

Potencial Larvicida de Extratos de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. Sobre *Aedes aegypti* e Avaliação do Efeito Citotóxico e Genotóxico

Larvicidal Potential of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. Extracts Against *Aedes aegypti* and Evaluation of Cytotoxic and Genotoxic Effects

Sthefanie Brito Oliva Mota^a; Vanessa de Andrade Royo^{*a}; Thallyta Maria Vieira^a; Rafael Macedo Guedes^b; Karla Nunes de Oliveira^b; Hamilton dos Reis Sales^b; Valdo Soares Martins Júnior^a; Sandro Morais^a

^aUniversidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, MG, Brasil.

^bInstituto Federal do Norte de Minas Gerais, Januária, MG, Brasil.

*E-mail: vanroyo31@gmail.com

Resumo

Larvicidas derivados de plantas têm sido indicados como estratégias biodegradáveis e de baixo custo para o controle do mosquito *Aedes aegypti*, transmissor da dengue, zika, chikungunya e febre amarela. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos extratos aquosos, etanólicos e hidroalcoólicos produzidos a partir do barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum* Mart.) como método alternativo no controle de larvas de *Aedes aegypti* bem como o potencial citotóxico e genotóxico. O material vegetal foi coletado em diferentes plantas na cidade de Bocaiúva-MG e os extratos a serem avaliados foram produzidos nas concentrações de 100, 75, 50, 25, 12,5% para extratos aquosos e 7200, 3600, 1800, 900, 700, 600, 400 e 200 ppm para extratos etanólicos e hidroalcoólicos. A toxicidade em organismos não-alvo foi avaliada por meio de ensaios com *Artemia salina* e *Allium cepa*. Testes fitoquímicos preliminares foram realizados para a caracterização dos metabólitos secundários foliares. Nos ensaios com *A. salina*, o extrato aquoso foliar (EAF) causou 100% de mortalidade das larvas nas primeiras 24 h em 3 das 4 doses testadas, já o extrato etanólico foliar (EEF), as concentrações letais foram $CL_{50} \geq 3094$ ppm e $CL_{90} \geq 45156$ ppm, enquanto para o extrato hidroalcoólico foliar (EHF), $CL_{50} \geq 1992$ ppm e $CL_{90} \geq 37067$ ppm. Os testes fitoquímicos preliminares indicaram forte presença de flavonoides, saponinas, taninos e moderada de alcaloides nas folhas. O EAF demonstrou 100% de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* em 48 h, enquanto os ensaios com *Allium cepa* evidenciaram citotoxicidade, mas sem genotoxicidade. Os extratos de *S. polyphyllum* apresentam-se como promissores larvicidas, embora sejam necessários mais estudos sobre sua toxicidade para organismos não-alvo.

Palavras-chave: Extratos Vegetais. Cerrado. Índice Mitótico. *Artemia salina*. Fitoquímica.

Abstract

Plant-derived larvicides have been indicated as biodegradable and low-cost strategies for controlling the mosquito *Aedes aegypti*, the vector of dengue, Zika, chikungunya, and yellow fever. The present study aimed to evaluate the effects of aqueous, ethanolic, and hydroalcoholic extracts produced from barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum* Mart.) as an alternative method for controlling *Aedes aegypti* larvae, as well as their cytotoxic and genotoxic potential. Plant material was collected from various plants in the city of Bocaiúva, MG, and the extracts to be evaluated were produced at concentrations of 100, 75, 50, 25, and 12.5% for aqueous extracts, and 7200, 3600, 1800, 900, 700, 600, 400, and 200 ppm for ethanolic and hydroalcoholic extracts. Toxicity in non-target organisms was assessed using *Artemia salina* and *Allium cepa* assays. Preliminary phytochemical tests were conducted to characterize the secondary metabolites in the leaves. In the *A. salina* assays, the aqueous leaf extract (ALE) caused 100% mortality of the larvae within the first 24 hours at 3 of the 4 doses tested. The lethal concentrations for the ethanolic leaf extract (ELE) were $CL_{50} \geq 3094$ ppm and $CL_{90} \geq 45156$ ppm, while for the hydroalcoholic leaf extract (HLE), $CL_{50} \geq 1992$ ppm and $CL_{90} \geq 37067$ ppm. Preliminary phytochemical tests indicated a strong presence of flavonoids, saponins, tannins, and moderate amounts of alkaloids in the leaves. The ALE demonstrated 100% mortality of *Aedes aegypti* larvae within 48 hours, while the *Allium cepa* assays showed cytotoxicity but no genotoxicity. Thus, *S. polyphyllum* extracts show promise as larvicides, although further studies are needed to evaluate their toxicity to non-target organisms.

Keywords: Vegetable Extracts. Scrubland. Mitotic index. *Artemia salina*. Phytochemical.

Introdução

A espécie *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. pertence à família *Fabaceae*, nativa e endêmica do Centro-leste brasileiro (Lorenzi, 1988). Apresenta distribuição geográfica com ocorrências confirmadas nas regiões Nordeste, Centro-oeste e Sudeste e abrange os domínios fitogeográficos Cerrado e Mata Atlântica, nos tipos vegetacionais Campo rupestre, Cerrado (*latu sensu*) e Floresta Estacional Semidecidual (Lima *et al.*, 2021).

Algumas espécies pertencentes ao gênero *Stryphnodendron* são muito utilizadas por populações tradicionais devido às

suas propriedades medicinais anti-inflamatórias (Melo *et al.*, 2007), antimicrobianas (Baldivia *et al.*, 2018; Ishida *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 2005), antiulcerogênicas (Audi *et al.*, 1999; Baldivia *et al.*, 2018), antioxidantes e cicatrizantes (Lopes *et al.*, 2005) que possui. Entretanto, apesar da comprovação do uso medicinal da espécie estudada, os elevados teores de terpenóides, em especial taninos (Pietro, 2018; Souza-Moreira; Queiroz-Fernandes), podem ser tóxicos para o homem e outras espécies animais (Santoro *et al.*, 2004). O pólen das flores de *Stryphnodendron polyphyllum* foi identificado como causador de sintomas semelhantes às doenças provocadas pelo

sacbrood vírus (SBV e TSBV) em abelhas, sendo nomeada de ‘Cria Ensacada Brasileira’ (Carvalho; Message, 2004). Outros estudos relacionam *Stryphnodendron polyphyllum* à nefrotoxicidade em bovinos (Santoro *et al.*, 2004), atividade acaricida (Vinaud; Lino Junir; Bezerra, 2008), caramujicida (Bezerra *et al.*, 2002; Vinaud; Lino Junir; Bezerra, 2008), tripanocida, toxicidade hepática, alterações fetais e morte embrionária em ratos (Vital; Peters; Guerra, 1987).

