UFRR
UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS

LEANDRO OLIVEIRA E OLIVEIRA

ATIVIDADE ANTIMALÁRICA E INSETICIDA DE EXTRATOS DE *Azadirachta indica* A. Juss. INTRODUZIDA NO MUNICÍPIO DE BOA VISTA, RORAIMA

Boa Vista, RR
2013

LEANDRO OLIVEIRA E OLIVEIRA

ATIVIDADE ANTIMALÁRICA E INSETICIDA DE EXTRATOS DE *Azadirachta indica* A. Juss. INTRODUZIDA NO MUNICÍPIO DE BOA VISTA, RORAIMA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, da Universidade Federal de Roraima, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais. Área de concentração: Bioprospecção.

Orientador: Dr. Adrian Martin Pohlit.
Co-orientadora: Dra. Adriana Flach.

Boa Vista, RR

2013

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Roraima

O48a Oliveira, Leandro Oliveira e.
Atividade antimalárica e inseticida de extratos *de Azadirachta indica A. Juss.* introduzida no município de Boa Vista, Roraima / Leandro Oliveira e Oliveira. -- Boa Vista, 2013.
73 f : il.

Orientador: Prof. Dr. Adrian Martin Pohlit.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Roraima, Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais.

1 – Inseticida. 2 – Insetos nocivos. 3 – Inseticidas naturais. 4 – Malária. 5 - Roraima. I – Título. II. – Pohlit, Adrian Martin (orientador).

CDU- 632.951(811.4)

LEANDRO OLIVEIRA E OLIVEIRA

Atividade antimalárica e inseticida de extratos de *Azadirachta indica* A. Juss. Introduzida no município de Boa Vista, Roraima.

Dissertação apresentada como pré-requisito para conclusão do Curso de Mestrado em Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima, defendida em 28 de agosto de 2013 e avaliada pela seguinte Banca Examinadora:

Prof. Dr. Adrian Martin Pohlit
Orientador – PRONAT

Profa. Dra. Cléria Mendonça de Moraes
Membro – Universidade Estadual de Roraima

Profa. Dra. Albanita de Jesus Rodrigues da Silva
Membro – Universidade Federal de Roraima

Prof. Dr. Habdel Nasser Rocha da Costa
Membro – Universidade Federal de Roraima

DEDICATÓRIA

A todos que
direta e indiretamente
auxiliaram, colaboraram e
incentivaram a caminha da percorrida.

AGRADECIMENTOS

Ao nosso senhor bom Deus, pelo direcionamento, oportunidade e resultados alcançados;

À Universidade Federal de Roraima – UFRR, por oferecer o curso de pós-graduação em Recursos Naturais e disponibilizar meios logísticos para conclusão deste e experiências vivenciadas;

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, que contribuiu direta (em especial Dr. Wanderli Pedro Tadei e todo seu Grupo de Pesquisa) para o alcance dos objetivos da pesquisa, e assim conclusão da Dissertação;

Ao Dr. Adrian Martin Pohlit e Dra. Adriana Flach que motivaram, incentivaram, acompanharam e acolheram o desenvolvimento da pesquisa;

Aos professores responsáveis pelos laboratórios utilizados nas atividades: Dra. Adriana Flach, Dr. Rodrigo Amorim e professor pesquisador Luiz Francisco Rocha e Silva;

Ao Dr. Marcos José Salgado Vital, Dra. Gardênia Holanda Cabral, Dr. Henrique Eduardo Bezerra da Silva e Dr. Reinaldo Imbrozio Barbosa, integrantes da Comissão de Seleção do Mestrado em Recursos Naturais, pelo entendimento do Pré-projeto apresentado na etapa inicial, pelas instruções e opiniões no decorrer do curso, e as secretarias Suzi Almeida Sampaio e Natalia Cristina;

Aos professores do programa que ministraram disciplinas no decorrer do curso;

Ao CNPQ pelo financiamento da bolsa e pesquisa;

A todos os demais mestrandos da turma 2011.2, vencedores das dificuldades enfrentadas com empenho e garra;

Aos estagiários que auxiliaram nas atividades desenvolvidas;

Aos meus pais: Adelino da Silva Oliveira e Francisca das Chagas Oliveira e Oliveira, e meus irmãos motivadores desta caminhada com Fé;

RESUMO

Propriedades inseticidas e farmacológicas presentes em espécies vegetais são exploradas atualmente pela necessidade de produtos com objetivo de controle de pragas, combate a insetos vetores ou no tratamento de doenças humanas. Uma das espécies exploradas biotecnologicamente, nativa da Ásia e presente em regiões tropicais, é o nim (*Azadirachta indica* A. Juss). Trabalhos demostram compostos químicos presentes na espécie capazes de interferir no desenvolvimento de outros organismos vivos, como artrópodes e protozoários. O inseto *Aedes aegypti* e o protozoário *Plasmodium falciparum* são organismos que causam problemas sociais mundialmente, principalmente em regiões tropicais. O primeiro é vetor da febre amarela e do vírus da dengue e o segundo é responsável por uma das principais doenças causadora de mortes nos seres humanos, a malária. Estes provocam graves problemas de saúde pública nas regiões tropicais, incluindo o Brasil e estão presentes no município de Boa Vista, estado de Roraima que possui características edafoclimáticas favoráveis para o desenvolvimento de organismos e espécies vegetais, assim como o nim que se faz presente no estado. O presente estudo teve como objetivo verificar a atividade de extratos e frações de *A. indica*, introduzida no município de Boa Vista, RR contra o mosquito *A. aegypti* e o protozoário *P. falciparum.* Os testes preliminares realizados mostram que para estabelecer CL_{50} contra larvas de *A. aegypti* as concentrações devem ser ≥5000 µg/mL nos copos, e das partes do vegetal utilizados para extração, apenas os extratos obtidos das folhas EMF e EAF mostraram atividade de inibição ao desenvolvimento de *P. falciparum*, *in vitro* com 100 e 80,79 % de inibição do crescimento do parasita, respectivamente na concentração de 50 µg/mL. Tais resultados mostram que extratos metanólicos e metanol/água obtidos de nim presentes no município de Boa Vista, RR apresentam atividade biológicas contra o vetor do arbovírus da dengue e o protozoário causador da malária humana *P. falciparum*, em ensaios *in vitro*.

Palavras-chave: Inseticida. Farmacologia. *Azadirachta indica* A. Juss. Roraima.

ABSTRACT

Insecticidal and pharmacological properties of plant species are currently exploited because of the need for products for pest control, fighting insect vectors or treatment of human diseases. One of the biotechnologically exploited species, a native to Asia and found in tropical regions, is neem (*Azadirachta indica* A. Juss). Previous work has demonstrated that chemical compounds present in the species can affect the development of other living organisms such as arthropods and protozoa. The insect *Aedes aegypti* and protozoan *Plasmodium falciparum* are organisms that cause social problems worldwide, especially in tropical regions. The former is a vector of yellow fever and dengue virus and the latter is responsible for a major disease causing death in humans, malaria. These three diseases represent severe public health problems in tropical countries. These diseases occur in Brazil, and are present in Boa Vista municipality in Roraima State that has favorable soil and climatic characteristics for the development of organisms and plant species, as well as neem that is present in this State. The present study aimed to verify the activity of extracts and fractions of *A. indica*, introduced in the municipality of Boa Vista against the *A. aegypti* mosquito and parasite *P. falciparum*. Preliminary tests show that to establish LC_{50} against larvae of *A. aegypti* concentrations should be ≥ 5000 mg/mL in the cups, and the parts of the plant used for extraction, only the extracts from the leaves and EMF EAF showed inhibitory activity development *P. falciparum in vitro* with 100 and 80.79% inhibition of parasite growth, respectively, at a concentration of 50 mg/mL. These results show that methanol and methanol/water extracts obtained from neem present in Boa Vista municipality exhibit biological activity against the dengue vector and the human malaria parasite *P. falciparum* in an *in vitro* assay.

Keywords: Insecticide. Pharmacology. *Azadirachta indica* A. Juss. Roraima.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura de substâncias encontradas na composição química de *A. indica*: A – azadiractina e B - β-hidroxiazadiradiona 22
Figura 2 – Estrutura de substâncias encontradas na composição química de *A. indica*; salanina (A), nimbidin (B), gedunin (C) e nimbin (D) 23
Figura 3 – Classificação dos estados brasileiros (destacando Roraima) de acordo com a Incidência Parasitária Anual (IPA) de 2008 24
Figura 4 – Ciclo de vida do parasita *Plasdodium falciparum* nas fases distintas de desenvolvimento (mosquito/humano): A – Inoculação dos Esporozoítas na corrente sanguínea; B – Ciclo assexuado nos hepatócitos do fígado humano; C – Penetração dos eritrócitos pelos merozoítos; D – Fase sexuada no estômago do inseto 26
Figura 5 – *Aedes aegypti* Linnaeus na fase adulta 29
Figura 6 – Fluxograma de execução dos processos de prospecção dos extratos metanólicos e metanol/água de *Azadirachta indica* 33
Figura 7 – Mapa com ponto de coleta da espécie *Azadirachta indica*, localizado no bairro Distrito Industrial, campus sede da EMBRAPA, no município de Boa Vista-RR 34
Figura 8 – Exsicata confeccionada da espécie *Azadirachta indica* coletada 34
Figura 9 - Fluxograma dos processos de fracionamento do extrato metanólico das folhas (EMF) de *Azadirachta indica* com respectivos rendimentos 41
Figura 10 – A – Recipientes utilizados para incubação dos ovos de *Aedes aegypti* (larvas no círculo); B – Manutenção das larvas com ração para peixes de aquário 43
Figura 11 – Instalação dos bioensaios larvicidas em copos de 50 mL, com 10 larvas de *Aedes aegypti*, 9,9 mL de H_2O pura e 100 µL das soluções teste 45
Figura 12 – A – Gaiolas utilizadas para manutenção dos mosquitos adultos de *Aedes aegypti*; B – Copos usados para transferências dos mosquitos das gaiolas para as garrafas tratadas 46
Figura 13 – A – Transferência dos mosquitos das gaiolas para as garrafas; B – Garrafas tratadas em observação com fêmeas adultas de *Aedes aegypti*. 46
Figura 14 – Esquema da aplicação das soluções testes nas garrafas de 250 mL 47
Figura 15 – Esquema de preparação das soluções a 5mg/mL e aplicação na microplaca de 96

