. aegypti* objetivou-se avaliar o efeito inseticida dos extratos etanólicos dos caules e das folhas de *T. pallida* no ciclo biológico do *A. aegypti* assim como determinar os constituintes químicos dos extratos etanólicos dos caules e folhas.

2. Material e Métodos

As folhas e caules de *T. pallida* foram coletadas em área de Cerrado na CEPAER/AGRAER (20°25' 09.78" S / 54°40' 11.75" W), no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. A coleta ocorreu em agosto de 2014, a exsicata foi identificada pelo Dr. Arnildo Pott (Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil) e depositada no herbário da Universidade - Anhanguera Uniderp (Nº. 8386).

Caules e folhas de *T. pallida* (1000 g de cada) foram selecionados, higienizados e submetidos, separadamente, à secagem em estufa com circulação de ar à temperatura de $45 \pm 2^\circ$ C. O material desidratado após trituração em moinho elétrico, foi submetidos à extração por percolação com etanol por sete dias consecutivos. Os extratos etanólicos dos caules e das folhas foram obtidos após evaporação do solvente em rota evaporador sob pressão reduzida.

Análise fitoquímica Clássica

Os extratos etanólicos dos caules e das folhas foram dissolvidos em etanol (20%) e submetidos à análise fitoquímica clássica, por meio de uma série de

reações de caracterização para: compostos fenólicos (reação de precipitação com cloreto férrico), naftoquinona (reação ácido/base), flavonoides (reação de cianidina e ácido sulfúrico), taninos (reação com sais de ferro, precipitação de proteínas), cumarinas (KOH/luz ultravioleta), triterpenos e esteroides (reação de Liebermann-Burchard), heterosídeos cardiotônicos (teste de Baljet e teste de Kedde), saponinas (reação de Lieberman-Buchard) e açúcares redutores (reação de Benedict) (Harborne, 1998; Matos, 2009).

As análises foram executadas com três repetições e os resultados comparados e contrastados observando a alteração de cor e precipitação com os extratos etanólicos. As intensidades foram classificadas como parcial ($\pm = 10\%$), baixa ($+ = 25\%$), mediamente moderada ($++ = 50\%$), moderado ($\pm++ = 75\%$) e alta intensidade ($+++ = 100\%$), além de negativa ($- = 0\%$) (Fountoura et al., 2015).

Determinação de compostos fenólicos e flavonoides

Para quantificar os fenóis totais (FT) o extrato etanólico foi analisado pelo Método Folin-Ciocalteu, com ácido gálico (10 a 350 mg mL^{-1}) como padrão ($y = 0,781 x - 0,0031$; $R^2 = 0,9959$); e os flavonoides (F), foram avaliados pelo método de cloreto de alumínio e como padrão a quercetina ($y = 0,0088x - 0,0015$; $R^2 = 0,988$), para construir a curva de calibração (Doe et al., 2014). Os dados de quantificação de compostos fenólicos e flavonoides foram analisados utilizando método de comparação entre médias, por meio do teste Tukey a 5% de probabilidade.

Análise Espectrofotometria UV/visível e Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para confirmar os constituintes majoritários do extrato etanólico em espectro de UV-visível (FEMTO[®], 800XI) utilizou-se de uma alíquota de 10 mg mL⁻¹ das amostras dissolvidas em metanol (HPLC/Merck). Os espectros de absorção foram determinados na faixa de comprimento de onda 190 a 750 nm e as bandas de absorção comparadas com a literatura (Silverstein & Webster, 2014).

O segundo método de caracterização, ocorreu com o extrato etanólico em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando um cromatógrafo líquido da Shimadzu SCL-10AVP[®] ajustado para as faixas de 220 nm e equipado com bomba LC 10AD; detector por varredura de espectro ao ultravioleta DAD SPD M10A. A coluna cromatográfica utilizada foi a RP-18 (20 mm x 4,6 ID) da Merck[®] e pré-coluna RP-18 (250 mm x 4,6 ID, 5 µm). As fases móveis eram compostas pelos seguintes solventes: (A) acetonitrila e (B) água mili Q acidificada pH 3,5 (ácido acético glacial). Para a detecção dos compostos polares foi considerada a seguinte programação: acetonitrila - 10% (0 min), 90% (80 min) e 10% (90 min) e para compostos apolares H₂O - 90% (0 min), 10% (80 min) e 90% (90 min) com um fluxo de 1,0 mL/minuto da amostra, considerando uma temperatura de 40° C. A análise dos espectros foi realizada com base em dados da literatura de Marston (2007).