O mosquito *Aedes aegypti* é o inseto reconhecido como o principal vetor de transmissão da Chikungunya, febre amarela, Zika e dengue no Brasil, sendo esta, destaque entre as doenças reemergentes no mundo (Pérez, 2006). A dengue é considerada a mais importante arbovirose do país, capaz de infectar seres humanos (Monteiro; Araújo, 2020), com maiores quantitativos de casos registrados nos primeiros meses do ano devido às chuvas e altas temperaturas (Brasil, 2001, 2016; Silva *et al.*, 2019).

Em decorrência do elevado número de notificações, a dengue se tornou alvo prioritário de campanhas de Saúde Pública no Brasil (Andrade *et al.*, 2020; Brasil, 2001), com incremento de notificações de 149% no biênio 2018-2019 (Brasil, 2019). Ainda de acordo com Brasil (2019), o primeiro ‘Levantamento Rápido de Índices de Infestação pelo *Aedes aegypti*’ (LIRAA) apontou 994 municípios brasileiros com alto índice de infestação e risco de surto para dengue, Zika e Chikungunya, com aumento expressivo de 339,9% nas notificações para o biênio 2018-2019.

Diversas metodologias têm sido aplicadas para avaliar o controle da proliferação de mosquitos de *Aedes aegypti* mediante o uso de compostos bioativos obtidos a partir de espécies da flora e da fauna (Torawane *et al.*, 2021; Benelli *et al.*, 2017). Técnicas seguras e eficazes para avaliar as substâncias bioativas e seus graus de toxicidade baseiam-se na realização de ensaios citogenéticos, de forma a identificar alterações no processo de divisão celular, mutações e aberrações cromossômicas sobre o bioindicador. Dentre essas, o sistema teste vegetal de *Allium cepa* apresenta-se como um bioindicador ideal para o primeiro screening da genotoxicidade de infusões de plantas medicinais, devido ao seu baixo custo, confiabilidade e concordância com outros testes de genotoxicidade, auxiliando os estudos de prevenção de danos à saúde humana (Bagattini; Silva; Tedesco, 2007). O resultado da exposição a agentes genotóxicos e mutagênicos ou a realização de testes alelopáticos constituem técnicas importantes para avaliar a capacidade de biomoléculas influenciarem o desenvolvimento de outros organismos (Parvan *et al.*, 2020). Além disso, este método é aceito pelo Programa Internacional de Segurança Química e Programa Ambiental das Nações Unidas eficaz para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (Cabrera; Rodriguez, 1999; Do Carmo *et al.*, 2020; WHO, 2009).

Dados recentes apontaram que *Aedes aegypti* apresenta

mecanismos de resistência aos inseticidas e larvicidas sintéticos utilizados nas desinsetizações necessárias à redução populacional desta espécie, o que dificulta o controle da disseminação das doenças por ele transmitidas (Brasil, 2019; Matos *et al.*, 2022; Torawane *et al.*, 2021). Em razão destas informações, vislumbra-se os metabólitos secundários bioativos, oriundos principalmente de plantas, como alternativa para a produção de novas moléculas capazes de exercer atividade no controle dos vetores sem gerar resíduos agressores no meio ambiente (Silva, 2019). Desta forma, registra-se que a busca de estratégias de controle de reprodução dos mosquitos, o combate eficaz e seguro da disseminação, constituem desafios técnico-científicos cada vez mais requisitados pelos órgãos públicos de saúde e diferentes setores da iniciativa privada (Matos *et al.*, 2022).

Nesta lógica de interação demanda-pesquisa, o presente trabalho surgiu com o objetivo de avaliar o efeito larvicida de diferentes extratos produzidos a partir do Barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum*, Mart.) sobre os ínstaes iniciais do mosquito *Aedes aegypti*, avaliando de forma concomitante os efeitos citotóxicos e genotóxicos em espécies não-alvo.

2 Material e Métodos

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES). A etapa experimental que envolveu cortes e análises histológicas foi realizada no Laboratório de Botânica do Instituto Federal do Norte de Minas Gerais, Campus Januária.

A autorização para as coletas previstas no projeto foi emitida pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob os números de registro AAE86B9 (pólen e flores) e AE5AF8D (folhas). O material vegetal foi cedido pela COOPEMAPI e coletado a partir de diferentes plantas de *Stryphnodendron polyphyllum* no município de Bocaiúva/MG (S17°06’26.6” e W43°41’15.6”), nos meses de novembro/2020 (flores) abril/2021 (folhas).

2.1 Preparo do Material vegetal

Em campo, foram coletados 3,5 kg de folhas maduras de 10 plantas de *Stryphnodendron polyphyllum*, as quais foram submetidas à secagem por 15 dias em temperatura ambiente de 26 °C ± 3 °C, período após o qual foram novamente pesadas, constatando-se redução de massa de 44,17% (Santos, 2020). As folhas danificadas foram descartadas, e as selecionadas foram moídas em liquidificador industrial, acondicionadas em sacos de papel Kraft para proteção de incidência de luz, e armazenadas sob refrigeração (Cruz; Ribeiro; Vasconcelos, 2022).

O extrato aquoso de pólen foi produzido por meio da adição de 2 g de pólen em 200 mL de água destilada, e o

aquoso das folhas obtido a partir de 100 g do material vegetal moído adicionado em 1000 mL de água destilada. Ambos foram aquecidos em banho-maria a 40 °C, durante 60 minutos. Após o período supracitado, a solução foi filtrada em funil de vidro com gaze e algodão (Cruz; Ribeiro; Vasconcelos, 2022; Nery *et al.*, 2010).

O extrato aquoso obtido a partir das folhas (EAF) de *Stryphnodendron polyphyllum* foi submetido à triagem fitoquímica para caracterização de metabólitos secundários seguindo os protocolos de Mouco, Bernardinho e Cornélio *et al.* (2003), Lima *et al.* (2009) e Silva *et al.* (2010). Foram realizadas reações para a caracterização de flavonoides (reação com cloreto férrico a 2%, cloreto de alumínio a 5%, hidróxido de sódio e Reação de Shinoda), taninos (reação com cloreto férrico a 2%, gelatina a 2,5%, cafeína a 1% e acetato de cobre a 5%), alcaloides (reação de Liebermann-Burchard, Dragendorff, Meyer e Bertrano), saponinas (teste qualitativo de espuma) e compostos fenólicos (cloreto férrico a 2%, hidróxido de sódio e cloreto de magnésio).