poços com parasitas para realização dos testes *in vitro* 48
Figura 16 – A – Lâminas de microscopia com esfregaços corados (soluções testes com hemácias parasitadas); B – Campo observado em microscópio ótico para quantificação da parasitemia..... 49
Figura 17 – Gráfico com resultados dos bioensaios larvicidas contra *Aedes aegypti* utilizando extratos metanólicos de *Azadirachta indica* em diferentes concentrações (µg/mL) no período de 24 h 53
Figura 18 – Gráfico com resultados dos bioensaios larvicidas contra *Aedes aegypti* utilizando extratos metanol/água de *Azadirachta indica* em diferentes concentrações de 312,5, 625, 1250, 2500, 5000 µg/mL no período de 24 h 55
Figura 19 – Gráfico com resultados do screening dos extratos de *Azadirachta indica* a concentração de 50 µg/mL contra *Plasmodium falciparum* 58
Figura 20 – Estruturas de compostos antimaláricos presentes na composição química dos frutos de *Azadirachta indica.* 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação botânica do nim (*Azadirachta indica* A. Juss) 20
Tabela 2 – Alguns compostos extraídos da composição de *Azadirachta indica* e suas respectivas bioatividades 22
Tabela 3 – Descrição e quantificação das partes coletadas de *Azadirachta indica* 35
Tabela 4 – Massas e rendimentos dos extratos metanólicos de *Azadirachta indica* 37
Tabela 5 – Rendimento da extração metanol/água das partes de *Azadirachta indica* 38
Tabela 6 - Descrição dos extratos metanólicos de *Azadirachta indica* 38
Tabela 7 - Descrição dos extratos metanol/água de *Azadirachta indica* a 39
Tabela 8 - Descrição dos solventes orgânicos utilizados no processo de fracionamento das amostras EMF e EAF por partição liquido-liquido 39
Tabela 9 - Valores das amostras trabalhadas no fracionamento 40
Tabela 10 – Frações obtidas da amostra EMF com respectivos códigos atribuídos e rendimentos 42
Tabela 11 – Frações obtidas da amostra EAF com respectivos códigos atribuídos e rendimentos 42
Tabela 12 – Resultados do bioensaio teste para estabelecer a tolerância das larvas de *Aedes aegypti* a diferentes porcentagens de DMSO 44
Tabela 13 - Resultados dos bioensaios larvicidas contra *Aedes aegypti* utilizando extratos metanólicos de *Azadirachta indica* em diferentes concentrações e intervalos de tempo, com resultados da CL_{50} e percentual de atividade para cada concentração 51
Tabela 14 – Resultados dos bioensaios larvicidas contra *Aedes aegypti* utilizando extratos metanol/água de *Azadirachta indica* em diferentes concentrações e intervalos de tempo, com resultados da CL_{50} e percentual de atividade para cada concentração 54
Tabela 15 – Inibição do crescimento *in vitro* da cepa K1 de *Plasmodium falciparum* frente aos extratos metanólicos de diferentes partes de *Azadirachta indica*. 57
Tabela 16 – Inibição do crescimento *in vitro* da cepa K1 de *Plasmodium falciparum* frente os extratos metanol/água de diferentes partes de *Azadirachta indica*. 57

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
AFA	Fração hexânica da amostra EAF
AFC	Fração clorofórmica da amostra EAF
AFH	Fração acetato de etila da amostra EAF
AFNB	Fração hidro alcoólica da amostra EAF
AFS	Fração n-Butanol da amostra EAF
ArcGis	Sistema de Informação Geográfica
BOD	Estufas incubadoras para B.O.D. (demanda bioquímica de oxigênio)
C6H14	Hexano
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CDC	Centro para Controle e Prevenção de Doenças (EUA)
CGPNCM	Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Malária
CGVS	Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde
CL_{50}	Concentração que mata 50% dos organismos
d	Densidade
DMSO	Dimetilsulfóxido
DVE	Departamento de Vigilância Epidemiológica
EACC	Extrato metanol/água da casca do caule
EACR	Extrato metanol/água do caule dos ramos
EACR1	Extrato etanol/água da casca dos ramos
EACR2	Extrato metanol/água da casca da raiz
EACR3	Extrato metanol/água do caule da raiz
EAF	Extrato metanol/Água das Folhas
EAF1	Extrato metanol/Água dos Frutos
EMBRAPA-RR	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária de Roraima
EMCC	Extrato metanólico da casca do caule
EMCR	Extrato metanólico do caule dos Ramos
EMCR1	Extrato metanólico do caule da raiz
EMCR2	Extrato metanólico da casca dos ramos
EMCR3	Extrato metanólico da casca da Raiz

EMF	Extrato metanólico das folhas
EMF1	Extrato metanólico dos frutos
FMTAM	Fundação de Medicina Tropical do Amazonas
GPS	Global Positioning System – Sistema de Posicionamento Global
IAPAR	Instituto Agronômico do Paraná
CI_{50}	Concentração que inibe 50% de um parâmetro
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
IPA	Índice Parasitário Anual
K1	Cepa multi-resistente de *Plasmodium falciparum* - MR4
LAPAAM	Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia
MFA	Fração hexânica da amostra EMF
MFC	Fração clorofórmica da amostra EMF
MFF	Fração hidro alcoólica da amostra EMF
MFH Fração	Fração acetato de etila da amostra EMF
MFM	Fração metanólica da amostra EMF
MFS	Fração n-butanol da amostra EMF
MR4	Malaria Research and Reference Reagent Resource Center
NCFAD	Núcleo de Controle de Febre Amarela e Dengue
OMS	Organização Mundial da Saúde
ppm	Parte por milhão
rpm	Rotações por minutos
RPMI 1640	Meio de cultura (mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular)
RTS,S	Vacina para proteção de pessoas contra a malária
SESAU/RR	Secretaria de Estado da Saúde de Roraima
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SIVEP	Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
1.1 ETNOFARMACOLOGIA 18
1.2 PLANTAS MEDICINAIS 18
1.3 *Azadirachta indica* A. Juss 19
1.3.1 Composição Química de *Azadirachta indica* 21
1.4 MALÁRIA 23
1.4.1 *Plasmodium falciparum* Marchiafava e Celli 24
1.4.2 Ciclo de Vida do Parasita *Plasmodium falciparum* 25
1.4.3 Controle e Tratamento da Malária 27
1.5 DENGUE 28
1.5.1 *Aedes aegypti* Linnaeus 29
1.5.2 Controle de *Aedes aegypti* 30
2 OBJETIVOS 31
2.1 OBJETIVO GERAL 31
3 MATERIAL E MÉTODOS 32
3.1 COLETA 32
3.1.1 Procedimentos Laboratoriais 35
3.1.2 Extração Metanólica 36
3.1.3 Extração Metanol/Água 37
3.2 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS 39
3.2.1 Extrato Metanólico 40
3.2.2 Extrato Metanol/Água 42
3.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS 43
3.3.1 Bioensaios Contra *Aedes aegypti* 43
3.3.2 Bioensaios Larvicida Contra *Aedes aegypti* 43
3.3.2 Bioensaios Contra Fêmeas Adultas de *Aedes aegypti* 45
3.4 ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA *IN VITRO* 47
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA 49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 50
4.1 RESULTADOS DOS BIOENSAIOS LARVICIDA 50
4.2 RESULTADOS DOS BIOENSAIOS ADULTICIDAS 56

4.3 RESULTADOS DA ATIVIDADE *IN VITRO* 56
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS 60
REFERÊNCIAS 61

1 INTRODUÇÃO

Espécies vegetais com propriedades terapêuticas e inseticidas são motivo de interesse científico, por meio da aplicação de princípios da farmacologia, a qual possui conhecimentos na área da farmacodinâmica, posologia, quimioterapia, terapêutica, e da farmacognosia e toxicologia (MATOS et al., 2009; SIMÕES et al., 2003). O estudo da toxicidade dos compostos presentes nos vegetais por conta de seus efeitos aos organismos é a finalidade do último ramo com importância na atualidade (SIMÕES et al., 2003).

Uma das espécies vegetais com propriedades biotecnológicas, que pode ser empregada no tratamento e controle de problemas de saúde ocasionados por insetos vetores e organismos patogênicos e atividades biológicas é o nim (*Azadirachta indica* A. Juss), espécie vegetal com inúmeras utilizações inseticida e farmacológica (DEQUECH et al., 2008; DHAR et al., 1998; DRABU; KHATRI; BABU, 2012; DUA et al., 2009; FORIM et al., 2010; KAUR et al., 2009; LOVATTO; MAUCH; SCHIEDECK, 2011; MICHELETTI et al., 2010; MORGAN, 2009; NAHAK; SAHU, 2010; NATA et al., 1991; OMAR et al., 2003; RAJA; RAMANATHAN; SAVITHA, 2009; SCHMUTTERER, 1990; SILVA et al., 2007; SINGH; KHANAM; AHMAD, 2011). O extrato e óleo de *A. indica* é eficiente no controle de diversos artrópodes (POHLIT et al., 2011a, 2011b), a espécie é foco de intensa atenção internacional, pois além de se desenvolver sob as mais diversas condições agroclimáticas, principalmente em clima tropical, adapta-se facilmente a solos pobres (RIBEIRO et al., 2006) propiciando sua exploração. A espécie é nativa da Ásia, está presente em regiões tropicais e subtropicais do mundo (CABONI et al., 2006; DRABU; KHATRI; BABU, 2012). Introduzida no Brasil, existe alguns trabalhos que demostram a ação biológica de extratos de *A. indica*, nos estados de Espirito Santo (CASER et al., 2007), Pernambuco (SILVA et al., 2007), Minas Gerais (RIBEIRO et al., 2006), São Paulo (MEDEIROS; JUNIOR; TORRES, 2005) e no Paraná (WANDSCHEER et al., 2004).

Conhecida por suas atividades biológicas, foi introduzida no município de Boa Vista, Estado de Roraima, onde se desenvolve sob ás características pertinentes ao ambiente local, segundo Gobbo-Neto; Lopes (2007) e Monteiro et al., (2005), compostos do metabolismo secundário vegetal estão relacionados e/ou sofrem alterações por efeitos do ecossistema. Entretanto, não há informações de quando esta espécie foi introduzida no estado, também não se tem verificado a ação biológica da espécie introduzida, contra qualquer outro organismo (patógeno ou inseto). Roraima apresenta características favoráveis para o desenvolvimento de

espécies vegetais, por consequências de condições edafoclimáticas, condições de solo e clima, que propiciam o desenvolvimento de diferentes espécies vegetais, e ao desenvolvimento de espécies vegetais exóticas. Apresenta biomas diferenciados como, o de savana (lavrado), florestas e as capinaranas (VALE JÚNIOR; SCHAEFER, 2010).

