



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE**

**ATIVIDADE LARVICIDA E ADULTICIDA DO EXTRATO
ETANÓLICO
BRUTO DE *Deguelia rufescens* var. *urucu* (Ducke) A. M. G.
AZEVEDO EM *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762)
(DIPTERA:CULICIDAE).**

ISRAEL GONÇALVES DOS SANTOS

**Macapá
2021**

ISRAEL GONÇALVES DOS SANTOS

**ATIVIDADE LARVICIDA E ADULTICIDA DO EXTRATO
ETANÓLICO
BRUTO DE *Deguelia rufescens* var. *urucu* (Ducke) A. M. G.
AZEVEDO EM *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762)
(DIPTERA:CULICIDAE).**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós- Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade Federal do
Amapá para obtenção do Título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Área de: concentração: Ensaio
Biológicos

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Nonato
Picanço Souto

**Macapá
2021**

ISRAEL GONÇALVES DOS SANTOS

Dados Internacionais de Catalogação na
Publicação (CIP) Biblioteca Central da
Universidade Federal do Amapá Elaborada
por Jamile da Conceição da Silva - CRB-
2/1010

- S237a Santos, Israel Gonçalves dos.
Atividade larvívica e adultívica do extrato etanólico bruto de
Deguelia rufescens var. *Urucu* (Ducke) A. M. G. Azevedo em
Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus, 1762) (Diptera:
Culicidae) / Israel Gonçalves dos Santos - 2021.
1 recurso eletrônico. 66 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -
Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Macapá, 2021.
Orientador: Professor Doutor Raimundo Nonato Picanço
Souto

Modo de acesso: World Wide Web.
Formato de arquivo: Portable Document

Format (PDF). Inclui referências e
anexos.

1. *Deguelia rufescens* var. *urucu*. 3. Larvívicas. 4. Dengue.
5. *Aedes aegypti* - Controle. I. Souto, Raimundo Nonato
Picanço, orientador. II. Título.

Classificação Decimal de Dewey. 22 ed.
615.321

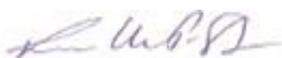
SANTOS, Israel Gonçalves dos. Atividade larvívica e adultívica do extrato etanólico bruto de *Deguelia rufescens* var. *Urucu* (Ducke) A. M. G. Azevedo em *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). Orientador: Raimundo Nonato Picanço Souto. 2021. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós- Graduação em Ciências da Sa

ISRAEL GONÇALVES DOS SANTOS

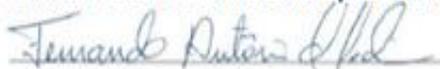
**ATIVIDADE LARVICIDA E ADULTICIDA DO EXTRATO ETANÓLICO
BRUTO DE *Deguelia rufescens* var. *urucu* (Ducke) A. M. G. AZEVEDO
EM *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (DIPTERA:CULICIDAE).**

Dissertação de Mestrado apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá, em cumprimento a requisito final para obtenção de título de Mestre em Ciências da Saúde.

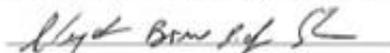
Área de concentração: Ensaios Biológicos



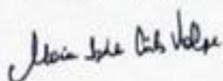
Prof. Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto (Orientador)
Universidade Federal do Amapá-UNIFAP



Prof. Dr. Fernando Antônio de Medeiros (Examinador)
Universidade Federal do Amapá-UNIFAP



Prof. Dr. Cleydson Breno Rodrigues dos Santos (Examinador)
Universidade Federal do Amapá-UNIFAP



Prof.ª Dr.ª Maria Izabel Tentes Cortes (Examinador)
Universidade Federal do Amapá-UNIFAP



Prof. Dr. Roberto Messias Bezerra (Suplente)
Universidade Federal do Amapá

Macapá
2021

Dedico esse trabalho a Deus, aos meus pais, meus filhos e à minha esposa Francisca!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conduzir e iluminar a cada passo rumo ao meu sonho por me conceder força, fé e determinação em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis. E por ter colocado pessoas tão especiais ao meu lado que foram essenciais para enriquecimento e realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Amapá e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pela estrutura física ofertada e corpo docente qualificado, pois oportunizaram o desenvolvimento deste trabalho.

Ao povo brasileiro, especialmente ao contribuinte que financiou indiretamente meus estudos.

Ao Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESPG).

Ao meu orientador, Professor Raimundo Nonato Picanço Souto, pela oportunidade, por ter paciência nas orientações, por todo apoio e por ampliar o meu conhecimento e senso crítico, pois tenho convicção de que foram fundamentais para minha formação profissional. Aos colegas de Laboratório de Aracnida, pela compreensão, companheirismo, humildade e ensinamentos e por serem sempre solícitos em todas as etapas deste trabalho, em especial ao Professor Ricardo ao Emanuel, ao ilustríssimo Professor Irlon Ferreira e ao Igor pela força e ensinamentos, ao professor Roberto Messias e ao técnico de seu laboratório e a técnica Karen.

À querida colega de profissão professora Marlene Trajano, que muito me incentivou na vida acadêmica, à professora de Língua Inglesa Andreia, que me incentivou muito para realização da prova de proficiência na Língua Inglesa. Aos Gestores da Escola SESC, que sempre compreenderam e me liberaram para ir à universidade, especialmente à professora Kátia Luna e a Diretora Ana Paula Santos.

Aos meus pais, Benonil Serrão dos Santos e minha mãe Maria de Nazaré Gonçalves dos Santos, *in memoriam*, meu infinito agradecimento, pois por muitas vezes renunciaram os seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu. À senhora minha mãe que, enquanto viva, me concedeu amor, alegria, proteção, suporte, comprometimento, me ensinou ter humildade e

caráter, mulher de fé, guerreira, agradeço por toda força, compreensão, dedicação, incentivo.

À minha fiel companheira Francisca Marciana Barbosa, obrigado pelo amor, paciência e por me encorajar a concretizar todas as etapas deste trabalho.

Aos meus filhos Mateus, Thiago Gabriel, Marcos Vinicius, Alice Millena e Iago Gabriel, que sempre me incentivaram neste trabalho.

Ao meu querido irmão, Emanuel Santos, meu agradecimento especial, pois, a seu modo, sempre se orgulhou de mim. Obrigado pela confiança!

Agradeço também a meu amigo Eliziário Coelho Bezerra, *in memoriam*, que sempre incentivou na vida acadêmica enquanto estava entre nós, nunca esquecerei seus conselhos.

Por fim, a todos aqueles e àquelas que direta ou indiretamente contribuíram, acreditaram e tiveram paciência comigo para que eu pudesse chegar até a conclusão deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	Estágios do desenvolvimento do mosquito <i>A. aegypti</i>	21
FIGURA 2 –	Esquema geral simplificado da interface entre o metabolismo primário e as vias de síntese dos metabólitos secundários.....	26
FIGURA 3 –	Substâncias tóxicas de <i>Deguella rufescens</i> var. <i>urucu</i> descrito na literatura.....	31
FIGURA 4 –	Estrutura química da rotenona.....	34
FIGURA 5 –	Inibição do complexo da cadeia respiratória mitocondrial I pela proteína induz a apoptose morte celular em uma variedade de células.....	35
FIGURA 6 –	Tubos cilíndricos em que foram realizados os ensaios da atividade adulticida.....	42
FIGURA 7 –	Duas cromatoplasmas: a primeira (7 a) do extrato bruto etanólico de <i>D.rufescens</i> var. <i>urucu</i> fase móvel: Hexano/AcOEt (9:1) visualização: UV, 254nm, dist. Desenvolvimento: 5 cm , a segunda:do extrato bruto, fase móvel: Clorofórmio/ Acetona (5:4),visualização:borrifamento com reagente cloreto férrico, observa-se a amostra retida na origem.....	41
FIGURA 8 –	Cromatoplasma do padrão de rotenona, fase móvel: Hexano/AcOEt (9:1) Visualização: UV, 254nm, dist. Desenvolvimento:5 cm com Rf 0,23.....	42

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1-	Principais classes de inseticidas químicos e o tipo de resistência.....	24
QUADRO 2-	Principais Estratégias para controle de vetores de arbovírus analisadas pelo VCAG.....	32

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	Metabólitos secundários do EBE de <i>D.rufescens</i> var. <i>urucu</i> ...	44
TABELA 2 –	Valores de Ph, Densidade e do rendimento da tintura e do extrato bruto de <i>D.rufescens</i> var. <i>urucu</i>	45
TABELA 3 –	Valores dos R_{fs} calculados das manchas que aparecem na placa cromatográfica da figura 1 e figura 3b (R_f).....	48
TABELA 4 –	Percentual de mortalidade média (\pm desvio padrão) de larvas de <i>A. aegypti</i> frente a diferentes concentrações do extrato bruto de <i>D.rufescens</i> var. <i>urucu</i> , em 24 e 48h.....	49
TABELA 5 –	Estimativas das concentrações letais (CL_{50} e CL_{90}) em ppm e seus respectivos intervalos de confiança (IC) com limite inferior (LI) e limite superior (LS) das concentrações do extrato bruto etanólico de <i>D.rufescens</i> var. <i>urucu</i> em larvas de <i>A.aegypti</i> , em 24 e 48 horas de exposição.....	50
TABELA 6 –	Percentual médio de Mortalidade (%) de indivíduos adultos de <i>A. aegypti</i> submetidos a diferentes concentrações do extrato bruto de <i>D.rufescens</i> var. <i>urucu</i> e ao Controle (Etanol), em 24 horas de exposição.....	51

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massa
CI	Concentração Inibitória
CL ₅₀	Concentração Letal para a morte de 50% dos indivíduos
Cm	Centímetro
CHIKV	Vírus Chikungunya
DENV	Vírus da Dengue
EBE	Extrato Bruto Etanólico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
g	Grama
IEPA	Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
KPa	Quilopascal
mg	Miligrama
mL	Mililitro
OMS	Organização Mundial da Saúde
°C	Grau Celsius
SPSS	Statistical Package for Social Science
SPJ	Science Partner Journal
WHO	World Health Organization
ZIKV	Vírus Zika

RESUMO

ATIVIDADE LARVICIDA E ADULTICIDA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *Deguelia rufescens* var. *urucu* (Ducke) A. M. G. AZEVEDO EM *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE).

Este estudo avaliou a atividade do extrato bruto etanólico das raízes de *Deguelia rufescens* var. *urucu* (Fabaceae) planta conhecida popularmente como “timbó”, na região Amazônica e utilizada em pescarias por indígenas, devido a um conjunto de substâncias químicas chamadas rotenóides encontradas em suas raízes. O objetivo deste trabalho foi obter e identificar as principais classes de metabólitos secundários do extrato bruto etanólico das raízes de *D. rufescens* var. *urucu* e avaliar sua atividade larvicida e adulticida frente ao mosquito *Aedes aegypti*. As raízes de *D. rufescens* var. *urucu* foram coletadas no Município de Macapá-Amapá-Brasil. O Extrato Bruto foi extraído pela técnica de maceração exaustiva usando o etanol a 70° como solvente. A partir de uma solução mãe de 10 000 ppm (partes por milhão) foi preparado diferentes soluções testes a (10 ppm, 20 ppm, 30 ppm e 40 ppm) do extrato bruto. Para ação larvicida do extrato bruto etanólico de *D. rufescens* var. *urucu*, nas 24 horas foi encontrado uma mortalidade 84% nas concentrações de 40 ppm e 62% nas concentrações de 30 ppm e 58,4% nas concentrações de 20 ppm. Em 48 horas de exposição esse valor foi para 98,4% nas concentrações de 40 ppm e 92% nas concentrações de 30 ppm e 86,5 % nas concentrações de 20 ppm. Através dos ensaios larvicida foi possível estabelecer CL₅₀= 12,53 ppm (-2,97 - 18,28) e CL₉₀= 26,92 ppm (20,90 — 47,90). Para ação adulticida observou-se as maiores mortalidades nas concentrações a 80ppm que foi de 67,5% e na concentração a 100ppm que teve mortalidade de 96,25% em 24 horas de exposição. Dos resultados do ensaio adulticida foi possível estabelecer uma CL₅₀= 46,69 ppm (37,45 - 58,96) e CL₉₀= 94,4 ppm (76,2 - 127,6) e seus respectivos intervalos de confiança com os limites inferiores e superiores, evidenciando-se uma atividade tóxica aos adultos de *A. aegypti*. Desta forma, o extrato bruto etanólico de *D. rufescens* var. *urucu*, apresentou atividade larvicida e adulticida contra *A. aegypti*, estudos posteriores ajudarão a compreender melhor essa atividade.

Palavra-chave: dengue; *Deguelia rufescens* var. *Urucu*; larvas; rotenona.

ABSTRACT

LARVICIDE AND ADULTICID ACTIVITY OF THE GROSS ETHANOLIC EXTRACT FROM *Deguelia rufescens* var. *urucu* (Ducke) AM AZEVEDO IN *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE)

This study evaluated the activity of crude ethanol extracts from the roots of *Deguelia rufescens* var. *urucu* (Fabaceae), a plant popularly known as “timbó”, in the Amazon region, used in fisheries by indigenous people, due to a chemical substance called rotenone found in its roots. The objective of this work was to obtain and identify the main classes of secondary metabolites of the crude ethanol extract from the roots of *D. rufescens* var. *urucu* and to evaluate its larvicidal and adulticidal activity against the *Aedes aegypti* mosquito. The roots of *D. rufescens* var. *urucu* were collected in the municipality of Macapá-Amapá-Brasil. The Crude Extract was extracted using the exhaustive maceration technique using 70° ethanol as a solvent. From a stock solution of 10,000 ppm (parts per million) different test solutions were prepared (10 ppm, 20 ppm, 30 ppm and 40 ppm) of the crude extract. For larvicidal action of crude ethanol extract of *D. rufescens* var. *annatto*, in 24 hours, an 84% mortality was found at concentrations of 40 ppm and 62% at concentrations of 30 ppm and 58.4% at concentrations of 20 ppm. In 48 hours of exposure this value went to 98.4% at concentrations of 40 ppm and 92% at concentrations of 30 ppm and 86.5% at concentrations of 20 ppm. Through the larvicide tests it was possible to establish $LC_{50} = 12.53$ ppm (-2.97 - 18.28) and $LC_{90} = 26.92$ ppm (20.90 - 47.90). For adulticidal action, the highest mortalities were observed at the concentrations at 80 ppm, which was 67.5%, and at the concentration at 100 ppm, which had a mortality rate of 96.25% in 24 hours of exposure. From the results of the adulticide test it was possible to establish a $LC_{50} = 46.69$ ppm (37.45 - 58.96) and $LC_{90} = 94.4$ ppm (76.2 - 127.6) and their respective confidence intervals with the lower limits and higher, showing an activity that is toxic to adults of *A. aegypti*. Thus, the crude ethanol extract of *D. rufescens* var. *annatto*, showed larvicidal and adulticidal activity against *A. aegypti*, further studies will help to better understand this activity.

