

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE BIOMEDICINA

RAY SILVA DE ALMEIDA

**PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO
ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Azadirachta indica* (NIM) FRENTE A LARVAS DE
*Aedes aegypti***

Juazeiro do Norte - CE

2018

RAY SILVA DE ALMEIDA

**PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO
ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Azadirachta indica* (NIM) FRENTE A LARVAS DE
*Aedes aegypti***

Artigo Científico apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof.^a Ma. Raíra Justino Oliveira Costa

Juazeiro do Norte - CE

2018

RAY SILVA DE ALMEIDA

**PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO
ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Azadirachta indica* (NIM) FRENTE A LARVAS DE
*Aedes aegypti***

Artigo Científico apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof.^a Ma. Raíra Justino Oliveira Costa

Data da aprovação: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a Ma. Raíra Justino Oliveira Costa
Centro Universitário Leão Sampaio

1º Examinador: Prof.^a Ma. Ana Ruth Sampaio Grangeiro
Centro Universitário Leão Sampaio

2º Examinador: Prof. Esp. Cícero Roberto Nascimento Saraiva
Centro Universitário Leão Sampaio

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer em primeiro lugar ao Autor da vida, Cristo Jesus, meu Senhor e Salvador, minha maior fonte de motivação em tudo que faço sem o qual eu seria como um barco à deriva, vivendo sem rumo e em minha própria justiça. Aos meus queridos e amados pais José do Carmo Silva e Maria Viana de Almeida, pelo amor, incentivo e por todo o esforço para que conseguisse chegar ao fim dessa primeira jornada. A minha irmã Raiane Silva de Almeida, pelo grande apoio e companheirismo.

A minha amiga, professora e excelente orientadora Raíra Justino Oliveira Costa, que me ajudou a crescer profissionalmente com novas e brilhantes ideias, além de me fornecer oportunidades. A minha exímia coordenadora Ana Ruth Sampaio Grangeiro, por todo apoio durante todo o curso. Ao meu grande amigo e professor Fernando Gomes Figueredo, por me dar oportunidades e me fazer crescer como profissional. Quero também agradecer a todos os profissionais do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio.

Quero também externar minha gratidão a todos os meus amigos que sempre oraram e me fizeram ser uma pessoa melhor, em especial a minha amiga Carol Justino, Dayane Aquino, Patrícia Alcântara, Geovani Saraiva, Jairo Salviano, Maria Elizabete, Carlos Santos, Ana Santos e meu querido e amigo pastor Elvis Diniz, meu muito obrigado.

As palavras são poucas e simples, mas por trás dela existe uma sinceridade e um contexto de vida pessoal, uma história e um turbilhão de sentimentos. Essas palavras nunca serão suficientes para expressar com clareza o que sinto, no entanto, procuro expressar com atitudes e gestos a fim de honrar a vocês que me honraram. Fica aqui o meu muito obrigado a todos que fizeram e fazem parte dessa história de luta, garra e companheirismo. Amo todos vocês, e que Deus vos abençoe muitíssimo e faça os vossos caminhos prosperarem. Obrigado!

Porque dEle, e por meio dEle, e para Ele são todas as coisas. A Ele, pois, a glória eternamente. Amém! (Romanos 11:36)

**PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO
ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Azadirachta indica* (NIM) FRENTE A LARVAS DE
*Aedes aegypti***

Ray Silva de Almeida¹

Ma. Raíra Justino Oliveira Costa²

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo principal realizar a perfil fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *A. indica* (EEFAI) e avaliar sua atividade larvicida frente *Ae. aegypti*. A coleta do vegetal foi realizada na cidade de Tarrafas – Ce, e encaminhadas para o Centro Universitário Leão Sampaio para secagem e obtenção do extrato etanólico. A fitoquímica do EEFAI foi realizada por meio da técnica de Cromatografia de Camada Delgada. Para realização dos bioensaios larvicida foram utilizadas 30 larvas de terceiro e quarto instar, por repetição. Como solvente para solubilização do extrato e do controle foram utilizados etanol, tween 80 e água destilada. Testaram-se cinco concentrações da amostra (7,5; 5,0; 2,5; 1,0 e 0,5 mg/mL) e para cada concentração foram empregadas 3 repetições. As observações da mortalidade das larvas foram feitas com 30min, 1h, 2h, 4h, 8h, 16h e 24h, após início do experimento. Os resultados obtidos através da análise fitoquímica demonstraram a presença de alguns metabólitos secundários tais como, cumarinas, fenóis, terpenos e triterpenos. A mortalidade larval foi calculada em relação ao grupo controle, que não apresentou mortalidade. As concentrações apresentaram mortalidade variando de 3,33% a 100%. Também se observou que nas concentrações de 7,5 mg/mL e 5,0 mg/mL, o pico de mortalidade ocorreu nas primeiras 4h do início do teste, demonstrando a rápida ação do extrato. O potencial larvicida de *A. indica* pode ser explicado pela presença dos metabólitos secundários produzidos pela planta que podem afetar os processos bioquímicos, fisiológicos e anular o mecanismo de desintoxicação dos insetos. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o EEFAI apresentou atividade larvicida sobre *Aedes aegypti*, mostrando-se como um promissor bioinseticida. Estudos futuros são necessários para um maior entendimento dos mecanismos de ação desse extrato e para o desenvolvimento de novas formulações inseticidas ou otimização de produtos já existentes no mercado.