Os extratos etanólico (EEF) e hidroalcoólico (EHF) das folhas de *Stryphnodendron polyphyllum* foram obtidos por meio da submersão de 100 g do material vegetal em 1 L de etanol PA e álcool 70%, respectivamente. Ambos foram armazenados em recipientes de vidro âmbar, conservados em local escuro, seco e submetidos a agitações ocasionais durante sete dias. Após este período foi realizada filtragem em funil de vidro com gaze e algodão. Os extratos foram levados à estufa de circulação forçada de ar a 40 °C até a obtenção de peso constante (Cruz; Ribeiro; Vasconcelos, 2022; Nery *et al.*, 2010) e posteriormente ressuspensos em água destilada estéril nas concentrações de 7200 ppm, 3600 ppm, 1800 ppm, 900 ppm, 700 ppm, 600 ppm, 400 ppm e 200 ppm (Santos *et al.*, 2019).

Alíquotas dos extratos foram submetidas à determinação da matéria seca a 105 °C, para determinação das concentrações testadas (Quadro 1).

Quadro 1 - Concentrações definidas a partir dos extratos aquosos produzidos a partir dos grãos de pólen (EAP) e das folhas (EAF) de *Stryphnodendron polyphyllum* (mg/mL)

Concentrações Definidas a Partir do Cálculo de Matéria Seca	
	mg/mL
EAP	
100%	21,1
50%	10,55
25%	5,75
12,5%	2,73
EAF	
100%	25,53
75%	19,14
50%	12,76
25%	6,38
12,5%	3,19

Fonte: dados da pesquisa.

2.2 Bioensaios em larvas de *Aedes aegypti*

Os ovos de *Aedes aegypti* foram obtidos de colônia fechada e previamente estabelecida no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos, do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG (Instituto de Ciências Biológicas).

Os bioensaios foram executados de acordo com protocolos propostos pela OMS (WHO, 1981), com larvas entre o terceiro instar final e quarto instar de desenvolvimento, acondicionadas em recipientes plásticos descartáveis contendo 30 mL dos EAF, EEF, EHF, com o controle negativo contendo apenas água destilada. Os testes foram realizados em triplicata, adicionando-se 20 larvas de *Aedes aegypti* a cada recipiente. As concentrações finais ficaram estabelecidas em 25,53-19,14-12,76-6,38 e 3,19 mg/mL para o EAF e 7200, 3600, 1800, 900, 700, 600, 400 e 200 ppm em ambos EEF e EHF.

Após os períodos de 24 e 48 h, as larvas de cada tratamento foram colocadas separadamente em placas de petri para observação da mortalidade e alterações morfológicas com o auxílio de microscopia óptica. Além da avaliação do efeito do extrato testado, foi verificada a relação entre a taxa de mortalidade e o tempo de exposição das larvas aos extratos, de forma a possibilitar a posterior comparação das análises de regressão de mortalidade e concentração, nos tempos de 24 e 48 h.

2.3 Bioensaios de citotoxicidade e genotoxicidade

A toxicidade dos extratos de *Stryphnodendron polyphyllum* foi avaliada mediante o bioensaio de letalidade contra náuplios de *Artemia salina* (Cruz, Ribeiro; Vasconcelos, 2022; Meyer *et al.*, 1982; Vanhaecke *et al.*, 1981).

Para a eclosão dos náuplios de *Artemia salina*, preparou-se uma solução salina com 23 g/L de NaCl em água destilada, com adição de 0,2 g de ovos de *Artemia salina*, com a solução mantida em temperatura de 25 °C ± 1 °C por 48 h. Após o período de incubação, o teste foi montado com utilização de 3 repetições para cada um dos tratamentos e um controle negativo composto por água salina. O experimento foi mantido em temperatura de 25 °C ± 1 °C por 24 h, para posterior avaliação da mortalidade dos náuplios. Foram considerados mortos os indivíduos que não apresentaram movimento, ainda que sob agitação (Cruz; Ribeiro; Vasconcelos, 2022).

Os bioensaios para avaliação do índice mitótico (IM) e potencial mutagênico dos extratos aquoso e hidroalcoólico de *Stryphnodendron polyphyllum* foram realizados em *Allium cepa*, utilizando-se o extrato aquoso (EAF) nas concentrações de 100, 75, 50, 25 e 12,5% (Nery *et al.*, 2010) e o extrato hidroalcoólico (HHF) nas concentrações de 7200, 3600, 1800, 900, 700, 600, 400 e 200 ppm (Santos *et al.*, 2019).

Para as diferentes concentrações foram utilizados um total de 45 bulbos pequenos de cebolas, da mesma variedade e de tamanho uniforme, submetidos a 15 tratamentos: treze concentrações acima descritas, mais um controle positivo (CP) composto por solução de sulfato de cobre (0,0006 mg/mL) e

um controle negativo (CN) composto por água destilada. O ensaio foi realizado em triplicata e montado em recipientes plásticos de 50 mL (Silva *et al.*, 2013).

Os bulbos de *Allium cepa*, desprovidos de raízes, foram colocados em contato com água destilada em temperatura $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h. Posteriormente, os bulbos foram transferidos para os devidos tratamentos, nos quais permaneceram com o meristema radicular em contato com os extratos por 120 h. Mensurou-se então, o comprimento das raízes para avaliação direta da ação tóxica dos extratos no crescimento, em detrimento da influência no processo mitótico.

Em sequência, três amostras de raízes de cada bulbo foram cortadas com bisturi em espessura de 5 mm e submetidas a solução Carnoy 3:1 (etanol/ácido acético) por 24 h para o preparo das lâminas histológicas. As raízes foram transferidas para um recipiente com etanol 70%, lavadas duas vezes em água destilada por 5 min, e em seguida submetidas à hidrólise ácida em HCL 1 mol/L a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 8 min. Ao final deste tempo, foram novamente lavadas em água destilada duas vezes por 5 min (Mondin; Aguiar-Perecin, 2009; Silva *et al.*, 2013).

A coloração foi realizada segundo a técnica de Feulgen onde as raízes foram acondicionadas em reativo de Schiff por 60 min, e depois lavadas com água destilada até ficarem coradas de rosa. O processo de lavagem foi repetido até que a água se tornasse incolor, indicando que as raízes estavam prontas para o preparo das lâminas (Mondin; Aguiar-Perecin, 2009).

Os meristemas apicais radiculares foram dispostos em lâminas de microscopia, adicionadas de uma gota de orceína acética a 1% e preparadas com auxílio de uma lamínula, pelo método de esmagamento, com o material levemente aquecido para que as células se expandissem, e fosse permitido melhor visualização ao microscópio. As lâminas foram seladas de forma semi-permanente com utilização de base de esmalte. Foram confeccionadas três lâminas para cada repetição, que totalizou 9 lâminas para cada tratamento (Bagatini; Silva; Tedesco, 2007).

As radículas foram visualizadas em microscópio fotônico binocular (ZEISS Primo Star) nas objetivas de 40 x e 100 x, acoplado a um computador com o software ZEN 2.5 lite. Anomalias cromossômicas também foram observadas e anotadas.