Keywords: dengue fever; *Deguelia rufescens* var. *Urucu*; larvae; Rotenone.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	OBJETIVOS.....	17
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
3.1	OS CULICÍDEOS.....	18
3.2	DOENÇAS EMERGENTES E REEMERGENTES.....	19
3.3	O CONTROLE QUÍMICO E A RESISTÊNCIA DO <i>A. aegypti</i>	20
3.4	PRINCIPAIS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA.....	20
3.5	OS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	22
3.6	CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO <i>Deguelia</i> Aubl., Azevedo Tozzi (1989, 1992, 1994, 1995).....	26
3.6.1	Considerações botânica e química <i>Deguelia rufescens</i> var. <i>urucu</i>.....	26
3.6.2	Principais rotenoides de <i>Deguelia rufescens</i> var <i>urucu</i>.....	27
3.6.3	A rotenona e a espécie <i>Deguelia rufescens</i> var <i>urucu</i>.....	29
3.6.4	Mecanismo de ação da rotenona.....	31
4	METODOLOGIA.....	33
4.1	COLETA E PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	33
4.2	PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DAS RAÍZES DE <i>Deguelia urucu</i>	33
4.3	CONTROLE DE QUALIDADE DA TINTURA DAS RAÍZES DE <i>D.rufescens</i> var. <i>urucu</i>	33
4.3.1	Análise das Classes de metabólitos secundários presentes no extrato bruto de <i>Deguelia urucu</i>.....	35
4.4	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COMPARATIVA.....	36
4.5	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	37
4.5.1	Obtenção das larvas de <i>A. aegypti</i>.....	37
4.5.2	Preparo das soluções testes e avaliação da atividade larvicida.....	37
4.5.3	Avaliação da atividade adulticida.....	39

5	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	41
5.1	SCREENING FITOQUÍMICO PARA AS PRINCIPAIS CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DAS RAÍZES DE <i>D. rufescens</i> var. <i>urucu</i>	41
5.2	CONTROLE DA QUALIDADE DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO.....	41
5.3	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA EM CAMADA DELGADA COMPARATIVA DO EXTRATO BRUTO DE <i>D.rufescens</i> var. <i>urucu</i>	43
5.4	ATIVIDADE LARVICIDA.....	46
5.4.1	Estimativas da CL50 e CL90 do extrato de <i>D.rufescens</i> var. <i>urucu</i> frente às larvas de <i>A. Aegypti</i>.....	47
5.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ADULTICIDA.....	48
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
	REFERÊNCIAS.....	51
	ANEXOS.....	64
	ANEXO A – Confirmação da submissão do Artigo Qualis B1.	64
	ANEXO B – Parecer do Curador HAMAB sobre a Identificação Taxonômica da espécie em estudo.....	65

1 INTRODUÇÃO

Os culicídeos são mosquitos relevantes na epidemiologia de doenças transmitidas por vetores, visto seu papel na transmissão de praticamente metade dos Flavivírus (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Dentre as enfermidades veiculadas pela espécie *Aedes aegypti*, destacam-se dengue, Chikungunya, Zika e febre amarela. A dengue continua se apresentando como um agravo que provoca relevantes efeitos negativos sobre a situação epidemiológica, social e econômica, ocorrendo em ampla distribuição geográfica e causando formas graves e letais (BARRETO; TEXEIRA, 2008).

A incidência de dengue no mundo aumentou em mais de 30 vezes nos últimos 50 anos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que anualmente entre 50 e 100 milhões de infecções ocorram em mais de 100 países (OMS, 2018). A manifestação severada doença, antes denominada Febre Hemorrágica da Dengue (FHD), foi identificada pela primeira vez nos anos 50, durante uma epidemia nas Filipinas e Tailândia. Atualmente, a dengue grave tem se tornado uma das principais causas de hospitalizações e morte de crianças na maioria dos países da Ásia e América Latina (BRASIL, 2017).

Desde 2015, os vírus da dengue (DENV), da zika (ZIKV) e da Chikungunya (CHIKV) circulam no Brasil, e a coinfeção pelo *A. aegypti* com esses arbovírus poderia favorecer a transmissão de um vírus específico, refletindo a mudança no padrão epidemiológico. Contudo, quando o vetor foi coinfectado com dois ou três arbovírus (DENV-CHIKV e DENV- ZIKV), não foram observadas vantagens para nenhum desses vírus (GÖERTZ *et al.*, 2017).

Há décadas, os inseticidas químicos sintéticos das classes dos organoclorados, organofosforados e piretróides são utilizados no controle de pragas agrícolas e de espécies de *culicidae*, de importância vetorial. Recentemente, a Organização Mundial da Saúde vem restringindo esta prática em face aos efeitos prejudiciais, à natureza e conseqüentemente à saúde humana em decorrência da contaminação do ar, da água e do solo, contribuindo para a seleção de espécies de vetores resistentes (ZARA *et al.*, 2016; NIROUMAND *et al.*, 2016).

Em face ao exposto, a comunidade científica viu a necessidade da busca de novas formulações químicas para a realização do controle vetorial. Para isso, as plantas podem ser uma possibilidade, pois, além de serem organismos que coevoluem com microrganismos e insetos, também são fontes naturais de substâncias inseticidas e antimicrobianas, visto que precisam se defender dos ataques patogênicos (bactéria, fungos e vírus) e dos herbívoros. Diversos compostos voláteis (ácidos, aldeídos e terpenos) possuem grande importância por serem considerados compostos altamente bioativos e não causarem danos ambientais (GRAYNER, 2001).

Na perspectiva do uso de substâncias que possam minimizar os impactos ao meio ambiente, menos danos à saúde animal e humana e diminuir a seleção de populações de vetores resistentes, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade inseticida do extrato etanólico bruto da espécie *Deguelia rufescens* var. *urucu* em larvas e adultos de *A. aegypti*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade larvícida e adultícida do extrato etanólico bruto de *Degueliarufescens* var. *urucu* A.M.G. Azevedo & R. A. Camargo, frente à espécie *A. Aegypti*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar através de um Screening fitoquímico as principais Classes de Metabólitos secundários presentes extrato bruto etanólico das raízes de *D. rufescens* var. *urucu*;
- Identificar a presença da rotenona no extrato bruto etanólico através da cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC);
- Avaliar a atividade larvícida do Extrato Bruto Etanólico de *D. rufescens* Var. *urucu*;
- Avaliar a atividade adultícida do Extrato Bruto Etanólico de *D. rufescens* Var. *urucu*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 OS CULICÍDEOS

Os culicídeos são insetos de pequeno porte e corpo delgado que popularmente recebem os nomes de mosquitos, pernilongos, muriçocas e carapanãs, pertencentes a ordem Díptera, subordem *Nematocera* e família Culicidae. Estão agrupados em duas subfamílias: *Anophelinae* e *Culicinae*. A subfamília *Anophelinae* é constituída por espécies do gênero *Bironella Teobald*, 1905, presente apenas na região australiana, *Chagasia Cruz*, 1906, restrito à região neotropical, e *Anopheles Meigen*, 1818, cosmopolita, apresentando 471 espécies formalmente descritas. A subfamília *Culicinae* é a maior subfamília, compreendendo 11 tribos, 92 gêneros e aproximadamente 3.000 espécies descritas (KNIGHT; STONE, 1977; WARD, 1984; FORATTINI, 2002).

Atualmente, conhece-se cerca de 3.510 espécies em 95 gêneros (WARD, 1984, 1992; FORATTINI, 2002; HARBACH, 2007), distribuídos por todo o mundo, sendo a área neotropical a detentora do maior nível de endemismo, uma vez que 27% desses grupos são restritos a essa região biogeográfica (WARD, 1982; FORATTINI, 2002). Essa região conta com 908 espécies (PAPAVERO; GUIMARÃES, 2000), inseridas em 22 gêneros e 9 tribos (FORATTINI, 2002). Guimarães (1997) registra, para o Brasil, 371 espécies, representando 40,8% das ocorrências neotropicais.

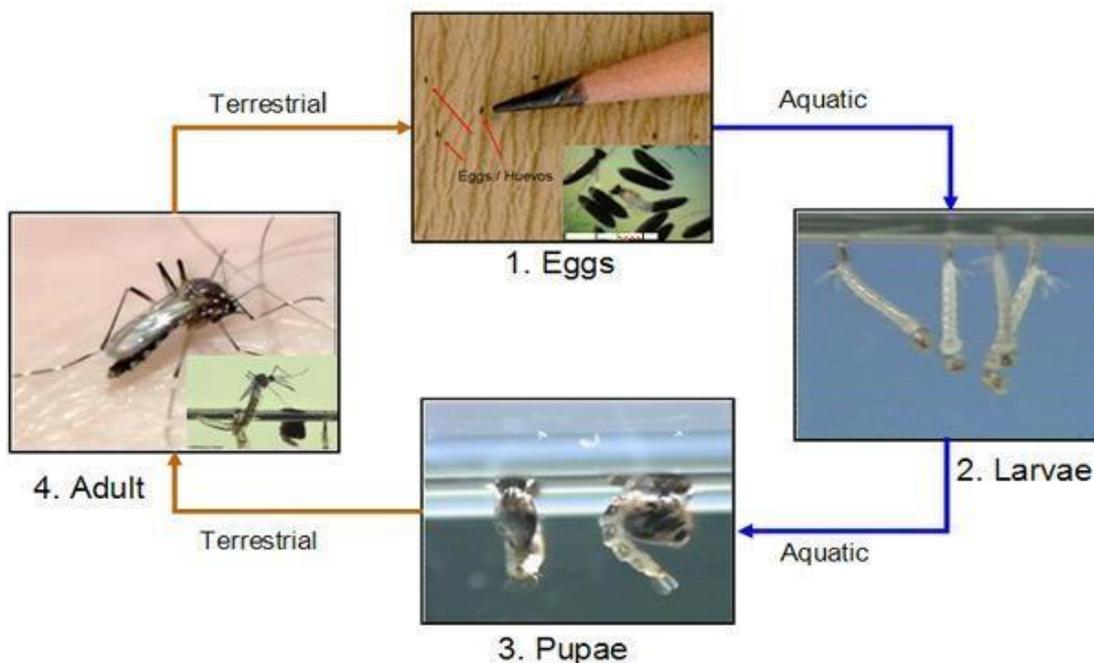
A incidência de mosquitos nas regiões tropicais varia, geralmente, de acordo com as precipitações pluviométricas. A distribuição estacional de mosquitos está influenciada por três fatores climáticos: precipitação pluviométrica, umidade relativa e temperatura. Sendo que a estação chuvosa atua como fator limitante para a maioria das espécies na Amazônia brasileira. Mosquitos adultos podem desaparecer totalmente das coletas durante o período mais seco do ano (BATES, 1949; CAUSEY; SANTOS, 1949; GALINDO *et al.*, 1950; FORATTINI, 1968; GUIMARÃES *et al.*, 1984).

Dentre os culicídeos, o de maior importância epidemiológica nas áreas tropical e subtropical é o *A. aegypti*, importante vetor relacionado à transmissão da dengue, febre amarela urbana, Chikungunya e Zika Vírus. O mosquito

possui hábito antropofílico e apresenta grande capacidade de adaptação a criadouros artificiais, o que possibilita o aumento de sua população, levando ao aparecimento de epidemias, como as da dengue (BESERRA *et al.*, 2006; ZARA *et al.*, 2016).

Seu ciclo biológico é dividido em quatro fases, compreendendo as fases de ovo, larvas, pupa e adulto. As fases de ovo, larva e pupa ocorrem na água, enquanto a fase adulta é terrestre (Figura 1) (NUNES, 2015).

FIGURA 1 – Estágios do desenvolvimento do mosquito *A. aegypti*.



Fonte: CDC (2019).

3.2 DOENÇAS EMERGENTES E REEMERGENTES

A emergência e reemergência de doenças infecciosas ocorrem ao longo do tempo. Antes de uma epidemia, agentes de doenças infecciosas passam por várias fases de adaptação ao acesso ou ao adquirir características patogênicas em um novo hospedeiro (NII-TREBI, 2017).

De acordo com o Catálogo Internacional de Arbovírus, arboviroses são doenças causadas por arbovírus, vírus que são essencialmente transmitidos por artrópodes. Esta doença tem prevalência em países tropicais e subtropicais. Na década de 1960, o *International Committee on the Nomenclature of Viruses* oficialmente definiu o termo arbovírus para se referir

aos vírus mantido através de ciclos envolvendo vetores de artrópodes hematófagos (JENTES, 2011).

3.3 O CONTROLE QUÍMICO E A RESISTÊNCIA DO *A. aegypti*

Uma das estratégias para o controle de surtos de arboviroses como a dengue é o uso de produtos químicos sintéticos com ação rápida para matar os vetores adultos usando a pulverização no espaço (ACHEE, 2015). A maioria dos inseticidas recomendada é da classe química dos piretróides, criando desafios para impedir a pressão de seleção em populações suscetíveis de mosquitos, bem como o controle de vetores resistentes aos piretróides (CORBEL, 2016).

A utilização de vários inseticidas sintéticos tem sido restrita recentemente devido ao alto custo ambiental de prejudiciais efeitos, à sua natureza não biodegradável e ao aumento da resistência ao inseticida. Inseticidas como organoclorados e organofosforados são prejudiciais à saúde por contaminar o ar, a água e os alimentos, enquanto os produtos derivados de plantas não promovem tamanha contaminação e tornam-se importantes alternativas para o controle de insetos resistentes (ZARA *et al.*, 2016; NIROUMAND *et al.*, 2016).

No Brasil, o temefós foi o larvicida utilizado ao longo de 30 anos, mas teve seu uso restringido desde 2010 por causa dos registros de populações de *A. aegypti* resistentes a esse composto (BRASIL, 2010). E, em 2014, foi introduzido nos programas de controle o larvicida piriproxifen (BRASIL, 2014).

Os carbamatos são praguicidas derivados do ácido carbâmico, compostos instáveis com degradabilidade dependente de umidade, temperatura, luz e volatilidade. Estes agem inibindo a colinesterase, cuja inibição pode ser reversível (CASIDA; QUISTAD, 1998; WARE, 2000; HEMINGWAY; RANSON, 2005).

3.4 PRINCIPAIS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS INSETICIDAS

Dentre os mecanismos de resistência aos inseticidas em mosquitos,

podem incluir a dificuldade de penetração ou a penetração reduzida de inseticida no corpo do inseto, tal dificuldade ocorre devido às mutações que afetam as proteínas alvos dos inseticidas, que desempenham um papel fundamental no funcionamento do sistema nervoso dos mosquitos. Qualquer mutação que ocorra nessas proteínas pode potencialmente diminuir a afinidade dos inseticidas com a proteína alvo e contribuir para a resistência. A esse tipo de mecanismo, denomina-se resistência ao local-alvo (DAVID *et al.*, 2013).

Outro mecanismo de resistência do mosquito *A. aegypti* descrito na literatura é a biodegradação ou resistência enzimática, que ocorre através de uma alteração significativade enzimas envolvidas no sequestro e excreção de inseticidas. As enzimas metabólicas primárias envolvidas neste mecanismo de resistência pertencem a famílias de genes como citocromo P450 monooxigenases [P450s], glutationa S-transferases [GSTs] e carboxi/colinesterases [CCEs]. A tabela abaixo mostra as principais classes de inseticidas químicos e os principais mecanismos de resistência do mosquito *A. aegypti* e onde ocorreram as mutações (MOYSÉS *et al.*, 2017).

QUADRO 1 – Principais classes de inseticidas químicos e o tipo de resistência “continua”

Classe de Inseticida Químico	Tipo de Resistência	Mecanismos onde ocorrem as Mutações
Organofosfatos	Local-alvo	Agonistas da acetilcolinestera e (GRIGORAKI, 2016)
Piretroides e DDT (permetrina-deltametrina)	Local-alvo	No canal de sódio dependente de voltagem (HARRIS; RAJATILEKA; RANSON, 2010)
Ciclodienos	Metabólica	Mutação no receptor GABA (THOMPSON, <i>et al.</i> , 1993).