Palavras-chave: Bioinseticida. Controle alternativo. Controle de vetor. Extratos vegetais.

**PHYTOCHEMISTRY PROFILE AND EVALUATION OF ITS TOXICITY OF THE
ETHANOLIC EXTRACT OF THE LEAVES *Azadirachta indica* (NIM) AGAINST
LARVAE OF *Aedes aegypti***

¹Discente do Curso de biomedicina, rayalmeidasilva2306@gmail.com; Centro Universitário Leão Sampaio

²Biomédica, mestra, rairajustino@hotmail.com; Centro Universitário Leão Sampaio

ABSTRACT

The present job has as main objective to execute the phytochemical profile of the ethanolic extract of the leaves of *A. indica* (EEFAI) and to evaluation its larvicidal activity against *Ae. aegypti*. The collection of the vegetable was carried out in the city of Tarrafas - Ce, and forwarded to the Leão Sampaio University Center for drying and extraction of the ethanolic extract. The phytochemistry of the EEFAI was performed by the thin layer chromatography technique. To obtain larval bioassays, 30 third and fourth instar larvae were used per replicate. As solvent for solubilization of the extract and control, ethanol was used between 80 and distilled water. Five times of the sample (7.5, 5.0, 2.5, 1.0 and 0.5 mg / mL) were tested and 3 replicates were used for each round. The occurrences of larvae were made at 30min, 1h, 2h, 4h, 8h, 16h and 24h, after the start of the experiment. The results obtained through the phytochemical analysis showed the presence of some metabolites such as concentrations, coumarins, phenols, terpenes and triterpenes. Mortality was obtained in relation to the control. The differences were of varying rates from 3.33% to 100%. It is also possible that the concentrations of 7.5 mg / mL and 5.0 mg / mL are first order in the first hours of the test, demonstrating a rapid action of the extract. The larvicidal potential of *A. indica* can be explained by the presence of plant-bound metabolites that may be the biochemical, physiological and ring factor of the insect detoxification mechanism. The results of this study demonstrate that the EEFAI showed larvicidal activity on *Aedes aegypti*, showing itself as a promising bioinsecticide. Future studies are more demanding for the implementation of data extraction mechanisms and the development of new insight and optimized formulations of products on the market.

Keywords: Bioinsecticide. Alternate control. Vector control. Plant extracts.

1 INTRODUÇÃO

Originário da África, *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae), é um mosquito antropofílico que se adaptou ao meio urbano, processo esse que facilitou a sua reprodução e proliferação por várias regiões do país (BARRETO; TEXEIRA, 2008; DUARTE et al., 2013). *Ae. aegypti* é o principal vetor viral responsável pela transmissão de diversos tipos de doenças, tais como, dengue, febre amarela urbana, febre chikungunya e zica (PICINATO et al., 2015).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) enfatiza que a dengue é atualmente um dos maiores problemas de Saúde Pública e, devido a tal problema, foi lançado dia 15 de novembro de 2012, a Estratégia Global para Prevenção e Controle da Dengue, 2012-2020. Essa estratégia tem como objetivo central, reduzir a doença em todo o mundo, além de tentar promover uma redução de 50% da mortalidade e 25% da morbidade, até o ano de 2020 (WHO., 2012).

A principal medida utilizada pelos Programas de Saúde Pública na tentativa de controlar o vetor, é o uso de inseticidas químicos como: *temephos*, *malathion* e *fenitrothion*. No entanto, em diferentes partes do mundo tem sido registrado casos de resistência do mosquito *Ae. aegypti* a esses produtos. Diante desse cenário, buscam-se alternativas para o desenvolvimento de

inseticidas que atendam aos parâmetros de segurança, eficácia e seletividade (FURTADO et al., 2005; MACORIS et al., 2003; MAHRAN, et al., 2013).

Tendo em vista a grande diversidade de plantas existentes no Brasil, estudos a partir de extratos vegetais surgem como perspectiva de se encontrar substâncias com propriedades inseticidas para serem usadas em futuras formulações comerciais (LIMA et al., 2018; MORREIRA et al., 2007). A utilização de produtos naturais é uma fonte terapêutica muito útil devido à sua eficácia, acessibilidade, baixo custo operacional e compatibilidade cultural. Porém, para que os compostos bioativos das plantas possam ser utilizados de forma segura, é necessário a realização de pesquisas direcionadas na busca de substâncias que sejam eficazes, econômicas e ecologicamente viáveis (FIGUEREDO et al., 2013).