Aliados às variáveis condições naturais estão os problemas sociais que afetam a população mundial (VALDÉS et al., 2010). Também, o estado de Roraima, especificamente o município de Boa Vista, enfrenta o desenvolvimento de artrópodes vetores da malária e a dengue (BRASIL, 2005; NAGM et al., 2007; SANCHEZ, 2007). No ano de 2010, a incidência de casos de malária aumentou 38 % (em comparação á anos anteriores de 2008 e 2009), segundo registros do Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica (SIVEP) da Secretaria Estadual de Saúde de Roraima (REDAÇÃO, 2011). Devido a tal característica o Estado é classificado como área de alto risco, de acordo com o Índice Parasitário Anual - IPA (BRASIL, 2005), e no período de 2008 ao primeiro semestre de 2013 foram registrados 22.973 casos positivos de malária, e 12.818 casos de Dengue no município de Boa Vista (BRASIL, 2013a, 2013b). Ambas as doenças possuem organismos causadores resistentes (MENDONÇA et al., 2005; OMS, 2011) aos produtos empregados no tratamento e/ou controle, os inseticidas organofosforados, piretróides (QUADROS; TADEI; NONUMURA, 2010) e os antimaláricos artemisinina e cloroquina (DHAR et al. 1998) necessitando a realização de ensaios com novos produtos.

O presente estudo teve como finalidade verificar extratos e frações de *A. indica* A. Juss, introduzida no município de Boa Vista, em atividades biológicas contra o artrópode *A. aegypti* Linnaeus (mosquito vetor da febre amarela e do arbovirus da dengue) e o protozoário *Plasmodium falciparum* Marchiafava e Celli (causador da malária humana). Estabelecendo conhecimentos acerca da espécie vegetal de grande importancia biotecnologica para o mundo, presente no Estado de Roraima. A pesquisa foi estimulada pela hipótese alternativa (H1): de que todas as partes de *A. indica*, submetidas a extratação demostrassem atividade contra *P. falciparum* e *A. aegypti*, por conta das caracteristicas ambientais favoraveis do estado ao desenvolvimento de espécies vegetais. Este foi o primeiro trabalho com *A. indica* introduzida no Brasil, verificando a atividade antimalárica.

1.1 ETNOFARMACOLOGIA

As plantas representaram, durante séculos, fontes de agentes terapêuticos para o homem. No início do século XIX, com o desenvolvimento da química farmacêutica, as plantas passaram a representar a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos (COELHO et al., 2005).

Medicamentos naturais têm contribuído significativamente nas modernas terapias, mesmo com o avanço da indústria química internacional de drogas. A utilização de ervas nativas é realizada em diferentes partes da terra, onde os medicamentos químicos não estão disponíveis, consequentemente a fitoterapia nativa torna-se assim a única alternativa para curar doenças, aliviar a dor e infecções, aliviar o sofrimento crônico ou temporário, que diminuem a qualidade de vida dessas sociedades (MADALENO, 2007).

Nesse contexto, cerca de 88% da população mundial utilizam medicamentos naturais, obtidos de vegetais, como sua principal forma de manter a saúde e combater doenças. São utilizados mundialmente como drogas 119 metabólitos secundários derivados de plantas. 15% das angiospermas têm sido investigadas fitoquimicamente e 74% dos derivados descobertos são farmacologicamente ativos (RAJA; RAMANATHAN; SAVITHA, 2009).

1.2 PLANTAS MEDICINAIS

Questões de saúde humana, animal e sanidade vegetal afetam o mundo, acarretando em prejuízos sociais, financeiros e ecológicos, no entanto, uma alternativa utilizada em tais questões, são plantas com potencial farmacêutico e inseticida, estabelecendo benefícios ambientais e sociais (IDU; ONYIB, 2007; MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005). Uso de plantas representa estratégia eficaz que, além de tudo, minimiza os impactos ambientais e prejuizos a saúde humana, ocasionados pelos produtos sintéticos (PETROSKI; STANLEY, 2009). Nos dias atuais esta alternativa (exploração de plantas) vem sendo difundida, uma vez que tem sido comprovada cientificamente a ação de compostos responsáveis pelas atividades biológicas características (BOTELHO et al., 2007; MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005).

Os extratos e óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas são uma alternativa com aspectos econômicos e ecológicos (QUADROS; TADEI; NONUMURA, 2010) com potencial

terapêutico e pesticida, principalmente quando os defensivos sintéticos não são permitidos (CALMASUR; ASLAN; SAHIN, 2006; MOURÃO et al., 2004). Seja para uso terapêutico ou como defensivo, fatores como: qualidade, segurança e eficiência são atributos dessa alternativa (HEINZMANN; BARROS, 2007).

Metabólitos secundários como: alcalóides, terpenóides e compostos fenólicos, presentes nos vegetais, funcionam como uma defesa química das plantas, são fundamentais na defesa contra microrganismos fitopatogênicos e na atração de insetos benéficos (BRITO et al., 2006; SIMÕES et al., 2003). Algumas das principais plantas que possuem essas substâncias são espécies da família Meliaceae, como exemplo *Azadirachta indica* que possui atividades sobre diversos organismos (DEQUECH et al., 2008; JÚNIOR, 2003; LOVATTO; MAUCH; SCHIEDECK, 2011).

Atualmente, cerca de 88% da população mundial utilizam medicamentos naturais, obtidos de vegetais, como sua principal forma de manter a saúde e combater doenças. São utilizados mundialmente como drogas, 119 metabólitos secundários derivados de plantas, 15% das angiospermas têm sido investigadas fitoquimicamente e 74% dos derivados descobertos são farmacologicamente ativos (RAJA; RAMANATHAN; SAVITHA, 2009).

Em trabalho realizado por Luz (2001), na capital do estado de Roraima, Boa Vista, foi constatado que a populaçao utiliza plantas medicinais. Embora, o cultivo das mesmas é escasso, restrito a quintais e pequenas hortas domésticas.

1.3 *Azadirachta indica* A. Juss

O Nim (*A. indica*) é uma árvore que possui porte de 15 a 20 m de altura (DRABU; KHATRI; BABU, 2012), com tronco semi-reto a reto, de 30 a 80 cm de diâmetro (MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005). Plantas da família (Meliaceae) possuem compostos secundários de interesse em sua composição química, tais substâncias podem ser extraídas de todas as partes da planta: raízes, caules, folhas, flores, frutos e semente, e que sofrem diferença na concentração por fatores climáticos (SIMÕES et al., 2003). A espécie possui a seguinte classificação botânica de acordo com a tabela 1.

O nim é uma planta com potencial farmacológico e inseticida (SINGH et al., 1999), fonte promissora de inseticidas orgânicos de acordo com estudos de formulações obtidas a partir de partes da planta (DEQUECH et al., 2008; MICHELETTI et al., 2010).

Tabela 1 – Classificação botânica do nim (*Azadirachta indica* A. Juss)

Ordem	Rutales
Subordem	Rutinae
Família	Meliaceae
Subfamília	Melioideae
Tribo	Melieae
Gênero	*Azadirachta* A. Juss
Espécie	*A. indica* A. Juss

Fonte: Ogbuewu et al., (2011).

A espécie *A. indica* é originária do sul e sudeste da Ásia, possui grande ocorrência em áreas tropical e subtropical da África, América e Austrália (DRABU; KHATRI; BABU, 2012). Há 20 anos o nim vem sendo estudado biologicamente (SCHMUTTERER, 1990), *A. indica* é foco de intensa atenção internacional, pois está presente em diferentes regiões do mundo, principalmente em regiões de clima tropical (RIBEIRO et al., 2006), é uma espécie de potencial biológico (TAN; LUO, 2011) uma das duas espécies do gênero *Azadirachta* (DRABU; KHATRI; BABU, 2012).

No Brasil, as primeiras sementes do nim foram introduzidas pelo Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR-PR) nos anos de 1986 e 1989, a partir de então a espécie foi introduzida em outros estados (NEVES; CARPANEZZI, 2009). Já houve alguns trabalhos realizados com *A. indica* introduzida no Brasil, mostrando sua atividade biológica (larvicida, inseticida e carrapaticida) nos estados de Espírito Santo (CASER et al., 2007), Minas Gerais (RIBEIRO et al., 2006), Pernambuco (SILVA et al., 2007) e São Paulo (MEDEIROS; JUNIOR; TORRES, 2005). Compostos do metabolismo secundário vegetal apresentam interações e/ou sofrem alterações nas plantas por fatores ambientais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; MONTEIRO et al., 2005) fazendo necessário estudos com a espécie presente em diferentes regiões.

A. indica destaca-se como estratégia para controle e manejo alternativo de insetos, por possuir como metabolito majoritário a azadiractina (figura 1 – A), um limonoide com baixa toxicidade ambiental que apresenta diferentes modos de ação biológica (LOVATTO; MAUCH; SCHIEDECK, 2011). É considerada fonte para o desenvolvimento de produtos naturais (DRABU; KHATRI; BABU, 2012).

Apesar das características biológicas, comprovada cientificamente e possuir compostos bioativos, existem insetos que danificam a planta, como as formigas cortadeiras,

causadoras de desfolha, percevejos e cochonilhas. Seus principais elementos químicos são uma mistura de 3 ou 4 compostos correlatos, que podem ser modificados em mais de 20 outros menores, porém não menos ativos (MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005).

1.3.1 Composição Química de *Azadirachta indica*

A classe geral de compostos ativos presentes em *A. indica*, são os triterpenos e dentro desta categoria os mais eficazes são os limonóides, abundantes no óleo de nim. O nim também contém mais de 20 compostos sulfurosos, responsáveis pelo cheiro característico das sementes trituradas e o óleo obtido (DRABU; KHATRI; BABU, 2012).

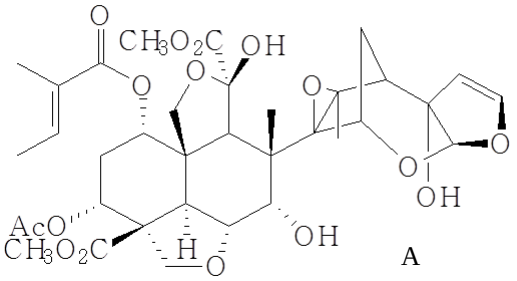
Os limonóides, azadiractina e β-hidroxiazadiradiona (figura 1 – A e B), possuem atividade medicinal e inseticida. O primeiro possui ação antialimentar em insetos, é classificado como um dos compostos promissores para o manejo de artrópodes pragas. Na medicina popular as raízes, caule, folhas, frutos e flores de *A. indica* têm sido amplamente empregados contra dores de cabeça, problemas estomacais (SILVA; BATISTA; BRITO, 2009).