Bioensaio com *Aedes aegypti*

As larvas utilizadas foram criadas e mantidas no Laboratório de Entomologia da UCDB, oriundas das colônias permanentes e alimentadas com ração para gatos triturada, de acordo com metodologia de Silva (1998).

Os bioensaios foram estabelecidos a partir de larvas do 3º instar que foram submetidas à exposição nas soluções dos extratos etanólicos de *T. pallida* solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO), nas concentrações de 1,0, 0,5, 0,25,

0,125 e 0,062 mg mL⁻¹. Cada unidade experimental constou de 25 larvas, em quatro repetições, com 25ml no meio líquido. Todos os experimentos foram acompanhados de uma série de controle positivo contendo água desclorada. Os parâmetros estabelecidos nos bioensaios foram: duração da fase larval, mortalidade larval e pupal, em leitura feita a cada período de 24 horas da exposição.

Para os dados de duração das fases (larval e pupal) foram agrupados em horas e foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA e o teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para comparação das médias no programa Assistat 7.7 beta[®] INPI 0004051-2 (SILVA E AZEVEDO, 2016).

3. Resultados

Prospecção Fitoquímica

Os extratos etanólicos dos caules e das folhas de *T. pallida* apresentaram perfis semelhantes para algumas classes de metabólitos, como os compostos fenólicos, taninos, flavonoides, triterpenos, esteróides, glicosídeos cardiotônicos e açúcares redutores, exceto para cumarinas (25%) e saponinas (50%) detectadas apenas nas folhas (Figura 1).

O solvente extrator forneceu maior número de classes de metabólitos secundários (9 classes) para as folhas em relação aos caules (7 classes). Contudo, em ambos os extratos foram detectados com a mesma intensidade os compostos fenólicos (100%), os triterpenos, esteroides e açúcares redutores com uma frequência de 50%. O taninos e flavonoides foram superiores para os caules, com frequência de 100% e 75% e para as folhas a frequência foi de 50% para as duas classes. Já os glicosídeos cardiotônicos apresentaram maior frequência nas folhas (100%).

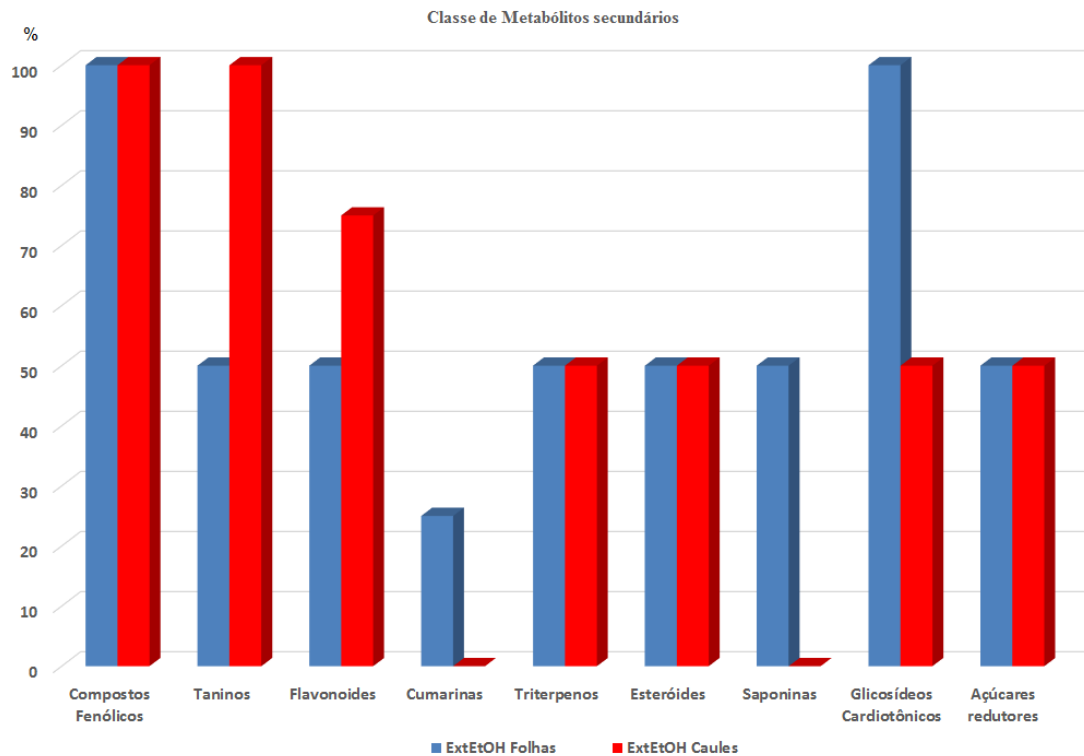


Figura 1. Frequência dos metabólitos secundários encontrados nos extratos etanólicos das folhas e caules de *Trichilia pallida*.