QUADRO 1 – Principais classes de inseticidas químicos e o tipo de resistência “Conclusão”

		2014)
Famílias de Genes alternativos (CCEs, GSTE2 e GSTE7 na resistência à deltametrina)	Metabólica	CCEs podem hidrolisar piretróides (LUMJUAN <i>et al.</i> , 2011)

Fonte: adaptado de Moyses *et al.* (2017).

3.5 OS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

O aumento da transmissão de doenças tendo os insetos como vetores tem levado a comunidade científica a uma busca contínua por novos inseticidas, e as plantas por serem uma importante fonte de substâncias químicas com diferentes estruturas e com diversas atividades contra os insetos vêm apresentando resultados satisfatórios, entretanto seu uso direto ou de seus extratos brutos se limita a aplicações domésticas (VIEIRA; FERNANDES; ANDREI, 2007). A literatura classifica como “inseticidas” aqueles compostos que são utilizados contra formas adultas dos mosquitos e “larvicida” de formas imaturas (FORATINI, 2002).

Sabe-se que as plantas produzem metabólitos primários, onde estes se encontram em todas as plantas e são responsáveis pelo desenvolvimento, e os metabólitos secundários que apresentam atividade de proteção para as plantas bem como propriedades aromáticas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Compostos fenólicos estão amplamente distribuídos em vegetais e em microrganismos. As plantas são capazes de sintetizar uma grande diversidade de compostos com baixo peso molecular, denominados metabólitos secundários, que podem apresentar um papel essencial no metabolismo vegetal (ESCARPA; GONZALES, 2001).

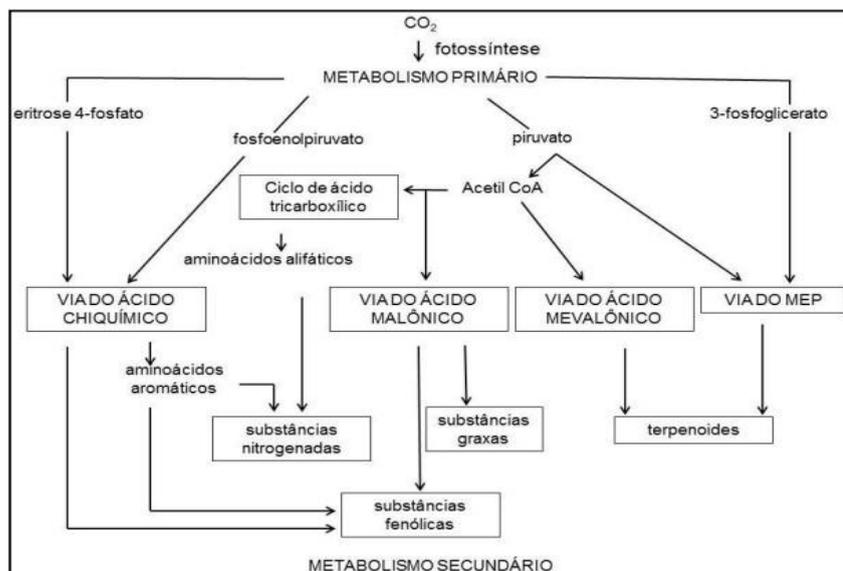
Os compostos fenólicos presentes nas plantas são sintetizados tipicamente durante o seu desenvolvimento, apresentam a função de protegê-las de infecções e agressões de microrganismos e servem como filtros de

radiação UV, além disso, contribuem com o aroma, adstringência, cor e estabilidade oxidativa das mesmas (NACZK; SHAHIDI, 2004). Devido a este potencial de reação contra alguns organismos, essas substâncias vêm ganhando espaço nas pesquisas acadêmicas para que se encontrem novos compostos com atividade antimalárica, inseticida e antimicrobiana (SANTOS *et al.*, 2014).

Os metabólitos secundários são encontrados principalmente em plantas, fungos e outros microrganismos, mas também estão presentes em animais. Atualmente, estima-se que existam mais de 200.000 metabólitos secundários conhecidos (HARTMANN, 2007).

Apesar da grande diversidade, toda essa gama de substâncias produzida pelas plantas é sintetizada a partir de quatro vias metabólicas principais (Figura 5), via do acetato-malonato, via do metileritritol fosfato e via do ácido chiquímico. Os mais importantes blocos construtores para biossíntese dos metabólitos secundários são acetil coenzima A, ácido chiquímico, ácido mevalônico e o metileritritol fosfato (DEWICK, 2009).

Figura 2 – Esquema geral simplificado da interface entre o metabolismo primário e as vias de síntese dos metabólitos secundários.



Fonte: Taiz; Zeiger (2009).

Os compostos fenólicos podem ser divididos em várias classes, destacando-se os ácidos fenólicos, flavonoides e taninos, como antioxidantes fenólicos mais disseminados na natureza (ANGELO; JORGE, 2007).

Dentre as classes de compostos fenólicos, estão os flavonoides que desempenham diversas funções. Entre elas, pode-se citar a proteção contra raios ultravioleta, proteção contra microrganismos patogênicos, ação antioxidante, ação alelopática e inibição enzimática (SIMÕES *et al.*, 2000; HARBORNE; WILLIAMS, 2000; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

Várias plantas vêm sendo investigadas em relação às suas propriedades inseticidas, buscando o controle especificamente de mosquitos vetores, objetivando a diminuição dos impactos que os resíduos tóxicos causam ao meio ambiente (SUKUMAR *et al.*, 2004).

Substitutos para os inseticidas químicos sintéticos têm estimulado muitos trabalhos científicos, contemplando a utilização de óleos, extratos ou constituintes ativos provenientes de plantas (GUISSONI *et al.*, 2013). Compostos a partir de plantas são apresentados como alternativa no controle de vetores por ser de fácil degradação e apresentar menor toxicidade ao homem.

Campell *et al.* (1933) foram os pioneiros na utilização de extratos de plantas no controle de larvas de culicídeos. Os autores isolaram de uma erva silvestre da Rússia *Anabasis aphylla* L. (Chenopodiaceae), alcalóides semelhantes à nicotina com atividade letal em larvas do mosquito *Culex pipens*, *Culex territans*, e *Culex quinquesfasciatus* (CAMPELL *et al.*, 1933).

Os extratos são preparações com consistência líquida, sólida ou intermediária, obtida a partir de um material vegetal ou animal, preparado por percolação, maceração ou outro método adequado e validado, onde utiliza solvente, como álcool etílico, água ou outro solvente adequado (FARMACOPÉIA, 2010). A composição química de extratos e óleos essenciais provenientes de plantas é complexa e pode chegar a centenas de compostos com funções diferentes. (BAKKALI; AVERBECK; IDAOMAR, 2008).

A utilização de plantas como repelente contra os insetos tem sido relatada em diversas regiões, como na Índia, onde as mulheres aplicam diariamente cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em óleo para proteção contra mosquitos, assim como desde o início do século XX, muitos produtos foram empregados como repelente contra os insetos, entre eles, se destacam a citronela, piretro e a andiroba (BUENO; ANDRADE, 2010).

Tradicionalmente, as plantas e seus derivados sempre foram usados para matar os mosquitos e outras pragas domésticas, porém a utilização de

diferentes partes das plantas e seus produtos secundários no controle dos mosquitos vem sendo bem estabelecida por várias investigações (SUBRAMANIAM *et al.*, 2012). Bioensaios realizados para repelência contra espécies de dípteros, em particular aqueles pertencentes ao gênero *Aedes*, *Anopheles* e *Culex*, que são vetores de doenças, responsáveis por problemas de saúde pública, como dengue, malária, febre amarela vem crescendo no meio científico (NERIO *et al.*, 2010).

Nararak *et al.* (2016) relataram vinte e quatro espécies de plantas que apresentam potencial repelente contra mosquitos, dentre elas a *Citrus hystrix* (Rutaceae) e *Cymbopogon Martini* (Poaceae) apresentou 100% de proteção por três horas contra mosquito *A. aegypti* e 100% de proteção contra o mosquito *Anopheles minimus* (Culicidae) durante um período de doze horas.

Atividade larvicida da espécie *Acorus calamus* (Araceae) frente às larvas de mosquitos do *A. aegypti* também vem sendo investigada no trabalho de Zarnigar *et al.* (2014) que avaliaram atividade larvicida do extrato com éter de petróleo e álcool etílico, obtendo resultados positivos para os testes com larvas do *A. aegypti* do terceiro e quarto instar. Outrora, em pesquisas realizadas com a família anacardiaceae, espécie *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae), apresentou atividade larvicida contra o mosquito da dengue através do líquido da castanha do caju (GUISSONI *et al.*, 2013).

O óleo essencial de cinco espécies de plantas *Acorus calamus* (Araceae), *Mentha arvensis* (Labiatae), *Ocimum basilicum* (Lamiaceae), *Saussurea lappa* (Asteraceae) e *Cymbopogon citratus* (Poaceae) também foram investigados para avaliar o potencial larvicida, onde larvas de terceiro instar de *A. aegypti* e *Culex quinquefasciatus* foram expostas a diferentes concentrações e sua mortalidade foi avaliada após 24 horas sob condições de laboratório, no qual os resultados demonstraram que todos os óleos apresentavam mortalidade larval significativa, tanto para *A. aegypti* como para *C. quinquefasciatus* (FURTADO *et al.*, 2005).

Trabalhos com plantas oriundas do Brasil também tem sido testada para avaliação da atividade biológica, principalmente larvicida contra *A. aegypti*, como o extrato bruto hexânico de *Ottonia anisum* (Piperaceae), que obteve 100% de mortalidade após 24 horas de exposição com 200 µg/mL, ao isolar o metabólito 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno do extrato, foi possível

observar mortalidade de 100% das larvas com concentração de 30 µg/mL (MARQUES *et al.*, 2017).

Plantas como *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae), *Cymbopogon winterianus* (Poaceae), *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae), *Ageratum conyzoides* (Asteraceae) e *Carapaguianensis* (Meliaceae) também já foram testadas contra *A. aegypti* obtendo resultados satisfatórios como larvicidas (FURTADO *et al.*, 2005)

3.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO *Deguelia* Aubl., Azevedo Tozzi (1989, 1992, 1994, 1995).

As plantas do gênero *Deguelia* pertencem à família *Fabaceae*, subfamília *Papilionoideae* (FIRMINO, 1998) e tribo *Millettieae* (MCINDOO, 1919; ATCHISON, 1949; SAITO; LUCCHINI, 1998).

O gênero *Deguelia* foi descrito pelo naturalista francês Jean Baptiste Fusée-Aublet, em sua obra *Histoire des Plantes de la Guiane Française*, em 1775, baseando-se na espécie *Deguelia scaandens* Aubl. Durante várias décadas permaneceu esquecido, desde a sinonimização com *Derris lourdeana* (MCINDOO, 1919; ATCHISON, 1949; SAITO; LUCCHINI, 1998).

O gênero *Deguelia* contém 18 espécies aceitas e 48 sinônimos neotropicais (THEPLANT LIST, 2018). Destas, apenas duas, *Deguelia alata* (M. Souza) e *Deguelia densiflora* (Benth) A.M.G. Azevedo ocorrem na América Central (SOUZA, 2009).

As demais se distribuem por toda a América do Sul até os limites do estado de São Paulo, sendo em maior diversidade, entretanto, na bacia Amazônica, onde estão presentes em toda região Norte e por alguns estados da região Nordeste, Centro-oeste e Sudeste. Com exceção de região Sul, visto serem espécies típicas de bioma Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica (SAITO; LUCCHINI, 1998).

Dentre as espécies do gênero *Deguelia*, as que mais se destacam e tem estudos descrevendo a sua toxicidade são: *Deguelia negrensis* (Benth.), *Deguelia utilis* (A.C. Sm.), *Deguelia duckeana* A.M.G Azevedo (ROCHA, ZOGHBI, 1982).

3.6.1 Considerações botânica e química da espécie *Deguelia rufescens* var. *urucu*

Dentre as várias espécies, destaca-se a popularmente conhecida na Amazônia como timbó, timbó vermelho, timborana (GILBERT; FAVORETO, 2010), comumente utilizada em pescarias por índios, devido a uma substância química chamada rotenona, encontrada em suas raízes, altamente tóxica para peixes e muitos insetos (GREENHALGH, 1986). Outros constituintes químicos importantes também podem ser encontrados nas raízes de *D. rufescens* var. *urucu*, como a *daguelina* e *tephrosia*, que apresentaram efeitos tóxicos aos insetos, porém menos ativos do que a rotenona (DAVIDSON, 1930).

A palavra timbó é de origem tupi (ti- sumo, suco e mbo - cobra), significando, portanto, sumo de cobra, suco venenoso, sumo que mata (CORBETT, 1940). Chama-se timbó todas as plantas que esmagadas, trituradas e lançadas na água provocam a morte de peixes pela ação de suas substâncias tóxicas. Devido a este fato, acaba existindo uma grande quantidade de espécies de diferentes famílias com esta nomenclatura (SAITO; LUCHINNI, 1998).

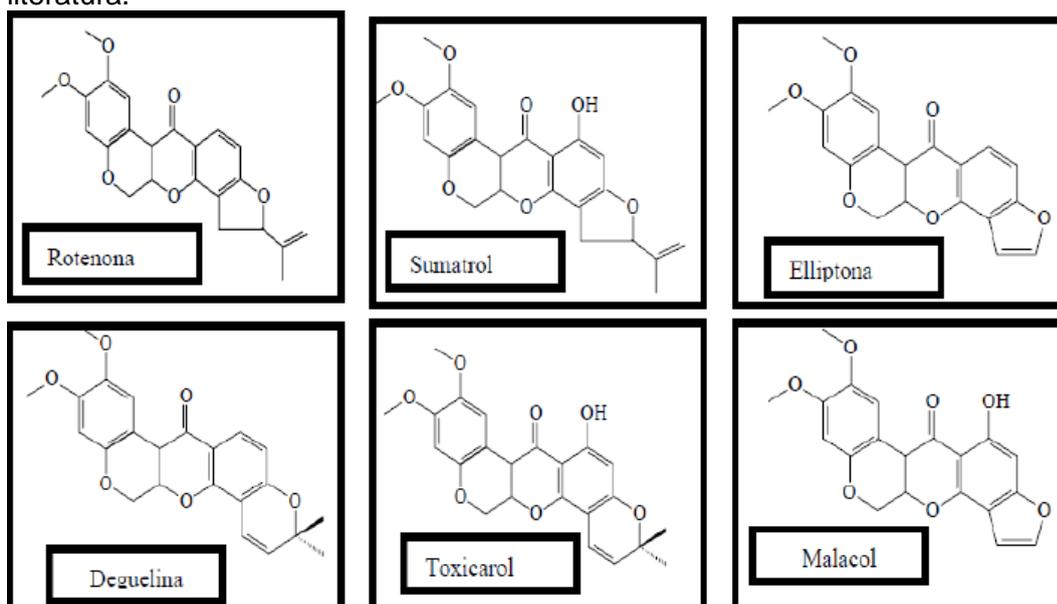
Caminha Filho (1940) cita as variedades de timbó mais conhecidas no Norte brasileiro, entre elas, *Lonchocarpus nicou* Benth (timbó macaquinho), *Lonchocarpus urucu* Killip (timbó vermelho), *Lonchocarpus floribundus* Benth (timbó venenoso), *Derris guianensis* Benth (timbó da mata), *Derris negrensis* Benth (timborana de Gurupá), *Tephrosia brevipes* (timbó do campo) e *Tephrosia nitens* Benth (timbó ajaré) (CAMINHA FILHO, 1940).

