

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Metabólitos secundários e atividade tóxica de *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e *Artemia salina* (Crustacea: Artemiidae)

Autora: Nathalie Nogueira Paré
Orientadora: 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 BIOTECNOLOGIA

Metabólitos secundários e atividade tóxica de *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e *Artemia salina* (Crustacea: Artemiidae)

Autora: Nathalie Nogueira Paré
Orientadora: Prof^a Dr^a Antonia Railda Roel
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Rosemary Matias

"Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde"

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
2017



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
Inspira o futuro

**Metabólitos Secundários e Atividade Tóxica de *Simarouba versicolor*
(Simaroubaceae) sobre *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) e
Artemia salina (Crustaceae: Artemiidae)**

Autora: Nathalie Nogueira Paré
Orientadora: Profa. Dra. Antonia Railda Roel
Coorientadora: Profa. Dra. Rosemary Matias

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia
Área de concentração: Biotecnologia.

APROVADA em 14 de março de 2017.

Profa. Dra. Antonia Railda Roel – UCDB
(orientadora)

Profa. Dra. Rosemary Matias – UNIDERP
(coorientadora)

Prof. Dr. Lucas de Castro Torres – UCDB

Prof. Dr. Ademir Kleber Morbeck de Oliveira – UNIDERP

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

P227m Paré, Nathalie Nogueira
Metabólitos secundários e atividade tóxica de *Simarouba versicolor*
(*Simaroubaceae*) sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e *Artemia*
salina (Crustacea: Artemiidae) / Nathalie Nogueira Paré; orientadora
Antonia Railda Roel; coorientadora Rosemary Matias -- 2017
61 f.

Dissertação (mestrado em biotecnologia) – Universidade Católica
Dom Bosco, Campo Grande, 2017.
Inclui bibliografias.

1. Controle de vetores 2. Simaroubaceae 3. Plantas inseticidas
4. Inseticida botânico I. Roel, Antonia Railda II. Matias, Rosemary
III. Título.

CDD: 583.77

O Saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.

Cora Coralina

Aos meus pais e irmão, pelo apoio fundamental para que eu cumprisse
mais essa etapa de minha vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, por todas as bênçãos concedidas durante esta etapa da minha vida, por me iluminar, dar força e sabedoria nos momentos de dúvidas, fraquezas e dificuldades.

À minha família, meus pais e irmão, pelo apoio, compreensão e confiança sempre, sem eles eu não chegaria aonde cheguei, pois em meio às dificuldades que passei sempre estiveram ao meu lado me incentivando a não desistir.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Antonia Railda Roel, pela oportunidade concedida e pelos ensinamentos valiosos.

À Prof.^a Dra. Rosemary Matias, por aceitar a me coorientar, pela ajuda e disponibilidade de tempo e ensinamento.

À Prof.^a Dra. Karla Rejane de Andrade Porto, pelo grande incentivo antes mesmo de eu decidir entrar no mestrado, pelos ensinamentos e auxílios durante a execução nos experimentos em laboratório e pela disponibilidade em sempre me ajudar.

As minhas amigas, Prof^a MSc. Marla Miranda e Deize Zanella, as quais tive o privilégio de conhecer nesse período, serei eternamente grata por terem sido luz quando eu enxergava escuridão, por toda paciência e pelas ajudas nas horas de imensas dúvidas e desespero. Amizade esta para toda vida.

Agradeço à Universidade Católica Dom Bosco e ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia pelo ensino de qualidade oferecido.

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

Aos amigos do mestrado especialmente Ricardo Peruca, Priscilla Motti e Mateus Falco, pelos momentos agradáveis que juntos passamos.

Aos técnicos de laboratório do setor de Biosaúde da UCDB, por sempre ajudar com paciência e dedicação quando precisei.

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

Meus agradecimentos.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Nathalie Nogueira Paré, filha de Oswaldo Fraiha Paré e Roseli Nogueira Paré, nasceu em Campo Grande, Mato Grosso do Sul em 17 de Setembro de 1985. Concluiu a graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura, pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campus de Aquidauana, no ano de 2007.

Atualmente é mestranda em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco, UCDB.

SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii

	PÁGINA
1. INTRODUÇÃO	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	3
2.1 Inseticidas botânicos no controle de insetos.....	3
2.2. A Família Simaroubaceae e <i>Simarouba versicolor</i>	5
2.2.1 Estudos de bioprospecção com <i>Simarouba versicolor</i>	6
2.3. Ocorrência, Morfologia e aspectos biológicos de <i>Aedes aegypti</i>	7
2.3.1. As doenças transmitidas por <i>Aedes aegypti</i>	10
2.4. Toxicidade frente <i>Artemia salina</i>	11
3. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo Geral.....	13
3.2 Objetivos Específicos.....	13
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14

CAPÍTULO 1	PÁGINA
Perfil químico e atividade inseticida do extrato etanólico de folhas e caule de <i>Simarouba versicolor</i> (Simaroubaceae) sobre <i>Aedes aegypti</i> L. (1762) (Culicidae) e <i>Artemia salina</i> L. (Crustaceae:Artemiidae).....	24
RESUMO.....	24
INTRODUÇÃO	25
MATERIAL E MÉTODOS	27

Coleta do Material Vegetal.....	27
Obtenção dos Extratos de <i>S. versicolor</i>	27
Estudos Fitoquímicos	27
Determinação do pH, Condutividade Elétrica e Sólidos Dissolvidos	28
Ensaio Biológico com <i>Artemia aegypti</i>	28
Bioensaio com <i>Aedes salina</i>	29
RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
Estudos Fitoquímicos	29
Ensaio com <i>Aedes aegypti</i>	33
Ensaio com <i>Artemia salina</i>	38
CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. <i>Simarouba versicolor</i> (Simaroubaceae) (A) Folhas (B) Frutos.....	6
Figura 2. Ciclo de Vida do <i>Aedes aegypti</i>	8
Figura 3. Ovo de <i>Aedes aegypti</i>	9
Figura 4. Larvas adultas de <i>Aedes aegypti</i>	9
Figura 5. Pupa de <i>Aedes aegypti</i>	10
Figura 6. Ilustração de um mosquito adulto fêmea de <i>Aedes aegypti</i>	10
Figura 7. Náupilos de <i>Artemia salina</i> (Artemiidae)	12

CAPÍTULO 1

PÁGINA

Fig. 1. Frequência dos metabólitos secundários encontrados no extrato etanólico das folhas e caules de <i>Simarouba versicolor</i> . Negativo (- = ausência), parcial (\pm = 10%), baixa (+ = 25%), parcialmente moderado ($\pm\pm$ = 50%), moderado ($\pm\pm\pm$ = 75%) e alta intensidade ($\pm\pm\pm$ = 100%)	30
Fig. 2 Espectro de absorção do extrato etanólico das folhas e cascas de <i>Simarouba versicolor</i> , varredura entre 100 e 780 nm.....	31
Fig. 3 Efeitos das concentrações letais do extrato do caule de <i>Simarouba versicolor</i> (Simaroubaceae) sobre <i>Aedes aegypti</i> (Culicidae)	34
Fig. 4 Concentrações Letais em $\mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato etanólico dos caules de <i>Simarouba versicolor</i> sobre náupilos de <i>Artemia salina</i> , após exposição de 24horas	39
Fig. 5 Concentrações Letais em $\mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato etanólico das folhas de <i>Simarouba versicolor</i> sobre náupilos de <i>Artemia salina</i> , após exposição de 24horas	40

LISTA DE TABELAS

CÁPITULO 1	PÁGINA
Tabela 1 Cromatografia em Camada Delgada, Fator de Retenção do extrato etanólico das folhas e caules de <i>Simarouba versicolor</i>	31
Tabela 2 Efeito do extrato etanólico de caule de <i>Simarouba versicolor</i> (Simaroubaceae) no desenvolvimento e mortalidade de <i>Aedes aegypti</i> (Culicidae). Temperatura 26 ±2 °C e fotofase de 14 horas	35
Tabela 3 Efeito do extrato etanólico de folhas de <i>Simarouba versicolor</i> (Simaroubaceae) no desenvolvimento e mortalidade de <i>Aedes aegypti</i> (Culicidae). Temperatura 26 ±2 °C e fotofase de 14 horas	36
Tabela 4 Concentração letal para naúpilos de <i>Artemia salina</i> em diferentes concentrações do extrato etanólico da folha e caule de <i>Simarouba versicolor</i> , após 24 horas de exposição	39

RESUMO

Metabólitos secundários são compostos produzidos por plantas que desempenham funções de defesa química contra herbívoros, resultado do processo de evolução de alguns grupos vegetais. Estas substâncias podem causar diferentes efeitos aos insetos herbívoros tais como, repelência, deterrência, atraso na maturação do desenvolvimento fisiológico, baixa fertilidade e fecundidade, e morte. Por esta ação química específica algumas plantas são empregadas popularmente como inseticidas, como *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae), espécie nativa do Cerrado. Assim objetivou-se estudar a composição química dos extratos etanólicos das folhas e caules e o seu potencial inseticida no controle de *Aedes aegypti* (Dip.: Culicidae) e na toxicidade em *Artemia salina* (Crustacea: Artemiidae). Os estudos sobre classe dos compostos químicos foram feitos por fitoquímica clássica, Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e Ultravioleta (UV). A CCD e os espectros de UV confirmam a presença de compostos fenólicos, flavonoides, triterpenos, cumarinas, esteroides e alcaloides, com teor de fenóis totais superior nos caules ($199,1 \pm 0,34 \text{ mg g}^{-1}$ ácido gálico) em relação as folhas ($78,34 \pm 0,08 \text{ mg g}^{-1}$ ácido gálico), com o mesmo perfil ocorreram para os teores de flavonoides. O extrato etanólico de folhas causou um alongamento no ciclo biológico do *A. aegypti* nas concentrações de 1000 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em relação a testemunha, enquanto que o de caule, na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, não resultou em adultos formados. Quanto a toxicidade frente à *A. salina*, os valores atribuídos a concentração letal (CL_{50}) da população foi em 0,11 e 0,141 mg mL^{-1} para os extratos do caule e da folha, respectivamente. Conclui-se que o extrato etanólico do caule de *S. versicolor* tem ação inseticida para *A. aegypti* nas concentrações de 1000 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e moderada toxicidade para *A. salina* o que indica que esta planta possuiu potencial para uso com fitoinseticida.

Palavras-chave: toxicidade, controle de vetores, inseticida botânico, substâncias secundárias de plantas.

ABSTRACT

Secondary metabolites are compounds produced by plants that perform chemical defense functions against herbivores, a result of the evolution process of some plant groups. These substances can cause different effects to herbivorous insects such as repellency, deterrence, delay in maturation of physiological development, low fertility and fecundity, and death. Due to this specific chemical action some plants are popularly used as insecticides, such as *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae), a native species of the Cerrado. The objective of this paper is to study the chemical composition of the ethanolic extracts of *Simarouba versicolor*'s leaves and stem, its effects on repelling *Aedes aegypti* mosquitoes (Dip. : Culicidae) and toxicity in *Artemia salina* (Crustacea: Artemiidae). Class studies of the chemical compounds were made by classical phytochemistry, thin layer chromatography (TLC) and ultraviolet (UV). TLC and UV spectra confirm the presence of phenolic compounds, flavonoids, triterpenes, coumarins, steroids and alkaloids, with a higher total phenol content in the stems (199.1 ± 0.34 mg g⁻¹ gallic acid) than Leaves (78.34 ± 0.08 mg g⁻¹ gallic acid), with the same profile occurred for the flavonoid contents. Ethanol from leaves caused an increase in the biological cycle of *A. aegypti* at concentrations of 1000 and 500 µg mL⁻¹ compared to control, while stem at 1000 µg mL⁻¹ concentration did not result in adults formed. As for toxicity to *A. salina*, the values assigned to the lethal concentration (LC₅₀) of the population were 0.11 and 0.141 mg mL⁻¹ for stem and leaf extracts, respectively. It is concluded that the ethanolic extract of the stem of *S. versicolor* has insecticidal action for *A. aegypti* at concentrations of 1000 and 500 µg mL⁻¹ and moderate toxicity to *A. salina* indicating that this plant has potential for use with phyto-sticide.