A azadiractina é o limonóide mais importante e com maior número de estudos em todo mundo (MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005). É o principal componente presente na composição do nim, responsável pelos efeitos tóxicos sobre espécies de insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera, Diptera e Hyminoptera, ocasionando efeitos de repelência, ação na metamorfose, redução na oviposição e alimentação (TAN; LUO, 2011; SCHMUTTERER, 1990) tanto por ingestão como por contato (CABONI et al., 2006; SILVA; BATISTA; BRITO, 2009).

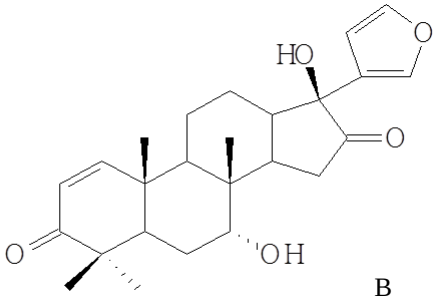
Repelentes comerciais para insetos são extraídos do óleo de nim. O princípio ativo nestes produtos é a azadiractina, substância com grande utilização em produtos farmacêuticos, tais como: cosméticos, cremes, loções, sabonetes, xampus, tônicos capilares e creme dental (ARAÚJO; RODRIGUEZ; PAES, 2000).

Butterworth; Morgan (1968), isolaram azadiractina do extrato etanólico dos frutos de *A. indica* com sucessivas partições, seguidas por cromatografia em alumina. A aplicação de prudutos comerciais, na indústria agrícola, a base de azadiractina tem aumentado na atualidade (TAN; LUO, 2011).

Figura 1 – Estrutura de substâncias encontradas na composição química de *A. indica*: A – azadiractina e B - β-hidroxiazadiradiona



A



B

Fonte: Júnior (2003).

Além de azadiractina, outras substâncias bioativas foram isoladas do nim como mostra a tabela 2. Salanina (figura 2 – A), 14-epoxiazadiradiona, meliantrol, melianona, nimbidin (figura 2 – B), gedunin (figura 2 – C), nimbolina, nimbin (figura 2 – D), nimbinem, deacetilasalanina, azadiractol, azadirona, vilosinina, meliacarpina, entre outros, totalizando mais de 300 substâncias isoladas e caracterizadas (ALVES, 2007).

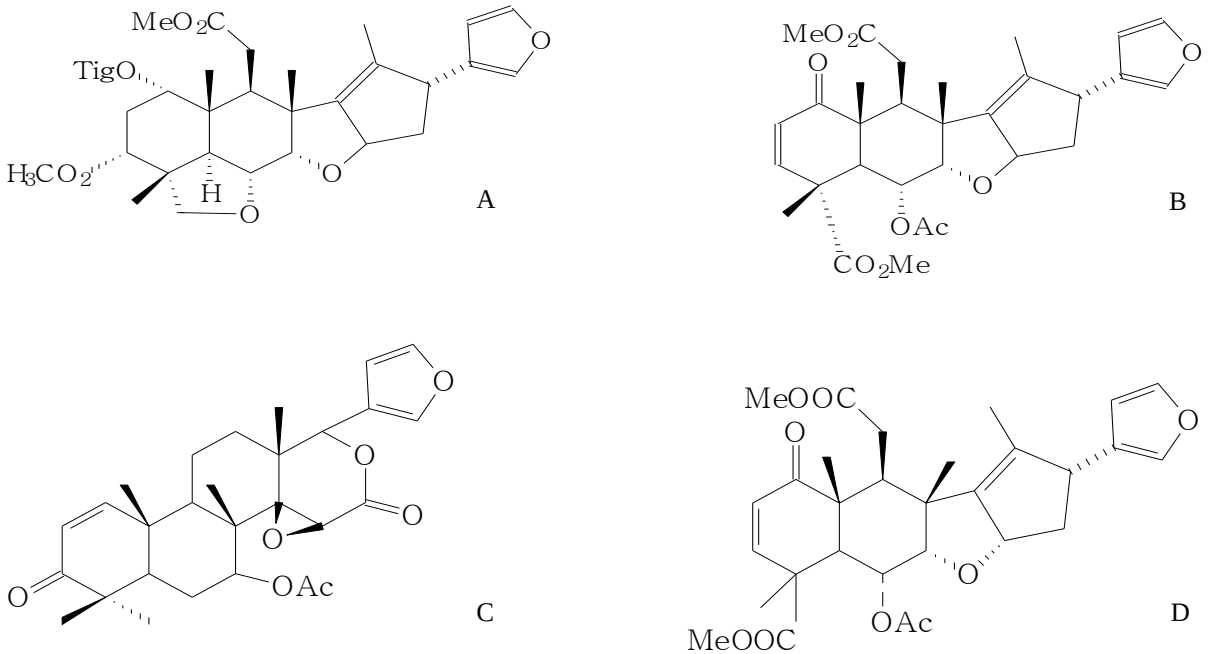
Em pesquisas realizadas por Omar et al. (2003), demonstrou que *A. indica* apresenta significativos resultados contra *P. falciparum* em testes *in vitro*. E na tentativa de impedir o desenvolvimento *in vitro* de *P. falciparum* resistentes em diferentes estágios de maturação a outras drogas (cloroquina/pirimetamina) Dhar et al. (1998), verificaram que frações hexânica e hidro alcóolica obtidas de *A. indica* inibem o desenvolvimento do parasita.

Tabela 2 – Alguns compostos extraídos da composição de *Azadirachta indica* e suas respectivas bioatividades

Composto	Bioatividade
Gedunin	Vasodilatadora e antifúngica
Nimbidin	É analgésico e bactericida
Nimbin	Espermicida, é uma substância contraceptiva
Salanina	Repelência em insetos

Fonte: Biswas et al. (2002); Drabu; Khatri; Babu (2012).

Figura 2 – Estrutura de substâncias encontradas na composição química de *A. indica*; salanina (A), nimbidin (B), gedunin (C) e nimbin (D)



Fonte: Alves (2007); Biswas et al. (2002).

1.4 MALÁRIA

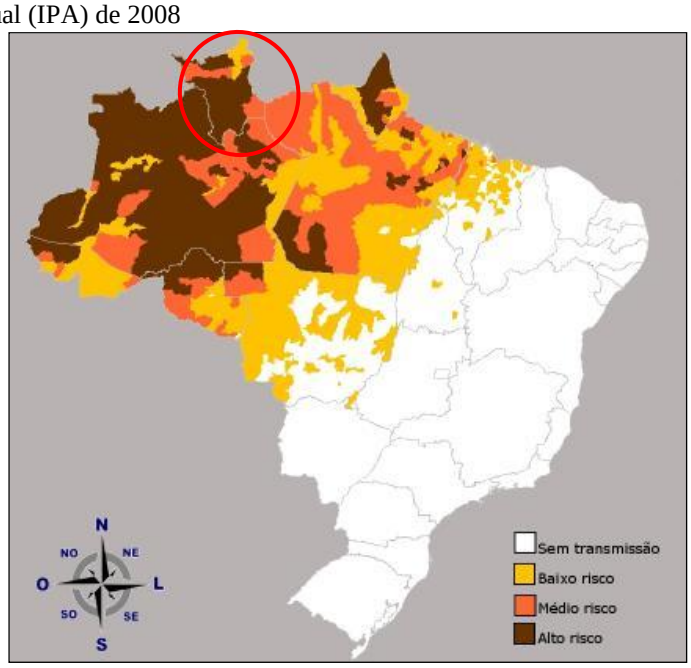
A malária é uma doença infecciosa encontrada principalmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo causando intoleráveis números de mortes, especialmente em países pobres da África (CHIANESE et al., 2010). Em 2002, 2,2 bilhões de pessoas foram expostas ao risco de ser infectado pelo parasito da malária e em 2005 uma faixa de 300 a 660 milhões de casos foram estimados (SNOW et al., 2005), e causa pelo menos um milhão de mortes por ano mundialmente (KAPPE; MIKOLAJCZAK, 2011; MILHOUS; WEINA, 2010; VAUGHAN; KAPPE, 2012).

É uma das maiores ameaças a saúde pública mundial (VALDÉS et al., 2010). A maioria das mortes ocasionadas pela malária ocorreu em crianças africanas, nos anos de 2000 a 2011, onde a cada minuto uma criança morreu da doença, a enfermidade foi responsável por 22% das mortes infantis no mundo (OMS, 2011). A malária em suas formas graves (malária cerebral), é a principal causa de mortalidade, chega a 40% dos óbitos, que podem ocorrer 24 horas após admissão nos hospitais (ALECRIM et al., 2003). Na figura 3, podemos observar a distribuição da doença no Brasil, com enfase o estado de Roraima.

A malária é entendida como uma doença tropical a qual, no entanto, veio pelos

estrangeiros ocidentais na colonização das americas quando chegou ao Brasil (ADAMS et al,. 2011). É a principal endemia da Amazônia, com 99,5% dos casos ocorridos no Brasil (SARAIVA et al., 2009). No período compreendido entre janeiro de 1996 a dezembro de 1998, no estado do Amazonas, foram diagnosticados 279.914 casos (ALECRIM et al., 2003).

Figura 3 – Classificação dos estados brasileiros (destacando Roraima) de acordo com a Incidência Parasitária Anual (IPA) de 2008



Fonte: Brasil (2009).

Inserido na região amazônica, o estado de Roraima-RR apresenta condições naturais favoráveis ao desenvolvimento da malária, acarretando em problema na saúde pública do estado (SANCHEZ, 2007). Roraima é classificado como área de alto risco, de acordo com o Índice Parasitário Anual – IPA, que classifica as áreas de transmissão da doença em: alto, médio e baixo risco, de acordo com o número de casos por mil habitantes (BRASIL, 2009).

1.4.1 *Plasmodium falciparum* Marchiafava e Celli

Os parasitas da malária são protozoários pertencetes ao gênero *Plasmodium*. Existem mais de 100 espécies que podem infectar répteis, pássaros e mamíferos na natureza por

mosquitos vetores, (CDC, 2010; COX, 2010).