O *D. rufescens* var. *urucu* é uma planta trepadeira, ou cipó trepador, que se entrelaça e atinge a copa das árvores de maior porte; os ramos tomam-se escandentes e entrelaçam-se formando um teto compacto sobre o solo, protegendo-o da ação do sol, as raízes apresentam nodosidade resultantes da simbiose com a bactéria *Rhizobium* (COSTA *et al.*, 1997) que, de acordo com a revisão realizada por Francis McBride (1910), foram retiradas do gênero *Lonchocarpus* e colocadas no gênero *Deguelia*, dentro da família das leguminosas (LIMA, 1987).

3.6.2 Principais rotenoides de *Deguelia rufescens* var. *urucu*

Em toda Amazônia, os timbós são conhecidos pelos indígenas e ribeirinhos como plantas que possuem substâncias de forte ação tóxica sobre animais de sangue frio (LÔBO *et al.*, 2008). Os rotenoides são uma classe importante de produtos naturais isolados das espécies dos gêneros *Deguelia*, *Derris* e *Lonchocarpus* e incluem uma grande quantidade de compostos como rotenona, elliptona, sumatrol, malacol, toxicarol e deguelina (figura 3) (COLBERT, 1940; MARICONI, 1981; TEIXEIRA, 2003; KRIEGER, 2010;). Segundo Mariconi (1981), as cinco últimas substâncias têm composição semelhante à rotenona, porém são 5 a 10 vezes menos tóxica para insetos (MARICONI, 1981).

FIGURA 3 – Substâncias tóxicas de *Deguelia rufescens* var. *urucu* descritas na literatura.



Fonte: Teixeira, 2003.

Essas substâncias têm propriedade biológicas e farmacológicas incluindo: antibacteriana, antiviral, antifúngica, atividades anticancerígenas, anti-inflamatórias e inseticidas, e foram divulgadas na literatura (YANG *et al.*, 2001; TAKASHIMA, 2002). De acordo com a literatura, no quadro 2, relata-se os principais rotenoides e suas atividades farmacológicas e biológicas.

QUADRO 2 – Principais atividades farmacológicas e biológicas dos rotenoides descritas na literatura

Principais Rotenoides	Atividade Farmacológica e Biológica	Referência
Hydroximunduserone	Atividade antitumoral	WU <i>et al.</i> (2016)
Trefosina e deguelina	Reagentes apoptóticos e antiangiogênicos contra várias células cancerígenas humanas como pulmão, próstata, estômago.	LUYENGI. <i>et al.</i> , (1994); GARCIA <i>et al.</i> , (2012)
Rotenona e hidroxiirotenona	Inibem o câncer de mama e pulmão	CHEEPRACHA <i>et al.</i> (2007); LEUNER (2013).
Miletosina e rotenona	Pesticidas importantes	VAN PUYUELDE, <i>et al.</i> , (1987); BELOFSKY <i>et al.</i> , (2014)

Fonte: Perveen *et al.* (2019)

3.6.3 A rotenona e a espécie *Deguelia rufescens var. urucu*

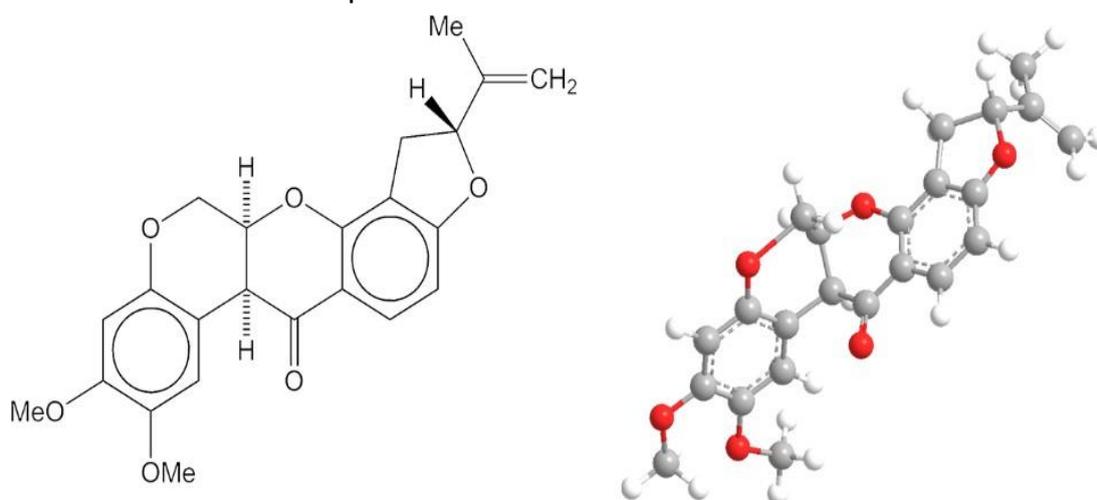
Durante séculos, os povos indígenas usaram plantas da família *Fabaceae* (Leguminosae) nas pescarias para envenenar peixes, obtendo, assim, facilmente sua captura. Essas plantas contêm rotenona, um inseticida não seletivo. Muito utilizada pelos agricultores orgânicos como pesticida, pois não agride o meio ambiente e é biodegradável em climas temperados, foi um inseticida amplamente utilizado antes da Segunda Guerra Mundial. E, após o advento dos inseticidas sintéticos, caiu em desuso (ACHEE, 2019).

Geoffroy (1895) isolou um material de *Robinia nicou* (agora denominada pela literatura *Lonchocarpus nicou*) e nomeou-o como nicouline. Vários anos depois, Nagai (1930) isolou um composto cristalino de *D. elliptica* (Leguminosae) e o chamou de rotenona em homenagem ao nome japonês da planta. Em 1930, eles mostraram ser o mesmo composto. Mayano (1965), em artigo publicado no *Journal of the American Chemical Society*, relatou a síntese total da rotenona.

A rotenona é apenas moderadamente tóxica para a maioria dos mamíferos, porém extremamente tóxica para muitas espécies de peixes e insetos. A rotenona inibe a respiração das mitocôndrias ao bloquear o segmento reduzido de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) desidrogenase da cadeia respiratória quando essa enzima é derivada de espécies altamente suscetíveis ou resistentes ao envenenamento por rotenona (FUKAMI, 1956; TOMIZAWA, 1956; ERNSTER *et al.*, 1963; HORGAN *et al.*, 1968).

A rotenona (C₂₃ H₂₂ O₆) é um isoflavonóide (figura 4) cristalino, inodoro e insípido, biossintetizado pela via do metabolismo secundário da planta. É uma molécula de média polaridade, sua distribuição é observada em diversas partes da planta, sendo a maior concentração nas raízes (MAYANO, 1965).

FIGURA 4 – Estrutura química da rotenona



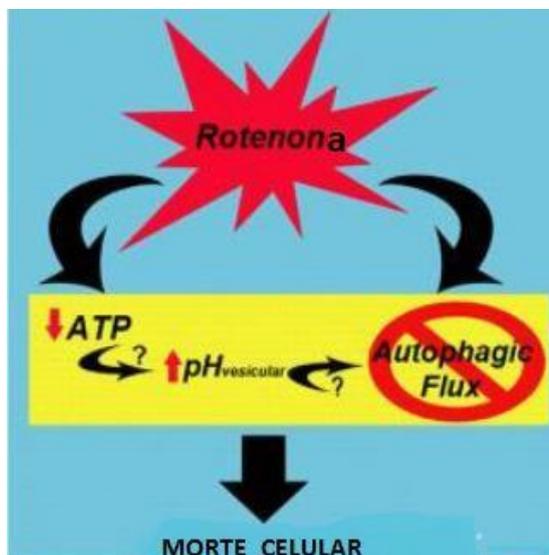
Fonte: JAS (2014)

Burton *et al.* (2012), em seus estudos sobre os efeitos da rotenona em seres humanos, concluíram que a mesma inibe seletivamente o complexo mitocondrial I, induzindo as células ao estresse oxidativo, ao acúmulo de α -sinucleína e consequente à morte dos neurônios dopaminérgicos que são responsáveis pelas principais patologias da Doença de Parkinson. Em seus estudos, os efeitos da rotenona nas primeiras seis horas inibe a síntese de ATP e a indução de morte celular (figura 5) e Apoptose (BURTON *et al.*, 2012).

Essas descobertas indicaram que a rotenona tem efeito na organela mitocôndria da célula, sendo seu efeito potencialmente neurotóxico, sendo

utilizada como modelo da Doença de Parkinson (BURTON *et al.*, 2012).

Figura 5 – Inibição do complexo da cadeia respiratória mitocondrial I pela proteína induz a apoptose morte celular em uma variedade de células



Fonte: Burton *et al.* (2012).

3.6.4 Mecanismo de ação da rotenona

O mecanismo de ação da rotenona compreende a inibição da transferência de elétrons dos centros ferro-enxofre do complexo I para a ubiquinona, tendo como consequência o bloqueio da fosforilação oxidativa com síntese limitada de ATP (PALMER *et al.*, 1968). A rotenona é um clássico inibidor do complexo I da cadeia respiratória e é utilizada como marcador da atividade específica desse complexo (TAHARA *et al.*, 2009). A rotenona causa morte dos animais por meio da inibição da cadeia respiratória mitocondrial, bloqueando a fosforilação do ADP a ATP, sendo peixes e insetos altamente sensíveis (MASCARO *et al.*, 1998).

Devido ao seu forte caráter lipofílico, atravessa rapidamente a barreira hematoencefálica sem necessitar de nenhum transportador, atingindo os neurônios dopaminérgicos e formando inclusões do tipo corpos de Lewy (GREENAMYRE *et al.*, 2003). Em pesquisas, Barbett *et al.* (2000) mostraram que a administração sistêmica de rotenona resulta em degeneração progressiva da substância negra e do estriado cerebral. Drolet e colaboradores (2009) demonstraram, em experimentos com animais tratados

com rotenona, que ela provoca alterações gastrointestinais e a diminuição motilidade e da absorção intestinal desses animais (DROLET *et al.*, 2009; GREENE; NOORIAN; SRINIVASAN, 2009).

A rotenona é capaz de inibir a respiração celular em quase todos os organismos vivos, incluindo mamíferos, peixes, anfíbios, insetos e até plantas (PALMER *et al.*, 1968).

Os peixes são altamente suscetíveis porque a rotenona pode entrar com eficiência e rapidez na corrente sanguínea através das brânquias. Isso é agravado pelo fato de que é lipossolúvel em água e as brânquias têm um teor lipídico relativamente alto que a rotenona favorece. A traqueia de insetos age de maneira semelhante às brânquias de um peixe, o que significa que a rotenona também pode agir rapidamente nos insetos (LINDAHL, 1960).

4 METODOLOGIA

4.1 COLETA E PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal (raízes) de *D.rufescens* var. *urucu* foi coletado em março de 2019 (período mais chuvoso) em uma área de mata de galeria, na localidade de Ilha Grande, distrito do Abacate da Pedreira, município de Macapá, Amapá (N 0° 16' 49.2" W 50° 55' 39.6"). Foi amostrado material fértil para a identificação taxonômica que depositado no Herbário Amapaense (HAMAB) do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá (IEPA), onde encontra-se depositada uma exsicata da espécie em estudo com a identificação I.G. Santos 01/HAMAB 019291, identificada pelo botânico Dr. Tonny David Santiago Medeiros.

O material coletado (raízes) foi conduzido ao Laboratório de Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica (NANOFITO) da Universidade Federal do Amapá, onde foi lavado e submetido a uma pré-secagem à temperatura ambiente, em seguida, foi desidratado e seco em estufa à 40°C com circulação forçada de ar, de acordo com a metodologia descrita por Allen (2013).

4.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DAS RAÍZES DE *D. Rufescens* Var. *urucu*

Uma amostra de 3.995g de raízes foi desidratada em estufa com circulação de ar à 40°C e triturada em moinho de faca e em seguida submetida a extração por maceração com etanol comercial 70% em temperatura ambiente por um período de 10 dias. A solução extrativa obtida (tintura) foi concentrada em evaporador rotativo sob temperatura controlada (45° C).

4.3 CONTROLE DE QUALIDADE DO EXTRATO BRUTO DAS RAÍZES DE *D. Rufescens* var. *urucu*

Para caracterizar as amostras, foram determinados os seguintes

parâmetros: Potencial Hidrogeniônico (pH), densidade e resíduo seco, os testes de pH e densidade foram realizados em triplicata.

- A. Determinação do pH:** Foi realizado em potenciômetro (Meter®) previamente calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0 e os resultados correspondem a média de três determinações independentes .
- B. Teste de Densidade:** Foi realizado em triplicata utilizando-se o método da picnometria (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Inicialmente com o auxílio de uma balança digital pesou-se um picnômetro vazio calibrado de 5 mL anotou-se a massa. Com o auxílio de uma pipeta transferiu-se 5 mL do extrato bruto previamente solubilizado em etanol, transferiu-se a amostra para o picnômetro e pesou-se. Obteve-se o peso da amostra através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. Calculou-se a densidade utilizando a fórmula: $d = m/v$ (onde : d = densidade, m = massa e v = volume).
- C. Rendimento:** O rendimento em relação a massa vegetal de *D.rufescens var. urucu* foi estimado de acordo com a metodologia descrita por Allen (2008).
- D. Resíduo seco:** foi calculado, de acordo com a metodologia proposta pelo Manual de Controle de qualidade do Instituto Adolfo Lutz, utilizando a seguinte fórmula:

$$\frac{100 \times N}{A} = \text{Resíduo \% m/m}$$

Onde: N= 3.995 g (Massa do material vegetal seco)

A = 40000 mL (volume de solvente utilizado)

$$\frac{100 \times 3,995}{40000} = 0,0099 \text{ g/mL}$$

4.3.1 Análise das Classes de Metabólitos secundários presentes no Extrato Bruto das raízes de *D. rufescens* var. *urucu*

As análises fitoquímicas do extrato etanólico de *D. rufescens* var. *urucu* foram realizadas seguindo o Protocolo de Adetuyi e Popoola (Trease, Evans e Sofowora) (2001). Os testes realizados foram alcaloides (Dragendorff/reagente Sonheschauin), fenóis (teste de cloreto de ferro FeCl_3), carboidratos (reagente de Molisch), cumarinas (reagente de Erlich), flavonoides (reagente Shinoda e NaOH a 1%), purinas (teste de HCl), saponinas (teste espuma, reagente de Rosenthaler), terpenoides (reagente Ac_2O) e, por último, o teste de taninos (reagente Cloreto de ferro e cianeto de ferro).

A- Taninos: para identificar a presença de taninos no extrato bruto etanólico de *D. rufescens* var. *urucu* empregou-se a reação de Stiasny descrita por Wissing (1995) pesou-se 10mg do extrato bruto solubilizado em 5 mL de etanol, em seguida em um Becker adicionou-se 20 mL de água destilada e homogeneizou-se com o auxílio de um bastão de vidro. Levou-se manta aquecedora e deixou-se 10 minutos até a fervura. Após esfriar acrescentou-se 10 mL de formaldeído e 5 mL de HCL concentrado colocou-se sobre a manta aquecedora por 10 minutos, homogeneizando a mistura com bastão de vidro a cada 5 minutos. Após esfriar transferiu-se para um tubo de ensaio 2 mL da solução adicionou-se 5 mg de acetato de sódio e com o auxílio de um conta gotas adicionou-se 3 gotas de cloretoférico (FeCl_3) a 1%, agitou-se levemente o tubo de ensaio e observou-se a coloração azul da solução.