2.4 Análise estatística

A aplicação dos extratos sobre os náuplios de *Artemia salina* e larvas de *Aedes aegypti* foi realizada em delineamento inteiramente casualizado em parcelas subdivididas (tratamentos definidos como as concentrações e períodos como as sub parcelas). Os dados foram submetidos à análise de variância e os valores médios comparados por meio do teste Scott-Knott ($p < 0,05$), utilizando-se o pacote estatístico SAEG 9.1. A concentração capaz de ocasionar mortalidade de 50% e 90% das larvas foi estimada pela análise de regressão

Probit ($p < 0,05$).

Na aplicação dos extratos sobre *Allium cepa* o índice mitótico foi obtido por meio da divisão do número total de células em mitose (Prófase + metáfase + anáfase + telófase) pelo número total de células analisadas (interfase + mitose) multiplicado por 100 (Galvão *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2020; Pires *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 1996).

As médias de células normais e anormais foram submetidas à análise de variância e, para as causas de variações significativas, foi utilizado o teste de Skott Knott ao nível de $p < 0,05\%$ de probabilidade para comparação das médias. O mesmo programa foi usado para análise.

3 Resultados e Discussão

3.1 Prospecção fitoquímica

Por meio dos testes fitoquímicos realizados a partir das folhas foi observado a presença de flavonoides, saponinas, taninos, alcaloides e compostos fenólicos (Quadro 2).

Quadro 2 - Testes identificadores empregados na análise fitoquímica do extrato aquoso foliar (EAF) de *Stryphnodendron polyphyllum*

Classe Fitoquímica	Extrato Aquoso
Flavonoides	
Cloreto férrico 2%	+++
Cloreto de alumínio	++
Hidróxido de sódio	++
Reação de Shinoda	++ ^(a)
Saponinas	
Teste qualitativo da espuma	
1	+
2	++
3	++
4	++
5	+++
6	+++
7	+++
8	+++
9	+++
10	+++
Taninos	
Gelatina 2,5%	+++
Cafeína 1%	+++
Acetato de cobre	+++
Cloreto férrico	+++
Alcaloides	
Ácido sulfúrico	-
Mayer	Precipitado
Dragendorff	Precipitado
Bertrano	Precipitado
Liebermann-Burchard	Precipitado
Compostos fenólicos	
Cloreto férrico	+++
Hidróxido de sódio	+++
Cloreto de magnésio	++

^(a)Coloração laranja (indicativo da presença de flavonas); (+++) forte positivo; (++) moderado positivo; (+) fraco positivo; negativo (-).

Fonte: dados da pesquisa.

3.2 Atividade larvicida

As aplicações realizadas a partir do extrato aquoso foliar (EAF) mostraram interação significativa entre os períodos e concentrações testadas frente às larvas de *A. aegypti* ($p < 0,001$), e foi obtido maior efeito após 48 h de tratamento. Neste período, o EAF apresentou 100% de eficácia na mortalidade das larvas de *A. aegypti* na concentração de 23,53 mg/mL (Quadro 3). Por sua vez, o EAP (Extrato aquoso de pólen) não apresentou eficácia frente às larvas de *Aedes aegypti* nas concentrações testadas, e foi observado, portanto, a sobrevivência de todas as larvas após os períodos de avaliação de 24 e 48 h (Quadro 3).

Quadro 3 - Mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* expostas aos extratos aquoso do pólen (EAP), extrato aquoso das folhas (EAF), extrato etanólico das folhas (EEF), e extrato hidroalcoólico das folhas (EHF) de *Stryphnodendron polyphyllum* em função dos períodos de 24 e 48 h em diferentes concentrações

Tratamentos	24h	48h	Desvio Padrão 24h	Desvio Padrão 48h
EAP (mg/mL)				
21,11	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0	0
10,55	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0	0
5,75	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0	0
2,73	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0	0
Água Destilada	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0	0
EAF (mg/mL)				
25,53	98,33 ^{Aa}	100 ^{Aa}	0,023	0
19,14	93,33 ^{Ba}	98,33 ^{Bb}	0,023	0,023
12,76	76,66 ^{Ca}	90 ^{Cb}	0,062	0
6,38	13,33 ^{Da}	71,66 ^{Db}	0,09	0,143
3,19	3,33 ^{Ea}	8,33 ^{Eb}	0,047	0,084
Água Destilada	0 ^{Fa}	0 ^{Fb}	0	0
EEF (ppm)				
7200	7,5 ^{Aa}	13,75 ^{Ab}	0,04	0,062
3600	1,25 ^{Ba}	17,5 ^{Bb}	0,023	0,023
1800	5 ^{Ca}	15 ^{Cb}	0,047	0,07
900	16,25 ^{Da}	43,75 ^{Db}	0,154	0,239
700	5 ^{Da}	22,5 ^{Eb}	0,094	0,248
600	1,25 ^{Ea}	11,25 ^{Fb}	0,023	0,04
400	10 ^{Fa}	35 ^{Gb}	0,0623	0,0623
200	2,5 ^{Fa}	30 ^{Hb}	0,023	0,04
Água Destilada	0 ^{Ga}	0 ^{Ia}	0	0
EHF (ppm)				
7200	13,33 ^{Aa}	58,33 ^{Ab}	6,236	10,274
3600	16,66 ^{Ba}	48,33 ^{Bb}	10,27	8,498
1800	11,66 ^{Ca}	20 ^{Bb}	9,428	14,719
900	11,66 ^{Da}	31,66 ^{Db}	6,236	2,357
700	3 ^{Da}	15 ^{Eb}	4,714	4,082
600	10 ^{Ea}	16,66 ^{Fb}	4,082	8,498
400	10 ^{Ea}	43,33 ^{Gb}	4,082	6,236
200	21,66 ^{Fa}	46,66 ^{Hb}	6,236	10,274
Água Destilada	0 ^{Ga}	0 ^{Ia}	0	0

Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças entre os tratamentos e letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças entre os períodos ($p < 0,05$).

Fonte: dados da pesquisa.

A concentração letal capaz de ocasionar a morte de 50% (CL_{50}) e 90% (CL_{90}) dos indivíduos sob efeito do EAF foi estimada em $\geq 5,64$ e em $\geq 11,03$ mg/mL, respectivamente. No entanto, não foi possível estabelecer valores para as CL_{50} e CL_{90} dos EEF e EHF, pois ambos não demonstraram relação entre as doses utilizadas no presente estudo e o tempo de exposição, apontando, desta forma, mortalidade ocasional (aleatória).

Figura 1 - A) Larva de *Aedes aegypti* entre final do terceiro e início do quarto estágio de desenvolvimento. B) Larva com sintomas de intoxicação apresentando expulsão do conteúdo intestinal. C) Larva de *Aedes aegypti* morta após 48 h sob o extrato aquoso das folhas de *Stryphnodendron polyphyllum*.