A confirmação dos constituintes majoritários nos extratos etanólicos de caules e folhas de *T. pallida* ocorreu por varredura em UV-visível e revelou bandas de absorção máxima ($\lambda_{\text{máxj. MeOH}}$) entre 250 e 330 nm e 260 e 350 nm, respectivamente para as folhas e caules, correspondente aos flavonoides e as bandas 280 e 290 nm aos compostos fenólicos. Os teores de fenóis totais no extrato etanólico dos caules foi de $424,39 \pm 0,05 \pm 0,03$ mg de equivalentes de ácido gálico e superiores aos valores obtidos para as folhas ($140,27 \pm 0,03$ mg). Os flavonoides seguiu o mesmo perfil (Tabela 1).

Tabela 1: Quantificação de fenóis totais e flavonoides dos extratos etanólicos das folhas e caules de *Trichilia pallida*

<i>Trichilia pallida</i>	Fenóis totais (mg GAE g ⁻¹)	Flavonoides totais (mg QE g ⁻¹)	UVvisível (λ _{max})
Folha	140,27 ± 0,03	75,25 ± 0,06	290 nm 260 e 350 nm
Caule	424,39 ± 0,05	111,36 ± 0,01	280 nm, 250 e 330 nm

A banda de absorção máxima λ_{máx}.MeOH em 220 nm em geral é característica de triterpenoides, correspondem ao anel limonoides, comum na família Mileaceae e detectados nas folhas e caules em HPLC (Figura 2 e 3). Em ambos cromatogramas é evidenciado nos tempos de retenção em 21,4 e 20,6 constituintes majoritários característicos de triterpenoides.

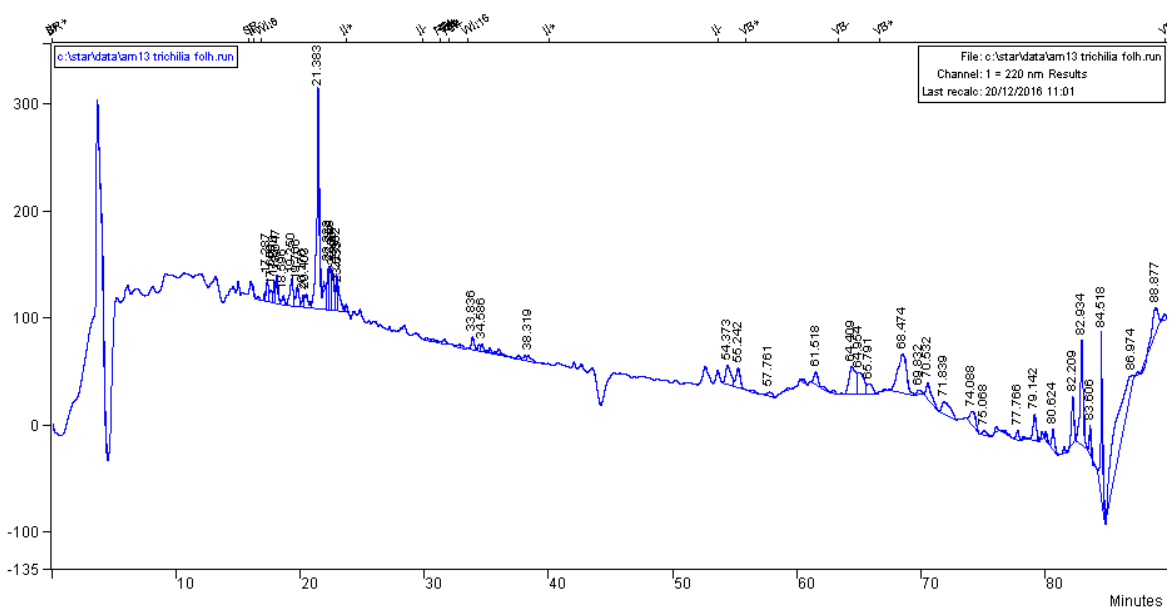


Figura 2. Cromatograma obtido por HPLC-DAD para os compostos majoritários do extrato etanólico das folhas *Trichilia pallida*, Campo Grande, 2015.