B- Fenóis: foi determinado empregando-se o método de Waterma e Molw (1994). Em que uma quantidade de 10mg em triplicata do extrato etanólico foram colocados em um tubo de ensaio e adicionado 1ml de metanol (MeOH) em seguida transferiu-se para balões volumétricos contendo 4ml de água destilada adicionou-se 5 gotas de carbonato de sódio (NaCO_3) e 0,25 ml do reagente Folin-cioncalteau. Após 60 minutos realizou-se a leitura em espectrofotometro (colleman3d) a 760 nm utilizando-se como padrão de identificação ácido tânico.

C- Flavonoides: foi determinado a presença de flavonoides empregando-se a metodologia de Evans, sofowora (1982) em que uma quantidade de 10mg

em triplicata foi dissolvida em (NaOH) a 1%, após homogeneizar adicionou-se reagente Shinoda. Formou-se uma solução amarela indicando a presença de flavonoides.

D- Saponinas: para determinação de saponinas cerca de 10mg em triplicata do Extrato bruto etanolico de *D. rufescens* var. *urucu* foi agitado em 5ml de água destiladae depois agitou-se até formar espuma. A formação de espuma de aparência cremosa indicaa presença de saponinas.

E- Alcalóides: para determinar a presença de alcaloides pegou-se uma quantidade em triplicata de 10mg do extrato bruto de *D. rufescens* var. *urucu* foram aquecidas com H₂SO₄ a 2% por dois minutos. Em seguida foi adicionado algumas gotas do reagente Dragendorf, formou-se um precipitado laranja avermelhado que indica a presença de alcaloides.

4.4 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COMPARATIVA

As análises das amostras em CCDC (Cromatografia em Camada Delgada Comparativa) foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Degani; Cass e Vieira (1998) em que se utilizou placas analíticas pré-fabricadas em gel de sílica (TLC silicagel G60- POLYGRAM[®], SIL G/UV 254 DE ACRHT: 0,20mm Kieselgel 60mit Fluoreszenz- Macherey- nagel, 20X20cm).

O padrão de referência (rotenona) foi cedida pelo professor Milton. N. Silva do LABACROL (Laboratório de Cromatografia) do Instituto de Ciências Naturais- ICEN, da Universidade Federal do Pará, obtida da American Sigma Compay USA, com pureza de 98%, 2mg de rotenona e dissolvida em 2 mL de etanol.

Foram testados quatro sistemas de solventes como fase móvel, dentre aqueles descritos na literatura (PHILINPSON, HEMIINGWAY, 1975; KEPLINGER *et al.*, 2002), que aliavam o maior potencial de separação dos constituintes químicos presentes no extrato bruto, testou-se os seguintes sistemas de eluentes: Acetato de etila/ Hexano (9:1), Clorofórmio/ Acetona (5:4), Clorofórmio/ Metanol (95:5), Acetato de Etila/ Isopropanol(16:3).

Após escolhido os sistemas de eluentes, testou-se a distância ótima de desenvolvimento. Inicialmente utilizou-se placas cromatográficas de 5cm e

11cm de comprimento por 3 cm de largura. Marcou-se 1 cm como linha de aplicação da amostra e com o auxílio de tubos capilares de vidro. A concentração ideal para análise foi uma solução preparada com 5mg do extrato bruto diluído em 2ml de metanol.

A amostra foi aplicada na base inferior da placa (origem) e colocada na cuba cromatográfica saturada em fase móvel adequada hexano/ acetato de etila (9:1). Foram confeccionadas quatro placas com os eluentes descritos anteriormente.

Utilizou-se como parâmetro de validação o fator de retenção (Rf) do marcador químico como referência para identificar a substância rotenona presente no extrato bruto de *D. rufescens* var. *urucu* e do padrão de rotenona analisados concomitantemente.

4.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.5.1 Obtenção das Larvas de *A. Aegypti*

As larvas de *A. aegypti* foram obtidas no insetário do Laboratório de Arthropoda (ARTROLAB) da Universidade Federal do Amapá de uma colônia da cepa Rockefeller. Para os bioensaios da atividade larvicida, todas as larvas foram do estágio L3 para que não chegassem à pupa durante os experimentos. Foram mantidas em condições climáticas padronizadas em uma sala medindo 12 m² (3m x 4m), com temperatura e umidades controladas (26°C a 28°C), fotoperíodo de 12 horas como preconiza a OMS. Um total de 350 larvas foram utilizadas no bioensaio.

4.5.2 Preparo das soluções testes e avaliação da atividade larvicida

Para a realização da atividade larvicida foi preparada uma solução mãe a 10.000 partes por milhão (ppm) utilizando 0,06g do Extrato Bruto das raízes de *D. rufescens* var. *urucu* solubilizado em 6mL de etanol. A partir desta foram preparadas soluções do Extrato Bruto nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 ppm, para o cálculo destas concentrações utilizou-se a seguinte fórmula: $C^i.V^i$

= $C^{ii} \cdot V^{ii}$ (C^i =concentração inicial, V^i = Volume inicial, C^{ii} = concentração final e V^{ii} = Volume final).

Os bioensaios de atividade larvicida foram realizados em quintuplicata, em becker de vidro com capacidade de 100 ml , ao qual adicionou-se inicialmente 80mL de água destilada, em seguida da adição da solução mãe do Extrato Bruto, na quantidade correspondente a concentração a ser testada e homogeneizada a mistura. Posteriormente foram adicionadas as larvas de *A. aegypti* completando-se o volume com água destilada até que atingisse o volume de 100mL em cada Becker. Foram preparados dois grupos controles negativo, um com água destilada e etanol, na proporção da usada para a dissolução do óleo essencial e outro usando somente água destilada.

Foram utilizadas 10 larvas por grupos testes, sendo a leitura da mortalidade realizada em 24 e 48 horas após as larvas de *A. aegypti* serem expostas às soluções. As larvas foram consideradas mortas quando observadas ausência total de movimentos voluntário ou por estimulação exaustiva externa do recipiente feitas com o auxílio de pipeta Pasteur.

Para se obter o índice de mortalidade para cada tratamento, calculado através da fórmula:

$$\frac{\text{Número de larvas mortas}}{\text{Número de larvas testadas}} \times 100 = \% \text{ Mortalidade}$$

Para se estimar os valores das concentrações CL_{50} e CL_{90} da atividade larvicida extrato etanólico de *D. rufescens* var. *urucu* frente às larvas de *A. aegypti*, foi utilizada a análise Probit, levando-se em consideração os tempos 24 e 48 horas através do software Stat Graphic Centurium XXV.1 (Stat Ease Co. MA. USA).

Para verificar se houve diferença significativa ($p = < 0,05$) entre as mortalidades médias obtidas nos diferentes tratamentos adotados, foi utilizado o teste da análise de variância (ANOVA) unidirecional ou bidirecional seguido do teste de Tukey por meio do Software GraphPad Prism 6.02 (GraphPad Software Inc, San Diego, Califórnia EUA).

4.5.3 Avaliação da atividade adulticida

Todos os indivíduos fêmeas adultos de *A. aegypti* utilizados nos ensaios de avaliação da atividade adulticida foram oriundos de uma colônia da cepa Rockefeller, mantida no Laboratório de Arthropoda (ARTHROLAB) da Universidade Federal do Amapá.

Para a execução dos experimentos, utilizou-se a técnica proposta pela WHO (2009), que consiste na utilização de um kit com dois tubos plásticos (altura: 125 mm e diâmetro de 44 mm) separados por uma porta deslizante. O primeiro tubo (tubo de exposição) tem sua parede interna revestida por um papel filtro de cor branca que é impregnada de concentração da substância em análise. No segundo tubo (tubo de observação), a parede interna é revestida com o papel filtro sem nenhum tratamento. No final deste, há uma abertura de 20mm que serve para se introduzir os mosquitos (figura 6). Os dois cilindros foram separados por uma porta deslizante e 20 fêmeas adultas (2 a 5 dias de idade) das espécies de mosquitos em estudo foram introduzidas no cilindro branco, a porta foi aberta e os insetos deslocados para o cilindro da amostra; após 1 hora, foram deslocados ao cilindro branco e retidos durante 24 horas, depois foi realizada a leitura, verificando quantos mosquitos ficaram intoxicados e /ou mortos.

O Extrato Bruto Etanólico foi diluído com etanol nas concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 ppm. O controle foi constituído de etanol. Antes da impregnação dos papéis filtros com os tratamentos os mosquitos foram inseridos no tubo de retenção para se aclimatar por 1 hora. Em seguida, 2mL de cada solução preparada foram aplicados em papéis de filtro Whatman nº.1 (tamanho 12 x 15 cm e deixados evaporar o etanol por 10 min. O papel de filtro do controle foi tratado com 2 ml de etanol. Após a evaporação do solvente, tanto do papel filtro como das concentrações do EBE quanto o de controle foram inseridos nos tubos cilíndricos. Depois disso, dez indivíduos fêmeas de *A. aegypti* não alimentados com sangue, com idade de 4-6 dias, foram transferidos em cada réplica de cada tratamento. Após 1 hora de exposição, os mosquitos retornaram para o tubo de retenção e a mortalidade foi avaliada em 24 horas, considerando como mortos os indivíduos incapazes de voar, andar ou que rotacionarem dentro do tubo.

FIGURA 6 – Tubos cilíndricos em que foram realizados os ensaios da atividade adulticida.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2021.

O percentual de mortalidade foi estimado através da fórmula:

$$\frac{\text{Número de mosquitos mortos}}{\text{Número de mosquitos testados}} \times 100 = \% \text{ Mortalidade}$$

Os percentuais médios de mortalidade de adultos foram submetidos a análise Probit para as estimativas das CL_{50} e CL_{90} e os intervalos de confiança de 95% com limite de superior e inferior utilizando-se o software SPSS versão 12.0.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 SCREENING FITOQUÍMICO PARA AS PRINCIPAIS CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DAS RAÍZES DE *Deguelia rufescens* var. *urucu*

O Screening Fitoquímico para determinar os principais grupos de metabólitos secundários presentes no Extrato Bruto etanólico esta representados na Tabela 1.

Tabela 1 – Metabólitos secundários do EBE de *D. rufescens* var. *urucu*.

Composto bioativo	Teste	Resultado
Taninos	FeCl ₃	+
Alcaloides	HCl a 1%/reagente Dragendo	+
Saponinas	espuma/reagent Bouchard	+
Fenois totais	FeCl ₃	+
Terpenoides	Reagente Ac ₂ O	+
Flavonoides	Reagente Shinoda/ NaOH	+
Cumarinas	1% Reagente Erlich	+

Legenda: “+” = presente; “-”= ausente.

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2021.

Os resultados do Screening fitoquímico realizado no extrato bruto de *D.rufescens* var. *urucu* revelaram a presença de importantes metabólitos secundários como alcaloides e Flavonóides. Esses metabólitos desempenham importante papel como repelente e inibidor de alimentação de insetos herbívoros (HIKAL, 2017).

O screening fitoquímico tem por objetivo a detecção e a prospecção preliminar dos diferentes constituintes químicos de plantas, com base na extração destes com solventes apropriados e na aplicação de testes de coloração (MOREIRA *et al.*, 1979)

Tais compostos têm sido investigados principalmente quanto à atividade larvicida sobre *A. aegypti*, uma vez que extratos orgânicos que apresentam

metabólitos secundários como alcalóides tem efeito tóxico contra larvas desta espécie (RINCON, 2019), pois provocam inibição da oviposição, alimentação, causam repelência, alteram o desenvolvimento, causam deformações, infertilidade, mortalidade, dentre outras (ROEL, 2001).

5.2 CONTROLE DE QUALIDADE DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO

Os resultados dos testes de aferição do pH, da densidade e do rendimento do extrato bruto em relação a massa vegetal seca das raízes de *D. rufescens* var. *urucu* são observados na tabela 2, os principais parâmetros de controle de qualidade do extrato bruto aferidos em triplicata.

Tabela 2 – Valores dos ensaios físico-químicos do extrato bruto de *D. rufescens* var. *urucu*

Amostras	pH	Densidade (mg/mL)	Rendimento
A	6,24	0,81	-
B	6,26	0,79	-
C	6,31	0,83	-
Médias	6,27	0,81 g/cm ³	5,86%

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2021.

A determinação do pH tem como objetivo identificar se uma amostra é ácida, básica ou neutra. Ainda não há na Farmacopeia Brasileira ou qualquer outro documento oficial, especificações de valores de pH para preparações como extrato de plantas ou tinturas, porém, estudo realizado por Borella (2011), com extratos brutos de plantas, foram encontrados valores variando de 5,19 a 5,76 valores que são próximos ao encontrado no presente estudo. Em se tratando de qualidade o pH é um parâmetro importante em produtos de origem vegetal, uma vez que se relaciona com a eficácia e segurança, em atributos como estabilidade, biodisponibilidade e biocompatibilidade (GIL, 2010).

Segundo Borella *et al.* (2011) a densidade de extratos e tinturas oriundos de plantas é considerado padrão no intervalo de 0,81 a 0,98 g/mL, se esses valores forem adotados, indicam que todas as amostras analisadas estão dentro da normalidade.

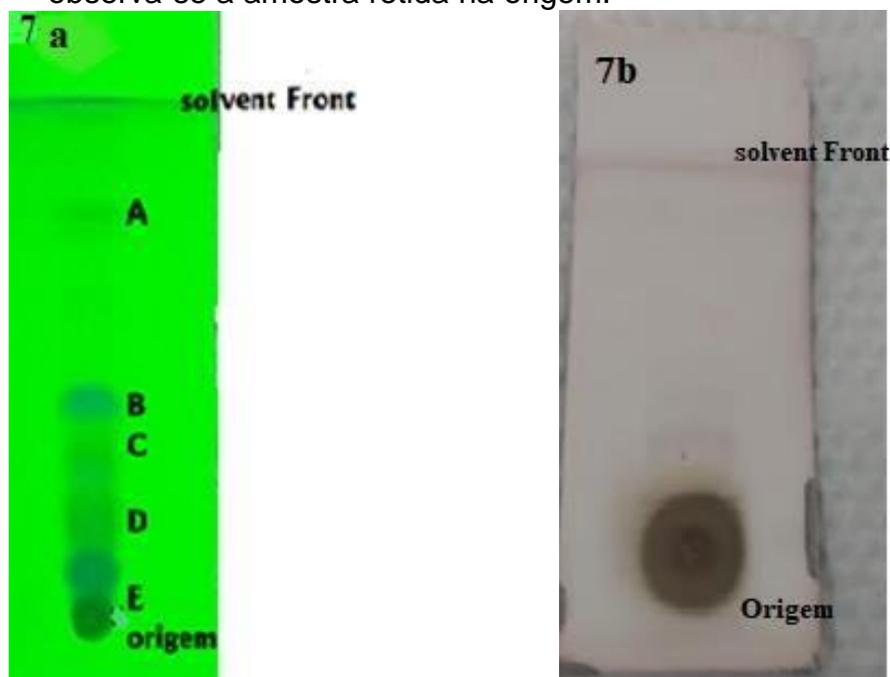
5.3 ANÁLISE CROMATOGRÁFIA EM CAMADA DELGADA COMPARATIVA DO EXTRATO BRUTO DE *D. rufescens* var. *Urucu*

Com o extrato bruto de *D.rufescens* var. *urucu* foram confeccionadas placas cromatográficas eluidas nos quatro sistemas de solventes descritos na metodologia. O sistema que melhor apresentou resultados foi o hexano/acetato de etila na proporção (9:1) demonstrou ser eficiente na separação dos componentes do extrato bruto de *D.rufescens* var. *urucu* quando se emprega camada delgada a sílica gel.