Fonte: os autores.

3.3 Teste de toxicidade em náuplios de *Artemia salina*

No teste de toxicidade frente aos náuplios de *Artemia salina*, o EAF foi capaz de ocasionar a morte de 100% das larvas no período de 24 h, em 3 das 4 doses utilizadas. Como os índices de mortalidade se mostraram muito elevados, não foi possível definir as CL_{50} e CL_{90} . As concentrações letais do EEF foram estabelecidas em $CL_{50} \geq 3094$ ppm e $CL_{90} \geq 45156$ ppm. Enquanto no EHF as CL_{50} e CL_{90} foram ≥ 1992 e ≥ 37067 ppm, respectivamente (Quadro 4).

Quadro 4 - Avaliação dos índices de mortalidade (%) dos náuplios de *Artemia salina* sob o extrato aquoso foliar, extrato etanólico foliar e extrato hidroalcoólico foliar, após o período de 24 h de exposição

<i>Artemia salina</i>		
EAF (mg/mL)	24 h	Desvio Padrão 24h
25,53	100 ^a	0
19,14	100 ^a	0
12,76	100 ^a	0
6,38	100 ^a	0
3,19	63,33 ^b	0,942
Água Destilada	0	0
EEF (ppm)		
7200	83,33 ^a	0,047
3600	43,33 ^b	0,047
1800	43,33 ^b	0,094
900	26,67 ^c	0,094
700	23,33 ^c	0,047
600	16,67 ^c	0,094

400	16,67 ^c	0,047
200	13,33 ^c	0,047
Água Destilada	0	0

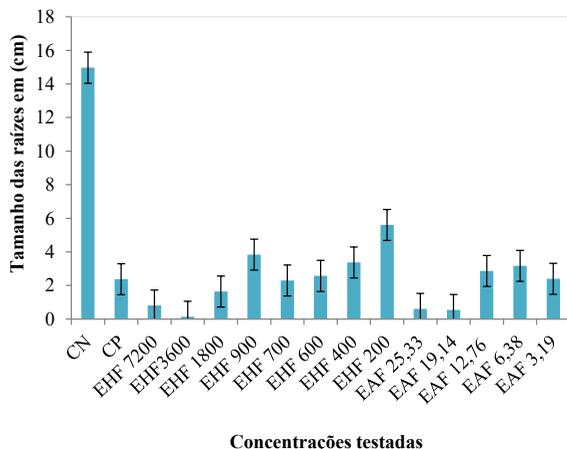
EHF (ppm)		
7200	80 ^a	1,11
3600	63,33 ^a	0,124
1800	40 ^b	0,081
900	30 ^b	0,047
700	30 ^b	0,081
600	26,67 ^b	0,081
400	23,33 ^b	0,124
200	23,33 ^b	0,124
Água Destilada	0	0

Fonte: dados da pesquisa.

3.4 Teste de atividade citotóxica e genotóxica em *Allium cepa*

O período de exposição de 120 h dos bulbos de cebola aos extratos permitiu observar variações no tamanho e aparência das raízes, com diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 2).

Figura 2 - Tamanho de raízes (cm) de *Allium cepa* após exposição a diferentes concentrações dos extratos aquoso foliar (EAF) e hidroalcoólico foliar (EHF) no intervalo de 120 h



Fonte: dados da pesquisa.

Quadro 5 - Índice mitótico (IM) e de anomalias (%) encontradas nas células meristemáticas de cebola tratadas com diferentes infusões de *Stryphnodendron polyphyllum*.

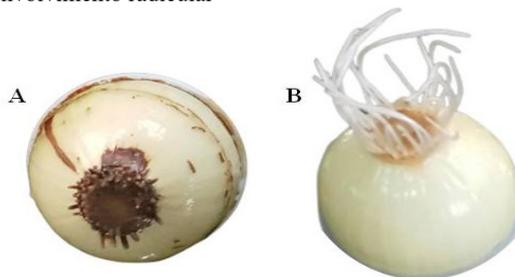
Tratamentos	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	Interfase	(%) IM	Anomalias
CN	27,11 ^a	4,77 ^a	3,77 ^a	27,77 ^a	36,59 ^a	63,44 ^a	0,0 ^b
CP	22,88 ^b	1,88 ^b	1,55 ^b	18,22 ^b	55,45 ^b	44,55 ^b	3,11 ^a
EHF 7200 ppm	17,22 ^c	2,55 ^b	1,77 ^b	17,0 ^b	61,45 ^c	38,55 ^c	0,0 ^b
EHF 3600 ppm	16 ^c	1,33 ^b	1,66 ^b	14,88 ^c	66,2 ^d	33,88 ^d	0,0 ^b
EHF 1800 ppm	14,11 ^d	1,66 ^b	1,33 ^b	12,66 ^c	70,23 ^e	29,77 ^e	0,0 ^b
EHF 900 ppm	13,22 ^d	1,22 ^c	1,0 ^c	13,11 ^c	71,45 ^e	28,55 ^e	0,0 ^b
EHF 700 ppm	11,44 ^e	1,0 ^c	0,66 ^c	12,77 ^c	74,11 ^f	25,89 ^f	0,0 ^b
EHF 600 ppm	11 ^e	1,0 ^c	0,88 ^c	13,0 ^c	74,12 ^f	25,88 ^f	0,0 ^b
EHF 400 ppm	10 ^e	0,66 ^c	0,55 ^c	11,66 ^c	77,12 ^f	22,88 ^f	0,0 ^b
EHF 200 ppm	7,66 ^f	0,55 ^c	0,55 ^c	7,44 ^d	83,78 ^g	16,22 ^g	0,0 ^b
EAF 25,33 mg/mL	2,77 ^g	0,33 ^c	0,11 ^c	3,66 ^e	93,12 ^h	6,88 ^h	0,0 ^b
EAF 19,14mg/mL	5,77 ^f	0,55 ^c	0,55 ^c	5,55 ^d	87,56 ^g	12,44 ^g	0,0 ^b
EAF 12,76 mg/mL	6,77 ^f	0,44 ^c	0,66 ^c	6,66 ^d	85,45 ^g	14,55 ^g	0,0 ^b
EAF 6,38 mg/mL	12,55 ^d	1,22 ^c	1,0 ^c	13,88 ^c	71,34 ^e	28,66 ^e	0,0 ^b
EAF 3,19 mg/mL	11,33 ^e	1,22 ^c	1,11 ^c	14,44 ^c	71,89 ^e	28,11 ^e	0,0 ^b

Número total de células analisadas por tratamento=2250

Fonte: dados da pesquisa.