Key words: toxicity, vector control, botanical insecticides, secondary plant substances,

1. INTRODUÇÃO

Os insetos ocupam diversas posições na cadeia alimentar, consumindo plantas, outros insetos, sangue de vertebrados, pólen, cadáveres, fungos, entre outros. Podem ser considerados benéficos quando prestam serviços como polinizadores, inimigos naturais de diferentes pragas, decompositores e ainda produtores de alimentos, tal como o mel. Porém em outras situações, como os hematófagos transmitem doenças em animais e humanos, sendo descritos como vetores de doenças.

Destaca-se nesta situação *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae), transmissor de viroses tais como a Dengue, Zika, Chikungunya e febre amarela urbana, doenças que podem levar a morte. O crescente aumento da população deste vetor e da propagação dessas viroses, se deve a uma combinação de fatores tais como o aumento da urbanização, migração, viagens internacionais, aumento da temperatura global e a dificuldade de controle do vetor nestes ambientes.

O controle de *A. aegypti* envolve vários métodos integrados, desde campanhas educacionais e eliminação de criadouros até o controle químico de larvas e adultos, com produtos químicos sintéticos. Contudo, o uso contínuo destes produtos apresenta efeitos indesejáveis, como acumulação no solo e na água, devido a degradação lenta, comprometendo o ambiente e permitindo o aparecimento de populações resistentes.

Com a crescente preocupação com a saúde humana e a preservação ambiental, pesquisas vegetais têm aumentado, pois estes apresentam constituintes químicos de metabolismo secundário que atuam nos insetos, agindo como inibidores de crescimento, no período de desenvolvimento até a emergência de adultos, na fecundidade e fertilidade dos ovos. Também podem apresentar atividade deterrente, quando sua ação ocasiona distúrbio nos mecanismos sensoriais do inseto, impedindo ou diminuindo sua alimentação, podendo ocasionar a morte por inanição. Muitas espécies de plantas possuem moléculas ativas utilizadas como inseticida na

cultura popular, como a espécie nativa brasileira *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae) (LORENZI, 1998).

Conhecer os constituintes químicos de determinada espécie é importante para correlacionar as informações de uso popular e o resultado do estudo dos efeitos das classes de compostos e assim contribuir para a avaliação da viabilidade destes. Para se avaliar seus efeitos tóxicos no ambiente os testes de toxicidade sobre bioindicadores são realizados, entre os ensaios já estabelecidos está o teste de letalidade com o microcrustáceo *Artemia salina* Leach. (Crustaceae: Artemiidae), muito utilizado por sua praticidade.

Dessa forma, buscou-se, por meio desta pesquisa, determinar os compostos químicos secundários do extrato etanólico das folhas e do caule de *S. versicolor* e avaliar seu potencial inseticida e toxicidade, por meio de bioensaios sobre *A. aegypti* e toxicidade frente *A. salina*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Inseticidas botânicos no controle de insetos

O uso de inseticidas botânicos visando o controle de pragas ocorre desde os primórdios da humanidade, já citados na Índia, a 2.000 a.C. No Egito, no tempo dos Faraós e também na China, por volta do ano de 1.200 a.C., inseticidas derivados de plantas já eram utilizados para controle de pragas em grãos armazenados, e aplicados diretamente na cultura destes (MOREIRA et al., 2005). O século XVI foi marcado pelo uso expressivo de inseticidas naturais pelos europeus, com a finalidade de proteger o cultivo de produtos hortifrutigranjeiros contra pragas e vetores de doenças (KIM et al., 2003, MENEZES, 2005).

Contudo, no período pós-guerra, a utilização dos inseticidas naturais foi reduzida, abrindo espaço para a inserção daqueles cuja origem baseava-se em substâncias organo-sintéticas (FLINT; VAN DEN BOSCH, 1981; CASIDA; QUISTAD, 1998; THACKER, 2002). Com isso, a utilização de produtos naturais, especialmente até a década de 1940, foi reduzida com surgimento dos inseticidas sintéticos, representados pelo DDT (diclorodifenil-tricloroetano) (SAITO; LUCHINI, 1998). Em 1942, esses compostos passaram a ser usados em grande escala e de forma indiscriminada, gerando inúmeras consequências ambientais, tais como a contaminação do ar, água, solo e alimentos e também em alguns casos intoxicação de pessoas (VENDRAMIM; SCAMPINI, 1997).

Em função das pressões da população e de reuniões internacionais, pesquisas científicas buscam novas formas de controle, no sentido de minimizar o efeito dos impactos dos inseticidas sintéticos no ambiente e na saúde humana. Como uma alternativa viável de controle, os estudos com os inseticidas botânicos voltam a ser objetivo de estudo de pesquisadores, na busca de ingredientes ativos com propriedade inseticida, os quais são compostos resultantes do metabolismo secundário das plantas (KIM et al., 2003).

O metabolismo vegetal gera produtos denominados metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários, como os carboidratos, lipídeos, aminoácidos, nucleotídeos, etc; possuem funções vitais ao organismo; os secundários são derivados do metabolismo primário e têm ação biológica que garante vantagens adaptativas e estão restritos a determinados grupos vegetais (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Dentre os compostos secundários, destacam-se os alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais (BARRETO, 2005) e sua produção ocorre em diferentes órgãos e/ou partes das plantas, como raízes, folhas, flores e frutos. Sua concentração nos tecidos também depende de variados fatores, tais como temperatura, luminosidade, pluviosidade entre outros (MACÍAS, 2007; BORELLA et al., 2010). Algumas plantas desenvolvem a sua própria defesa química contra insetos herbívoros, sintetizando metabólitos secundários com propriedades inseticidas. Os princípios ativos poderão ser obtidos a partir de material vegetal, os quais são moídos até serem reduzidos a pó, onde através de vários processos químicos utilizando solventes orgânicos ou água na obtenção de extratos (MENEZES, 2005). Estes extratos contendo compostos químicos ativos em quantidade suficiente podem produzir efeitos, alterando o mecanismo dos insetos como: toxicidade, repelência e modificador comportamental (ARNASON et al., 1990; BELL et al., 1990). Há, também, os inseticidas que atuam como agente antialimentar, impedindo que os insetos iniciem a alimentação, causando morte por inanição. Dependendo da concentração de extrato utilizada podem reduzir a viabilidade de ovos, ninfas, larvas e pupas. A redução do número de ovos e a inibição da oviposição são importantes sobre a reprodução dos insetos (COSTA et al., 2004, MENEZES, 2005).

Inseticidas botânicos à base de plantas, tais como os óleos de andiroba, citronela, eucalipto, assim como o extrato de alho, rotenona e especificamente o nim (*Azadirachta indica*) 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).

Thomazini (2000) e Souza; Vendramim (2000a) realizaram estudos com a finalidade inseticida com extratos aquosos de ramos e folhas de *Trichilia pallida* (Meliaceae) sobre o desenvolvimento de *Tuta absoluta* e mosca-branca *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B, criada em tomateiro.

Quanto às vantagens e desvantagens da utilização dos inseticidas botânicos, Cloyd (2004) aponta como vantagem a rápida degradação no ambiente (sobretudo em condições alta luminosidade, umidade e chuva). Em mamíferos, podem apresentar uma baixa toxicidade (DL_{50}) e geralmente são seletivos, causando menores danos a insetos e ácaros benéficos, principalmente devido ao seu baixo efeito residual. No que se refere às desvantagens, a rápida degradação pode exigir muitas aplicações para se obter o controle satisfatório da praga.

2.2.A Família Simaroubaceae e *Simarouba versicolor*

A família Simaroubaceae é composta por 32 gêneros em 200 espécies entre arbustos e árvores, distribuídas em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo (VIEIRA, 1995). As espécies dessa família possuem uma classe de substância (quassinóides) que as distinguem, por ter sabor amargo, encontrado principalmente em seu córtex. Essa classe se tornou um marcador taxonômico das Simaroubaceae juntamente com os alcaloides (PENAFLORES et al., 2009). Provavelmente é a presença de quassinóides que confere as atividades farmacológicas atribuídas a algumas plantas desta família.

Simarouba versicolor é uma espécie semidecídua, heliófita e xerófita, característica de Cerrados e Caatinga. É encontrada desde o Nordeste até o Estado de São Paulo e em algumas áreas de Mato Grosso do Sul e Pará (MESQUITA, 1997; LORENZI, 1998). Segundo Mesquita (1997), é conhecida popularmente como Caraíba, Mata-cachorro, Mata-menino, Páparauba, Paraíba, Pau-caixeta, Pauparaiba, Pe-de-perdiz, Perdiz, Pitombeira-de-marajo e Simarouba-do-Brasil. No Pantanal sul-mato-grossense, é conhecida por “perna de perdiz” e no Cerrado, por “estraquinina”, conforme mencionado por pecuaristas da região (LEMOS, 2012).

É árvore de porte regular, podendo atingir 11 metros, com copa arredondada, tronco curto e cilíndrico, de casca grossa, esbranquiçada, esponjosa, fibrosa e fissurada longitudinalmente, de 30 a 60 cm de diâmetro. Suas folhas são alternas, compostas pinadas, com raque de 8 a 16 cm de comprimento, sobre pecíolo de 4 a 6 cm (Figura 1). Os folíolos são alternos, discolors, em número de 5 a 7, curto - peciolulados, com a nervura central bem visível em ambas as faces, de 3 a 9 cm de comprimento por 1,5 a 3,0 cm de largura, com a face superior glabra. Sua inflorescência é em panículas terminais compostas, de 25 a 35 cm de comprimento,

e o fruto drupa ovalada, de polpa carnososa, com uma semente (LORENZI, 1998) (Figura 1).

Por ser raramente pastejada, acredita-se que seja tóxica no Pantanal (POTT; POTT, 1994). A madeira é considerada leve, com densidade de $0,48 \text{ g/cm}^3$, porosa, de baixa resistência mecânica, porém, resistente ao ataque de cupins de madeira seca (LORENZI, 1998).

Segundo Fernandes et al. (2004) os frutos e a casca são usados como anti-helmíntico e a infusão da casca tem efeito antipeçonhento.



Figura 1. *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae) (A) Folhas. (B) Frutos.

Fonte: Foto Minas Verde Florestal (2016).

2.2.1 Estudos de bioprospecção com *Simarouba versicolor*

Alguns estudos com extratos de *Simarouba versicolor* indicam sua ação como inseticida, no combate a triatomíneos (COELHO et al., 2006), na inibição da enzima acetilcolinesterase (CARVALHO, 2008) e na atividade antitumoral (GHOSH et al., 1977).

De extratos de raízes, talos, folhas, frutos, caule e galhos foram isoladas diversas substâncias como quassinoides, alcaloides, triterpenoides, esteróis, cumarinas e flavonoides (ARRIAGA et al., 2002; SIMOTE, 2006). Destas substâncias, sabe-se que suas atividades biológicas estão relacionadas à ação antileucêmica (POLONSKY, 1985), amebicida (ALMEIDA et al., 2007), inseticida (ARRIAGA et al., 2002), antimalárica (O'NEILL et al., 1988), anti-inflamatória (RAJIC et al., 2000) e imunossupressora (HOULT; PAYÁ, 1986).

Mesquita (1997), através de análise cromatográfica dos extratos clorofórmico e acetato de etila, retirados do lenho de *S. versicolor*, fez o isolamento de dois

quassinóides, excelsina e 11-acetato-amarolídio, sendo que a excelsina foi isolada pela primeira vez neste gênero.

Arriaga et al. (2002), a partir das raízes, galhos e frutos desta planta, isolaram através dos extratos hexânico, clorofórmico, acetato de etila e metanólico, os quassinoides e triterpenoides e uma mistura de esteroides, além do flavonoide canferol e derivados esqualênicos.