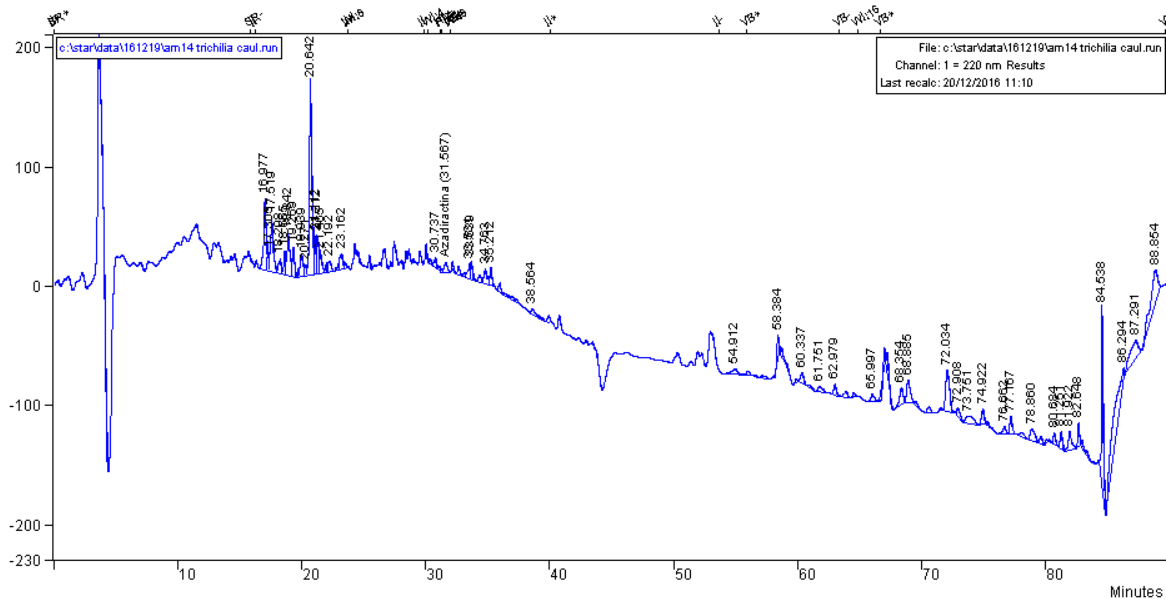


Figura 3. Cromatograma obtido por HPLC-DAD para os compostos majoritários do extrato etanólico dos caules *Trichilia pallida*, Campo Grande, 2015.

Ensaio com *Aedes aegypti*

Os extratos dos caules e das folhas não proporcionaram cálculo de Concentrações Letais (CL) nas concentrações testadas, com mortalidade larval inferior a 50% após 24 horas de exposição.

O extrato etanólico do caule de *T. pallida*, em tratamento de larvas do 3^o instar provocou alongamento da duração larval para as concentrações de 0,125 e 0,625 mg mL⁻¹, com valores de 329,08 e 339,72 horas, iguais entre si e diferentes das demais concentrações e da testemunha (222,30 horas). As concentrações menores de 0,5 e 0,25 mg mL⁻¹ demonstraram ser iguais entre si com períodos de 285,50 e 295,20 horas. Com tudo a exposição do produto na maior concentração (1 mg mL⁻¹) ocorreu uma mortalidade de 100 % das larvas (Tabela 2).

De acordo com a concentração letal determinada, o extrato etanólico do caule não se mostrou eficiente 24 horas após exposição. Entretanto o efeito de plantas inseticidas nem sempre causa mortalidade imediata, como ocorre normalmente com

inseticidas químicos sintéticos. Quando se observa a mortalidade no final da fase, a mortalidade larval nos tratamentos foi de 52, 42, 30 e 28%, respectivamente para as dosagens 0,5, 0,25, 0,125 e 0,625 mg mL⁻¹, enquanto no grupo controle foi de 4%. E somente na concentração de 1 mg mL⁻¹ observou-se mortalidade total de larvas (Tabela 2).