Espécies de mosquitos *Anopheles* (COX, 2010; OMS, 2011), são responsáveis pela transmissão de parasitas do filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium* (*P. falciparum* Welch, 1897; *P. vivax* Grassi e Feletti, 1890; *P. malariae* Feletti e Grassi, 1889; *P. ovale* Stephens, 1922) e *P. knowlesi*. São espécies de protozoários responsáveis por causar a malária humana, através da picada de fêmeas do mosquito *Anopheles*, infectada por *Plasmodium* (BRASIL, 2005; POHLIT et al., 2011a, 2011b; SANCHEZ, 2007). A mais recente e quinta espécie de protozoário (*P. knowlesi* Sinton e Mulligan, 1933), presente naturalmente em sp. de macacos, foi registrada capaz de infectar seres humanos (CHIN et al., 1965).

A malária é classifica de acordo com a periodicidade dos ataques de febre nos indivíduos infectados, como: tertiana, que acarreta febre a cada 48 h causada por *P. vivax* e *P. ovale;* em quartana, caracterizada por sintomas de febre a cada 72 h, causada por *P. malariae*; e a malária trópica, ocasionada por *P. falciparum*, com febres de forma irregular ou também a cada 48 h (ADAMS et al., 2011). Para *P. knowlesi* foi registrado febres dentro de 24 h chegando a 40 ºC (CHIN et al., 1965).

P. falciparum é a espécie mais patogênica, causadora da malária cerebral grave letal para indivíduos primo-infectados não-tratados é altamente polimórfico e dotado de uma grande capacidade de adaptação (KRETTLI, 2008). O aumento da incidência da malária tem sido atribuída ao desenvolvimento de resistência do *P. falciparum* à cloroquina e outras drogas (DHAR et al., 1998), e a resistência dos mosquitos vetores aos inseticidas utilizados (MACKINNON et al., 1997).

1.4.2 Ciclo de Vida do Parasita *Plasmodium falciparum*

O ciclo evolutivo do parasita *P. falciparum* possui alta complexidade, três estágios do ciclo de vida de *P. falciparum* têm sido observados. O primeiro ocorre na inoculação dos esporozoítas no organismo humano pelo mosquito *Anopheles* contaminado, em seguida acontece à multiplicação assexuada ou esquizogonia hepática (ocorre nos hepatócitos) que resulta na formação dos esquizontes, que darão origem aos merozoítas.

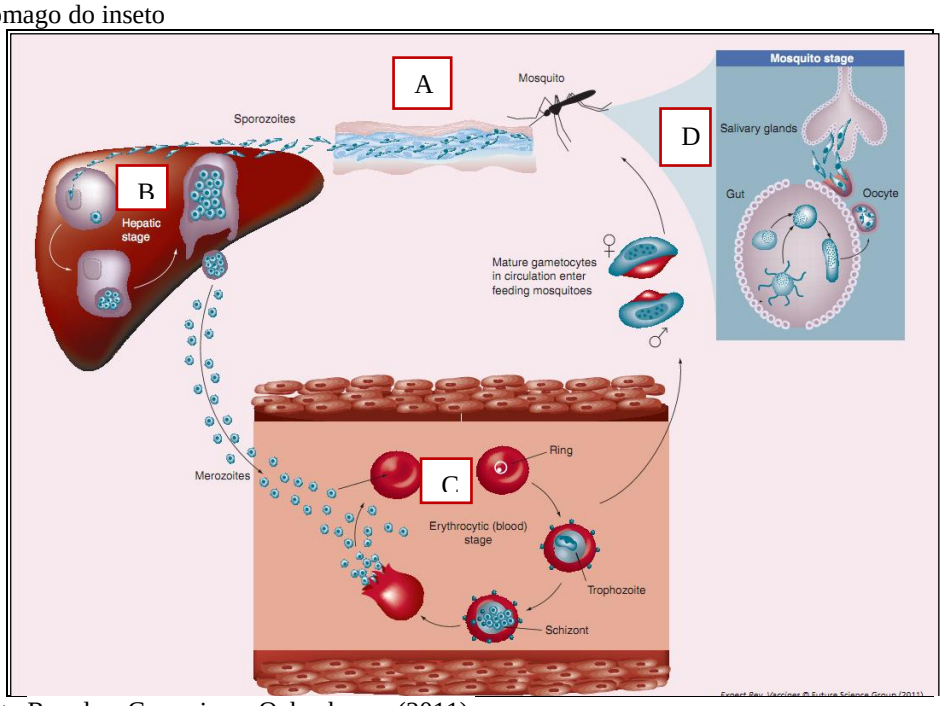
A segunda fase ocorre na penetração dos merozoítas nos eritrócitos (estágio no sangue), onde se transformaram em trofozoíta jovem (forma de anel), em seguida na forma

irregular (trofozoíta ameboides) que em determinado momento seu núcleo divide-se, tornando-se esquizontes, e multiplicando-se em merozoítas, que voltaram a parasitar outros glóbulos vermelhos dando inicio a um novo ciclo sanguíneo (REGULES; CUMMINGS; OCKENHOUSE, 2011; VERONESI; FOCACCIA, 2002).

A fase sexuada ou Gametogônica no estômago do inseto. Os merozoítas se diferenciam em gametócitos feminino (macrogametócitos) e masculino (microgametócitos). Os gametócitos amadurecem no sangue periférico e sobrevivem por um dia, quando a fêmea de *Anopheles* se alimenta do indivíduo contaminado e retira os gametócitos, que sofreram o processo de exflagelação originando os zigotos que geram os oocistos que crescem rompendo-se, migrando para as glândulas salivares do inseto. A partir daí, as fêmeas de *Anopheles* se tornam infectantes (REGULES; CUMMINGS; OCKENHOUSE, 2011; VERONESI; FOCACCIA, 2002).

Estes parasitas, uma vez introduzidos no organismo humano, destroem os glóbulos vermelhos do sangue. Tal destruição dos glóbulos vermelhos acarreta os sintomas da doença como: calafrios, dores musculares, febre, náusea, vômito, anemia e problemas respiratórios (RAHMATULLAH et al., 2012). Os vetores são mais abundantes nos horários crepusculares, ou seja, ao entardecer e amanhecer (BRASIL, 2005).

Figura 4 – Ciclo de vida do parasita *Plasdodium falciparum* nas fases distintas de desenvolvimento (mosquito/humano): A – Inoculação dos Esporozoítas na corrente sanguínea; B – Ciclo assexuado nos hepatócitos do fígado humano; C – Penetração dos eritrócitos pelos merozoítos; D – Fase sexuada no estômago do inseto



Fonte:Regules; Cummings; Ockenhouse (2011).

1.4.3 Controle e Tratamento da Malária

A principal forma de prevenção da malária, assim como outras doenças ocasionadas por artrópodes, é no controle dos vetores através do uso de inseticidas a base de piretróides. Os piretróides são a classe de inseticidas empregadas no controle dos mosquitos. Tem-se observado a resistência dos mosquitos aos inseticidas, especialmente na África (OMS, 2011). É muito urgente à necessidade de novos medicamentos antimaláricos (GUIGUEMDE et al., 2012; MARIATH et al., 2009) e inseticidas para controle dos vetores (OMS, 2011).

O tratamento da malária com a planta *Artemisia annua* L. (erva-de-são-joão), apresenta vantagens econômicas, baixa toxicidade e não causa efeitos colaterais, diferente dos produtos convencionais utilizados para o tratamento da doença (QUITÉRIO, 2006). A substância artemisinina, extraída da *A. annua*, é uma lactona sesquiterpênica (metabólito secundário) que foi classificada em 1979, e é responsável pelo efeito dessa planta contra *Plasmodium* (MILHOUS; WEINA, 2010; QUITÉRIO, 2006).

No Oriente, há informações do uso de plantas medicinais para tratar febres e outras doenças a milhares de anos, inclusive *A. annua*, recentemente redescoberta e da qual se extrai o princípio ativo mais importante para tratar malária grave, a artemisinina (KRETTLI, 2008).

Não há vacina licenciada contra qualquer doença parasitária humana (MICHALAKIS; RENAUD, 2009; VAUGHAN; KAPPE, 2012). A busca por vacinas contra a malária, é uma necessidade muito requisitada na tentativa de proteção de pessoas, incluindo a repelência dos artrópodes (mosquitos do gênero *Anopheles*) transmissores da doença, na tentativa de reduzir a relação entre humano/vetor (RAJKUMAR; JEBANESAN, 2007). O desenvolvimento de vacinas contra a malária é um desejo pretendido a mais de 40 anos (REGULES; CUMMINGS; OCKENHOUSE, 2011).

A vacina RTS,S (nome comercial Mosquiris), é a mais avançada para proteção da malária, está na III fase de ensaios clínicos, reduz pela metade o número de casos tanto em crianças como adultos, em pesquisas realizadas em Moçambique/África (REGULES; CUMMINGS; OCKENHOUSE, 2011). A vacina RTS,S é capaz de prevenir a maturação e multiplicação do parasita no fígado, interrompendo a entrada do protozoário na corrente sanguínea, que levaria à infecção das hemácias e sintomatologia da doença (EXPERT..., 2013). RTS,S é uma combinação de fragmentos de proteínas do protozoário *P. falciparum* com uma proteína do vírus da hepatite B (VOGEL, 2004).

Centros de pesquisas africanos estabelecem resultados em longo prazo, e a

Organização Mundial de Saúde tem indicado que os resultados positivos podem levar a recomendação da RTS,S contra a malária em 2015 (EXPERT..., 2013).

1.5 DENGUE

A dengue afeta milhares de pessoas em regiões tropicais do mundo, as principais razões para essa situação são: indisponibilidade de vacinas e o desenvolvimento da resistência a inseticidas e fármacos usados no controle/tratamento dos insetos e patógeno respectivamente (HORTA et al., 2011).

O Brasil possui clima tropical na maior parte do seu território, com diversidade de fauna e flora adequadas para proliferação de doenças causadas por artrópodes vetores, entre elas a dengue (FIGUEIREDO, 2003; HOANG et al., 2010). Outro fator que colabora, com a incidência de casos de dengue no Brasil é a maior parte de sua população vivendo em áreas urbanas infestadas por *Aedes aegypti*, que se colonizam rapidamente (GIL; BENÍTEZ; GUTIÉRREZ, 2010) tornando estes, em centros endêmicos (FIGUEIREDO, 2003). A combinação de tais aspectos, clima e o acúmulo de água nos mais diversos tipos de recipientes encontrados no ambiente antrópico, são excelentes criadouros para tal espécie vetora e favorecem a sua proliferação (SILVA; SILVA, 2000; TAUIL, 2006).