O efeito do extrato aquoso e etanólico da planta foram avaliados por Pires (2006), na atividade reprodutiva “*in vitro*” dos carrapatos *Rhipicephalus* (*boophilus*) *microplus* e *sanguineus*, com inibição em 100% da ovipostura e eclosão dos ovos de teleóginas imersas entre 10 a 60 minutos nos extratos; ambos provocaram a morte das larvas após seis horas de contato.

2.3. Ocorrência, morfologia e aspectos biológicos de *Aedes aegypti*

O Brasil apresenta inúmeras particularidades e peculiaridades em relação ao clima e geografia, por se localizar em uma região tropical, fato este que permite a proliferação de inúmeros artrópodes, alguns considerados pragas urbanas, agrícolas e vetores de doenças. Claro et al. (2004) afirmam que a multiplicação desenfreada destes agentes ocorrem também devido a falta de atitudes preventivas e de conscientização por parte da população.

Este fato gerou uma grande preocupação por parte das autoridades sanitárias, no que se refere às formas de controle destes vetores. Buscando novas formas eficientes e que causem menor impacto ambiental, incentivando mais estudos com inseticidas botânicos.

Dentre estes vetores de maior preocupação está o *Aedes Aegypti* pertencente à família Culicidae (Diptera). 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).

O mosquito *A. aegypti* apresenta duas fases ecológicas interdependentes: a aquática, que inclui três etapas de desenvolvimento – ovo, larva e pupa; e a

terrestre, que corresponde ao mosquito adulto (SVS, 2016). É um mosquito doméstico, antropofílico, com atividade hematofágica diurna que utiliza, preferencialmente, depósitos artificiais de água limpa para oviposição (TAUIL, 2002). Entretanto, já foi observada a presença de ovos e larvas em recipientes com água salobra (RAMASAMY et al., 2011).

A duração do ciclo de vida (Figura 2), em condições favoráveis, é de aproximadamente 10 dias, a partir da oviposição até a idade adulta. Diversos fatores influenciam na duração desse período, entre eles a temperatura e a oferta de alimentos (HONÓRIO; OLIVEIRA, 2001).

Os adultos de *A. aegypti* realizam o repasto açucarado; entretanto, apenas as fêmeas fazem o repasto sanguíneo, para proporcionar o desenvolvimento ovariano. A cópula é um importante fator estimulante para o início da atividade hematofágica (PAIXÃO, 2007). Barata et al. (2001) revelaram a preferência de *A. aegypti* por humanos como fonte de alimentação em 87,9% das fêmeas observadas.

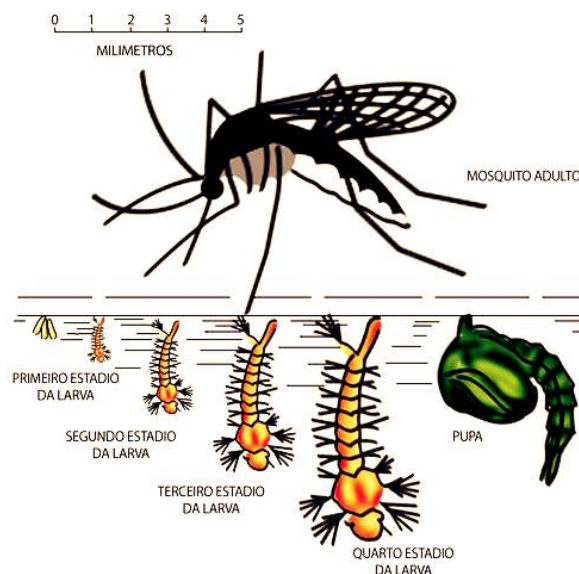


Figura 2. Ciclo de vida do *Aedes aegypti*
 Fonte: deleonscarlett.wordpress.com

Os ovos medem aproximadamente 1 mm de comprimento, são fusiformes e têm contorno alongado. São envolvidos por uma casca composta de três camadas: o exocório, um envoltório externo, fino e transparente, o endocório, situado logo abaixo e constituído por quitina, e internamente, a membrana vitelina envolvendo o núcleo, citoplasma e vitelo (PEREIRA et al., 2006).



Figura 3. Ovo de *Aedes aegypti*
Fonte: Agência Fiocruz.

Quando completado o desenvolvimento embrionário, entre dois a três dias, os ovos tornam-se resistentes a dessecação, sendo capazes de resistir a mais de um ano, podendo chegar até 450 dias (NATAL, 2002; ALMEIDA et al., 2008). As fêmeas podem realizar durante sua vida até cinco posturas (CLEMENTS, 1992), colocando em média 150 ovos por postura (FORATTINI, 2002). (Figura 3).

Morfologicamente, as larvas são alongadas, vermiformes, esbranquiçadas (Figura 4) (LOZOVEL, 2001). A fase larvária é o período de crescimento e de intensa alimentação do inseto. A duração do tempo entre cada um dos instares depende de fatores como: temperatura, disponibilidade de alimento e densidade da população dentro do criadouro. De vida livre, alimentam-se de partículas orgânicas presentes na água, alguns tipos de algas, sendo a filtração a forma mais comum de alimentação, ocorrendo à filtração de até dois litros de água por dia (ALCIOLE, 2009).



Figura 4. Larvas adultas de *Aedes aegypti*
Fonte: Purdue Agricultural Communication

Na fase seguinte, chamada de pupa (Figura 5), ocorrem às modificações mais significativas para a formação do adulto e nesta fase não há alimentação (MARCONDES, 2001). Esse estágio dura de dois a três dias em condições adequadas de temperatura e corresponde ao estágio de transição entre o indivíduo do meio aquático para o terrestre. O indivíduo tem o aspecto de “vírgula” em virtude

da cabeça se unir ao tórax, formando o cefalotórax. A pupa apresenta metabolismo lento e permanece na superfície da água até ocorrer à metamorfose para o indivíduo adulto, com coloração esbranquiçada, semelhante à larva; porém, à medida que aproxima da transformação em adulto, adquire coloração escura (FORATTINI, 2002).



Figura 5. Pupa de *Aedes aegypti*
Fonte: www.deolhonoaedesaegypti.com

2.3.1. As doenças transmitidas por *Aedes aegypti*

O mosquito *A. aegypti* (Figura 6), provavelmente foi introduzido nas Américas durante as primeiras explorações europeias ao Novo Mundo no século XV, por meio de barcos que cruzaram o Atlântico (DIAZ-NIETO et al, 2013), é o principal vetor dos quatro sorotipos do vírus da dengue DEN I, II, III e IV (GARCEZ et al., 2013), da febre amarela, Chikungunya e mais recentemente, do vírus Zika (SVS, 2016).



Figura 6. Ilustração de um mosquito adulto fêmea de *Aedes aegypti*
Fonte: www.tuasaude.com

A Dengue sendo uma doença viral sistêmica de proporções endêmica e epidêmica (BHATT et al., 2013); a Febre Chikungunya, cuja etimologia no idioma africano Makonde, significa “andar curvado”, relaciona-se com uma infecção

alfavírus originário da África (HONÓRIO et al., 2015); e vírus Zika que refere-se a um flavivírus neurotrópico conecta-se intimamente com a Dengue (PETERSEN et al., 2016).

Devido ao grande impacto na saúde pública, a procura por uma vacina contra o vírus da dengue teve início durante a Segunda Guerra Mundial. Entretanto a ocorrência de quatro sorotipos (DEN I, II, III, IV), e a falta de informação dos mecanismos patogênicos e de incentivos econômicos dificultam os avanços nessa área (HOMBACH, 2007).

Por ainda não existir uma vacina validada, o controle vetorial é muito importante, consistindo, principalmente, na eliminação de criadouros naturais e artificiais de mosquitos, além da aplicação de inseticidas, tanto para as larvas quanto para os adultos (LIGON, 2005).

Inseticidas sintéticos são medidas utilizadas contra esses vetores. As principais classes de inseticidas sintéticos utilizados no controle são os organofosforados, carbamatos e piretróides (BISSET, 2002).

Porém o controle dos vetores através dos inseticidas causa impactos na natureza levando ao desenvolvimento de populações de mosquitos resistentes, o que, justifica a necessidade de buscar alternativas de controle de vetores mais sustentáveis e menos agressivas ao ambiente.

2.4. Toxicidade frente *Artemia salina*

Produtos inseticida originários de plantas nem sempre são necessariamente atóxicos a organismos não alvos, podendo muitas moléculas de plantas serem tóxicas ao homem e não seletivas tornando-se necessário averiguar a toxicidade destes produtos sobre organismos bioindicadores.

Os testes de toxicidade são elaborados com o objetivo de avaliar ou prever os efeitos de substâncias tóxicas nos sistemas biológicos e averiguar a toxicidade relativa das substâncias (BAROSA et al., 2003).

O teste de toxicidade contra a *Artemia salina* é um ensaio biológico considerado como uma das ferramentas mais utilizadas para a avaliação preliminar de toxicidade. Desta forma, esse microcrustáceo tem sido usada como um organismo alvo para detectar compostos bioativos em extratos de plantas (ALVES et

al., 2000) e útil no direcionamento de estudos fitoquímicos e na busca e avaliação de substâncias bioativas.

A *A. salina* é um microcrustáceo de água salgada utilizado como alimento para peixes ornamentais, com ovos deste microcrustáceo apresentado elevada taxa de eclosão e facilmente encontrados em lojas especializadas. Os náupilos (Figura 7) deste microcrustáceo são utilizados para estimar a toxicidade através da concentração letal (CL_{50}) e os resultados podem ser tratados estatisticamente com facilidade (MCLAUGHLIN et al., 1991).

Diversos trabalhos correlacionam ainda a toxicidade sobre *A. salina* com atividades antifúngica, virucida, antimicrobiana, antiparasitária e tripanossomicida (ZUQUE et al., 2004).

Em geral, extratos de plantas e derivados com alta toxicidade contra a *A. salina* sugerem alto potencial para outras atividades biológicas (MCLAUGHLIN et al., 1991).



Figura 7. Náupilos de *Artemia salina* (Artemiidae)
Fonte: www.schursastrophotography.com

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar os constituintes químicos dos extratos etanólicos das folhas e do caule da *Simarouba versicolor* e avaliar seu efeito inseticida no ciclo biológico de *Aedes aegypti* e a toxicidade aguda sobre *Artemia salina*.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Realizar triagem fitoquímica e identificar metabólitos secundários dos extratos etanólicos de caule e folhas de *Simarouba versicolor*;
- ✓ Realizar doseamento por espectrofotometria dos extratos etanólicos de caule e folhas de *Simarouba versicolor*;
- ✓ Avaliar o efeito dos extratos brutos de folhas e caule de *Simarouba versicolor* na mortalidade e desenvolvimento de *Aedes aegypti*, quando aplicado na fase larval;
- ✓ Determinar as concentrações letais do extrato etanólico de folhas e caules de *Simarouba versicolor* em *Aedes aegypti*;
- ✓ Avaliar o efeito dos extratos etanólico de folhas e caules de *Simarouba versicolor* em *Artemia salina*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIOLE, S. D. G. **Avaliação da atividade inseticida dos óleos essenciais das plantas Amazonicas, Annonaceae, Boraginaceae e de Mata Atlântica Myrtaceae como alternativa de controle às larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: culicidae).** Dissertação Mestrado em Biologia Humana e Ambiente. Universidade de Lisboa, 86 p, 2009.

ALMEIDA, M. M. B.; ARRIAGA, A. M. C.; SANTOS, A. K. L.; LEMOS, T. L. G; BRAZ – FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. Ocorrência e atividade biológica de quassinóides da última década. **Química Nova**, v. 30, p. 935-951, 2007.

ALMEIDA, M. C. D. M.; ASSUNÇÃO, R. M.; PROIETTI, F. A.; CAIAFFA, W. T. Dinâmica intra-urbana das epidemias de dengue em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1996-2002. **Cadernos de Saúde Pública**, v.24, p.2385-2395, 2008.