Dentre as plantas disponíveis para pesquisas nesse sentido, encontra-se *Azadirachta indica*, pertencente à família Meliaceae. É uma árvore que pode crescer até alcançar 25 metros de altura. Popularmente conhecida como nim, é nativa da Índia e naturalizada na maioria dos países tropicais e subtropicais, sendo amplamente distribuído pelo mundo e conhecido por seu valor medicinal (GIRISH; BHAT., 2008; MESQUITA et al., 2015; VINOTH et al., 2012).

Os benefícios da planta vão desde seus fins medicinais, químicos e industriais até a geração de renda para famílias que vivem em pequenas propriedades agrícolas. Devido à baixa toxicidade e larga distribuição na natureza, o Nim pode ser considerado como uma valiosa fonte para uso na medicina tradicional e no desenvolvimento de drogas modernas (MOSSINI; KEMMELMEIER., 2005).

Extratos biologicamente ativos obtidos de folhas, frutos, sementes e tronco de *A. indica* são reconhecidos por suas propriedades inseticidas, sendo a azadiractina considerada o composto ativo mais potente do vegetal, isolado por Butterworth e Morgan. As Azadiractinas causam diversos efeitos sobre insetos, agindo como inibidoras de alimentação, reguladoras de crescimento e esterilizantes (MARQUES et al., 2004).

Devido aos relatos de suas propriedades farmacológicas e da presença de substâncias bioativas, objetivou-se nesse trabalho, realizar a prospecção fitoquímica do EEFAI e avaliar o seu potencial toxicológico frente a larvas do mosquito transmissor da dengue, *Aedes aegypti*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 TIPO DE ESTUDO

O presente estudo trata-se de uma pesquisa de caráter experimental, com abordagem qualitativa e quantitativa, para avaliação da atividade inseticida de *Azadirachata indica*, em ambiente controlado para realização dos testes. O mesmo foi realizado durante o período de agosto a dezembro de 2018, no Centro Universitário Doutor Leão Sampaio, no município de Juazeiro do Norte - CE.

2.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As folhas de *Azadirachata indica* (Figura 1) foram coletadas em agosto de 2018, no município de Tarrafas, Ceará, Brasil (Coo. dms: 6° 68' 72.662" S 39° 75' 28.830" W). Uma exsicata da espécie foi preparada e enviada para o Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), no município de Recife – PE, que foi depositada sob número de registo 92.382.

Figura 1: *Azadirachata indica*



Fonte: ALMEIDA, 2018

2.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Azadirachta indica*

Para a preparação do extrato etanólico, as folhas de *Azadirachta indica* foram levadas para o Laboratório de Bioquímica do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio, onde foram lavadas, pesadas e submetidas a processo de secagem por 48 horas. As folhas secas foram novamente pesadas, trituradas manualmente e submetidas a processo de extração por maceração em Etanol PA, utilizando-se 400 g de folhas secas, submersas em 4 L de etanol por 7 dias.

Após esse período, o extrato foi filtrado através de papel filtro, evaporado por evaporador rotativo, a temperatura média de 45 °C e pressão reduzida, e levado a banho maria para total retirada do solvente. O rendimento total do extrato foi calculado de acordo com a fórmula:

$$RE\%: \frac{P_{ext}}{P_{folhas}} \times 100$$

Onde: RE = Rendimento total do extrato (%); P_{ext} = Peso do extrato seco (g); P_{folhas} = Peso das folhas secas (g).

2.4 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Para análise dos fitoconstituintes presentes no EEFAI, foram retirados 15 µL do extrato e submetidos à Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em placas de gel de sílica (MERCK-Germany, 15553), empregando-se o sistema de solventes.

Os alcalóides foram revelados com reagente de Dragendorff e utilizado escopolamina como substância padrão. Para a pesquisa de terpenos e triterpenos empregou-se como fase móvel uma mistura, tolueno: acetato de etila (93:7 v/v), revelada com vanilina sulfúrica a 1 %, seguida de aquecimento em estufa (100 °C). O surgimento de manchas com coloração roxo/verde/azul foi usado como critério diagnóstico. A solução de cloreto férrico foi utilizada para detectar possíveis fenóis. Para as cumarinas, a fase móvel utilizada foi éter (1:1) após secagem utilizou-se o revelador KOH/EtOH colocado sob luz UV. Na pesquisa para as saponinas foi usado o índice de espuma após a agitação e como controle o juá (HARBORNE., 1998; MATOS., 1988).