Na atualidade *A. aegypti*, é altamente dependente dos recipientes manufaturados pelo homem (VIDAL, 2010), é o mosquito vetor da febre amarela e o vírus da dengue (FIGUEIREDO, 2003), doenças transmitidas através da picada do mosquito (LIMA, 1985). A transmissão da doença ocorre, pela necessidade das fêmeas de *A. aegypti* realizarem o repasto sanguíneo para a maturação dos ovos, com isso as contaminadas com o vírus da dengue transmitem a doença aos seres humanos (BARATA et al., 2001).

É possível que *A. aegypti* tenha sido introduzido no Brasil, no século XVI, através do comércio de escravos trazidos da África (FIGUEIREDO, 2003) durante a colonização (SILVA; SILVA, 2000). Segundo Lima (1985), em março de 1982 houve o primeiro registro de *A. aegypti* na cidade de Boa Vista estado de Roraima, com procedência das Guianas. No mesmo ano foi registrado no município de Caracaraí, e em agosto de 1983 no município de Pacaraima com a procedência da Venezuela. No entanto, Osanai et al. (1983), relata presumivelmente que em maio de 1982, 7.000 pessoas tenham tido a doença desde Setembro de 1981 e Rosa et al. (1998), também afirmam que desde 1981 casos de doença febril tem

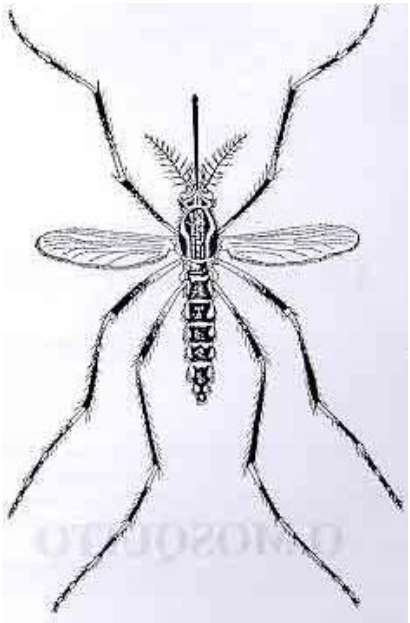
sido notificados em Boa Vista, e foram posteriormente confirmados como dengue.

A proximidade com países endêmicos (Venezuela e Guiana) e condições adequadas (clima) para o desenvolvimento do vetor, fazem de Boa Vista-RR um ponto estratégico para vigilância da dengue no Brasil (CODEÇO et al., 2009).

1.5.1 *Aedes aegypti* Linnaeus

O mosquito vetor pertence à família Culicidae. Existem cerca de 3.500 espécies importantes pertencentes a esta família, por estarem associados na transmissão de patógenos ao homem (VIDAL, 2010). São insetos que apresentam metamorfose completa (holometábolos), com duas fases no seu ciclo de vida, aquática e terrestre (VIDAL, 2010). Grande parte deposita ovos diretamente na água isolados ou aglutinados. *A. aegypti* (figura 5) enquadra-se entre as espécies que depositam ovos nas paredes de pequenos recipientes com acúmulo de água, relativamente limpa ou parada (NATAL, 2002).

Figura 5 – *Aedes aegypti* Linnaeus na fase adulta



Fonte: Taveira; Fontes; Natal (2001).

O ciclo biológico do inseto sofre variação de acordo com a temperatura e a disponibilidade de alimento, em condições ideais (temperatura ideal 27 ºC e alimentação

adequada) esse período se completa em 9 a 13 dias. O inseto adulto possui as seguintes características morfológicas: inseto preto com listras e manchas brancas de hábito diurno (TAVEIRA; FONTES; NATAL, 2001).

1.5.2 Controle de *Aedes aegypti*

A erradicação de *A. aegypti* esta associada às ações de combate as doenças transmitidas por vetores aos seres humanos (LIMA, 1985; SAKTHIVADIVEL; DANIEL, 2008). Segundo Fang (2010), umas das campanhas que se obteve sucesso, contra *A. aegypti*, foi realizada no início do ano de 1900.

No Brasil as campanhas para erradicação do *A. aegypti*, foram iniciadas por Oswaldo Cruz em 1904 com o objetivo de combater a febre amarela (FIGUEIREDO, 2003). A principal forma de controle das doenças ocasionadas por vetores, é com erradicação dos artrópodes causadores (SRISAWAT et al., 2010), principalmente em seu estágio larval (BRAGA; VALLE, 2007; FIGUEIREDO, 2003).

Apesar da alternativa de compostos vegetais, o controle de *A. aegypti* ainda depende basicamente da utilização de pesticidas sintéticos, acarretando na resistência dos insetos, necessitando de uma maior dosagem a cada aplicação dos produtos (MENDONÇA et al., 2005). Com o surgimento de formas resistentes, um obstáculo ao controle de insetos (SIMAS et al., 2004), aos inseticidas convencionais utilizados (organofosforados e piretróides), tem crescido a procura por inseticidas de origem vegetal, como opção econômica viável e ecológica, efetivas no combate ao mosquito adulto e/ou larvas de *A. aegypti* (QUADROS; TADEI; NONUMURA, 2010).

Estudo de Dua et al. (2009), mostra que extratos de nim (*A. indica* A. Juss), enfraquecem o sistema de defesa cuticular das larvas dos insetos, causando à paralisação do desenvolvimento. Em estudo de Caser et al. (2007), na avaliação de extrato de folhas do nim contra larvas de *A. aegypti* Linnaeus, foi observado mortalidade das larvas após 48 horas, já em estudo realizado por Maheswaran; Ignacimuthu (2012), com produto comercial Ponneem (composto de *A. indica* e *Pongamia glabra*.) observou-se, 100% de mortalidade das larvas de *A. aegypti* após 24 horas, assim como o estudo de George; Vincent (2005) com extratos de nim contra larvas de *A. aegypti* e outras duas espécies de mosquitos vetores *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 e *Anopheles stephensi* Liston 1901.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho estudou a atividade biológica de extratos e frações vegetais, seguindo os objetivos a seguir:

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a atividade antimalárica e inseticida de *Azadirachta indica* A. Juss introduzida no município de Boa Vista, RR.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar a atividade antimalárica e inseticida de extratos das partes de *A. indica* (raízes, cascas do caule, ramos, folhas e frutos) contra larvas e fêmeas adultas de *Aedes aegypti* Linnaeus e o protozoário causador da malária humana *Plasmodium falciparum* Marchiafava e Celli;

Determinar a Concentração Letal Mediana (CL_{50}) dos extratos contra larvas de *Ae. aegypti*;

Verificar a atividade de frações dos extratos da espécie *A. indica* contra larvas *Ae. aegypti*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

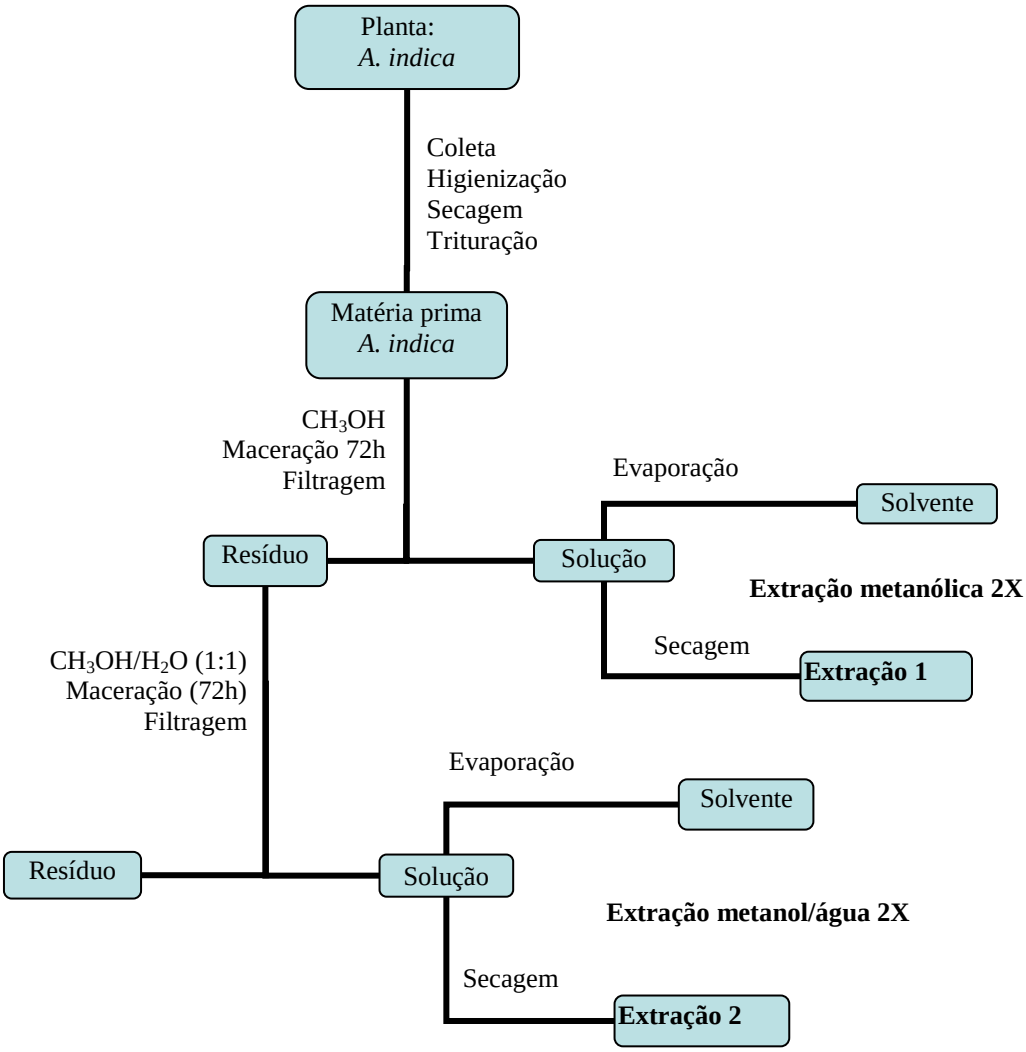
Na realização da pesquisa foram desenvolvidas atividades nos Laboratórios de: Biotecnologia e Química Fina da Universidade Federal de Roraima (UFRR), em Boa Vista-RR; Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e Dengue, Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde do INPA-AM, e Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia – LAPAAM, e Laboratório de cultivo de *P. falciparum* e testes de atividade antiplasmodial da Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD/INPA.