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA Jr, A.; ZANI, C.L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 367-373, 2000.

ARRIAGA, A.M.C.; MESQUITA A.C.; POULIQUEN Y.B.M.; De LIMA R.A.; CAVALCANTE S.H.; CARVALHO M.G.; SIQUEIRA J.Á.; ALEGRIO L.V.; Chemical constituents of *Simarouba versicolor*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.74, p.415-24, 2002.

ARNASON, J.T.; PHILOGÈNE B.J.R.; MORAND P. **Insecticide of plant origin.** Washington, DC: American Chemical Society, v. 387, 214 p, 1990.

BARATA, E.F.; COSTA, A.I.P.; CHIARAVALLOTI-NETO, F.; GLASSER, C.M.; BARATA, J.M.; NATAL, D. População de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil. **Revista Saúde Pública**, v. 35, p. 237-242, 2001.

BAROSA, J.; FERREIRA, A.; FONSECA, B.; SOUZA, I. Teste de toxicidade de cobre para *Artemia salina*. **Poluição e ecotoxicologia marinha**, 2003.

BARRETO, C. F. *Aedes aegypti*: Resistência aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle. **Revista eletrônica Faculdade Montes Belos**, v. 1, p. 62-73, 2005.

BELL, A.; FELLOWS, L.E.; SIMMONDS, M.S.J. **Natural products from plants for the control of insect pests**. In: HONDGSON, E.; KUHR, R. J. (Ed) Safer insecticide development and use. New York and Basel. Marcel: Dekker, p.337-383, 1990.

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, p. 504-507, 2013.

BISSET, J.A. Uso correcto de insecticidas: Control de la resistencia. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 54, p. 202-219, 2002.

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 Unitaú**, v. 16, p. 2, 2010.

CARVALHO, J. I. X. **Estudo fitoquímico e avaliação do potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase de *Simarouba versicolor* (SIMAROUBACEAE)**. Dissertação de Mestrado em Química Orgânica – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 143 p, 2008.

CASIDA, J.E.; QUISTAD, G.B. Golden age of insecticide research: past, present, or future?. **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 1-16, 1998.

CLARO, L.B.L.; TOMASSINI, H.C.B.; ROSA, M.L. Prevenção e controle do dengue: uma revisão de estudos sobre conhecimentos, crenças e práticas da população. **Caderno Saúde Pública**, v. 20, p. 1447-1457, 2004.

CLEMENTS, A. **The Biology of Mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction**. New York: Chapman and Hall, 1992. URL <http://books.google.com/books>.

CLOYD, R. Natural indeed: Are natural insecticide safer and better then conventional insecticide? **Illinois Pesticide Review**, v. 17, p. 1-3, 2004.

COELHO, A. A. M.; PAULA, J. E.; ESPÍNDOLA L. S. Insecticidal activity of cerrado plant extracts on *Rhodnius milesi* Carcavallo, Rocha, Galvão & Jurberg (Hemiptera: Reduviidae), under laboratory conditions. **Neotropical entomology**, v. 35, n.1, p. 133-138, 2006.

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

COSTA, E. L. N.; SILVA, R. D.; FIUZA, L. M. Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. **Acta Biologica Leopoldensia**, v.26, n.2, p.173-85, 2004.

DÍAZ-NIETO, L. M.; MACIÁ, A.; PERROTTI, M. A.; BERÓN, C. M. Geographical limits of the Southeastern distribution of *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) in Argentina. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.7, n.1, p.1963, 2013.

FERNANDES, M. Z. L. C. M.; FERNANDES, R. M.; LOPES, J. B.; VIANA, G. E. N. Determinação da toxicidade aguda da *Simarouba versicolor* em camundongos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, n.2, p.44-47, 2004.

FLINT, M. L.; VAN DEN BOSCH, R. **Introduction to integrated pest management**. New York: Plenum, 240p, 1981.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. vol.2. Universidade de São Paulo: São Paulo, Brasil, 864p, 2002.

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**, Niterói, v. 5, n. 3, p. 363-393, 2013.

GHOSH, P.C.; LARRAHONDO, J.E.; LE QUESNE, P.W.; RAFFAUF, R.F. Antitumor Plants.IV. Constituents of *Simarouba versicolor*. **Journal of Natural Products** , v. 40, p.364-369, 1977.

HOMBACH, J. Vaccines against dengue: a review of current candidate vaccines at advanced development stages. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 21, p. 254-260, 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.

HONÓRIO, N. A.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, E. R. Frequência de larvas e pupas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em armadilhas, Brasil. **Revista Saúde Pública**, v. 35, p.385-391, 2001.

HOULT, J.R.S.; PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. **General Pharmacology**, v. 27, p. 713-722, 1986.

KIM, S. I.; ROH, J. Y.; KIM, D. H.; LEE, H. S.; AHN, Y. J. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. **Journal of Stored Products Research**, v.39, p.293-303, 2003.

LEMOS, R. A. A. **Comunicação pessoal, Intoxicação espontânea e experimental por *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae) em bovinos.** Apresentação oral, ENDIVET 2012. Porto Alegre-RS de 23 a 27 de outubro 2012.

LIGON, B.L. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: a review of the history, transmission, treatment and prevention. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v.16, p. 60-65, 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** 2 ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 324p, 1998.

LOZOVEI, A. L. Culicídeos (Mosquitos). *In*: MARCONDES, C. B. (Ed.). **Entomologia médica e veterinária.** 7. ed., São Paulo: Atheneu, 432p, 2001.

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

MARCONDES, C. B. **Entomologia médica e veterinária.** São Paulo: Editora Atheneu. 432 p, 2001.

MCLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C. J.; SMITH, D. L. Bench-top” bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. **Studies in Natural Product Chemistry**, 9th ed. Amsterdam: Elsevier, p. 383-409, 1991.

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

MESQUITA, A. G. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste do Brasil: *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae).** Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará: Fortaleza, 119p, 1997.

MOREIRA M. D.; PICANÇO M. C.; SILVA E. D.; MORENO S. C.; MARTINS J. C.; **Uso de inseticidas botânicos no controle de pragas.** In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. (Org.). Controle alternativo de pragas e doenças. Viçosa: EPAMIG/CTZM, p. 89-120, 2005.

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

NATAL, D. Bioecology of *Aedes aegypti*. **Biológico**, v.64, n.2, p.205-207, 2002.

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.

O'NEILL, M. J.; BRAY, D. H.; BOARDMAN, P.; WRIGHT, C. W.; PHILLIPSON, J.D.; WARHURST, D.C.; GUPTA, M. P.; CORRYA, M.; SOLIS, P. Plants as sources of antimalarial drugs, part 6: activities of *Simarouba amara* fruits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 183-190, 1988.

PAIXÃO, K. S. **Avaliação do controle químico de adultos de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) de Fortaleza por meio de métodos convencionais e das armadilhas BG-Sentinel R e MosquiTRAPr.** Dissertação (Mestrado em Parasitologia): Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 119p, 2007.

PEÑAFLORES, M. F. G. V.; ALMEIDA, R. N.; SIMOTE, S. Y.; YAMANE, E. R. I. C. A.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; PAGNOCCA, F. C. Toxicity of substances isolated from *Simarouba versicolor* St. Hil.(Simaroubaceae) to the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. **Bioassay**, v. 4, p. 1-7, 2009.

PEREIRA, S. T.; SECUNDINO, N. F. C.; BOTELHO, A. C. C.; PINHEIRO, V. C.; TADEI, W. P.; PIMENTA, P. F. B. Role of eggs buster in hatching of *Aedes aegypti*

scanning electron microscopy study. **Journal of Medical Entomology**, v.43, p.68-72, 2006.

PETERSEN, L. R.; JAMIESON, D. J.; POWERS, ANN. M.; HONEIN, M. A.; Zika virus. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1552-1563, 2016.

PIRES J. E. P. E. **Efeito dos extratos aquoso e etanólico de planta *Simarouba versicolor* St. Hill “in vitro” sobre larvas e teleóginas de carrapatos *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 e *Rhipicephalus sanguineus***. Dissertação de Mestrado – Ciência Animal – Universidade Federal do Piauí, Terezina. 33p, 2006.

POLONSKY, J. Quassinoid bitter principles II. In: **Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**. Springer Vienna, v. 47, p. 221-264, 1985.

POTT, A.; POTT, V.J. **Plantas do Pantanal. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal – Corumbá, MS: EMBRAPA-SPI, 320p, 1994.

RAJIC, A.; KWERFIO-OKAI, G.; MACRIDES, T.; SANDEMAN, R.; CHANDLER, D.; POLYA, G. Inhibition of Serime Proteases by Anti-inflammatory Triterpenoids, **Planta Medica**, v. 66, p. 206-210, 2000.

RAMASAMY, R.; SUREDRAN, S.N.; JUDE, J.P.; DHARSHINI, S.; VINOBA, M. Larval development of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in peri-urban brackish water and its implications for transmission of Arboviral Diseases. **Ploss Neglected Tropical Diseases**. V. 5, p. 11, 2011.

SAITO, M. L.; LUCCHINI, F. **Substâncias obtidas das plantas e a procura por praguicidas eficientes e seguros ao meio ambiente**. Jaguaruíma: EMBRAPA-CNPMA (EMBRAPA-CNPMA. Séries Documentos, 12), 46 p, 1998.

SIMOTE, S.Y. **Estudo Fitoquímico de *Helietta puberula* (Rutaceae), *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae) e Busca de um Processo de Microencapsulação de**

Compostos Ativos, Visando o Controle de Formigas Cortadeiras. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 200 p, 2006.

S.V.S. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 47. **Boletim Epidemiológico**, v. 46, p. 1-9, 2016.

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**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 720p, 2004.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle da dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.18, n.3, p. 67-871, 2002.

THACKER, J.R.M. **An Introduction to arthropod pest control**. Cambridge, Cambridge University. 360p. 2002.

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.

VENDRAMIM, J. D.; SCAMPINI, P. J. Efeito do extrato aquoso de *Melia azedarach* sobre o desenvolvimento *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) em dois genótipos de milho. **Revista de Agricultura**, v.72, n.2, p.159-170, 1997.

VIEIRA, I. J. C. **Uma contribuição à química da família Simaroubaceae**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), Programa de Pós-Graduação em Química, 318p, 1995.

ZUQUE, A. L. F.; WATANABE, E. S.; FERREIRA, A. M. T.; ARRUDA, A. L. A.; RESENDE, U. M.; BUENO, N. R.; CASTILHO, R. O. Avaliação das atividades

antioxidante, antimicrobiana e citotóxica de *Couepia grandiflora* Benth. (Chrysobalanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 129-136, 2004.

CAPITULO 1

Perfil químico e atividade inseticida do extrato etanólico de folhas e caule de *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae) sobre *Aedes aegypti* L. (1762) (Culicidae) e *Artemia salina* L. (Crustaceae: Artemiidae)

Nathalie N. Paré¹, Antonia R. Roel^{1,2}, Deizeluci de F. P. Zanella², Karla R. de A. Porto³, Marla R. A. Miranda³, Rosemary Matias⁴

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Av. Tamandaré, 6000, Jardim Seminário, 79117-900, Campo Grande - Mato Grosso do Sul, Brasil. Correspondence to: nathi_bio1@hotmail.com. Telefone: 55 (067) 3312-3768.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária, Universidade Católica Dom Bosco, Av. Tamandaré, 6000, Jardim Seminário, 79117-900, Campo Grande - Mato Grosso do Sul, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade da Rede Pró Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Cidade Universitária - s/n, Universitário, 79070-090, Campo Grande - Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁴Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional, Universidade Anhanguera Uniderp, Rua Alexandre Herculano, 1400, Taquaral Bosque, 79035-470, Campo Grande - Mato Grosso do Sul, Brasil.