2.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS

2.5.1 Estabelecimento e manutenção da colônia

A colônia de *Aedes aegypti*, foi mantida pelo Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental (LAFACE), Recife-PE. Os ovos do mosquito, oriundos da linhagem *Rockefeller*, foram depositados em recipientes plásticos (15,0 cm x 5,0 cm) contendo água deionizada, na proporção de, aproximadamente, 1000 ovos para 1 L de água deionizada e 1 g de alimentação. As vasilhas com os ovos e a água deionizada foram acondicionadas em uma sala climatizada regulada para $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sendo a umidade relativa do ar entre 70 e 85%. Após o quinto dia as larvas atingiram a fase de pupa, as quais foram coletadas e colocadas dentro de recipientes plásticos para posterior emergência. Esses recipientes foram colocados dentro de gaiolas (40,0 cm x 15,0 cm). Após a emergência dos adultos, machos e fêmeas foram alimentados com solução açucarada na proporção de 9:1. Foi realizado o repasto sanguíneo às fêmeas com sangue de Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), em acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), com o número de protocolo 23076.049863/2015-91. No terceiro dia, após o repasto sanguíneo, foi estimulada a ovoposição com a introdução de um vasilhame escuro com água e papel filtro.

2.5.2 Avaliação da atividade larvicida do extrato

Para avaliação da atividade inseticida do EEFAI, foram utilizados os ovos cedidos pelo LAFACE que foram estimulados a eclosão e mantidos, até atingirem o estágio de larvas de terceiro e quarto instar, em iguais condições a de estabelecimento e manutenção da colônia. Como solvente para solubilização do extrato etanólico foi utilizado o etanol absoluto, tween 80 e água destilada, para tanto, testaram-se cinco concentrações da amostra (7,5; 5,0; 2,5; 1,0 e 0,5 mg/mL). Para a preparação do grupo controle também foi utilizado etanol absoluto, tween 80 e água destilada nas mesmas proporções definidas. Para o bioensaio, foram usadas 30 larvas por três repetições por tratamento. As larvas eram acondicionadas em recipientes plásticos juntamente com a concentração do EEFAI e as observações da mortalidade das larvas foram realizadas nos intervalos de 30min, 1h, 2h, 4h, 8h, 16h e 24h, após o início do experimento (WHO, 1970).

2.5.3 Análises estatísticas para o ensaio inseticida sobre *Ae. aegypti*

Os resultados dos ensaios foram tabulados em uma planilha eletrônica do programa *Excel Microsoft Office Professional Plus 2016* e a partir dos resultados obtidos foram elaborados os elementos gráficos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA

Para a obtenção do extrato etanólico das folhas de *Azadirachta indica*, foram utilizados 400g do material seco, o que resultou em um rendimento de 8.5%. O Rendimento total do Extrato (RE) obtido neste estudo está semelhante aos encontrados na literatura, onde Silva et al (2016), utilizando folhas da mesma espécie e etanol como líquido extrator, citaram em seu trabalho um rendimento final do extrato de 9,82%.

A análise fitoquímica do EEFAI foi realizada utilizando a metodologia de Cromatografia de Camada Delgada e os resultados obtidos encontram-se descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Metabólitos encontrados no extrato etanólico bruto de *A. indica* através de Cromatografia de Camada Delgada.

Classe de metabólitos	Presença/Ausência
Alcalóides	-
Cumarinas	+
Fenóis	+
Terpenos	+
Triterpenos	+
Saponinas	-

Fonte: ALMEIDA, 2018

Resultado negativo (-), Resultado positivo (+).

Conforme demonstrado na tabela 1, a análise fitoquímica do EEFAI realizada através da técnica de cromatografia de camada delgada demonstrou a presença de diferentes metabólitos secundários, tais como: cumarinas, fenóis, terpenos e triterpenos. Porém, não foi detectada a presença de alcalóides e saponinas.

Biswas et al (2002) em seu artigo, conseguiu identificar a presença de metabólitos secundário no extrato etanólico do nim, como terpenos e triterpenos. Maciel et al (2010) também verificou a presença de triterpenos como metabolito secundário da planta nim. Segundo a literatura a planta apresenta os triterpenóides como seus principais componentes ativos, alguns exemplos são: azadiractina, meliantriol, limoneno e odoratone. (DELEITO; BORJA., 2008; PAES et al., 2015; PEREIRA et al., 2008).

Além desses compostos também podem ser extraídos a partir do nim, os flavonoides, os fenólicos, carotenóides, esteróides e cetonas, sendo o seu princípio mais ativo a azadiractina, que na verdade, é uma mistura de elaborados isoméricos. (MOSSINI; KEMMELMEIER., 2005). Os dados citados acima corroboram com os encontrados neste estudo, já que foi detectada na análise fitoquímica a presença de terpenos, triterpenos e fenóis.