O cromatograma que apresentou a melhor separação foi o da figura 7a, onde pode-se visualizar as manchas em luz ultravioleta 254nm: A- circular pouco intensa Rf 0.74; B- mancha circular escura Rf 0.57; C- mancha circular pouco intensa Rf 0.29; D-mancha circular pouco intensa Rf 0.22; E- mancha ogival escura intensa Rf 0.10; .

De acordo com Collins *et al.* (1995), os componentes são substâncias que, quando separadas, formam manchas claramente visíveis sob a luz UV, como mostra o cromatograma da figura 7 a. Já na figura 7b observa-se o oposto, utilizando o sistema de solvente diferente da figura 7 a (Cloroformio/Acetona (5:4), observa-se que o extrato bruto ficou retido na base impedindo a visualização das manchas

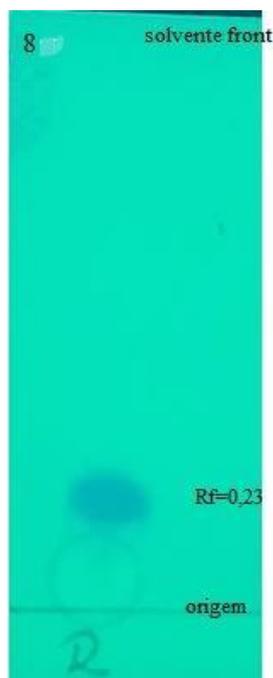
Figura 7 – Duas cromatoplasas: a primeira (7 a) do extrato bruto etanólico de *D.rufescens* var. *urucu* fase móvel: Hexano/AcOEt (9:1) visualização: UV, 254nm, dist. Desenvolvimento: 5 cm , a segunda: do extrato bruto, fase móvel: Clorofórmio/ Acetona (5:4), visualização:borrifamento com reagente cloreto férrico, observa-se a amostra retida na origem.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2021.

Na figura 8 a placa cromatográfica foi confeccionada somente com a substância padrão (rotenona), utilizando a mesma fase móvel (hexano/acetato de etila 9:1); o Rf calculado da mancha coincide com a mancha D da figura anterior. Tal semelhança entre os Rfs sugere a presença da substância rotenona no extrato bruto.

Figura 8 – Cromatoplaça do padrão de rotenona, fase móvel: Hexano/AcOEt (9:1) Visualização: UV, 254nm, dist. Desenvolvimento: 5 cm com Rf 0,23



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2021.

O parâmetro mais importante a ser considerado na CCDC é o fator de retenção (R_f), que é a razão entre a distância percorrida pela substância em questão e a distância percorrida pela fase móvel. Os valores ideais para R_f estão entre 0,4 e 0,6 (COLINS *et al.*, 2006). Os valores dos R_f s calculados na cromatoplaça da figura 7 a estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Faixa de valores de R_f calculados das manchas que aparecem na placa cromatográfica d figura 7^a (R_f)

Mancha	Deslocamento em mm	Faixa de valores de R_f^*
A	28	0.74
B	16	0.57
C	11	0.29
D	8	0.22
E	4	0.10
Solvent Front	37	-

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2021. *Fase móvel: Hexano/acetado de etila (9:1)

A CCDC é uma técnica de adsorção líquido-sólido em que a separação ocorre pela diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária. A figura 7 mostra um cromatograma obtido por CCDC, no qual se pode observar a diferença de afinidade pelas substâncias A, B, C, D, E, sendo a substância E mais retida que a substância A.

Resultados semelhantes aos apresentados nesta técnica de identificação de uma substância a partir de um marcador químico específico têm sido empregado com sucesso com outras espécies, como *Paulinia cupana* (MOUSINHO, 1986), *Casearia sylvestris*, *Cordia ecalyculata* (SAITO, 1986), *Pelmus boldus*, *Bauhini* spp (MELO, 2004).

5.4 ATIVIDADE LARVICIDA

A Tabela 4 mostra os percentuais médios de mortalidade e seus respectivos desvios padrões produzidos por diferentes concentrações do E.E.B da raiz de *Deguelia rufescens* var. *urucu*. Em todas as concentrações, as mortalidades foram significativamente maiores em 48 horas.

Tabela 4 – Percentual de mortalidade média (\pm desvio padrão) de larvas de *A. aegypti* frente a diferentes concentrações do extrato bruto de *D. rufescens* var. *urucu* em 24 e 48h.

Tempo de exposição (h)	C1	C2	10 ppm	20 ppm	30 ppm	40 ppm
24	2 \pm 4,4 7 ^a	0 \pm 0,0 a,f	12 \pm 8,37 a,d	58 \pm 4,47 b	62 \pm 8,37 b	84 \pm 5,4 7 ^c
48	2 \pm 4,4 7 ^a	0 \pm 0,0 a	34 \pm 8,94 b	86 \pm 5,48 c	92 \pm 4,47 ^c ,d	98 \pm 4,4 7 ^d

C1: Controle negativo com água destilada; C2: controle negativo com etanol.

*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (teste de Tukey, $p < 0.05$). Fonte: Elaborado pelo Autor, 2021.

Alguns estudos atribuem a toxicidade e ação inseticida das espécies do gênero, *Derris* e *Lonchocarpus*, principalmente a rotenona que é um rotenóide cristalino, inodoro e insípido, biossintetizado pela via do metabolismo secundário e que aparece sempre acompanhado de outros compostos flavonoídicos rotenoides, tais como deguelina, tefrosina e

toxicarol (KERR, 1982; LIMA, 1987; LIMA; COSTA, 1998).

Foram testadas diferentes concentrações de extrato da raiz de *Derris urucu* em larvas de *Aedes aegypti*, sendo obtida 100% de mortalidade com a concentração de 150µg/ml e a CL50 de 17,6 µg/ml, em 24 horas (GUSMÃO *et al.*, 2002). Vasconcelos *et al.* (2012) constaram a atividade larvicida dos compostos rotenoides *deguelin* (CL50=3,38 ±2,02 ppm), 12 a-hidróxido-α-toxicarol (CL50= 3,22±1,37 ppm), α-toxicarol (CL50= 24.55 ± 0.13 ppm) e tefrosin (CL50= 6.31 ppm ± 0.69), isolados do extrato etanólico bruto de raízes da planta timbó de Caiena, *Tephrusia toxicaria* Pers. (*Fabaceae*).

Espécies dos gêneros *Derris* e *Lonchocarpus* (COSTA *et al.*, 1986; LIMA, 1987), devido a sua toxicidade, apresentam comprovada ação inseticida (MOURA *et al.*, 2002; PEREIRA; FAMADAS, 2004; AZEVEDO *et al.*, 2005) e são utilizadas há várias décadas pelos índios da Amazônia nas pescarias e para o controle de insetos-praga (HIEN; GORTNIZKA; KRAEMER, 2003; MARINOS *et al.*, 2004; KOTZE *et al.*, 2006).

5.4.1 Estimativas da CL50 e CL90 do extrato de *D.rufescens* var. *urucu* frente às larvas de *A. Aegypti*

O extrato bruto etanólico de *D.rufescens* var. *urucu* mostrou um potencial inseticida frente à larvas de *A. aegypti* (Tabela 5).

Tabela 5 – Estimativas das concentrações letais (CL50 e CL90) em ppm e seus respectivos intervalos de confiança (IC) com limite inferior (LI) e limite superior (LS) das concentrações do extrato bruto etanólico de *D.rufescens* var. *urucu* em larvas de *A. aegypti*, em 24 e 48 horas de exposição.

Tempo de exposição (h)	CL50 (IC95% LI-LS)	CL90 (IC95% LI-LS)
24	23,14 (13,445 – 31,119)	43,34 (34,1642 – 78,872)
48	12,53 (-2,974 – 18,2828)	26,92 (20,9012 – 47,9063)

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2021.

A Organização Mundial da Saúde ainda não estabeleceu um critério padrão para determinação da atividade larvicida de produtos naturais, entretanto, alguns autores utilizam a classificação estabelecida por Cheng *et al.* (2003) em que os compostos com $CL_{50} > 100 \text{ mg/L}$ são considerados não ativos com $CL_{50} < 100 \text{ mg/L}$ considerados ativos e aqueles com $CL_{50} < 50 \text{ mg/L}$ altamente ativos.

5.5 ATIVIDADE ADULTICIDA

Todas as concentrações do Extrato Etanólico Bruto de *Deguelia rufescens* var. *urucu* mostraram a atividade inseticida em indivíduos adultos de *A. aegypti* após 24 horas de exposição, produzindo uma mortalidade média variando de 10 a 96,25% (tabela 6). Os resultados mostram claramente que a porcentagem de mortalidade é diretamente proporcional à concentração do extrato. Baseando-se em três níveis, foram definidas as atividades das concentrações dos extratos: 1- 49% baixo, 50-69% moderado e 70-100% alto.

Tabela 6 – Percentual médio de mortalidade (%) de indivíduos adultos de *A. aegypti* submetidos a diferentes concentrações do extrato bruto de *D. rufescens* var. *urucu* e ao Controle (Etanol) em 24 horas de exposição.

Concentração (ppm)	Tempo (h)	N	Nº de mortos	% Mortalidade
20	24	80	8	10
40	24	80	16	20
60	24	80	35	43,75
80	24	80	54	67,5
100	24	80	77	96,25
Controle	24	80	3	3,75

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2021.

Foram estimadas as concentrações letais $CL_{50} = 46,69 \text{ ppm}$ (37,45 - 58,96) e $CL_{90} = 94,4 \text{ ppm}$ (76,2 - 127,6) e seus respectivos intervalos de confianças com os limites inferiores e superiores, evidenciando-se uma atividade tóxica aos adultos de *A. aegypti*.

Alguns estudos demonstraram que, em extratos de espécies do gênero *Deguelia*, a maioria dos compostos ativos é rotenoide, especialmente rotenona, tefrosina, deguelina e 2-hidroxirrottenona. Em experimentos com *Aedes* spp, os

compostos mais eficientes foram rotenona e deguelina (NIRMA *et al.*, 2012), 12a-hidroxi- α -toxicarol e α -toxicarol (NUNES; VASCONCELOS *et al.*, 2012), usararotenóide-A (BOSIRE *et al.*, 2014) e as flavonas (PERUMALSAMY *et al.*, 2015).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho o Extrato Bruto Etanólico obtido das raízes de *Deguelia rufescens* var. *urucu*, no que tange aos bioensaios realizados para determinação da atividade larvicida e adulticida foi possível observar que o Extrato Bruto Etanólico apresentou uma excelente atividade tanto larvicida quanto adulticida frente as larvas e adultos de *A. aegypti*, respectivamente sendo:

- ✓ Para a ação larvicida do Extrato Bruto das raízes de *D. rufescens* var. *urucu* foi encontrada uma CL_{50} de 12,53 ppm e CL_{90} de 26,96 ppm para o tempo de 48 horas após a aplicação do deste;
- ✓ Para atividade adulticida foi observado que nas maiores concentrações de 80 ppm e 100 ppm obtiveram as maiores mortalidades que foram 67,5% e 96,25% respectivamente;
- ✓ Através da cromatografia comparativa em camada delgada foi possível sugerir a presença de rotenona no extrato bruto etanólico comparando os fatores de retenção do extrato bruto com o padrão de rotenona;

Apesar dos resultados obtidos terem confirmado uma ação larvicida e adulticida é necessário estudos adicionais que visem determinar o efeito da rotenona como testa-lo contra outras espécies de mosquitos vetores de doenças.

Assim sendo, o extrato bruto etanólico das raízes de *D. rufescens* var. *urucu*, apresenta-se como um potente produto a ser utilizado como agente larvicida e adulticida frente as larvas e adultos do mosquito *A. aegypti*, no entanto, estudos complementares no que se refere a determinação de toxicidade, desenvolvimento tecnológico, entre outros são essenciais para que se possa ter seu emprego para uso em grande escala.

REFERÊNCIAS

- ACHEE, N.L. et al. Correction: Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. **PLOS Negl. Trop. Dis.**, v.13, n.3, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007275>
- ACHEE, N.L. et al. A Critical Assessment of Vector Control for Dengue Prevention. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v.9, n.5, 2015.e0003655. Disponível: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003655>
- ADETUYI A.O.; POPOOLA, A. V. “Estudos de potencial de capacidade de extração e corantes do corante em planta *Zanthoxylum zanthoxyloides* em tecido de algodão”. **J.Eng. Technol.**, v.8, p.3291-3299, 2001.
- ALLEN, J.L.V.; POPOVICH, N.G., **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 9.ed. Porto Alegre: Artmed; 2013.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Rev.Inst. Adolfo Lutz (Impr.)**, São Paulo, v.66, n.1, 2007. Disponível em: http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552007000100001&lng=es&nrm=iso. Acesso em: 09 jun. 2020.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils--a review. **Food Chem. Toxicol.**, v.46, n.46, p.446-75, 2008. Disponível em: [doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106](https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106). Acesso em: 09 jun. 2020.
- BARRETO, M.L.; TEIXEIRA, M.G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, [S. l.], v.22, n.64, p.53-72, 2008. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/eav/article/view/10348>. Acesso em: 9 jun. 2020.
- BATES, M. **The Natural History of Mosquitoes**. The Macmillan Company, New York, 1949. p. 379.
- BELOFSKY, Gil *et al.* Metabolitos fenólicos antimicrobianos e anti-insectos de *Dalea arsliae*. **Rev. de Prod. Naturais**, v.77, n.5, p.1140-1149, 2014.
- BESERRA, E.B. *et al.* Biologia e Exigências Térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: *Culicidae*) Provenientes de Quatro Regiões Bioclimáticas da Paraíba. **Neotrop. Entomol.**, v.35, n.6, p.853-860, 2006. Disponível: <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2006000600021>. Acesso em: 9 jun. 2020.
- BORELLA, J.; MARTINAZZO, E. G.; AUMONDE, T. Z.. Atividade alelopática de extratos de folhas de *Schinus molle* L. sobre a germinação e o crescimento inicial do rabanete. **Rev. Bras. Bio.**, v. 9, n. 3, pág. 398, 2011.
- BOSIRE, C.M *et al.* Larvicidal activities of the stem bark extract and rotenoids of *Millettia usaramensis* subspecies *usaramensis* on *Aedes aegypti* L. (Diptera: *Culicidae*). **J Asia-Pacific Entomol.**, v.17, n.3, p.531–535, 2014. Doi:
-

10.1016/j.aspen.2014.05.003. Acesso em 22 set 2019.

BURTON J. M. *et al.* Rotenone Inhibits Autophagic Flux Prior to Inducing Cell Death. **ACS Chemical Neuroscience**, v.3, n.12, p.1063-1072, 2012. Disponível em: DOI: 10.1021/cn300145z. Acesso em 22 set 2019.