Em relação a fase pupal, enquanto no grupo testemunha nenhuma pupa morreu, nos tratamentos 0,5, 0,25, 0,125 e 0,625 mg mL⁻¹ causaram mortalidade de 48, 58, 70 e 72%, respectivamente. Resultando, portanto na formação de 35, 26, 20, 20 e 96 adultos nas concentrações 0,5, 0,25, 0,125 e 0,625 mg mL⁻¹ e na testemunha, respectivamente.

O efeito deletério no desenvolvimento e mortalidade de *A. aegypti* causada pela exposição do extrato etanólico de folhas de *T. pallida* foi menor que o observado no extrato do caule, assemelhando-se apenas na concentração de 1 mg mL⁻¹, onde houve a mortalidade total das larvas.

Sobre o efeito de extrato etanólico de folhas de *T. pallida* no desenvolvimento de *A. aegypti* observou-se que somente a menor concentração as larvas tiveram dificuldades em completar o desenvolvimento. Com durações larvais de 307,73 horas na concentração de 0,625 mg mL⁻¹, diferente ao controle, com 222,30 horas. Enquanto nas demais concentrações 0,5, 0,250 e 0,125 mg mL⁻¹ provocaram um pequeno efeito no desenvolvimento larval, com durações de 269, 92, 278,00 e 289, 18 horas iguais entre si e diferentes do controle (222,30 horas). Enquanto que na concentração de 1 mg mL⁻¹ do extrato etanólico de *T. pallida* provocou mortalidade total das larvas (Tabela 2).

Tabela 2 – Efeito dos Extratos etanólicos dos caules e folhas de *Trichila pallida* no desenvolvimento e mortalidade de *Aedes aegypti* (Culicidae).

Tratamentos mg mL ⁻¹	Duração larval (horas)	Mortalidade larval (%)	Mortalidade pupal (%)	Mortalidade total (%)	Adultos formados (%)
Folha					
Testemunha	222,30a	4	0		96
1	0	100	0	100	0
0,5	269,92b	63	40	60	40
0,25	278,00b	52	40	63	37
0,125	289,18b	39	61	60	40
0,0625	307,73c	25	75	63	37
Caule					
1	0	100	0	100	0
0,5	285,50b	52	48	65	35
0,25	295,20b	42	58	74	26
0,125	329,08c	30	70	80	20
0,0625	339,72c	28	72	80	20
CV = 32,02					

O aumento da duração larval nas concentrações de 0,5 e 0,25 mg mL⁻¹, mostrou seu efeito deletério na mortalidade larval de 63 e 52%, enquanto no controle somente 4% larvas não conseguiram completar o desenvolvimento. Nas demais concentrações de 0,125 e 0,625 mg mL⁻¹ provocaram menor mortalidade larval, com 39 e 25 %, respectivamente (Tabela 2).

Para todas as concentrações do extrato etanólico de folhas de *T. pallida* submetida a larvas, observou-se uma mortalidade na fase de pupa, com 40% nas concentrações de 0,5 e 0,25 mg mL⁻¹, e 61 % na concentração 125 µg mL⁻¹. Enquanto no grupo controle e nenhuma pupa morreu, na concentração de 0,625 mg mL⁻¹ observou mortalidade de 75% das pupas. Resultando, portanto, em mortalidade total de 60, 63, 60 e 63% nas concentrações 0,5, 0,25, 0,125 e 0,625 mg mL⁻¹ respectivamente. Enquanto no grupo controle a mortalidade total foi de 4%. Com

consequente formação de 40, 37, 40 e 37 adultos, nas concentrações 0,5, 0,25, 0,125 e 0,625 mg mL⁻¹ respectivamente e 96 adultos no grupo controle (Tabela 2).

4. Discussão

As classes de metabólitos secundários evidenciados nos extratos etanólicos de caules e folhas de *T. pallida* (Figura 1), também foram descritas para exemplares nativos em outras regiões do Brasil, principalmente os liminoides ou tetra-nor-triterpenos, evidenciados no espectro de HPLC. Esse grupo geralmente representa o nível máximo na sequência de produção de terpenoides em plantas, que normalmente não são atacadas por insetos (Viegas Júnior, 2003).

Especificamente, os triterpeno e esteroides foram isolados da fração diclorometano das folhas de *T. pallida* e liminoide e a esses constituintes aos triterpenoides e liminoides foi atribuído além da atividade inseticida sobre lagartas de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), o esteroide isolado promoveu o desenvolvimento larval e reduziu a sobrevivência larval, mas não afetou a duração, a sobrevivência e o peso de pupas de *T. absoluta* (Cunha et al., 2008). Já em nossos estudos os extratos etanólicos influenciaram no desenvolvimento e no número de adultos de *A. aegypti* formados, principalmente nas maiores concentrações. Esses resultados indicam que o efeito deletério dos constituintes detectados nestes extratos favoreceu a ação inseticida, além do solvente extrator.