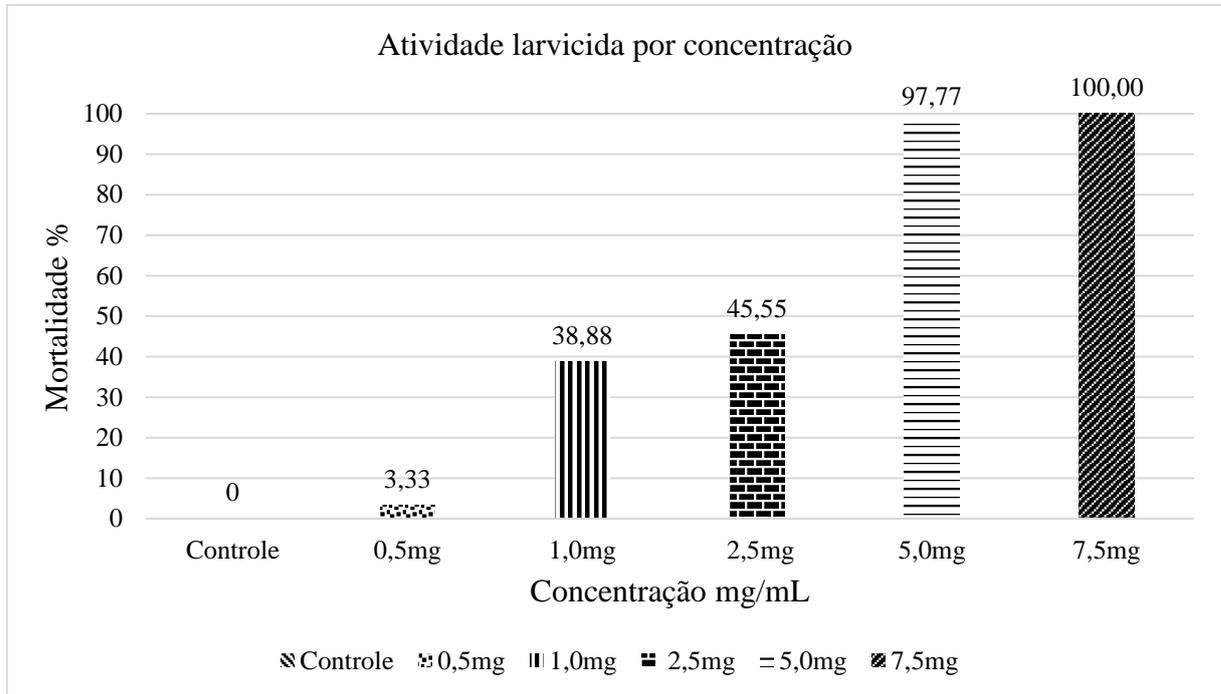
Chávez et al (2017) e Alvarado, Rosales, Machado (2016) citaram em seus artigos a presença de saponinas e alcaloides como metabólitos presentes em *A. indica*, resultados semelhantes não foram encontrados na fitoquímica realizada nesse trabalho. Isso pode se justificar devido à presença dos princípios bioativos estarem relacionados a fatores, como: tempo de coleta, seja folha ou fruto, local da coleta, ambiente, metodologia utilizada para extração do óleo ou extrato, como também da metodologia utilizada para sua identificação.

Os compostos bioativos de nim são utilizados na forma de pós, extratos aquosos e/ou orgânicos (metanólico, etanólico, acetônico, clorofórmico, hexânico), óleos e pasta, além de frações parcialmente purificadas e formulações ricas em azadiractina. O local de origem, idade das sementes e solvente utilizado na extração, podem ocasionar variações nos teores do princípio ativo e na sua atividade biológica (TRINDADE et al., 2000). De acordo com Chagas e Vieira (2007) os constituintes químicos de uma planta e outra pode ter discrepâncias dependendo de alguns fatores, como: variabilidade genética, diferenças ambientais, estágio de desenvolvimento, processo de secagem, extração e estocagem.

3.2 ATIVIDADE LARVICIDA

Os resultados de mortalidade obtidos após 24h do contato entre as concentrações do EEFAI e as larvas de *Ae. aegypti* estão demonstradas na figura 1.

Figura 1 – Percentual de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti*, expostas às diferentes concentrações do extrato etanólico bruto das folhas de *Azadirachta indica*, após 24h de exposição.



Fonte: ALMEIDA, 2018

Nos resultados demonstrados na figura 1, é possível observar que as concentrações de 7,5mg/mL e 5mg/mL foram as que obtiveram maior atividade larvicida atingindo, respectivamente, os percentuais de 100% e 97,77%. Nesse período também foi avaliado a situação do grupo controle que apresentou mortalidade de 0% após 24h, mostrando que o estudo estava em boas condições e que os resultados são confiáveis e consideráveis.

Observando a figura 1 é possível verificar que o aumento da concentração do EEFAI está relacionado diretamente ao aumento da porcentagem de mortalidade das larvas de *Ae. Aegypti*, mostrando assim, que a ação farmacológica do extrato é concentração-dependente.