BRASIL. Dengue: diagnóstico e manejo clínico - adulto e criança. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, 5. Ed, Brasília. 2010. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/dengue_diagnostico_manejo_adulto_crianca_3ed.pdf, Acesso em: 21 jan 2019.

BRASIL. Guia de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília. 2014. Disponível em: www.saude.gov.br/bvs >, Acesso em: 22 dez. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 34, Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. 2019. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/agosto/21/Publicacao-BE-2018-SE-30.pdf>, Acesso 12 de ago de 2019.

CAMPELL, F.L.; SULIVAN, W.W.; SMITH, L.N. The relative toxicity of nicotine, anabasine, menthyl anabasine and luprinine for culicine mosquito larvae. **J. Econ. Entomol.**, v.26, p.500-5, 1933.

CASIDA, J.E.; QUISTAD, G.B. Golden age of insecticide research: past, present, or future? **Annu Rev Entomol.**, v.43, p.1-16, 1998. Disponível em: doi:10.1146/annurev.ento.43.1.1. PMID: 9444749. Acesso em: 22 dez. 2018.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 5 ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1993.

CONSOLI, R.A.G.B.; OLIVEIRA, R.L. **Principais mosquitos de importância sanitária Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1994. 228p.

CORBETT, C.E. **Plantas icotóxicas farmacologia da rotenona**. 1940. 182 p.

CORBEL, V. *et al.* Tracking Insecticide Resistance in Mosquito Vectors of Arboviruses: The Worldwide Insecticide resistance Network (WIN). **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v.10, n.12, 2016. [e0005054]. Disponível: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005054>. Acesso em: 22 dez. 2018.

COSTA, N.A. *et al.* Uso do timbó urucu (*Derris urucu*) no controle do piolho

(*Haematopinus Tuberculatus*) embubalinos, Belém, **EMBRAPA Boletim de pesquisa**, CPATU, 78, 1986. 16p.

COSTA, J.P.C.; ALVES, S.M.; BELO, M. Differences among Timbo (*Derris* spp., *Fabaceae*) Species from Different Amazonian Regions in the control of *Musca domestica*L. **Acta Amazonica**, v.29, n.4, p.573-583, 1999.

CDC. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Links to state and local government West Nile virus web site**. Atlanta, USA, 2006. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/ncidod>>. Acesso em: 12 jun, 2019.

CHEENPRACHA, S. *et al.* Rotenoides citotóxicos das hastes de *Derris trifoliata*. **Can. J.Chem.**, v.85, n.12, p.1019-1022, 2007.

CHENG, S.S. *et al.* Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *BioresourceTechnology*, v.89, p.99-102, 2003.

DAVID, J.P. *et al.* Papel do citocromo P450s na resistência a inseticidas: impacto no controle de doenças transmitidas por mosquitos e uso de inseticidas na Terra. **Transações Filosóficas da Sociedade Real B: Ciências Biológicas**, v.368, n.1612, p.20120429, 2013.

DAVIDSON, W.M. Rotenone as a Contact Insecticid. **J. Econ. Entomol.**, v.23, n.5, p.868-874, 1930. Disponível: <https://doi.org/10.1093/jee/23.5.868>. Acesso em: 12 jun. 2019

DEWICK, P.M. **Medical Natural Products: a biosynthetic approach**. 3. ed, John Wiley & Sons Ltd, 2009. 550 p.

DROLET, R.E. *et al.* Chronic rotenone exposure reproduces Parkinson's disease gastrointestinal neuropathology. **Neurobiol. Dis.**, v.36, n.1, p.96-102, 2009. Disponível em: DOI: 10.1016/j.nbd.2009.06.017. Acesso em: 12 jun, 2019.

DEGANI, A.L.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia um breve ensaio. **Quim. Nova**, v.7, 1998.

ESCARPA, A.; GONZALEZ, M.C. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. **Analytica Chimica Acta**, v.427, n.1, p.119-127, 2001.

CAMINHA FILHO, A.C.C.; **Timbós e rotenona**. Rio de Janeiro. 1940. p.14.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: ANVISA. 2010.
FORATTINI, O.P. O pensamento epidemiológico evolutivo sobre as infecções. **Ver. Saúde Pública**, v.36, n.3, p.257-262, 2002. Disponível: <https://doi.org/10.1590/S0034-89102002000300001>. Acesso em: 12 jun.

2019.

FUKAMI, J. *et al.* Oxidative metabolism of rotenone in mammals, fish, and insects and its relation to selective toxicity. **J. Agric. FoodChem.**, v.17, n.6, p.1217-1226, 1956. Disponível em: DOI: 10.1021/jf60166a048. Acesso em: 12 jun. 2019.

FURTADO, R.F.; LIMA, M.G.A.L.; ANDRADE NETO, M.; BEZERRA, J.N.S.; SILVA, E.G.V. Larvicidal activity of essential oils against *Aedes aegypti* L. (Diptera: *Culicidae*). **Neotrop. Entomol.**, v.34, n.5, p.843-847, 2005. Disponível: <https://www.scielo.br/j/ne/a/swmfVNxRm5HVtDcjVYy9zsd/?format=pdf&lang=pt>

GARCIA, J. *et al.* Síntese de conjugados de gualtina-biotina e investigação das interações de gualtina. **Química biológica e medicinal**, v.20, n.2, p.672-680, 2012.

GEESINK, R.; *Scala Millettiearum: A survey of the genera of the Millettiea* (Legum-Pap.) with methodological considerations. **Leiden University Press**, Leiden, Netherlands, 1984.

GIACOPO, J.O.S. *et al.* Towards the Understanding of Tetrahydroquinolines Action in *Aedes aegypti*: Larvicide or Adulticide? **Mol. Simul.**, v.43, n.2, p.121-123, 2016. Disponível: <https://doi.org/10.1080/08927022.2016.1239823>. Acesso em: 12 jun. 2019.

GILBERT, B.; FAVORETO, R. Estado da Arte/State of the Art *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen. **Rev. fitos**, v.5, p.83-91, 2010. Disponível em: <https://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/103/102>. Acesso em: 12 jun. 2019.

GÖERTZ, G. P. *et al.* Mosquito co-infection with Zika and chikungunya virus allows simultaneous transmission without affecting vector competence of *Aedes aegypti*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v.11, n.6, p.1-22, 2017. Disponível: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005654>. Acesso em: 12 jun. 2019.

GUIMARÃES, J. H. **Systematics database of Diptera of the Americas South of the United States**. São Paulo, Ed. Plêiade/Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, 1997.

GUIMARÃES, M.G.A. *et al.* Desenvolvimento, Viabilidade e Mortalidade de Imaturos de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* Linnaeus, em Água de Duas Espécies de Bromélias: Estudo Bibliográfico e Experimental. **Entomo Brasilis**, v.8, n.3, p.214-221, 2015. Disponível em: doi:10.12741/ebrasilis.v8i3.515. Acesso em: 12 jun. 2019.

GUISSONI, A.C.P. *et al.* Larvicidal activity of *Anacardium occidentale* as an alternative to control *Aedes aegypti* and its toxicity in *Rattus norvegicus*. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v.15, n.3, p.363-367, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000300008>.

GUSMÃO, D.S. *et al.* *Derris (Lonchocarpus) urucu* (Leguminosae) Extract Modifies the Peritrophic Matrix Structure of *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.97, p.371-375, 2002.

GRAYER, R. J.; KOKUBUN, T. Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. **Phytochemistry**, v.56, n.3, p.253-63, 2001. Disponível em: doi: 10.1016/S0031-9422(00)00450-7. PMID: 11243452.

GREENAMYRE, J.T., BETARBET, R., SHERER, T.B. The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environmental and mitochondria. **Parkinsonism Relat. Disord.**, v.9, n.2, p.59-64, 2003. Disponível em: doi: 10.1016/S1353-8020(03)00023-3. PMID: 12915069.

GREENE, J.G.; NOORIAN, A.R.; SRINIVASAN, S. Delayed gastric emptying and enteric nervous system dysfunction in the rotenone model of Parkinson's disease. **Exp Neurol**, v.218, n.1, p.154-161, 2009.

GREENHALGH, E. A. Os efeitos de clordano e rotenona no trato alimentar do grilo decampo. **Toxicology**, v.42, p.317-330, 1986.

GRIGORAKI, L. *et al.* Functional and immunohistochemical characterization of CCEae3a, a carboxylesterase associated with temephos resistance in the major arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v.74, p.61-7, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.05.007>

HARBACH, R.E. **The *Culicidae* (Diptera)**: a review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa*, v.1668, p.591-638, 2007.

HARRIS, A.F.; RAJATILEKA, S.; RANSON, H. Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.83, p.277-84, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0623>.

HARBOPNE, B.J.; WILLIAMS, A.C. Advances in flavonoids research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, n.6, p.481-504, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00235-1).

HARTMANN, T.; From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, n.68, p.2831-2846, 2007. Disponível em: doi:10.1016/j.phytochem.2007.09.017.

HERTIG, M.; WOLBACH, S.B. Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. **J. Med. Res.**, v.44, n.3, p.329-74, 1924. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2041761/>.

HIKAL, S.L. Transmissão do vírus Zika por contato sexual com viajantes para áreas de transmissão contínua - Estados Unidos continentais, 2016. **MMWR. Relatório semanal de morbimortalidade**, v.65, 2016.

HIKAL, W.M.; BAESHEN, R.S.; SAID-AL, H.A.H. Botanical insecticide as simpleextractives for pest control. **Cogent Biol.**, v.3, n.1, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/23312025.2017.1404274>.

HIEN, P.P.; GORTNIZKA, H.; KRAEMER, R. Rotenone - potential and prospect forsustainable agriculture. **Omonrice**, v.11, p.83-92, 2003.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades. Amapá, Macapá. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ap/macapa/panorama>>, Acesso em: 26jan 2019.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: Métodos químicoe físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, p.25 1985.

ISOMAE, K. *et al.* "Effects of T- 82, a new quinoline derivative, on cholinesterase activity extracelular acetylcholine concentration in rat brain". **Jpn. J. Pharmacol.**, Kyoto, v.88, n.2,p.206-212, 2002.

JAFFAR-BANDJEE, M.C; GASQUE, P. Fisiopatologia da artrite crônica após infecção porchikungunya no homem. **Medicina tropical: revue du Corps de sante colonial**, v.72, p. 86-87, 2012.

JENTES, E.S. *et al.* The revised global yellow fever risk map and recommendations for vaccination, 2010: consensus of the Informal WHO Working Group on Geographic Risk forYellow Fever. **Lancet Infect Dis**, v.11, n.8, p.622-632, 2011. Disponível: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70147-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70147-5)

KHAN, M.S.A. *et al.* Fruit-Derived Polysaccharides and Terpenoids: Recent Update on the GastroprotectiveEffects and Mechanisms. **Front. Pharmacol.**, v.9, n.22, p.569, 2018.

KIM, S.I. *et al.* Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*.**J. Stored Prod. Res.**, v.39, s/n, p.293-303, 2003. Disponível: DOI:10.1016/S0022-474X(02)00017-6

KNUDSEN, A.B. Geographic spread of *Aedes albopictus* in Europe and the concernamong public health authorities. **Eur. J. Epidemiol.**, v.11, p.345-48, 1995.

KUNO, G. *et al.* Phylogeny of the genus *Flavivirus*. **J. virology**, v.72, n.1, p.73-83, 1998.

LABEAUD, A. D. Why Arboviruses Can Be Neglected Tropical Diseases. **PLOS Negl.Trop. Dis.**, v.2, n.6, p.e247, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000247>.

LEDERMANN, J.P. *et al.* *Aedes hensilli* as a Potential Vector of Chikungunya and Zika Viruses. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v.8, n.10, p.e3188, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003188>.

LEFEUVRE, A.; MARIANNEAU, P.; DEUBEL, V. Current assessment of yellow fever and yellow fever vaccine. **Curr. Infect. Dis. Rep.**, v.6, n.2, p.96, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11908-996-0005-9>

LEUNER, O. *et al.* Cytotoxic constituents of *Pachyrhizus tuberosus* from Peruvian amazon. **Nat. Prod. Commun.**, v.8, n.10, p.2013. Disponível em: DOI:10.1177/1934578X1300801022.

LI, M.I. *et al.* Oral susceptibility of Singapore *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus) to Zika vírus. **PLOS Negl. Trop. Dis.**, v.6, p.e1792, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001792>.

LIMA, R.R. Informações sobre duas espécies de timbó- *Derris urucu* (Killip et Smith) Macbr. e *Derris nicou* (Killip et Smith) Macbr., como plantas inseticidas. Belém, EMBRAPA-CPATU, p.23, 1987.

LINDAHL, P.; ÖBERG, K. Mechanism of the Physiological Action of Rotenone. **Nature**, v.187, n.784, 1960. Doi:10.1038/187784a0

LING, N.; Rotenone a review of its toxicity and for fisheries management. **Sci.Conserv.**, v.211, p.40, 2002.

LINNAEUS, C. **Species Plantarum**, 1753, p.590.

LÔBO L.T. *et al.* Dihydroflavonols from the leaves of *Derris urucu* (Leguminosae): structural elucidation and DPPH radical-scavenging activity. **J. Braz. Chem.**, v.20, n.6, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000600013>

LUYENGI, L. *et al.* Rotenoids and chalcones from *Mundulea sericea* that inhibit phorbol ester-induced ornithine decarboxylase activity. **Phytochemistry**. v.36, n.6, p.1523-1526, 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89755-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89755-1)

LUMJUAN, N. *et al.* The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v.41, n.3, p.203-209, 2011. Disponível em: doi:10.1016/j.ibmb.2010.12.005.

MACIEL, M. V. *et al.* Extratos vegetais usados no controle de dípteros vetores de zoonoses. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v.12, n.1, p.105-112, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722010000100015>.

MAHENDRADAS, P. Chikungunya in uveitis: text & imaging. **Jaypee Brothers**, New Delhi, p.706-712, 2009.

MANEERAT, S.; DAUDÉ, E. A spatial agent-based simulation model of the dengue vector *Aedes aegypti* to explore its population dynamics in urban áreas. **Ecological Modelling**, v.333, s/n, p.66-78, 2016.

MARICONI, F.A.M.; **Inseticidas e seu emprego no combate às pragas**: com uma introdução sobre o estudo dos insetos. São Paulo: Ed. Nobel, p.246, 1981.

MARTELLI, C. M. T. *et al.* Chikungunya and the eye: a review. **J.Ophthalmic Inflamm. Infect.**, v.3, n.1, p.35, 2013. DOI: 10.1186/1869-5760-3-35.

MATSUDA, H. *et al.* Rotenoids and flavonoids with anti-invasion of HT1080, anti-proliferation of U937, and differentiation-inducing activity in HL-60 from *Erycibe expansa*. **Bioorg. Med. Chem.**, v.15, n.3, p.1539-1546, 2007. Disponível em: doi: 10.1016/j.bmc.2006.09.024.

MELO, J.G. *et al.* Avaliação da qualidade de amostras comerciais de boldo (*Peumus boldus* Molina), pata-de-vaca (*Bauhinia* spp.) e ginko (*Ginkgo biloba* L.). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.14, p.111-120, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2004000200004>

MIYANO, M. Rotenoids. XX.1 Total Synthesis of Rotenone. **J. Am. Chem. Soc.**, v.87, n.17, 3958-3962, 1965. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja01095a030>.