Foram utilizados materiais e equipamentos de acordo com as atividades desenvolvidas, como: GPS para localização georreferenciada do local de coleta da planta *A. indica*; máquina fotográfica digital (sony, WX100); recipientes (sacos de fibra, sacos de papel, sacos plásticos), para acondicionamento adequado das partes coletadas (cascas do caule, ramos, folhas, frutos e raízes); estufa com circulação e renovação de ar (modelo UltraCleaner, 1400A–UNIQUE); moinho de facas (Tipo Willye), para á trituração das porções coletadas; evaporador rotativo (modelo Fisatom), para concentração dos extratos; capela com exaustor; dessecador (com vacuômetro, modelo Nalgom); balança de precisão (modelo UltraCleaner, 1400A – UNIQUE) e frascos, solventes (acetato de etila, água destilada, clorofórmio, hexano, metanol e n-butanol), funil de separação de 250 mL e frascos âmbar de 5 mL e 1 L, ultrassom (modelo UNIQUE), micropipeta automática de 1000 µL, tubos tipo Eppendorf de 2 mL, copos descartáveis de 50 mL, solvente (DMSO), espátulas, papel toalha e álcool etílico, fêmeas adultas de *A. aegypti*, coletores manuais (sugador), garrafas de vidro de 250 mL e copos plásticos de 500 mL, durante as realizações dos bioensaios; micropipeta automática de 100 µL; cepa multi-resistente K1 de *P. falciparum*, MR4 (adquirida de Malaria Research and Reference Reagent Resource Center, localizado em Manassas, Virgínia, EUA); estufa incubadora (tipo B.O.D) e microplaca (com 96 poços, fundo chato); câmara de fluxo laminar (Isocide).

3.1 COLETA

Durante as etapas de coleta (realizada no dia 22 de março de 2012, as 6:30) e prospecção dos extratos, as atividades foram executados de acordo com o fluxograma da figura 6.

Figura 6 – Fluxograma de execução dos processos de prospecção dos extratos metanólicos e metanol/água de *Azadirachta indica*

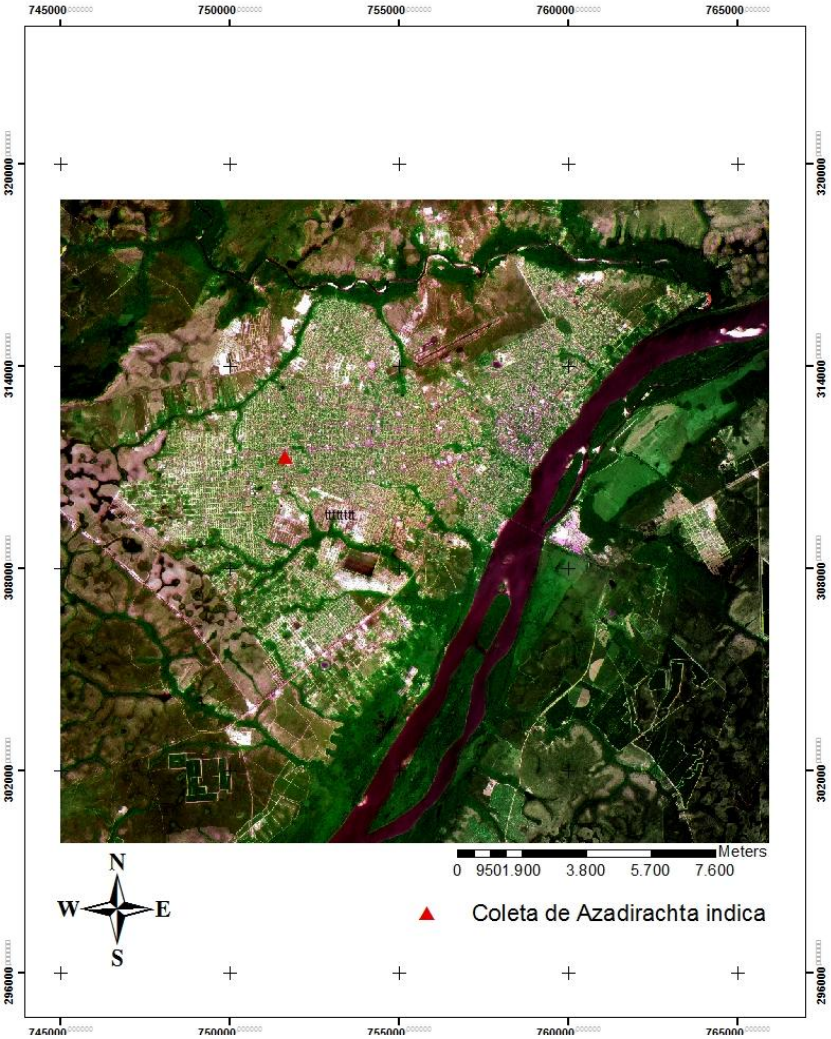


As partes de *A. indica* (raízes, cascas, ramos, folhas e frutos) foram coletadas no município de Boa Vista, RR (02° 51’ 24,4’’ N 60° 39’ 37,1’’ W) no campus-sede da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária de Roraima – Embrapa – RR (02° 49’ 56.2’’ N 60° 41’ 44.2’’ W), localizado no bairro Distrito Industrial, zona Sul da cidade de Boa Vista de acordo com o mapa da figura 7.

Foram confeccionadas quatro exsicatas (figura 8) da espécie coletada, das quais duas foram enviadas para o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA/AM, que foram avaliadas por responsáveis pelo Herbário do Instituto Dr. Carlos H. Franciscon e Dr. Mike Hopkins, e tombadas com números 249.479 e 249.480.

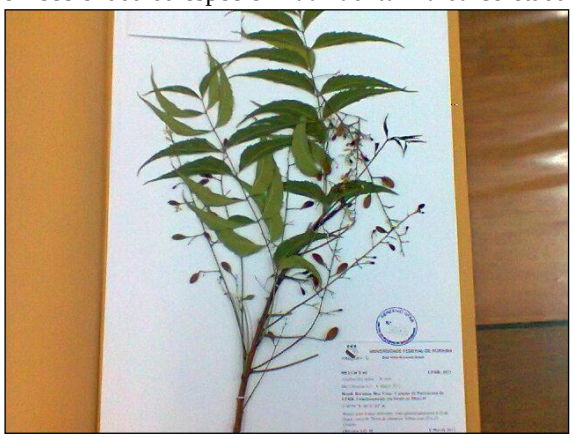
As exsicatas foram confeccionadas de acordo com os padrões utilizados pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA e da Universidade Federal de Roraima - UFRR, outras duas foram depositadas no Herbário da UFRR, com números 3033 e 3036.

Figura 7 – Mapa com ponto de coleta da espécie *Azadirachta indica*, localizado no bairro Distrito Industrial, campus sede da EMBRAPA, no município de Boa Vista-RR



Fonte: extraído/editado do Arcgis (2013).

Figura 8 – Exsicata confeccionada da espécie *Azadirachta indica* coletada



3.1.1 Procedimentos Laboratoriais

No laboratório de Biotecnologia e Química Fina da Universidade Federal de Roraima, as partes coletadas de *A. indica*: raízes, cascas do tronco, ramos, folhas e frutos, foram higienizadas e armazenadas separadamente em estufa, como se segue:

Folhas: foram retiradas dos ramos e colocadas em estufa a 60°C para desidratação. As folhas pesaram 557 g, na estufa foram reviradas constantemente para a secagem uniforme, pesando depois de desidratadas 248 g;

Ramos: os ramos de onde foram retiradas as folhas foram descascados e armazenados, separadamente o caule das cascas na estufa a 60ºC. As cascas pesaram 358 g e os caules 552 g de materiais coletados;

Frutos: foram coletados um total de 196 g de frutos que depois de lavados, foram secos em estufa a 60°C e posteriormente à desidratação pesaram 134 g;

Cascas do caule**:** as cascas foram lavadas com escova, para retirada de sujeiras. Um total de 1.842 g foram coletadas e secas em estufa a 60 °C. Após, desidratação pesaram 998 g;

Raízes: empregaram-se os mesmos passos da lavagem das cascas do caule nas raízes, posteriormente as raízes foram descascadas e armazenadas separadamente do caule na estufa a 60ºC. As cascas pesaram 1.074 g e os caules 678 g;

Tabela 3 – Descrição e quantificação das partes coletadas de *Azadirachta indica*

Partes Coletadas	Massa Verde (g)	Massa Seca (g)	Massa Perdida na secagem (%)	Massa Triturada (g)
Frutos	196,0	134,0	32,00	126,0
Folhas	1.265	579,0	54,00	534,0
Cascas dos Ramos	358,0	144,0	60,00	150,0
Cascas do Caule	1.842	998,0	46,00	626,0
Cascas das Raízes	1.074	354,0	67,00	372,0
Caule das Raízes	678,0	360,0	47,00	332,0
Caule dos Ramos	552,0	328,0	41,00	318,0

Depois de secas, as partes foram trituradas em moinho de facas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Roraima – CCA/UFRR. Na tabela 3, podemos ver as massas das partes coletadas, com seus respectivos pesos posterior a cada etapa do processamento.

3.1.2 Extração Metanólica

Empregou-se a metodologia utilizada por Chianese et al., (2010) e Siddiqui et al. (2002), com modificações. As porções trituradas de *A. indica* (frutos, folhas, cascas dos ramos, cascas das raízes, cascas do caule, caules das raízes e caules dos ramos), foram acondicionadas juntamente com solvente (metanol) em frascos de vidro de 590 mL em seguida envolvidos com papel alumínio, extração por maceração 72 h.

Foram adicionados 350 mL de metanol em cada recipiente contendo as partes trituradas: 80 g de frutos, 50 g folhas, 40 g de cascas dos ramos, 50 g de cascas do caule, 50 g de cascas das raízes, 40 g de caule das raízes e 40 g de caule dos ramos. Nos dois dias consecutivos, as soluções foram homogeneizadas.

No terceiro dia realizaram-se as filtragens. As soluções foram secas com sulfato de sódio depois da primeira filtragem. Posteriormente, foram filtradas novamente e levadas para evaporador rotativo (rotação de 100 rpm; temperatura do banho 30 ºC) e o solvente removido a pressão reduzida, as porções finais foram armazenadas em frascos âmbar de 10 mL.

Os frascos com as soluções concentradas foram deixadas em chapa de aquecimento dentro da capela com exaustor a 30 ºC, depois de alguns dias os extratos foram submetidos à bomba de vácuo para retirada do resíduo de solvente. Após concentração, os frascos com extratos foram levados para o dessecador a vácuo com pressão de -700 mmHg, onde ficaram por algumas semanas. Cada frasco foi pesado separadamente.