Ao entrarem em contato com o extrato etanólico do nim, as larvas começaram a apresentar mudanças comportamentais. Com o passar do tempo, os movimentos larvais foram sendo gradualmente comprometidos, situação não observada no grupo controle, cujo os movimentos continuaram normais. O contato das larvas com as 4 maiores concentrações do EEFAI (7,5mg/mL, 5 mg/mL, 2,5 mg/mL e 1mg/mL), fez com que as mesmas tivessem seus movimentos diminuídos, ficando parcialmente imobilizadas nas primeiras 4 horas, quando se observou as primeiras mortes. Já as submetidas a concentração de 0,5 mg/mL permaneceram com sua locomoção normal por quase todo o tempo.

Esse comportamento de resposta diminuída e diminuição da motilidade também foi vista por Beserra et al (2014), no qual as larvas de *Ae. aegypti* submetidas ao extrato bruto etanólico de *J. curcas*, tiveram seus movimentos diminuídos após uma hora de exposição, ficando totalmente imobilizadas após 24 horas do início do experimento. O mesmo relacionou essa variação comportamental com os mecanismos de ação dos vegetais nas larvas, penetrando por ingestão ou por contato direto. A mesma apresentação foi vista no trabalho nas diferentes concentrações.

A maior concentração do extrato testada apresentou uma mortalidade de 100%, efeito esse que se correlaciona com o trabalho de Wandscheer et al (2004), que também realizou testes com extrato etanólico de folhas de nim frente a larvas de *Ae aegypti*, em concentrações que variavam de 3mg/mL a 10mg/mL. Resultados obtidos nesse trabalho também demonstram semelhanças com os obtidos por Pereira et al (2009) que também obteve em seu trabalho uma atividade larvicida ao trabalhar com extrato etanólico de folhas de nim, com valores de mortalidade que ficaram entre 70 a 100% em um período de 24 a 48h, nas concentrações de 0,03% a 2%, e Dua et al (2009), trabalhando com o óleo das sementes de nim em um período de 48h percebeu uma atividade de mortalidade de até 99,7 % das larvas de *Ae aegypti*.

Um dos benefícios desse trabalho com a utilização das folhas em relação ao uso de sementes é a facilidade de obtenção de folhas para o preparo do extrato etanólico, tendo em vista que a produção de sementes em algumas regiões do Brasil é, muitas vezes, reduzida e o processamento para obtenção do óleo na propriedade é demorado, dificultando seu uso.

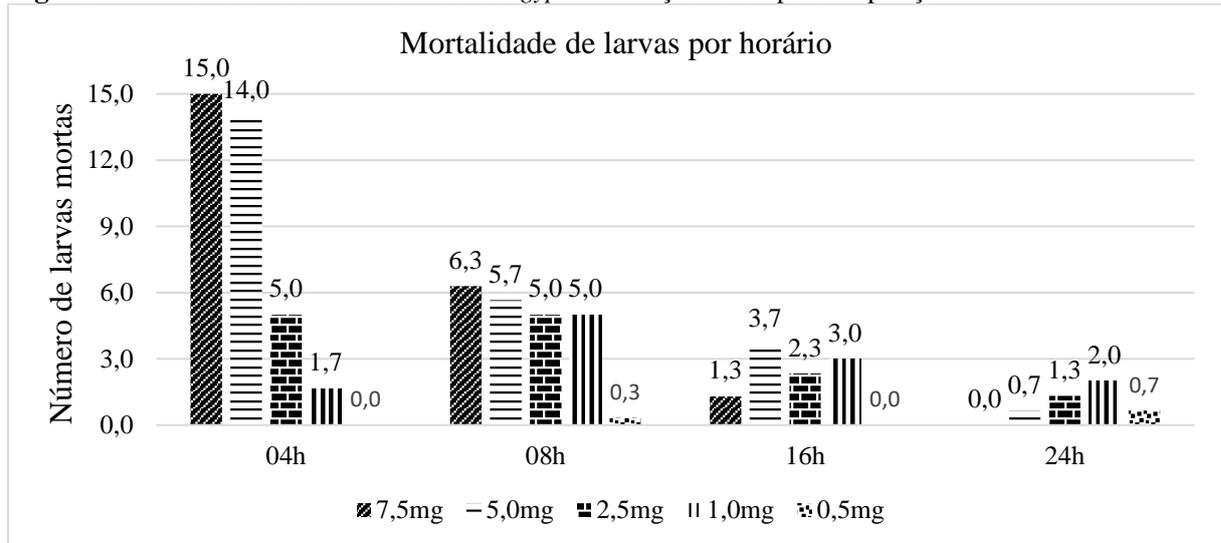
Porém alguns estudos demonstraram maiores taxas de mortalidade ao usarem menores concentrações quando comparadas as utilizadas nesse estudo. Hashmat, Azad e Ahmed (2012) ao realizar teste com extrato de nim com concentrações variando de 1 a 5mg/mL, obteve mortalidade que variaram de 70 - 99%. Os estudos realizados por Indrayani e Sudarmaja (2018), também demonstraram resultados divergentes quando analisados a concentração de 2,5mg/mL, que apresentou atividade larvicida de 100% e na presente pesquisa a taxa de mortalidade foi de 45,55%. Esse fato pode ser explicado pela forma de metodologia utilizada, como o tempo de exposição das larvas ao extrato podendo tanto influenciar na morte das larvas como também na presença e quantificação dos princípios bioativos.