Os diferentes os extratos, nas concentrações intermediárias, inibiram o crescimento radicular de forma semelhante ao controle positivo (CuSO_4), indicando interferências no ciclo de divisão celular, além de causarem escurecimento e enrijecimento (Figura 3).

Figura 3. A: Cebola com alterações no crescimento radicular e na coloração, após exposição de 120 h ao extrato aquoso foliar (23,35 mg/mL). B: Cebola utilizada como controle negativo após 120 h de exposição, apresentando características normais de desenvolvimento radicular

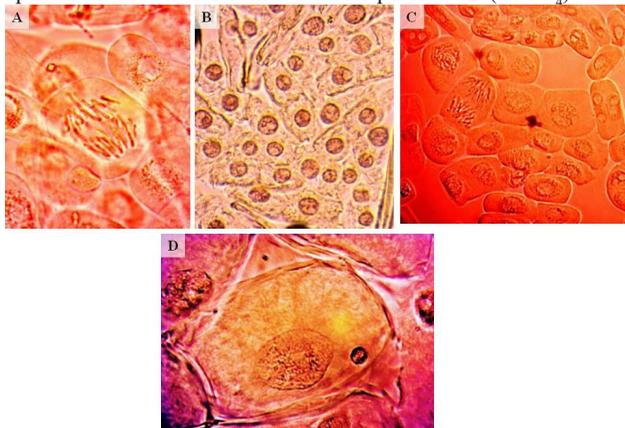


Fonte: os autores

Verificou-se que não ocorreram alterações cromossômicas nos bulbos submetidos aos extratos de *Stryphnodendron polyphyllum* (Quadro 5).

Contudo, foi possível observar a interrupção do processo de divisão celular, pois além de estacionar visualmente o crescimento das raízes, o número de células em interfase foi superior ao de células em processo mitótico em todas as concentrações avaliadas. Anomalias cromossômicas foram observadas apenas nas raízes expostas ao controle positivo (Figura 4).

Figura 4 - A: Célula em estágio de anáfase. B: Conjunto de células em interfase. C: Células em diferentes estágios de divisão celular. D: Célula de *Allium cepa* com presença de micronúcleo após 120 h em contato com o controle positivo de (CuSO₄)



Fonte: os autores.

O presente trabalho evidenciou por meio de análises fitoquímicas grupos moleculares encontrados nas folhas de barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum*) condizentes com os estudos pré-existentes. Santos *et al.* (2002) e Oliveira e Figueiredo (2007) ao realizarem análises fitoquímicas de diferentes espécies do gênero *Stryphnodendron*, descreveram a presença de polifenóis, delfinidinas, flavonoides glicosídicos, ácido gálico, catequinas, epicatequinas, polímeros, compostos fenólicos, ácido cafeico, rutina, saponinas e cumarinas além de taninos condensados e fenólicos nas folhas de *Stryphnodendron polyphyllum*, que corroboram com os dados fitoquímicos preliminares gerados. No estudo, foram identificados flavonoides, taninos, saponinas, alcaloides e compostos fenólicos no extrato aquoso foliar (EAF), os quais correlacionamos com a atividade larvicida. Especificamente, a alta presença de flavonoides e taninos, conhecidos por propriedades inseticidas, pode explicar o efeito larvicida mais forte do EAF em comparação com os outros extratos.

A prospecção de plantas tem se mostrado viável para a produção de extratos, isolamento de moléculas e a geração de biocompostos capazes de controlar etapas do ciclo de vida de insetos-praga e vetores parasitários (Torawane *et al.*, 2021). Formulações oriundas de diferentes estruturas vegetais permitem a realização de metodologias de fácil execução e relativamente econômicas, possibilitando rastrear novos produtos capazes de conter a disseminação de espécies vetoradas de doenças (Benelli *et al.*, 2017; Rawani *et al.*, 2009; Subramaniam *et al.*, 2012).

A ação larvicida diferencial observada no extrato

aquoso foliar (EAF) em comparação aos extratos etanólicos e hidroalcoólicos pode ser atribuída ao perfil fitoquímico específico. Embora todos os extratos contivessem metabólitos secundários, a atividade larvicida mais forte do EAF pode estar relacionada à maior concentração de flavonoides e taninos, que têm sido documentados para atividades inseticidas. Além disso, os compostos fenólicos detectados podem ter contribuído para a capacidade do extrato de interromper o desenvolvimento larval, como visto com 100% de mortalidade em larvas de *Aedes aegypti* em concentrações mais baixas. Em contraste, os extratos etanólicos e hidroalcoólicos, embora letais em determinadas doses, não exibiram um efeito tão pronunciado, provavelmente devido às diferenças na eficiência de extração dos solventes e na composição química resultante desses extratos (Lima *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos através do extrato aquoso foliar (EAF) de *Stryphnodendron polyphyllum* sugerem viabilidade em sua utilização como potencial larvicida, pois foram notados sintomas de intoxicação de forma mais intensa, e ainda que as larvas tenham utilizado mecanismos de defesa, como expulsão do conteúdo intestinal, não foram capazes de sobreviver (Matos *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2015). A estratégia adotada pelas larvas não foi suficiente para evitar os efeitos nocivos do extrato, uma vez que a taxa de sobrevivência das larvas diminuiu significativamente após o teste larvicida, e atingiu 100% de mortalidade na concentração de 25,53 mg/mL, no intervalo de avaliação de 48 h.

Os efeitos tóxicos sobre *Artemia salina* foram significativamente menores para os extratos etanólicos e hidroalcoólicos, com concentrações letais (CL₅₀) superiores a 3094 ppm e 37067 ppm, respectivamente. Esses achados sugerem que, embora esses extratos possam ser tóxicos em altas doses, eles podem representar menor risco para organismos aquáticos não-alvo em concentrações mais baixas, em conformidade com os critérios da Organização Mundial da Saúde para toxicidade (CL₅₀ abaixo de 1000 ppm). Tal baixa toxicidade indica que esses extratos poderiam ser alternativas ambientalmente mais seguras, com risco mínimo para espécies não-alvo, como peixes, crustáceos e outros organismos aquáticos (Cansian *et al.*, 2017; Cruz; Ribeiro; Vasconcelos, 2022; Rosa *et al.*, 2016).

Os dados obtidos por meio dos testes em *Allium cepa* demonstraram interferências no processo mitótico. O menor índice mitótico (IM = 6,88) foi registrado no EAF 100%, apresentando uma redução significativa (56,56%) em relação ao controle ($p < 0,05$), causando estagnação no crescimento radicular. No entanto, não foram observados efeitos mutagênicos nas células analisadas. Silva *et al.* (2021), ao avaliarem extratos de *Stryphnodendron adstringens* em diferentes concentrações e nos períodos de 4, 8, 12 e 16 h, observaram que o IM decaía na proporção em que se aumentava o tempo de exposição das raízes aos extratos e de forma ainda mais significativa nas concentrações mais elevadas.