RESUMO

O Cerrado brasileiro possui uma grande diversidade de espécies vegetais, muitas delas de uso medicinal e pesticida, como *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae). Objetivou-se caracterizar os constituintes químicos dos extratos etanólicos de folhas e caule da *S. versicolor* e avaliar seu efeito inseticida sobre *Aedes aegypti* e a toxicidade em *Artemia salina* (Artermiidae). As análises fitoquímicas demonstraram como grupos químicos prevalentes nos extratos os compostos fenólicos, taninos, triterpenos e flavonoides, sendo observados em maior intensidade no caule os

compostos fenólicos, taninos e triterpenos e nas folhas, compostos fenólicos e taninos. Constatou-se efeito larvicida, com a definição da concentração letal (CL_{50}) de $211,259 \mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato do caule e observou-se interferência de todas as concentrações na emergência de adultos, sendo que em $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ não resultou em nenhum adulto formado; em 500 e $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ houve um alongamento no ciclo biológico em relação a testemunha. Em relação ao extrato das folhas, ocorreu uma pequena interferência no ciclo biológico em todas as concentrações, com um alongamento do ciclo nas concentrações de 1000 e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ em relação a testemunha, indicando efeito deletério. Em relação a toxicidade frente a *A. salina*, os valores atribuídos para CL_{50} dos extratos etanólicos dos caules foi de $110 \mu\text{g mL}^{-1}$ e folhas, $141 \mu\text{g mL}^{-1}$, revelando moderada toxicidade. Estes resultados indicam que os caules podem ser utilizados em formulações para o controle do *A. aegypti* e que compostos secundários, tais como fenólicos e triterpenos, podem estar relacionados com esta atividade.

Palavras-chave: controle de insetos; toxicidade; controle de vetores; plantas inseticidas.

INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Dip.: Culicidae) é o transmissor de infecções sistêmicas como a dengue, a febre chikungunya, o zika vírus e a febre amarela. Apresenta distribuição global com ciclos caracterizados por epidemias e endemias, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (VASCONCELOS, 2015).

Estrategicamente, o uso de inseticidas químicos, aliado à eliminação dos criadouros com campanhas educacionais, é a melhor opção. Contudo, a presença do mosquito em todas as regiões brasileiras e as tentativas de controle intensivo e contínuo através de inseticidas químicos sintéticos ocasionaram o aparecimento de populações resistentes (BRAGA E VALLE, 2007). Associado a isso, também há os riscos da persistência no ambiente, devido à sua resistência à degradação física, química e bioquímica, colaborando para a bioacumulação e toxicidade em organismos não alvo, como o homem e outros mamíferos (GARCEZ et al., 2013).

A preocupação com o ambiente, a segurança alimentar e os elevados custos dos inseticidas sintéticos tem levado à busca de produtos inseticidas de menor

toxicidade. Dentre estes, estão os ingredientes ativos de muitas plantas com potencial inseticida, algumas como extratos ou óleos, outras como modelo em síntese de produtos comerciais. Estes ingredientes ativos tais como flavonoides, alcaloides e terpenoides são produtos do metabolismo secundário das plantas em resposta aos ataques dos patógenos, como insetos e micro-organismos, resultado de uma co-evolução natural, resultando em fontes naturais de substâncias inseticidas (SIMÕES et al., 2010; MARANGONI et al. 2012).

Uma das alternativas que tem se mostrado promissora no controle do vetor *A. aegypti* é o uso de plantas que apresentam potencial inseticida. A imensa biodiversidade da flora brasileira e o potencial inseticida de diversas espécies botânicas surgem como uma fonte inesgotável de novos ingredientes ativos para o controle de insetos vetores de doenças, como *A. aegypti*. Das espécies do Cerrado brasileiro, a família Simaroubaceae inclui 22 gêneros e 109 espécies de distribuição tropical (CLAYTON, 2011) consistindo os quassinoides como marcadores quimiotaxonômicos dessa família (ALMEIDA et al., 2007), a espécie *Simarouba versicolor*, destaca-se na medicina popular por utilizar a casca e fruto como anti-helmínticos, além da infusão de casca ter efeito anti-venenoso (PIRES et al., 2007). Almeida et al. (2007) citam que os quassinoides presentes em *S. versicolor* mostram um amplo conjunto de atividades biológicas, como antitumor, antimalárico, antioxidante, amebicidas, antiviral e inseticida.

Estudo com extratos da *S. versicolor* com ação inseticida indicaram eficiência no controle de triatomíneos (COELHO et al., 2006). Outros trabalhos apontam atividade carrapaticida do extrato aquoso das cascas no controle de *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae) (PIRES et al., 2007). A *S. versicolor* foi citada ainda como inibidora da enzima acetilcolinesterase, importante transmissora do sistema nervoso dos insetos (CARVALHO, 2008).

Estudos com produtos provenientes de plantas vêm mostrando-se eficazes como medidas de controle, com baixa toxicidade para mamíferos, reduzido impacto ambiental. Dentre os organismos empregados como bioindicadores cita-se a *Artemia salina* L. (Crustaceae: Artemiidae), microcrustáceo utilizado como modelo de ensaios toxicológicos. Esta espécie fornece ainda uma pré-triagem *in vitro* para determinação da toxicidade, podendo estimar a concentração média letal (CL₅₀) de maneira rápida e de baixo custo (BEDNARCZUK et al., 2010).

Objetivou-se com este estudo caracterizar os constituintes químicos dos extratos etanólicos das folhas e do caule da *S. versicolor* e avaliar o efeito inseticida na mortalidade, desenvolvimento e reprodução de *A. aegypti* e toxicidade sobre *A. salina*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do Material Vegetal

O material vegetal foi coletado na fazenda escola da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul (latitude 20° 23' 18.9 S e longitude 54° 36' 16.6 W). As exsiccatas das amostras coletadas e identificadas foram depositadas no Herbário da Universidade Anhanguera - Uniderp, em Campo Grande - MS, Brasil (registro 8387).

Obtenção dos Extratos de *Simarouba versicolor*

Folhas e caules de *S. versicolor* foram selecionados, higienizados e submetidos à secagem em estufa com circulação de ar à temperatura de 45±2°C. O material desidratado foi triturado em moinho elétrico separadamente e na sequência submetidos à extração por percolação com etanol na proporção de 1:25 (m/v), por 7 dias consecutivos. Posteriormente os extratos etanólicos das folhas e caules foram obtidos após evaporação do solvente em evaporador rotatório.

Estudos Fitoquímicos

Separadamente, alíquotas dos extratos etanólicos brutos das folhas e caules de *S. versicolor* foram dissolvidas em etanol (20 g 100 mL⁻¹) e submetidas à análise fitoquímica clássica (Harborne, 1998). As análises foram executadas em triplicatas e foi observada alteração de cor e formação de precipitado. A leitura foi representada como: negativo (- = ausência), parcial (± = 10%), baixa (+ = 25%), parcialmente moderado (++ = 50%), moderado (±++ = 75%) e alta intensidade (+++ = 100%) (FOUNTORA et al. 2015).

Para quantificar os fenóis totais nos extratos, os mesmos foram separadamente dissolvidos em metanol e submetidos à análise através do 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).

Os extratos também foram submetidos à Cromatografia em Camada Delgada (CCD: Sílica gel 60F₂₅₄). Para evidenciar flavonoides e glicoflavonoide; utilizou-se como padrão quercetina (Synth[®]) e rutina (Synth[®]); para compostos fenólicos, o ácido gálico (Synth[®]) e ácido tânico (Synth[®]); 1,2-benzopirona (Sigma[®]) para cumarinas; a cafeína para os alcaloides; e, para o esqueleto esteroidal, o colesterol (Sigma[®]), todos em solução a 1%. Os sistemas de eluentes, a visualização das bandas (irradiação com luz ultravioleta: 254 e 365 nm) e os reveladores foram baseados em Wagner e Blatt (2009). Foram calculados os fatores de retenção (Rf) das bandas obtidas dos extratos etanólicos, e foram ainda avaliados por UV-visível, com varredura foi feita de 200 a 700 nm (SILVERSTEIN et al., 2005).

Determinação do pH, Condutividade Elétrica e Sólidos Dissolvidos

A determinação do pH foi realizada em pHmetro (pH DM-20, Digimed) previamente calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0, medições em triplicata para obtenção da média e desvio padrão. Estas mesmas soluções foram utilizadas para determinação da condutividade elétrica (CE DM3, Digimed).

A concentração de sólidos solúveis dos extratos foi determinada utilizando um refratômetro digital (45 RTD- refractômetro), com os resultados expressos em graus Brix corrigido para 20°C.

Ensaio Biológicos 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 felinos 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 *S. versicolor* solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO), nas concentrações de 62,5, 125, 250, 500 e 1000 µg 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: mortalidade aguda em 24h de exposição aos tratamentos, duração da fase larval, mortalidade larval e pupal e número de adultos formados com observações diárias.

A análise estatística dos dados foi realizada pelo método de McLaughlin (1991), através do software Leora® (POLO 97355947870655352), para definir as concentrações letais (CL) do intervalo de confiança (95% de significância) e determinar a menor dosagem tóxica. Para os dados de duração da fase larval, foi aplicado o teste de análise de variância (ANOVA) com teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para comparação das médias, no programa Assistat 7.7 beta ® (SILVA, 2016).

Bioensaios com *Artemia salina*

Para os testes foram utilizadas larvas do 2º estágio, obtidas de cistos de *A. salina*, eclodidos em solução salina, após um período de 24 horas, sob a iluminação parcial, realizados nas concentrações de 31,2, 62,5, 125, 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em volume final de 30 mL de solução salina e a 1% de DMSO. Em cada concentração foram utilizadas 10 larvas e os testes foram realizados em quadruplicatas, tendo como controle branco (água salina), em tubos de ensaio com capacidade de 10 mL contendo um volume final de cinco mililitros. Em todas as situações, as larvas foram deixadas em contato com as soluções dos extratos durante 24 horas para observação de mortalidade após 24 horas. Os dados coletados foram submetidos ao programa Polo-PC que utiliza o método de Probit e a análise foi estabelecida na faixa de correlação de 0,95, definindo então os valores das concentrações letais estabelecidas para CL_{10} , CL_{50} e CL_{90} e os respectivos intervalos de confiança.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Estudos Fitoquímicos

A análise fitoquímica de *S. versicolor* demonstrou que os extratos etanólicos de folhas e caules possuem em comum onze classes de metabolitos secundários, com uma diversidade de estruturas químicas que se diferenciam na intensidade de

coloração e/ou precipitação, exceto para os compostos fenólicos e antraquinonas (Figura 1). Os resultados da análise em CCD dos extratos revelaram também a presença de quercetina e cumarinas. A cafeína, utilizada como padrão para alcaloides, não foi visualizada na cromatoplaça; contudo, o revelador reativo de Dragendorff indicou bandas características de outros alcaloides nas amostras, com maior intensidade para as folhas. Os compostos fenólicos, representados pelo ácido gálico e tânico, foram visualizados apenas nos caules. Já o esqueleto esteroidal foi positivo para os dois extratos, com maior intensidade para as folhas (Figura 1 e Tabela 1).