As mortes das larvas de *Ae. Aegypti* após exposição ao extrato de folhas de nim podem ter decorrido da interrupção do seu desenvolvimento, como citou Pereira et al (2009). Em trabalhos já publicados e realizados com extrato de *A. indica* mostraram que as larvas podem se desenvolver normalmente até uma próxima muda, mas não conseguem completa-las (TUNAZ; UYGUN., 2004). Esse efeito pode resultar de vários defeitos morfogenéticos e pode

causar a morte dos insetos, dependendo da concentração do produto, mostrando assim que o mesmo é concentração-dependente.

A toxicidade do EEFAI frente as larvas de *Ae. Aegypti* também foi avaliada em relação ao tempo de exposição. Os dados obtidos após essa observação estão demonstrados na figura 2.

Figura 2 - Mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* em relação ao tempo de exposição.



Fonte: ALMEIDA, 2018

Na análise da figura 2, é possível verificar que a morte das larvas por horário é mais eficaz na concentração de 7,5mg/mL e 5mg/mL. No tempo de 04 horas após o início do teste 15 larvas (50%) morreram na de 7,5mg/mL e 14 larvas (46,6%) morreram na de 5mg/mL. Na concentração de 2,5mg/mL a quantidade de larvas mortas permaneceram a mesma no tempo de 04h e no de 08h. A concentração de 1mg/mL teve sua maior atividade no tempo de 08h após o início do teste, que decresceu nas horas seguintes. O mesmo aconteceu para todas as concentrações, exceto a de 0,5mg/mL que teve sua atividade aumentada no tempo de 24h.

O gráfico da figura 2 mostra os picos de ação do extrato em função do tempo, ou seja, o efeito do extrato causados nas larvas se iniciaram em horários anteriores de observação, mas se agravam no período de 04h a 16h após o início dos testes para as concentrações de 7,5mg/mL, 5mg/mL, 2,5mg/mL e 1mg/mL.

Como foi possível observar, o extrato EEFAI demonstrou um rápido efeito inseticida, apresentando alto potencial de mortalidade nas 4 primeiras horas do experimento. Rondelli, (2010) relata em sua pesquisa que os inseticidas naturais possuem ação rápida, matando os insetos em pequenos intervalos de tempo ou fazendo com que eles não se alimentem. Essa ação

rápida, está associada a outras vantagens, como por exemplo, a degradação célere sob condições ambientais, redução dos impactos sobre organismos benéficos e não-alvo, e alta possibilidade de não apresentarem toxicidade a mamíferos (MACHADO; SILVA; OLIVEIRA, 2007; RONDELLI et al, 2010).

4 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que o extrato das folhas de *A. indica* possui atividade larvicida sobre as larvas de *Aedes aegypti* e que esses achados podem estar relacionados aos metabólitos secundários detectados na análise fitoquímica, o que pode indicar que compostos originários da planta, como os triterpenos presentes no nim, podem ser uma alternativa aos inseticidas químicos no controle de *Ae aegypti*. Outros estudos devem ser realizados para comprovar a atividade das substâncias isoladas sobre a larva, bem como, frente a outros estágios de desenvolvimento desse vetor.

REFERÊNCIAS

ALVARADO, N. L. A; ROSALES, X. K. G; MACHADO, H. R. O. Evaluación in vivo de la actividad repelente de semillas *Azadirachta indica* A. Juss (neem) contra *Aedes aegypti* vector de importância em salud pública. **Monografia para optar al título de licenciado em química farmacêutica, universidad nacional autónoma de nicaragua, managua**, 2016.

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuição para uma agenda de pesquisa. **Estudos avançados**, v. 22, n. 64, p. 53-72, 2008.

BESERRA, F.P. et al. *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) as a new biopesticide: preliminary phytochemical analysis and larvicidal activity against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Amazônia Science & Health**, v. 2, n. 3, p. 17-25, 2014.

BISWAS, K. C. I; BENERJEE, R.K; BANDYOPADHYAY, U. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). **Current Science**, v. 82, n. 11, p. 1336-1345. 2002.

CHAGAS, A. C. S; VIEIRA, L. S. Ação de *Azadirachta indica* (neem) em nematódeos gastrintestinais de caprinos. **Braz. J. vet. Res. Anim. Sci**, v. 44, n. 1, p. 49-55, 2007.

CHÁVEZ, M. J. A. et al. Análisis cualitativo de metabolitos por cromatografía em capa fina em plantas. **Revista UJAT**, v. 1, p. 188-194, 2017.

DELEITO, C. S. R; BORJA, G. E. M. Nim (*Azadirachta indica*): uma alternativa no controle de moscas na pecuária. **Pesquisa veterinária brasileira**, v. 28, p. 293-298, 2008.