MONATH, T.P. Dengue: o risco para países desenvolvidos e em desenvolvimento. **Anais da Academia Nacional de Ciências**, v.91, n.7, p.2395-2400, 1994.

MOREIRA, L. A.; *et al.* A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. **Cell**, v.139, n.7, p.1268-1278, 2009. Disponível em: doi: 10.1016/j.cell.2009.11.042.

MOREIRA, E.A., Marcha sistemática de análise em fitoquímica, **Trib. Farmac.** V.47, n 1, p.1-19, 1979.

MOUCHET, J.; CARNEVALE, P. Impact Of changes the environment on vector transmitted disease, **Sante**, v.7, n.4, p.263-269, 1997.

MOUSINHO, M.D.C., OLIVEIRA, F.D. Identificação de alcalóides xantínicos do guaraná (*Paullinia cupana* KBK) por cromatografia em camada delgada em amostras de urina. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.1, p.35-44, 1986. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbfar/a/Vh5sGPz7mXJTg6kCLxxXsTD/?lang=pt>. Acess 20 mai 2021.

MOYES, C.L. *et al.* Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v.11, n.7, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005625>

MUYEMBE-TAMFUM, J.J. *et al.* Epidemic of Chikungunya virus in 1999 and 200 in the Democratic Republic of the Congo. **Med. Trop. (Mars)**, v.63, n.6, p.637-638, 2003.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **J. Chromatogr.**, v.1054, p.95–111, 2004.

NARARAK, J. *et al.* Excito-Repellency of Citrus hystrix DC Leaf and Peel Essential Oils Against *Aedes aegypti* and *Anopheles minimus* (Diptera: *Culicidae*), Vectors of Human Pathogens. **J. Med. Entomol.**, v.54, n.1, p.178-186, 2016. Disponível em: doi: 10.1093/jme/tjw143.

NUNES, F.P. **Controle do mosquito *Aedes aegypti* e fungos entomopatogênicos: possibilidades de inserção de temas de biologia para ensino médio num contexto regional.** 2015. 68 f. Trabalho de [conclusão de curso (Graduação em Ciências da Natureza) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, Campos dos Goytacazes, 2015.

OMENA, M.C. *et al.* Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresour. Technol.**, v.98, n.13, p.2549-2556, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.040>.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Programa Especial para Investigación y Capacitación en Enfermedades Tropicales (TDR) DENGUE - guías para el diagnóstico tratamiento prevención y contro. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789995479213_spa.pdf?ua=1, Acesso: 27 dez. 2018.

PAPAVERO, N.; GUIMARÃES, J.H. The taxonomy of Brazilian insects vectors of transmissible diseases (1900-2000) -then and now. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v.95, Suppl1, p.109-18, 2000. Disponível em: doi: 10.1590/s0074-02762000000700019. PMID: 11142699.

PARAMASIVAN, R. *et al.* Vírus Chikungunya vírus isolated in Lakshadweep islands in the Indian Ocean: evidence of the Central/East African genotype. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v.62, n.1, p.67-69, 2009.

PAVELA, R. Possibilities of botanical insecticide exploitation in plant protection. **Pest Technology**, v.1, p.47-52, 2007.

PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. **Ind. Crops Prod.**, v.76, s/n, p.174-187, 2015. Disponível em: DOI:10.1016/j.indcrop.2015.06.050.

PERUMALSAMY, H. *et al.* Larvicidal activity and possible mode of action of four flavonoids and two fatty acids identified in *Millettia pinnata* seed toward three mosquito species. **Parasit. Vectors**, v.8, n.1, p.1-14, 2015. Doi:10.1186/s13071-015-0848-8.

PERVEEN, S. *et al.* Asymmetric total synthesis of rotenoids via organocatalyzed dynamic kinetic resolution. **Commun Chem**, v.2, n.8, 2019. Disponível em: <http://www.doi:10.1038/s42004-019-0110-y>.

PETERSEN; et al. Zika Virus. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v.374,p.1552-1563, 2016.

PIALOUX, G.; *et al.* Chikungunya, an epidemic arbovirose. **Lancet Infect. Dis.**, v.7, n.5,p.319-327, 2007. Disponível em: doi: 10.1016/S1473-3099(07)70107-X.

POOPATHI, S.; ABIDHA, S. Mosquitocidal bacterial toxins (*Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*): Mode of action, cytopathological effects and mechanism of resistance. **J Physiol Pathophysiol**, v.1, n.3, p.22-38, 2010. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/JPAP/article-full-text-pdf/ED79882634>.

RAGONHA, F. H.; NOWAK, R. G. A evolução e potencialização do *Aedes aegypti* em relação às doenças no Brasil e no estado do PARANÁ. **Arquivos do Mudi**, v.22, n.1,p.48-78, 21 maio 2018. Disponível em: <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ArqMudi/article/view/41521>

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E.; Regulando o crescimento e o desenvolvimento: os hormônios vegetais. *In*: RAVEN, P.H; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. (Ed.). **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.646-675.

RINCÓN, R.A.; RODRÍGUEZ, D.; COY-BARRERA, E. Botanicals against Tetranychus urticae Koch under laboratory conditions: A survey of alternatives for controlling pest mites. **Plants**, v.8, n.8, p.272, 2019. Disponível em: doi:10.3390/plants8080272.

ROBILLARD, P.Y. *et al.* Vertical maternal fetal transmission of the chikungunya virus. Tencases among 84 pregnant women. **Presse medicale (Paris, França: 1983)**, v.35, n.5, pt.1, p.785-788, 2006. Disponível em: DOI: 10.1016/s0755-4982(06)74690-5.

ROBINSON MC. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.49, n.1, p.28-32, 1955. Disponível em: doi: 10.1016/0035-9203(55)90080-8.

ROEL, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. **Rev. Int. Des. Local**, v.1, n.2, p.43-50, 2001.

SAITO, M.L.; OLIVEIRA, F. Morfodiagnose e identificação cromatográfica em camada delgada de chá de bugre -*Cordia ecalyculata* Vell. **Rev. Bras. Farm.**, v.67, p.1-6, 1986.

SANTOS, E.D. *et al.* Secretaria da saúde, Estado do Rio Grande do Sul. Alerta sobre o vírus do Nilo ocidental (VNO). Secretaria de saúde, **Boletim epidemiológico, Rio Grande do Sul**, v.8, n.3, set de 2006.

SIMÕES, C.; *et al.* (Org) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/ Editora da UFSC, 2000.

SIMON, F.; SAVINI, H.; PAROLA, P. Chikungunya: a paradigm of emergence and globalization of vector-borne diseases. **Med Clin North Am.**, v.92, n.6, p.1323-1343, 2008. Disponível em: doi: 10.1016/j.mcna.2008.07.008. PMID: 19061754.

SOFOWORA, A. **Medicinal Plants and Traditional Medicine in West Africa**, John Wiley and Sons, NY, EUA, 1982, 256 p.

SMITH, H.H. Controlling yellow fever. *In*: STRODE G.K. *et al.* **Yellow fever**. New York, McGraw-Hill, 1951, 539-628 p.

SHAH, K.V.; GIBBS, C. J.; BANERJEE, G. Virological Investigation of the Epidemic of Haemorrhagic Fever in Calcutta: Isolation of Three Strains of Chikungunya Virus. **Indian J. Med. Res.**, v.52, p.676-683, 1964.

SUKUMAR, K.; PERICH M.J.; BOOBAR L.R.; Botanical desative in mosquito control: Areview. **Adv. Colloid Interface Sci.**, p.303-318, 2004.

TAHARA, E.B.; NAVARETE, F.D.T.; KOWALTOWSKI. Tissue-substrate, and sitespecific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. **Free Radical Biology & Medicine**, v.46, p.1283-1297, 2009.

TAKASHIMA, J.; CHIBA, N.; YONEDA, K.; OHSAKI, A. Derrisin, a new rotenoid from Derris malaccensis plant and anti-helicobacter pylori activity of its related constituents. **Jounal Nature of Products**, n.65, p.611-613, 2002

TANNOUS, I. P. **Perfil Epidemiológico e Geográfico da Infecção Pelo Vírus da Dengue em um Município do Sudoeste de Goiás: um estudo transversal**. 2018. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2018. Disponível em: <http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/8817>. Acesso em: 27 out 2019.

TOMIZAWA, C. Efeitos da rotenona no sistema oxidase 1-glutâmico no inseto. **Botyu-Kagaku**, v.21, p.129-133, 1956.

THEILER, M.; SMITH, H.H.; O efeito do cultivo prolongado in vitro sobre a patogenicidade do vírus da febre amarela. **Int J Clin Exp Med**, v.65, n.6, p.767-786, 1937.

THOMÉ, R.C.A.; YANG, H.M.; ESTEVA, L. Optimal control of *Aedes aegypti* mosquitoes by the sterile insect technique and inceticide. **Math. Biosci.**, v.223, n.1, p.12-23, 2010. Disponível em: doi: 10.1016/j.mbs.2009.08.009

TREASE, G.E.; EVANS, W.C. **Pharmacognosy**. 11 Ed. Ed:Brailliar Tiridal Can MacmillianPublishers, 1989.

VAN PUYVELDE, L. *et al.* Isolamento e elucidação estrutural de compostos potencialmente inseticidas e acaricidas do tipo isoflavona da *Neorautanenia mitis*. **Rev. Prod. Naturais**, v.50, n.3, p.349-356, 1987.

VASCONCELOS, J.N. *et al.* Rotenoids from *Tephrosia toxicaria* with larvicidal activity against *Aedes aegypti*, the main vector of dengue fever. **Química Nova** (Impresso), v.35,p.1097-1100, 2012.

VAZQUEZ-PROKOPEC, G.M. *et al.* Combining contact tracing with targeted indoorresidual spraying significantly dengue transmission. **Science Advance**, v.3, n.2, p.e1602024, 2017. Disponível em: DOI: 10.1126/sciadv.1602024. 17 jun. 2019.

VURRO, M.; GRESSEL, J.; (Ed.). **Novel biotechnologies for biocontrol agentenhancement and management**. Springer Science & Business Media, 2007.

WEAVER, S.C. *et al.* Zika Virus: History, Emergence, Biology and Prospects for Control. **Antiviral Research**, Amsterdam, v.130, p.69-80, 2016.

WISSING, A. The utilization of bark II. Investigation of de Stiasny- reaction for the precipitation of polyphenols in Pine bark extractives. *Svensk Papperstidning* v. 58, n.20, p.45, 1995.

WHO. World Health Organization. Instructions for determining the suscetibility or resistance of adult mosquitoes to organochlorine, organophosphate and carbamate insecticides. Stablishment of the baseline. Geneva: World Health Organization, p.4, 1981.

WHO. World Health Organization. **Guidelines for Laboratory And Field Testing ofmosquito Larvicides**. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69101/1/WHO_CDS_WHOPES_GCD_PP_2005.13.pdf>.

WHO. World Health Organization. South-East Asia Regional Office. Chikungunya Fever, are-emerging Disease in Asia. 2008.

WOJCJECHOWSKI, M. F.; SANDERSON, M.J. **Reconstructing the phylogeny of the legumes (Leguminisae): An early 21st century perspective**. Ed. *In* B. B. Klitgaardand A.Bruneau, *Advances in legume systematics*, Royal Botanic Gardens, 2003.

YANG, S.W. *et al.* Three new phenolic compounds from a manipulated plant cell culture. **J. Nat. Prod.**, n.64, p.313-317, 2001. Disponível em: DOI:10.1021/np0004092. Acesso em: 20 nov 2019.

YARRINGTON, C. D. *et al.* Congenital Zika syndrome arising from sexual transmission of Zika virus, a case report. **Fertil Res Pract**, v.5, n.1, p.1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40738-018-0053-5>. Acesso em: 20 nov 2019.

YERGOLKAR, P.N. *et al.* Chikungunya outbreaks caused by African genotype, India. **Emerg. Infect. Dis.**, v.12, n.10, p.1580, 2006. Disponível em: doi: 10.3201/eid1210.060529. Acesso em: 20 nov 2019.

ZARA, A.L.S.A. *et al.* Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiol. Serv.Saúde**, v.25, p.391-404, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.5123/S1679-49742016000200017>. Acesso em: 20 nov 2019.

ANEXOS

ANEXO A – Confirmação da submissão do Artigo Qualis B1

----- Mensagem encaminhada -----

De: Editorial Office <sustainability@mdpi.com>

Para: Israel Gonçalves dos Santos <jgsantos33@yahoo.com.br>

Cc: Raimundo Nonato Picanço Souto <rnpsouto@unifap.br>; Ricardo Marcelo Dos Anjos Ferreira <ricardomf@gmail.com>

Enviado: domingo, 30 de maio de 2021 04:06:39 BRT

Assunto: [Sustainability] Manuscript ID: sustainability-1260324 - Submission Received

Dear Mr. Gonçalves dos Santos,

Thank you very much for uploading the following manuscript to the MDPI submission system. One of our editors will be in touch with you soon.

Journal name: Sustainability

Manuscript ID: sustainability-1260324

Type of manuscript: Article

Title: LARVICIDE ACTIVITY OF THE RAW ETHANOLIC EXTRACT OF *Deguelia urucu* ROOTS (KILLIP &

[A.C.Sm.](#)) A.M.G.AZEVEDO & R.A.CAMARGO IN *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera:Culicidae)

Authors: ISRAEL GONÇALVES DOS SANTOS *, Raimundo Nonato Picanço Souto,

Ricardo Marcelo Dos Anjos Ferreira

Received: 30 May 2021

E-mails: jgsantos33@yahoo.com.br, rnpsouto@unifap.br, ricardomf@gmail.com

You can follow progress of your manuscript at the following link (login required):

https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review_info/514bfc8361181323b8c6da3c51bdca21

The following points were confirmed during submission:

1. Sustainability is an open access journal with publishing fees of 1900 CHF

~~for accepted papers (see https://www.mdpi.com/about/for_details). This~~

ANEXO B – Parecer do Curador HAMAB sobre a Identificação Taxonômica da espécie em estudo.



Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá – IEPA
Núcleo de Biodiversidade – NUBIO
Herbário Amapaense - HAMAB

PARECER

Parecer Nº 03/2021 – HAMAB/NUBIO/IEPA

Macapá, 11 de maio de 2021.

De: **Dr. Tonny David Santiago Medeiros – Curador HAMAB**

Para: **Israel Gonçalves dos Santos – PPGCS/UNIFAP**

Assunto: **Depósito e Identificação Taxonômica de Amostras Botânicas**

Prezado(a) Senhor(a),

Conforme procedimentos adotados à identificação taxonômica do material enviado a este herbário seguem as informações que corroborarão a citação em Monografias e Publicações:

Familia	Nome Científico	Coletor e N°	Local da Coleta / Data de coleta / Coordenadas
Fabaceae	Dequelia urucu (Klipp & A.C.Sm.) A.M.G.Azevedo & R.A.Camargo	I.G. SANTOS 01 / HAMAB 019291	Brasil: Amapá, Distrito Abacate da Pedreira, comunidade Ilha Grande Rodovia AP 070 Km 40/ 14.III.2020 Lat.: 0° 16' 49.2" N; Long.: 52° 55' 38.6" W

Atenciosamente,

Tonny David Santiago Medeiros
Dr. Tonny David Santiago Medeiros
Curador do Herbário Amapaense – HAMAB/NUBIO/IEPA
Decreto Nº 0125 – 23.01.2018/IEPA/GEA