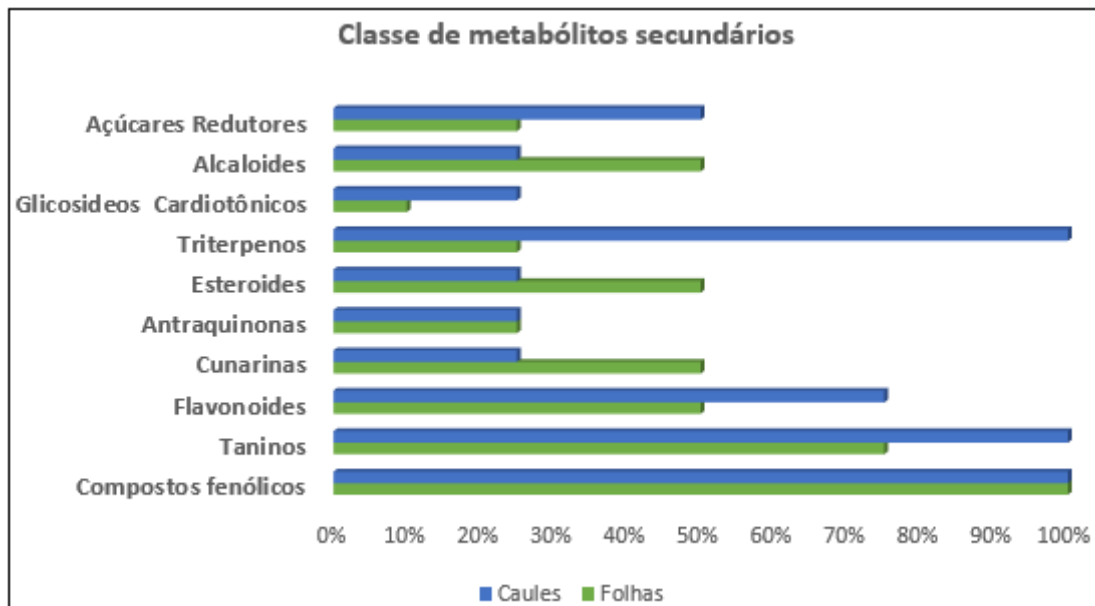


Fig. 1. Frequência dos metabólitos secundários encontrados no extrato etanólico das folhas e caules de *Simarouba versicolor*. Negativo (- = ausência), parcial (\pm = 10%), baixa (+ = 25%), parcialmente moderado (++) = 50%), moderado (\pm ++ = 75%) e alta intensidade (+++ = 100%)

As mesmas classes de metabólitos secundários descritos nesse estudo também foram encontradas nas folhas, caules e raízes de *S. versicolor* coletadas em outras regiões brasileiras, conforme relatado por Simote (2006).

As plantas da família Simaroubaceae são reconhecidas pelo sabor amargo e investigadas como inseticidas, atividades atribuídas aos quassinoides, alcaloides, triterpenos, esteroides, cumarinas, antraquinonas e flavonoides (Alves et al., 2015).

Tabela 1 Cromatografia em Camada Delgada, Fator de Retenção do extrato etanólico das folhas e caules de *Simarouba versicolor*

Classe de metabolitos secundários	Padrões	Padrões (Rf)	Extratos etanólicos	
			Folhas (Rf)	Caules (Rf)
Compostos fenólicos	Ácido Gálico.	0,70	-----	0,73
	Ácido Tânico	0,20	-----	0,20
Flavonoides	Quercetina	0,78	0,78	0,78
	Rutina	0,68	-----	-----
Cumarinas	1,2-benzopirona	0,93	0,95	0,95
Alcaloides	Cafeina	0,37	0,2	0,2
Esteroides	Colesterol	0,45	0,45	0,46

Esses grupos químicos também foram evidenciados com as análises espectrofotométricas na região UV-vísivel, onde banda de absorção máxima em 180 nm ($\lambda_{\text{máx.MeOH}}$) é característica de alcaloides (Figura 2). Em se tratando de Simaroubaceae, os quassinoides e os alcaloides do tipo cantinona são considerados os marcadores quimiotaxonômicos e as atividades biológicas são atribuídas a estas duas classes de metabólitos secundários (PENAFLORE et al., 2009). Os alcaloides cantinonicos possuem um anel aromático orto substituído, um anel piridinico e um anel quinolônico (lactana) (SIMÕES et al., 2010). Especificamente para *S. versicolor*, foram isolados os alcaloides cantinonicos das cascas e caules e triterpenos do grupo do lupeol (PENAFLORE et al., 2009).

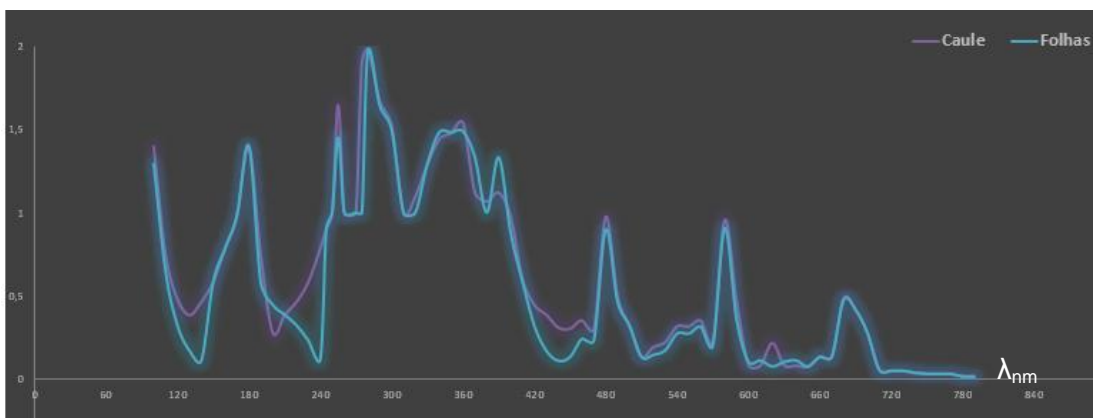


Fig. 2 Espectro de absorção do extrato etanólico das folhas e cascas de *Simarouba versicolor*, varredura entre 100 e 780 nm

Tratando-se de quassinoides, esses são quimicamente considerados triterpenos biodegradados com alto padrão de oxigenação, apresentando uma ampla faixa de atividade biológica (POLONSKY, 1985; ALMEIDA et al., 2007). Este é um dos grupos mais abundantes de substâncias naturais e sua síntese é quase exclusiva de Simaroubaceae (ALVES et al., 2015). Em estudos com cromatografia, Mesquita (1997) relatou que isolou nos extratos clorofórmico e acetato de etila do lenho de *S. versicolor*, dois quassinoides, a excelsina e o 11-acetato-amarolídio, sendo a excelsina descrita pela primeira vez para o gênero *Simarouba*.

No presente estudo foi possível observar no espectro uma absorção máxima em 280 nm, indicativa de sistemas aromáticos. Os flavonoides possuem pelo menos duas bandas de absorção, as quais correspondem a $200 < \lambda_{nm} > 250$ nm e (Banda I) e $320 < \lambda_{nm} > 400$ nm (Banda II) (SIMÕES et al. 2013). Especificamente para a quercetina, as bandas em 255 nm correspondem à absorção do anel A (hemicetal), e a banda em 360 nm representa o anel B do flavonoide. Essas regiões são características de cromóforos aromáticos conjugados de transições $\pi \rightarrow \pi$ (HARBORNE e WILLIAMS, 2000), típicas de flavonoides como quercetina e derivados (VERZA et al., 2007).

Os resultados positivos para flavonoides e triterpenos corroboram dados de Arriaga et al. (2002), que isolaram dos extratos hexânico, clorofórmico, acetato de etila e metanólico das raízes, caules e frutos de *S. Versicolor*.

A quantificação do teor de fenóis totais das folhas e caule indicou valores de $78,34 \pm 0,08$ e $199,1 \pm 0,34$ (mg g⁻¹ ácido gálico), respectivamente. O mesmo ocorreu para os teores de flavonoides que foram superiores para os caules ($45,72 \pm 0,21$ mg g⁻¹ quercetina) em relação às folhas ($41,90 \pm 0,03$ mg g⁻¹ quercetina). Isto demonstra que dentre os fenóis totais presentes nos caules da espécie, grande parte pertence ao grupo dos polifenóis, provavelmente os taninos, evidenciados na fitoquímica clássica, em CCD e no espectro de varredura.

A presença de taninos também foi confirmada através da banda de absorção em 480 nm ($\lambda_{m\acute{a}x.MeOH}$); bandas entre 480 e 560 nm são características de compostos aromáticos condensados (SILVERSTEIN et al., 2014). Igualmente encontrado nos extratos das folhas de *S. versicolor*, os taninos também foram os metabólitos secundários abundantes e representativos na espécie *S. amara*, conforme verificado em triagem fitoquímica por Alves et al. (2015).

O pH médio dos extratos etanólicos das folhas ($5,31 \pm 0,01$) foram superiores aos dos caules ($4,92 \pm 0,5$) e diferença de acidez pode ser relacionada aos ácidos fenólicos. A ação da substância química empregada como larvicida depende, dentre os vários parâmetros, do pH digestório do *A. aegypti*, que nos cecos gástricos é 8, no intestino médio posterior, 7 e na porção anterior do intestino médio, pode chegar a 10,5 (DADD, 1975). Para serem absorvidos nas células do digestório, os inseticidas devem ter pHs próximos a enzimas dos digestórios dos insetos.

Segundo Broadway e Duffey (1988), o potencial dos inibidores de proteinases depende da compatibilidade estrutural com a proteinase do organismo alvo, das condições fisiológicas internas do intestino médio (pH) e da qualidade do sistema proteinase. Com base nestas informações, os dois extratos possuem baixa absorção; por sua vez no interior da célula, o extrato etanólico dos caules, por apresentar menor pH, tem maior facilidade de ionizar e com isto pode-se inferir que este extrato possa ter maior afinidade pelas enzimas digestivas e maior ação, como observado nos testes de concentração letal (Figura 3).

Ensaio com *Aedes aegypti*

Os resultados de toxicidade aguda de 24h indicaram que apenas o extrato do caule foi eficiente para causar mortalidade significativa em 10, 50 e 90% da população (Figura 3). A análise pelo método de Probit estabeleceu as concentrações letais (CL) e seus intervalos para CL₁₀ 29,278 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (14,758 a 45,541), para CL₅₀ em 211,259 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (167,865 a 262,59) e CL₉₀ em 1524,384 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (1015,666 a 2846,366). O extrato das folhas não proporcionou cálculo de CL mesmo nas maiores concentrações testadas, com a mortalidade larval inferior a 50% em 24h, sendo considerada não efetivo nos testes padrões de toxicidade, 24 horas após aplicação.

O extrato etanólico do caule de *S. versicolor* em tratamento de larvas provocou alongamento da duração larval para as concentrações de 500 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com valores de 306,82 e 258,60 horas iguais entre si e diferentes das demais concentrações e da testemunha (195 horas). As concentrações de 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ diferem entre si com períodos de 238 e 189 horas. A exposição do produto na menor concentração (62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) as larvas sobreviveram, onde o período larval foi de 189 horas, semelhante à testemunha de 195 horas.

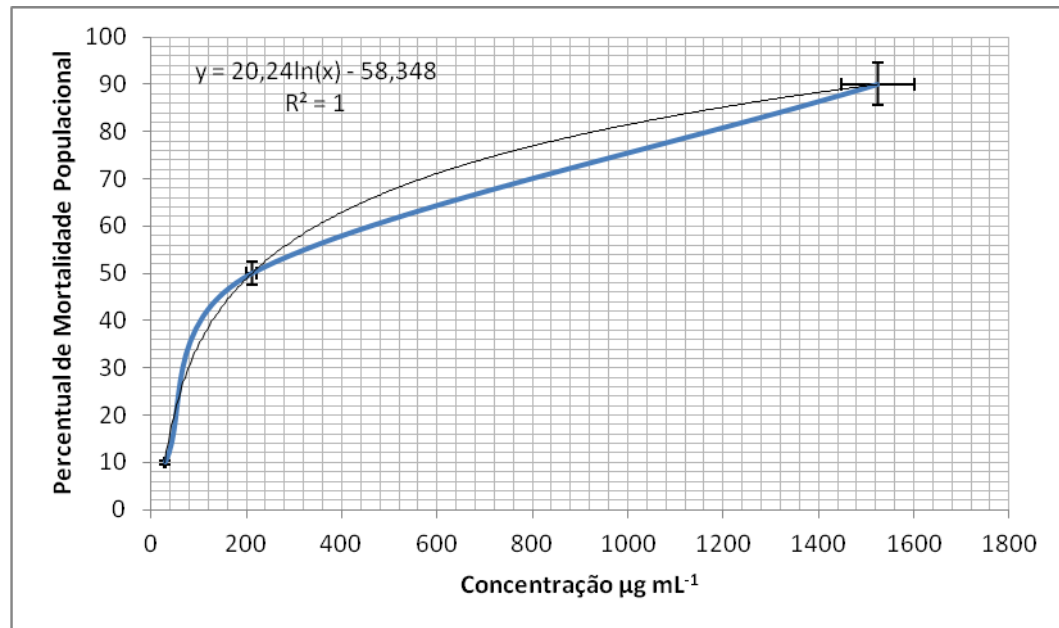


Fig. 3 Efeitos das concentrações letais do extrato do caule de *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae) sobre *Aedes aegypti* (Culicidae)

O alongamento da fase larval indica que o produto causa efeito deletério, no sentido de impedir o inseto de completar seu desenvolvimento, podendo causar maior mortalidade na fase pupal ou outros efeitos posteriores. Autores descrevem os efeitos de plantas inseticidas sobre insetos em diversos momentos, dependendo do ingrediente ativo. Nathan et al. (2005), utilizando extratos metanólicos de folhas e sementes de *Melia azedarach* (Meliaceae), que apresenta classes de compostos semelhantes à espécie *S. versicolor*, constataram atividade larvicida contra *Anopheles stephensi*, outro culicídeo de importância médica. Relações de dose-resposta claras foram estabelecidas, com a dose mais alta de 2% de extrato da planta, induzindo mortalidade de 96%. Além disso, verificaram importante atividade letal sobre pupas e adultos, além de efeito repelente e deterrente.