No caso, do etanol, um solvente polar, tem a capacidade de extrair substâncias com características polares como os glicosídeos cardiotônicos e apolares como os esteroides e triterpenos. Roel et al. (2000) ao investigarem a atividade tóxica de diferentes extratos obtidos das folhas e ramos de *T. pallida* sobre *Spodoptera frugiperda*, constataram entre os solventes testados (metanol, acetona,

acetato de etila e hexano) o mais ativo foi o acetado de etila, solvente de média polaridade. Para o extrato aquoso de folhas e ramos de *T. pallida*, os ramos foram os mais efetivos seguido das folhas sobre a Mosca branca *Bemisia tabaci* (Genn.) Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) (Souza e Vendramim, 2001). Resultados estes também evidenciado neste estudo, onde o extrato etanólico dos caules foram mais eficazes do que das folhas.

Já é conhecido e explorado em inúmeros trabalhos a variação dos metabólitos secundários no efeito de uma planta inseticida em função da estrutura vegetal utilizada para o preparo de extratos, por estes fitoinseticidas não estarem distribuídos uniformemente por toda a planta (TAIZ e ZEIGER, 2004), além do solvente extrator e tempo de extração (LAPORNIK et al., 2005).

Reconhecidamente, as plantas da família Meliaceae são investigadas por conter substâncias com inúmeras atividades inseticidas e dentre os fitoinseticidas destaca-se, como já mencionado, os limonóides (CASTILLO-SÁNCHEZ et al., 2010). Porém, neste estudo dentre as classes de metabólicos secundários investigadas estão como maior frequência nos dois extratos os compostos fenólicos, os taninos, flavonoides e seus derivados.

Rocha (2004), também isolou e identificou pela primeira vez a substância lupeol (triterpeno) e identificou a substância gedunina em *T. pallida* e relacionou essas substâncias com a atividade inseticida da planta.

Os compostos fenólicos possuem uma absorção máxima em 280 nm, banda indicativa de absorção de sistemas aromáticos com substituintes hidroxilas. Os flavonoides, por serem grupos aromáticos mais condensados absorvem em dois comprimentos de onda (HARBORNE e WILLIAMS, 2000), uma banda intensa entre 250 a 280 nm, correspondente à absorção do anel A (hemicetal) e uma segunda

banda em 360 a 390 nm representando o anel B do flavonoide (SILVERSTEIN et al., 2014), bandas evidenciadas nos extratos investigados (Tabela 1).

Os ensaios fitoquímicos com *Trichilia catigua* Adr. Juss (Meliaceae) indicaram a presença de alcaloides, taninos, óleos aromáticos, saponinas, terpenos, esteroides, resinas gordas, triterpenos (ácido beénico, lupeol) e flavonoides (BABY et al., 2007). Já para *Trichilia hirta* foram detectados nas folhas e cascas do caule as mesmas classes de metabólitos secundários de nossos estudos (SOSA et al., 2011).

Kamdem et al. (2013) através de HPLC-DAD revelaram a presença de compostos fenólicos (ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeico e ácidos elágicos), flavonoides (quercetina, isoquercetina e rutina) e taninos (catequina) no extrato etanólico da casca do caule de *T. catigua*. Esses dados vêm corroborar com os relatos do presente estudo nos extratos etanólicos dos caules e folhas de *T. pallida*. Em relação ao doseamento, foram encontrados dados apenas das cascas de *T. catigua*, os valores da concentração de fenóis totais ficou em 75,9 mg g⁻¹ (RABELO et al., 2013), teores inferiores aos encontrados para os caules da espécie em estudo.

Os flavonoides, são conhecidos por sua atividade antioxidante, já nos insetos, agem como inibidores de alimentação e interferem na reprodução podendo estimular a oviposição (HARBORNE E GRAYER, 1994; MUSAYIMANA et al., 2001; SIMMONDS, 2001). O conteúdo de flavonoides e compostos fenólicos relatados nas folhas de *Trichilia silvatica* podem ter promovido a inibição do crescimento de insetos.