Não foram observadas anomalias cromossômicas nas raízes de *Allium cepa* expostas aos extratos de *S. polyphyllum*, contudo a diminuição do IM sugere a presença de substâncias capazes de promover a anulação da atividade mitótica. Esse efeito pode ser atribuído ao potencial citotóxico dos metabólitos secundários identificados na análise fitoquímica, os quais poderiam interferir na divisão celular e no desenvolvimento meristemático (Haq *et al.*, 2017; Ruiz *et al.*, 2016).

Conclusão

O extrato aquoso das folhas de *Stryphnodendron polyphyllum* apresenta potencial larvicida frente ao *Aedes aegypti*, e causa altos índices de mortalidade em todas as concentrações avaliadas. No entanto, as mesmas concentrações do extrato aquoso mostram toxicidade significativa para *Artemia salina*, indicando que, embora seja eficaz contra *A. aegypti*, o EAF também apresenta riscos para organismos aquáticos não-alvo.

Os extratos alcoólicos e hidroalcoólicos não apresentam padrão na taxa de mortalidade que possibilita a determinação do CL₅₀ e CL₉₀, parâmetros consagrados em ensaios biológicos para determinação do potencial larvicida. Além disso, os extratos são menos tóxicos para espécies não-alvo em comparação ao EAF, e não demonstram atividade mutagênica; no entanto, interferem no índice mitótico, sugerindo a presença de compostos com atividade citotóxica.

É crucial considerar tanto a eficácia larvicida quanto os efeitos sobre organismos não-alvo ao avaliar o potencial de uso dos extratos de *Stryphnodendron polyphyllum* em estratégias de controle biológico.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pelo Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada da Unimontes (PPGBOT), pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Unimontes (PPGB), pelo Laboratório de Interações Biológicas (LIB) do Instituto Federal do Norte de Minas Gerais-Campus Januária (IFNMG-Januária), FAPEMIG, CNPq e Capes.

Referências

ANDRADE, N.F. et al. Análise das campanhas de prevenção às arboviroses dengue, Zika e Chikungunya do Ministério da Saúde na perspectiva da educação e comunicação em saúde. *Saúde Debate*, v.44, p.871-880, 2020. doi: <https://doi.org/10.1590/0103-1104202012621>.

AUDI, E.A. et al. Efeitos antiulcerogênicos gástricos de *Stryphnodendron adstringens* em ratos. *Phytoth. Res.*, v.13, p.264-266, 1999.

BAGATTINI, M.D.; SILVA, A.C.F.D.; TEDESCO, S.B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Rev. Bras. Farmacog.*, v.17, p.444-447, 2007. doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000300019>.

BALDIVIA, D.D.S. et al. Evaluation of *In Vitro* Antioxidant and Anticancer Properties of the Aqueous Extract from the Stem Bark of *Stryphnodendron adstringens*. *Int. J. Mol. Sci.*, v.19, n.8,

p.2432, 2018. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms19082432>.

BENELLI, G. et al. Larvicidal activity of *Blumea eriantha* essential oil and its components against six mosquito species, including Zika virus vectors: the promising potential of (4E,6Z)-allo-ocimene, carvotanacetone and dodecyl acetate. *Parasitol. Res.*, v.116, n.4, p.1175-1188, 2017. doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5395-0>.

BEZERRA, J.C.B. et al. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. *Fitoterapia*, v.73, n.5, p.428-430, 2002. doi: [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00121-1](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00121-1).

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Dengue. Instruções para pessoal de combate ao vetor. Brasília; Funasa, 2001. http://bvsm.s.saude.gov.br/bvsm/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf.

BRASIL. Ministério da Saúde alerta para aumento de 149% dos casos de dengue no país, 2019. www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45257-ministerio-da-saude-alerta-para-aumento-de-149-dos-casos-de-dengue-no-pais.

BRASIL. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica. Boletim epidemiológico, v.47, n.27, p.1-10, 2016. <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/30/2016-021.pdf>.

CABRERA, G.L.; RODRIGUEZ, D.M.G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. *Mut. Res. Fund. Mol. Mechan. Mutag.*, v.426, n.2, p.211-214, 1999. doi: [10.1016/s0027-5107\(99\)00070-6](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(99)00070-6).

CANSIAN, R.L. et al. Toxicity of clove essential oil and its ester eugenyl acetate against *Artemia salina*. *Braz. J. Biol.*, v.77, n.1, p.155-161, 2017. doi: [10.1590/1519-6984.12215](https://doi.org/10.1590/1519-6984.12215).

CARVALHO, A.C.P.; MESSAGE, D. A scientific note on the toxic pollen of *Stryphnodendron polyphyllum* (Fabaceae, Mimosoidae) which causes sacbrood-like symptoms. *Apidologie*, v.35, p.89-90, 2004.

CRUZ, J.P.; RIBEIRO, F.; OLIVEIRA VASCONCELOS, V. Molluscicidal activity of extracts of plants from the Cerrado against *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Res. Soc. Develop.*, v.11, n.8, e20611830656-e20611830656, 2022.

DO CARMO, L.R. et al. *Allium cepa* e teste do Micronúcleo como bioindicadores de citogenotoxicidade em extratos aquosos de plantas medicinais. *Braz. J. Develop.*, v.6, n.10, 82419-82430, 2020. doi: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n10-610>.

GALVÃO, M. et al. Potencial mutagênico em águas coletadas em diferentes pontos no perímetro urbano no município de Alta Floresta-MT através do teste *Allium* (*Allium cepa*). *Enciclop. Biosf.*, v.11, n.21, p.2373, 2015.

HAQ, I. et al. Genotoxicity assessment of pulp and paper mill effluent before and after bacterial degradation using *Allium cepa* test. *Chemosphere*, v.169, p.642-650, 2017.

ISHIDA, K. et al. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.58, n.5, p.942-949, 2006. doi: [10.1093/jac/dkl377](https://doi.org/10.1093/jac/dkl377).

KHAN, I.S. et al. Genotoxic effect of two commonly used food dyes metanil yellow and carmoisine using *Allium cepa* L. as an indicator. *Tox. Rep.*, v.7, p.370-375, 2020. doi: [10.1016/j.toxrep.2020.02.009](https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.02.009).

LIMA, A.G. et al. *Stryphnodendron* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020. Retrieved from <https://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB83739>.