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 larval, ela foi 66, 60, 36 e 18%, respectivamente, para as dosagens 500, 250, 125 e 62,5 µg mL⁻¹, enquanto que no grupo controle, de 4%. Somente na maior concentração, de 1000 µg mL⁻¹, observou-se mortalidade total de larvas (Tabela 2).

De forma semelhante, Coelho et al. (2009) observaram a mortalidade larval de 53% na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no extrato etanólico do caule de *Xylopiá ermáginata* (Annonaceae), aqui mencionada por apresentar alcalóides e flavonóides como principais metabólitos secundários.

Tabela 2 Efeito do extrato etanólico de caule de *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae) no desenvolvimento e mortalidade de *Aedes aegypti* (Culicidae). Temperatura 26 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 14 horas

Tratamentos $\mu\text{g mL}^{-1}$	Duração larval (horas)	Mortalidade larval (%)	Mortalidade pupal (%)	Mortalidade total (%)	Número de adultos formados
1000	0	100	0	100	0
500	306.82 ^a	66	0	66	34
250	258.60 ^a	60	5,26	62	38
125	238.37 ^b	36	12,28	43	57
62,5	189.36 ^c	18	5,12	22	78
Controle	195.00 ^c	4	0	4	96
CV (%)	47,71				

Valores seguidos pelas mesmas letras não são significativamente diferentes, teste de Tukey ($p < 0.01$)

Em relação à fase pupal, enquanto no grupo testemunha nenhuma pupa morreu, os tratamentos 250, 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ causaram mortalidade de 5, 12 e 5%, respectivamente. Esta situação resultou na formação de 34, 38, 57, 78 e 96 adultos nas concentrações 500, 250, 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e na testemunha, respectivamente. Enquanto na maior concentração, 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, nenhum adulto se formou. Demonstrando o efeito crescente de mortalidade total, enquanto se aumenta a dosagem do extrato. De forma mais acentuada onde o tratamento provocou maior duração larval.

O efeito deletério no desenvolvimento e mortalidade de *A. aegypti* causada pela exposição do extrato etanólico de folhas de *S. versicolor* foi menor que o observado no extrato do caule, onde nenhuma concentração causou mortalidade total.

Sobre o efeito de extrato etanólico de folhas no desenvolvimento, observou-se que somente nas maiores concentrações as larvas tiveram dificuldades em completar as fases. Ocorreu duração larval de 220,36 e 203,20 horas nas concentrações de 1000 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, iguais entre si e diferentes ao controle, com 195 horas, enquanto as demais concentrações, 250, 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ não provocaram efeito no desenvolvimento larval, com durações de 186,28; 166,28 e 181 horas, iguais entre si e com o controle (Tabela 3).

O aumento da duração larval nas concentrações de 1000 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, como efeito deletério do extrato, foi comprovado na mortalidade larval, onde 34 e 35% das larvas morreram, enquanto que no controle somente 4% das larvas não conseguiram completar o desenvolvimento. As demais concentrações, 250, 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ provocaram menor mortalidade larval, com 0, 2 e 8%, respectivamente.

Tabela 3 Efeito do extrato etanólico de folhas de *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae) no desenvolvimento e mortalidade de *Aedes aegypti* (Culicidae). Temperatura 26 ± 2 °C e fotofase de 14 horas

Tratamentos $\mu\text{g mL}^{-1}$	Duração larval (horas)	Mortalidade larval (%)	Mortalidade pupal (%)	Mortalidade total (%)	Número de adultos formados
1000	220.36 ^b	34	1,5	35	65
500	203.20 ^b	35	4,6	38	62
250	186.96 ^a	0	1	1	99
125	166.28 ^a	2	1,0	3	97
62,5	181.00 ^a	8	0	8	92
Controle	195.00 ^a	4	0	4	96
CV (%)	47,71				

Valores seguidos pelas mesmas letras não são significativamente diferentes, teste de Tukey ($p < 0.01$)

O controle de *A. aegypti* com plantas que possuem os mesmos grupos de substâncias secundárias que em *S. versicolor*, como os triterpenos, foi constatado por Coelho et al. (2009), onde o efeito da mortalidade larval no extrato etanólico das folhas de *Guarea guidonia* (Meliaceae) na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi de 6%.

Em todas as concentrações do extrato etanólico de folhas, observou-se pequena mortalidade na fase de pupa, com 1,5; 4,6; e 1% nas concentrações de 1000, 500 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 1,0% na concentração 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$. No grupo controle e na concentração 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, nenhuma pupa morreu.

Ao final resultou na mortalidade total de 35, 38, 1, 3 e 8% nas concentrações 1000, 500, 250, 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, enquanto no grupo controle foi de 4%. Conseqüentemente ocorreu a formação de 65, 62, 99, 97 e 92 adultos, nas concentrações 1000, 500, 250, 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e, 96 adultos, grupo controle.

O extrato etanólico de *S. versicolor* mostrou potencial inseticida somente quando foi feito com caule da planta na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e redução de população na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Este potencial pode estar relacionado com os maiores teores de compostos fenólicos e flavonoides e, dentre os polifenóis, os taninos.

Já é conhecido que a ingestão de plantas com elevados teores de compostos fenólicos, dentre eles os taninos, além de danos às células epiteliais, reduz o nível de proteínas e lipídios, formando um complexo de taninos-proteínas de difícil digestão. Além disso, podem ocorrer deformações letais e redução da disponibilidade dos aminoácidos essenciais (BARBEHENN e MARTIN, 1994; MELLO e SILVA-FILHO, 2002).

Além dos compostos flavonoides e taninos, os triterpenos são outra classe que tem importante influência na ação inseticida e podem atuar como um forte agente supressor de apetite e regulador de crescimento (VIEGAS JUNIOR, 2003). Os quassinoides, marcadores quimiotaxonomicos da família, são reconhecidos por seu potencial inseticida, atuando como anti-alimentar e inibindo o crescimento de pragas agrícolas (POLONSKY et al., 1989). Pavela et al. (2014) citam ainda que o mecanismo de ação de alguns quassinoides parece provavelmente estar associado a um efeito no sistema nervoso do inseto.

Para o extrato etanólico das cascas das raízes de *S. versicolor* foi atribuída aos quassinoides a ação inseticida frente ao *Rhodnius milesi* (Hem: Reduviidae), um triatomídeo responsável pela doença de Chagas (COELHO et al., 2006).

Ensaio com *Artemia salina*

A toxicidade ao micro crustáceo após de 24h revelou o perfil tóxico dos extratos testados, indicando a presença de constituintes capazes de causar mortalidade. Os valores atribuídos para CL_{50} dos extratos etanólicos dos caules em $110 \mu\text{g mL}^{-1}$ e das folhas em $141 \mu\text{g mL}^{-1}$ revelaram a moderada toxicidade (Tabela 4). As variações de mortalidade para 10, 50 e 90% das populações expostas aos diferentes extratos foram próximas, com limites de variação entre 30 a $300 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A relação entre o grau de toxicidade e a concentração letal média (CL_{50}) apresentada por extratos de plantas sobre naúpilos de *A. salina*, tanto extratos com solventes orgânicos e extratos aquosos com valores de CL_{50} acima $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, são considerados atóxicos. Quando a CL_{50} for superior a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ apresenta baixa toxicidade, moderada para CL_{50} entre 100 a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, e muito tóxico quando a CL_{50} foi inferior $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Amarante, 2011).

O fundamento do teste reside na letalidade desse organismo, como uma resposta biológica frente a uma determinada alteração ambiental, onde as variáveis morte ou vida são as únicas envolvidas. Segundo a literatura, este perfil frente a diferentes níveis de toxicidade se correlaciona com alterações mitóticas e inibição da DNA polimerase devido à presença de agentes químicos ou estressores (Meyer et al., 1982; Montanher et al., 2003; Zuque et al., 2004).

Adicionalmente, Bednarczuk et al. (2010) apontam que o ensaio com *A. salina* é uma análise preliminar de toxicidade geral, ao estimar a concentração média letal (CL_{50}); são considerados atóxicos valores acima de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ e não havendo morte acima de 50%. Com base nestas informações, pode-se inferir que os dois extratos etanólicos da planta em estudo são tóxicos, o que difere do estudo de Violante et al. (2012), que avaliaram o extrato etanólico e frações das cascas de exemplares de mesma espécie, sendo a CL_{50} superior a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 4 Concentração letal para náupilos de *Artemia salina* em diferentes concentrações do extrato etanólico da folha e caule de *Simarouba versicolor*, após 24 horas de exposição

Concentração letal	$\mu\text{g mL}^{-1}$		Faixa de toxicidade ($\mu\text{g mL}^{-1}$)*	
	Caule	Folha	Caule	Folha
CL ₁₀	51	69	35,142 a 64,326	51,628 a 84,523
CL ₅₀	110	141	92,878 a 128,694	121,674 a 164,171
CL ₉₀	237	288	194,055 a 325,694	237,373 a 385,271

*Correlação a 95 %

O perfil citotóxico apresentou forte correlação e a linha de tendência expressa foi calculada segundo a equação $y = 52,07\ln(x) - 194,7$ $R^2 = 1$ para o extrato etanólico dos caules e $y = 55,98\ln(x) - 227,0$ $R^2 = 1$ para o extrato etanólico das folhas (Figuras 4 e 5).