De acordo com Boiça et al. (2005) a mortalidade larval de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) foi analisada pelos extratos aquosos dos caules de *T.*

pallida causando 100% de mortalidade das larvas, enquanto os extratos das folhas resultou em 93,8% de mortalidade.

Em estudo feito com outro inseto, *Spodoptera frugiperda*, Borgoni & Vendramim (2003) mostraram que o extrato aquoso dos caules de *T. pallida* causou 40% de mortalidade e redução de peso (1,0 mg por lagarta).

5. Conclusão

Os extratos etanólicos dos caules e folhas de *T. pallida* tem potencial inseticida causando mortalidade total na concentração de 1 mg mL⁻¹ sobre *A. aegypti*. Estes extratos possuem metabólitos secundários, como compostos fenólicos, flavonoides, taninos e triterpenos, os quais são eficientes como inseticida.

6. Referências Bibliográficas

BABY, A. R.; MIGLIATO, K. F.; MACIEL, C. P. M.; ZAGUE, V.; PINTO, C. A. S. DE O.; SALGADO, H. R. N.; KANEKO, T. M., VELASCO, M, V, R. Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsions containing the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Bentham. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 43, n. 3, p. 405 – 412, 2007.

BALDIN, E. L. L.; VENDRAMIM, J. D.; LOURENÇÃO, A. L. Interaction between resistant tomato genotypes and plant extracts on *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B. **Scientia Agricola**, v. 64, n. 5, p. 476-481, 2007.

BEZERRA FILHO, J. G.; KERR, L. R. F. S.; MINÁ, D. D. L.; & BARRETO, M. L. Distribuição espacial da taxa de mortalidade infantil e principais determinantes no

Ceará, Brasil, no período 2000-2002. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, n.5, p. 1173-85, 2007.

BEZERRA-SILVA, P. C.; SANTOS, J. C.; SANTOS, G. K. N.; DUTRA, K. A.; SANTANA, A. L. B. D.; MARANHÃO, C. A. Extract of *Bowdichia virgilioides* and *maackiain* as larvicidal agent against *Aedes aegypti* mosquito. **Experimental Parasitology**, v. 153, p. 160-164, 2015.

BHATT, S.; GETHING, P. W.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; FARLOW, A. W.; MOYES, C. L.; DRAKE, J. M.; BROWNSTEIN, J. S.; HOEN, A. G.; SANKOH, O.; MYERS, M. F.; GEORGE, D. B.; JAENISCH, T.; G. R. WINT, W.; SIMMONS, C. P.; SCOTT, T. W.; FARRAR, J. J.; HAY, S. I. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504-507, 2013.

BOIÇA JUNIOR, A. L.; MEDEIROS, C. A. M.; TORRES, A. L.; CHAGAS FILHO, N. R. Efeito de extratos aquosos de plantas no desenvolvimento de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) em couve. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 1, p. 45-50, 2005.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: insecticides: mechanisms of action and resistance. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, 179-293, 2007.

CASTILLO, L. E.; JIMÉNEZ, J. J.; DELGADO, M. A. Secondary metabolites of the Annonaceae, Solanaceae and Meliaceae families used as biological control of insects. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 12, n. 3, p. 445-462, 2010.

CHÁVEZ, J.; VARGAS, J.; VARGAS, F. Resistência a deltametrina em dos poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) del Perú. **Revista Peruana de Biología**, v. 12, p. 161-164, 2005.

CUNHA, U.S. Da.; VENDRAMIM, J.D.; ROCHA, W.C.; VIEIRA, P.C. Potencial de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) como fonte de substâncias com atividade inseticida sobre a traça-dotomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Neotropical Entomology**. v. 34, p. 667-674, 2005.

DO, Q. D.; ANGKAWIJAYA, A. E.; TRAN-NGUYEN, P. L.; HUYNH, L. H.; SOETAREDJO, F. E.; ISMADJI, S.; JU, Y. H. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. **J. Food and Drug Ana**, v. 22, p. 296-302, 2014.

FONTOURA, F. M.; MATIAS, R.; LUDWIG, J.; OLIVEIRA, A. K. M.; BONO, J. A. M.; MARTINS, P. D. F. R. B.; GUEDES, N. M. R. Seasonal effects and antifungal activity from bark chemical constituents of *Sterculia apetala* (Malvaceae) at Pantanal of Miranda, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 45, n. 3, p. 283–292, 2015.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; SILVA, L. M. G. E.; SARMENTO, U. C. Substâncias de origem vegetal com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n.3, p. 363-93, 2013.