LIMA, J.M. et al. Prospecção fitoquímica de *Sonchus oleraceus*

- e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. Planta Daninha, v.27, p.7-11, 2009. doi: 10.1590/S0100-83582009000100002.
- LOPES, G.C. et al. Influência de extratos de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. e *Stryphnodendron obovatum* Benth. na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. J. Ethnoph., v.99, p.265-272, 2005. doi: 10.1016/j.jep.2005.02.019.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1998.
- MELO, J.O. et al. Efeito da casca de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) em modelos animais de nocicepção. Rev. Bras. Ciênc. Fármaco, v.43, p.465-469, 2017. doi: 10.5935/2446-4775.20160025.
- MEYER, B.N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Med., v.45, n.5, p.31-34, 1982. doi: 10.1055/s-2007-971236.
- MONDIN, M.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Coloração pelo Método de Feulgen, 2009. Retrieved from <http://www.genetica.esalq.usp.br/citogenetica/protocolos/Feulgen.pdf>.
- MONTEIRO, V.B.; ARAUJO, J.A.D. Aspectos socioeconômicos e climáticos que impactam a ocorrência de dengue no Brasil: análise municipal de 2008 a 2011 por regressões quantílicas para dados em painel, 2020. Retrieved from <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/53224>.
- MOUCO, G.B.; BERNARDINHO, M.J.; CORNÉLIO, M.L. Controle de qualidade de ervas medicinais. Biotec. Cienc. Desenv., v.31, p.68-73, 2003.
- NERY, P.S. et al. Effects of *Anacardium humile* leaf extracts on the development of gastrointestinal nematode larvae of sheep. Veterin. Parasitol., v.171, p.361-364, 2010. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.03.043.
- PARVAN, L.G. et al. Bioensaio com *Allium cepa* revela genotoxicidade de herbicida com flumioxazina. Rev. Pan-Amaz. de Saúde, v.11, 2020. doi: 10.5123/s2176-6223202000544.
- PÉREZ, G.L. Dengue, un problema social reemergente en América Latina. Estrategia para su erradicación. Biotec. Aplic., 23(2), 130-136, 2006.
- PIRES, N.D.M. et al. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. Rev. Bras. Fisio. Veg., v.13, p.55-65, 2001. doi: 10.1590/S0103-31312001000100007.
- PORTO, K.R.D.A. et al. Screening of plant extracts and fractions on *Aedes aegypti* larvae found in the state of Mato Grosso do Sul (Linnaeus, 1762) (Culicidae). Ann. Braz. Acad. Sci., v.89, n.2, p.895-906, 2017. doi: 10.1590/0001-3765201720150017.
- RAWANI, A. et al. Larvicidal activities of three plants against filarial vector *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Parasit. Res., v.105, n.5, p.1411-1417, 2009. doi:10.1007/s00436-009-1573-z.
- ROSA, C.S. et al. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. Rev. Bras. Plant. Med., v.18, n.1, p.19-26, 2016. doi: 10.1590/1983-084X/15_006.
- RUÍZ, J.C. et al. Efecto del aluminio y el pH en el crecimiento de raíces de *Phaseolus vulgaris* var. caballero en condiciones de laboratorio. Rebiol, v.36, n.2, p.4-15, 2016.
- SANTORO, K.R. et al. Efeito do tanino de *Stryphnodendron* spp. sobre a longevidade de abelhas *Apis mellifera* L. (abelhas africanizadas). Arch. de Zoot., v.53, n.203, p.281-291, 2004.
- SANTOS, A.M. et al. Avaliação da atividade larvicida do extrato etanólico das folhas e flores do Cambará de Chumbo (*Lantana camara*) frente ao *Aedes aegypti*. In: CONGRESSO NACIONAL DE QUÍMICA, 2019. <http://www.abq.org.br/cbq/2017/trabalhos/7/12519-23110.html>.
- SANTOS, I.P. et al. Bioatividade de extratos aquosos da parte aérea de *Poincianella bracteosa* sobre larvas de *Aedes aegypti*. Enciclop. Biosf., v.11, n.21, p.2908-2915, 2015.
- SANTOS, S.C. et al. Tannin composition of barbatimão species. Fitoterapia, v.73, n.4, p.292-299, 2002. doi: 10.1016/s0367-326x(02)00081-3.
- SILVA, B.C.G. et al. Citotoxicidade do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville) com o uso dos sistemas *Allium cepa* e *Pisum sativum*. Braz. J. Develop., v.7, n.3, 31230-31241, 2021. doi: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n3-716>.
- SILVA, B.M. et al. Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de citotoxicidade de substâncias usadas na conserva de *Olea europaea* L. Campo Grande: UNEMAT, 2013.
- SILVA, N.L.A.; MIRANDA, F.A.A.; CONCEIÇÃO, G.M. Triagem fitoquímica de plantas de Cerrado, da área de proteção ambiental municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. Sci. Plena, v.6, n.2, p.1-17, 2010. doi: <https://scientiaplenu.emnuvens.com.br/sp/article/view/22>.
- SILVA, T.M.S.D. *Indigofera suffruticosa* Mill (Fabaceae): estudo da biologia reprodutiva de machos de *Aedes aegypti* Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2019.
- SOUZA-MOREIRA, T.M.; QUEIROZ-FERNANDES, G.M.; PIETRO, R.C.L.R. *Stryphnodendron* species known as “barbatimão”: a comprehensive report. Molecules, v.23, n.4, p.910, 2018. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules23040910>.
- SUBRAMANIAM, J. et al. Mosquito larvicidal activity of *Aloe vera* (Family: Liliaceae) leaf extract and *Bacillus sphaericus*, against Chikungunya vector, *Aedes aegypti*. Saudi J. Biol. Scie., v.19, n.4, p.503-509, 2012. doi : <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.07.003>.
- TORAWANE, S. et al. Screening of some weed extracts for ovicidal and larvicidal activities against dengue vector *Aedes aegypti*. J. Bas. App. Zool., v.82, n.1, p.1-9, 2021. doi: <https://doi.org/10.1186/s41936-021-00233-y>.
- VANHAECKE, P. et al. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. Ecotoxic. and Envir. Safety, v.5, n.3, p.382-387, 1981. doi: [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(81\)90012-9](https://doi.org/10.1016/0147-6513(81)90012-9).
- VINAUD, M.C.; LINO JUNIOR, R.D.S.; BEZERRA, J.C.B. Activity of *Stryphnodendron polyphyllum*, a plant from the Brazilian savannah, against hemocytes of *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host of *Schistosoma mansoni*. Rev. Pat. Trop., p.237-246, 2008.
- VITRAL, G.S.F.; PETERS, V.M.; GUERRA, M.O. Mecanismos da ação embriotóxica do barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum* M.). Reprod. e Climat., v.3, p.222-226, 1987.
- WHO. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquitoes larvae to insecticide (No. WHO/VBC/81.807). World Health Organization, 1981.
- WHO. Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food: summary (Environmental health criteria; 240, 2009. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44065/WHO_EHC_240_15_summary_por.pdf?sequence=1.