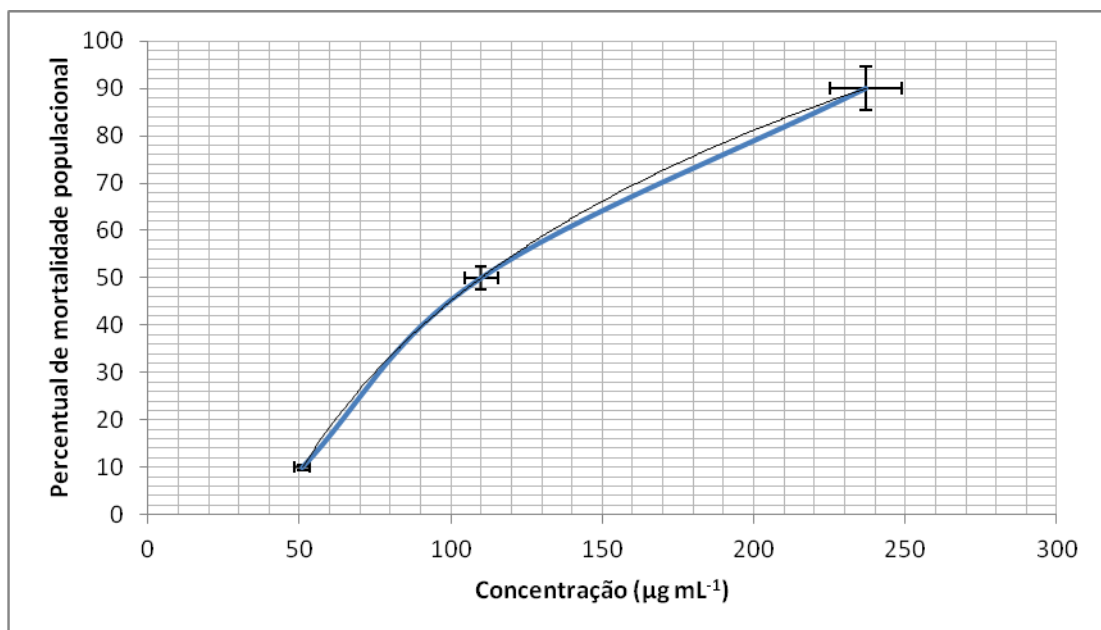


Fig. 4 Concentrações Letais em $\mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato etanólico dos caules de *Simarouba versicolor* sobre náupilos de *Artemia salina*, após exposição de 24 horas

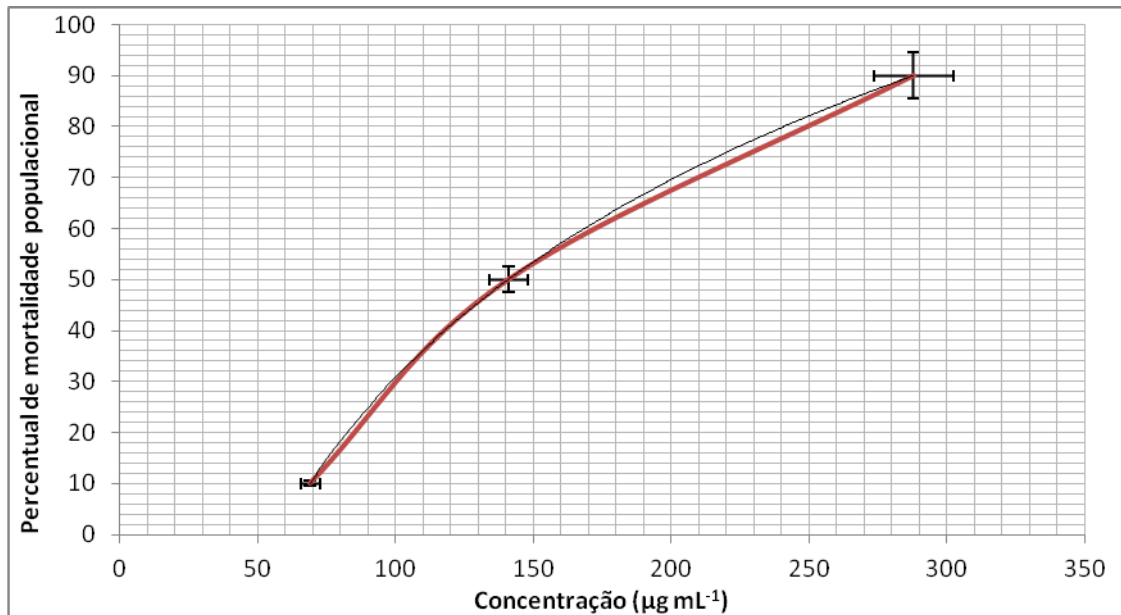


Fig. 5 Concentrações Letais em $\mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato etanólico das folhas de *Simarouba versicolor* sobre naúpilos de *Artemia salina*, após exposição de 24 horas

De acordo com Pompilho (2014), foram calculadas as CL_{50} dos extratos metanólicos das folhas de *Ottonia frutescens* Trel (Piperaceae) e *Trigynaea oblongifolia* Schldl (Annonaceae). Os resultados indicaram os mesmos como moderadamente tóxicos, para *A. salina*, relatando CL_{50} de $149,75 \pm 1, \mu\text{g mL}^{-1}$ e $148,8 \pm 1,74 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Apesar de pertencerem a grupos taxonômicos diferentes, as duas espécies avaliadas pelos pesquisadores apresentaram alcaloides, flavonoides e taninos, os mesmos ingredientes ativos encontrados nos extratos das folhas de *S. versicolor*.

CONCLUSÃO

Conclui-se que os compostos fenólicos e derivados são constituintes majoritários nos extratos analisados, com maiores teores para aos caules. A concentração letal do caule (CL_{50} $211,259 \mu\text{g mL}^{-1}$) justifica seu maior efeito larvicida; com o extrato da folha não foi possível cálculo de CL, mesmo nas maiores concentrações testadas. Considerando a mortalidade total e formação de adultos, o extrato etanólico de caule é um eficiente inseticida. Os extratos dos caules e das folhas revelaram moderada toxicidade frente à *A. salina*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. M. B.; ARRIAGA, A. M. C.; SANTOS, A. K. L.; LEMOS, T. L. G.; BRAZ FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. Ocorrência e atividade biológica de quassinoides da última década. **Química Nova**, v. 30, p.935-951, 2007.

ALVES, I. A. B. S.; MIRANDA, H. M.; BARBOSA, A. P.; RANDAU, K. P.; SOARES, L. A. L. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por espectrofotometria no visível para quantificação de taninos totais na casca do caule de *Simarouba amara* Aubl.1. **Revista Árvore**, v. 39, n. 1, p. 37-47, 2015.

AMARANTE, C. B.; MÜLLER, A. H.; PÓVOA, M. M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazônica** v. 41, n. 3, p. 431-434, 2011.

ARRIAGA, A. M. C.; MESQUITA, A. C.; POULIQUEN, Y. B. M.; LIMA, R. A.; CAVALCANTE, S. H.; CARVALHO, M. G.; SIQUEIRA, J. Á.; ALEGRIO, L. V. Chemical constituents of *Simarouba versicolor*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, n. 3, p. 415-424, 2002.

BARBEHENN, R. V.; MARTIN, M. M. Tannin sensitivity in larvae of *Malacosoma disstria* (Lepidoptera): Roles of the peritrophic envelope and midgut oxidation. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, n. 8, p. 1985-2001, 1994.

BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 11, n. 2, 2010.

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

BROADWAY, R. M.; DUFFEY, S. S. The effect of plant protein quality on insect digestive physiology and the toxicity of plant proteinase inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v. 34, p. 1111-1117, 1988.

CARVALHO, J. I. X. **Estudo fitoquímico e avaliação do potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase de *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae)**. Dissertação de Mestrado em Química Orgânica, Universidade Federal do Ceará, 2008.

CLAYTON, J. W. Simaroubaceae. In: Kubitzki K (ed) The families and genera of vascular plants. Flowering plants. Eudicots. Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae. **Springer**, Berlin, X, p. 408-423, (2011)

COELHO, A. A. M.; PAULA, J. E.; ESPÍNDOLA, L.S. Insecticidal activity of cerrado plant extracts on *Rhodnius milesi* Carcavallo, Rocha, Galvão & Jurberg (Hemiptera: Reduviidae), under laboratory conditions. **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 1, 133-138, 2006.

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, 2009.

DADD, R. H. Alkalinity within the midgut of mosquito larvae with alkaline-active digestive enzymes. **Journal of Insect Physiology**, v. 21, n. 11, p. 1847-1853, 1975.

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.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; SILVA, L. M. G. E.; SARMENTO, U. C. Substâncias de origem vegetal com atividade larvídica contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química** v. 5, n. 3, p. 363-393, 2013.

HARBORNE, A. B. *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. **Springer Science & Business Media**. 1998.

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

MARANGONI, C.; MOURA, N. F.; GARCIA, F. R. M. Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v. 6, n. 2, p. 95-112, 2012.

MCLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C. J.; SMITH, D. L. “**Bench-top**” bioassays for the **discovery of bioactive natural products: an update**. In: Rahman A (org) *Studies in Natural Product Chemistry*, 9. ed. Amsterdam, Elsevier, pp 383-409, 1991.

MELLO, M. O.; SILVA FILHO, M. C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 14, n. 2, p. 71-81, 2002.

MESQUITA, A. G. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste do Brasil: *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae)**. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica, Universidade Federal do Ceará, 1997.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. J.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MONTANHER, A. B. P.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Monitoramento dos extratos brutos de espécies de *Polygala* (Polygalaceae) utilizando *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, 66-68, 2003.

NATHAN, S. S.; SAVITHA, G.; GEORGE, D. K.; NARMADHA, A.; SUGANYA, L.; CHUNG, P. G. Efficacy of *Melia azedarach* L. extract on the malarial vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1316-1323, 2005.

PAVELA, R.; ZABKA, M.; TYLOVA, T.; KRESINOVA, Z. Insecticidal activity of compounds from *Ailanthus altissima* against *Spodoptera littoralis* larvae. **Journal of Agricultural Sciences**, v. 51, n. 1, p. 101-112, 2014.

PEÑAFLORES, M. F. G. V.; ALMEIDA, R. N. A.; SIMOTE, S. Y.; YAMANE, E.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; PAGNOCCA, F. C. Toxicity of substances isolated from *Simarouba versicolor* St. Hil. (Simaroubaceae) to the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. **Bioassay**, v. 4, p. 1, 2009.

PIRES, J. E. P.; FERNANDES, R. M.; FERNANDES, M. Z. L. C. M.; VIANA, G. E. N.; DOURADO, J. C. L.; SOUSA, S. A. A. Determinação da concentração inibitória média (CI₅₀) do extrato aquoso de *Simarouba versicolor*, St. Hill sobre a ovipostura do carrapato bovino (*Boophilus microplus*, Canestrine, 1887). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 4, p. 23-26, 2007.

POLONSKY, J. Quassinoids Bitter Principles II. Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe, v. 47, p. 221-264, 1985.

POLONSKY, J.; BHATNAGAR, S. C.; GRIFFITHS, D. C.; PICKETT, J. A.; WOODCOCK, C. W. Activity of quassinoids as antifeedants against aphids. **Journal of Chemical Ecology**, v. 15, p. 903-998, 1989.

POMPILHO, W. M.; MARCONDES, H. C.; OLIVEIRA, T. T. Bioatividade de três espécies vegetais nativas da Floresta Atlântica brasileira frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 473-480, 2014.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *Agric. Res.* 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. 53-63, 1998.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**, 7 ed, 550 p, 2005.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J.; BRYCE, D. L. **Spectrometric identification of organic compounds**. John Wiley & Sons, 8 ed, 464 p, 2014.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed, 1104 p, 2010.

SIMOTE, S. Y. **Estudo Fitoquímico de *Helietta puberula* (Rutaceae), *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae) e Busca de um Processo de Microencapsulação de Compostos Ativos, Visando o Controle de Formigas Cortadeiras**. Tese, Doutorado em Química, Universidade Federal de São Carlos, 2006.

VASCONCELOS, P. F. C. Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas? **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 2, p. 9-10, 2015.

VERZA, S. G.; KREINECKER, M. T.; REIS, V.; HENRIQUES, A.T.; ORTEGA, G. G. Evaluation of analytical variables of the Folin-Ciocalteu method for the quantitation of the total tannins content using a *Psidium guajava* L. leaves aqueous extract as a model. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 815-820, 2007.

VIEGAS JUNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

VIOLANTE, I. M. P.; HAMERSKI, L.; GARCEZ, W.S.; BATISTA, A. L.; CHANG, M. R.; POTT, V. J.; GARCEZ, F. R. Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central-western region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1302-1308, 2012.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas**. 2 ed. New York, 2009.

ZUQUE, A. L. F.; WATANABE, E. S.; FERREIRA, A. M. T.; ARRUDA, A. L. A.; RESENDE, U. M.; BUENO, N. R.; CASTILHO, R. O. Avaliação das atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica de *Couepia grandiflora* Benth. (Chrysobalanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 129-136, 2004.