HARBORNE, A. B. *Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis*. 3rd. Chapman and Hall, London, UK: Springer Science & Business Media. 1998.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, 481–504, 2000.

ISMAN, M. B; GRIENESEN, M. L. Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v.1, p. 1-6, 2013.

KAMDEM, J. P.; OLALEKAN, E. O.; HASSAN, W.; KADE, I. J.; YETUNDE, O.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; SOUZA, D. O.; ROCHA, J. B. T. *Trichilia catigua* (Catuaba) bark extract exerts neuroprotection against oxidative stress induced by different neurotoxic agents in rat hippocampal slices. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 625 – 632, 2013.

KOOU, S. Y. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae) from Singapore. **Journal of Medical Entomology**, v. 51, p. 170-81, 2014.

LAPORNIK, B.; PROŠEK, M.; WONDRA, A. G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of food engineering**, v. 71, n. 2, p. 214-222, 2005.

MARSTON, A. Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. **Phytochemistry**, Irlanda, v. 68, n. 22/24, p. 2785 - 2797, 2007.

MATOS, J. F. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 3 ed. Fortaleza: UFC, 2009.

MUSABYIMANA, T.; SAXENA, R. C.; KAIRU, E. W.; OGOL, C. P. K. O.; KHAN, Z. R. Effects of neem seed derivatives on behavioral and physiological responses of the *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 94, n. 2, p. 449-454, 2001.

RABELO, D. S.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Quantification of total phenols present in the bark of *Trichilia catigua* A. Juss (Meliaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 230-236, 2013.

ROCHA, W. C. **Busca de substâncias bioativas em plantas amazônicas: *Adiscanthus fusciflorus* (Rutaceae), *Trichilia pallida* e *T. rubra* (Meliaceae)**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos – São Paulo, 243 p, 2004.

RODRÍGUEZ, H. C.; VENDRAMIM, J.D. Toxicidade de extratos aquosos de Meliaceae em *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Manejo Integrado de Pragas**, v. 42, p. 14-22, 1996.

ROEL, A. R., Vendramim, J. D. Residual effect of ethyl acetate extract of *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) for *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797)(Lepidoptera: Noctuidae) larvae of diferents ages. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1049-1054, 2006.

ROEL, A.R.; VENDRAMIM, J.D. Desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) em genótipos de milho tratados com extrato acetato de etila de *Trichilia pallida*(Swartz). **Scientia Agricola**, v. 56, p. 581-586, 1999.

SARMENTO, U. C.; MIGUITA, C. H.; ALMEIDA, L. H. D. O.; GABAN, C. R. G.; SILVA, L. M. G. E. D.; SOUZA, A. S. D.; GAERCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R. Larvicidal efficacies of plants from Midwestern Brazil: melianodiol from *Guarea kunthiana* as a potential biopesticide against *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 7, p. 469-474, 2016.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **Agricultural Research**, v. 39, p. 3733-3740, 2016.

SILVA, H. H.G.; SILVA, I. G.; OLIVEIRA, C. L. N. S.; ELIAS, C. N. Adaptação do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em criadouros artificiais com água poluída. **Entomologia y vectores**, v.6, p. 383-391, 1998.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J.; BRYCE, D. L. **Spectrometric identification of organic compounds**. John Wiley & Sons. 2014.

SIMMONDS, M. S. J. Importance of flavonoids in insect–plant interactions: Feeding and oviposition. **Phytochemistry**, v. 56, n. 3, p. 245-252, 2001.

SOSA, E. H.; CASTEJON, Y. M.; DUHARTE, A. B.; PORTUONDO, D.; TAMAYO, V.; QUEVEDO, H. J. M.; MANRIQUE, C. E. M. M. Leukocyte-Stimulating Effect and

Phytochemical Screening of *Trichilia hirta* Extracts. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n.9, p. 1057–1059, 2011.

SOUZA, A.P.; VENDRAMIM, J. D. Efeito de extratos aquosos de meliáceas sobre *Bemisia tabaci* biótipo B em tomateiro. **Bragantia**, v. 59, p. 173-179, 2000a.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Artmed: Porto Alegre, 309-334. Reference to a chapter in an edited book, 2004.

THOMAZINI, A.P.B.W., VENDRAMIM, J.D.; LOPES, M.T.R.L. Extratos aquosos de *Trichilia pallida* e a traçado-tomateiro. **Scientia Agricola**, v. 57, p. 13-17, 2000.