DUA, V. K. et al. Larvicidal activity of neem oil (*Azadirachta indica*) formulation against mosquitoes. **Malaria journal**, v.8, n. 124, 2009.

DUARTE, E. H., et al. *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Diptera: Culicidae) em algumas ilhas de Cabo Verde: Tipologia dos criadouros e sua relação com a presença larval. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 3, p. 359-362, 2013.

FIGUEREDO, F. G. et. al. Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **BioMed Research International**, v. 1, p. 1-5, 2013.

FURTADO, R. et al. Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 843-847, 2005.

GIRISH, K; BHAT, S. S. Neem – A Green Treasure. **Journal of Biology**, v. 4, p.102-111, 2008.

HARBORNE, A. J. Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis. **springer science & business media**, 1998.

HASHMAT, I; AZAD, H; AHMED, A. Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) - A Nature's Drugstore: An overview. **International Research Journal of Biological Sciences**. v. 1, p.76-79, 2012.

INDRAYANI, L. M; SUDARMAJA, I. M. Efektivitas ekstrak etanol daun mimba (*azadirachta indica*) terhadap kematian larva nyamuk *aedes aegypti*. **E-jornal medikal**, v. 7, n. 1, 2018.

LIMA, R. A. et al. Prospecção fitoquímica do extrato vegetal de *Piper tuberculatum* JACQ. (Piperaceae) e seu potencial antimicrobiano. **C&D-Revista Eletrônica da FAINOR**, v. 11, n. 2, p. 316-334, 2018.

MACHADO, L. A.; SILVA, V. B.; OLIVEIRA, M.M. Uso de extratos vegetais no controle de pragas em horticultura. **Biológico, São Paulo**, v. 69, n. 2, p. 103-106, 2007.

MACIEL, M. V. et al. Atividade inseticida in vitro do óleo de sementes de nim sobre *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Revista brasileira de parasitologia**, v. 19, n. 1, p. 7-11, 2010.

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

MAHRAN, G. H. et al. Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 6, n. 2, p. 92-112, 2013.

MARQUES, R. P; MONTEIRO, A. C; PEREIRA, G. T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de Nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, v.34, p.1675-1680, 2004.

MATOS, F. J. A. Introdução a Fitoquímica Experimental. 2 Edição. Edições EUFC, Fortaleza, CE, p. 141, 1988.

MESQUITA, F. O. et al. Formação de mudas de nim com aplicação de biofertilizante bovino submetido à drenagem e estresse salino. **Biosci.** v. 31, p. 47-54, 2015.

MORREIRA, M. D. et al. Uso de inseticidas botânicos no controle de pragas. **ResearchGate**, 2007.

MOSSINI, S. A. G; KEMMELMEIER, C. A árvore nim (azadirachta indica a. Juss): múltiplos usos. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 24, p. 139-48, 2005.

PAES, J. B. et al. Rendimento e características físicas dos óleos de nim (azadirachta indica) e mamona (ricinus communis). **Floresta e Ambiente**, v. 22, p. 134-139, 2015.

PEREIRA, A. V. et al. Efeito ovicida e larvicida do extrato de azadirachta indica sobre mosquito aedes aegypti. **Agropecuária Técnica**, v. 30, n. 2, 2009.

PEREIRA, A. V. et al. Atividade anti-fúngica do neem e jurema-preta sobre cepas de Candida spp isolados de vacas com mastite subclínica no Estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 818-822, 2008.

PICINATO, M. A. C.; et al. Dengue: uma visão sobre o vetor urbano *Aedes aegypti* e a difícil interface do seu controle. v.13, n.1. 2015.

RONDELLI, V. M. et al. Desempenho do fungo *Beaveria bassiana* (Bals.) Vuill. e do óleo de mamona para controle de *Plutella xylostella* (L.)(Lepidoptera: Plitellidae). 2010.

SILVA, F. M. F. et al. Avaliação da toxicidade do extrato etanólico de nim (*Azadirachta indica* A. juss) sobre a f e em ratas lactentes. **ResearchGate**, 2016.

SCHOONHOVEN, L. M.; LOON, J. J. A.; DICKE, M. **Insect-plant biology**, v. 2, p. 421, 2005.

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

TUNAZ, H; UYGUN, N. Insect growth regulators for insect pest control. Turkish journal of agriculture and forestry. **Ankara**, v. 28, p377-387, 2004.

VINOTH, B; MANIVASAGAPERUMAL, R; RAJARAVINDRAN, M. Phytochemical analysis and antibacterial activity of azadirachta indica a juss. **International Journal of Research in Plant Science**, v.2, p.50-55, 2012.

WANDSCHEER, J. E. D. et al. Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. **Revista Toxicon**, 2004.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Strategy For Dengue Prevention and Control. 2012-2020**. 2012. Disponível em:

https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=3094. Acesso em: 20 Ago. 2018.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Health aspects of chemical and biological weapons: **Report of a WHO group of consultants**. 1970.