Os processos descritos anteriormente foram repetidos novamente (duas extrações com o solvente), utilizando os mesmos materiais e equipamentos e o rendimento dos extratos obtidos está apresentado na tabela 4.

Tabela 4 – Massas e rendimentos dos extratos metanólicos de *Azadirachta indica*

Partes Coletadas	Matéria Prima (g)	Rendimento (g)	Rendimento (%)
Frutos	80	10,56	13
Folhas	50	6,12	12
Cascas dos Ramos	40	3,61	9
Cascas do Caule	50	3,88	8
Cascas das Raízes	50	4,56	9
Caule das Raízes	40	1,08	3
Caule dos Ramos	40	1,10	3

3.1.3 Extração Metanol/Água

Na extração metanol/água (1:1) foram adicionados nos frascos contendo os resíduos das partes da planta *A. indica*, já extraídos com metanol (80 g de frutos, 50 g folhas, 40 g de cascas dos ramos, 50 g de cascas do caule, 50 g de cascas das raízes, 40 g de caule das raízes e 40 g de caule dos ramos), 150 mL de metanol e 150 mL de água destilada deixados em repouso por três dias, assim como as extrações metanólicas anteriores. No processo de filtração, o filtrado foi adicionado em frascos erlenmeyer, sem secagem com sulfato de sódio e levadas para evaporador rotativo sob vácuo (rotação de 100 rpm; temperatura do banho 30 ^{o}C).

Depois da retirada do metanol das soluções (metanol/água) no evaporador rotativo, foi iniciado o processo para retirada da água destilada em liofilizador no Núcleo de Pesquisas Energéticas da UFRR. As soluções foram adicionadas em frascos de vidro de 150 ml e postas em freezer, para congelamento, de acordo com necessidades do aparelho (liofilizador).

Os processos na extração metanol/água foram realizados duas vezes, assim como a extração metanólica. Na tabela 5, estão os rendimentos obtidos da extração metanol/água das partes coletadas.

Tabela 5 – Rendimento da extração metanol/água das partes de *Azadirachta indica*

Partes Coletadas	Matéria Prima (g)	Rendimento (g)	Rendimento (%)
Cascas das Raízes	50,00	2,00	4
Cascas do Caule	50,00	1,44	3
Cascas dos Ramos	40,00	1,14	3
Caule das Raízes	40,00	0,47	1
Caule dos Ramos	40,00	0,49	1
Folhas	50,00	2,46	5
Frutos	80,00	3,70	5

Os extratos metanólicos e metanol/água foram armazenados em frascos de 10 mL e estocados em geladeira até a realização dos Bioensaios. Antes das realizações dos bioensaios e testes *in vitro* foram atribuídos códigos nas amostras para facilitar a organização e evitar observações tendenciosas, os significados estão descritos nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6 - Descrição dos extratos metanólicos de *Azadirachta indica*

Códigos	Partes da planta
EMCR2	Casca dos Ramos
EMF	Folhas
EMCC	Casca do Caule
EMF1	Frutos
EMCR	Caule dos Ramos
EMCR3	Casca da Raiz
EMCR1	Caule da Raiz

Tabela 7 - Descrição dos extratos metanol/água de *Azadirachta indica* a

Código	Parte da planta
EACR2	Casca da Raiz
EAF	Folhas
EACC	Casca do Caule
EAF1	Frutos
EACR	Caule dos Ramos
EACR3	Caule da Raiz
EACR1	Casca dos Ramos

3.2 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS

Os extratos metanólico e metanol/água obtidos das folhas da espécie *A. indica* (códigos EMF e EAF) ativos no screening contra *P. falciparum* (cepa K1 multi-resistente) em ensaios *in vitro*, foram submetidos à partição líquido-líquido com solventes orgânicos destilados, em ordem crescente de polaridade, descritos nas tabelas 8 e 9, estão os valores dos extratos trabalhados durante o processo. .

Tabela 8 - Descrição dos solventes orgânicos utilizados no processo de fracionamento das amostras EMF e EAF por partição liquido-liquido

Solvente (Fórmula molecular)	Volume (mL)	Densidade (g/mL)
Hexano (C_6H_{14})	3 × 30	0,655
Clorofórmio ($CHCl_3$)	3 × 30	1,498
Acetato de Etila ($CH_3COOCH_2CH_3$)	3 × 30	0,897
n-Butanol ($CH_3(CH_2)_2CH_2OH$)	3 × 30	0,810
Metanol (CH_3OH)	3 × 30	0,791

Tabela 9 - Valores das amostras trabalhadas no fracionamento

Amostra Código	Massa do Extrato (g)
EMF	3,9195
EAF	4,1059

3.2.1 Extrato Metanólico

Os processos de fracionamento da amostra (EMF) ocorreram de acordo com o fluxograma exposto na figura 9.

Foram solubilizados 3,9195 g da amostra EMF em 80 mL de solução (metanol:água destilada 7:1) em ultrassom sob moderado aquecimento (±40 ºC), depois da solução formada a mesma foi transferida para funil de separação de 250 mL.

A esta solução foram acrescentados (3×) 30 mL de hexano com posterior agitação do funil para mistura das fases. Nas três extrações a mistura foi deixada em repouso para separação e a fase hexânica foi recolhida em um erlenmeyer.

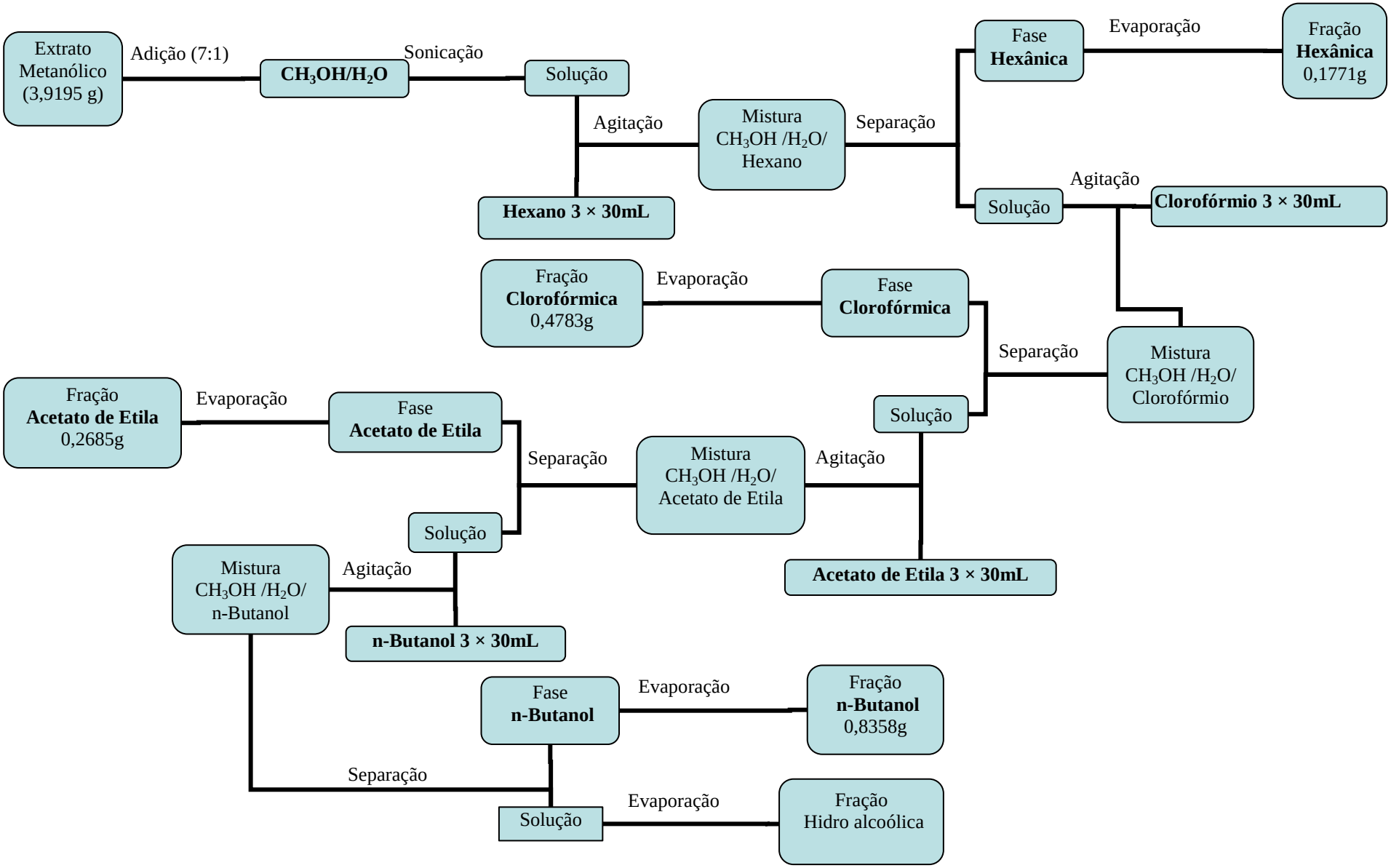
Na extração com clorofórmio, adicionou-se (3×) 30 mL no funil de separação contendo a solução, onde posterior agitação não houve formação das fases. Necessitou-se da adição de mais água destilada, onde foi separada em outro erlenmeyer a fração clorofórmica.

Depois da fase clorofórmica extraída, foi adicionado acetato de etila (3×) 30 mL ao funil contendo a solução. A fração acetato de etila foi separada em frasco erlenmeyer e armazenamento em geladeira até a concentração em evaporador rotativo.

Finalmente na adição do n-butanol (3×) 30 mL no funil de separação com a solução e posterior agitação, inicialmente não ocorreu à formação de fases procedendo-se com adição de solução salina (água destilada com cloreto de sódio) para ocorrer separação da fase n-butanol em frasco erlenmeyer. No funil de separação ficou a fase metanol/água, que também foi transferida para um erlenmeyer até concentração em evaporador rotativo.

As frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila, antes de concentradas em evaporador rotativo, foram secas com sulfato de sódio e filtradas. A fração hidro alcoólica da amostra EMF, depois de seca, foi diluída (3 mL de H_2O) novamente e submetida à nova extração com metanol (3x30 mL), resultando na fração metanólica.

Figura 9 - Fluxograma dos processos de fracionamento do extrato metanólico das folhas (EMF) de *Azadirachta indica* com respectivos rendimentos



3.2.2 Extrato Metanol/Água

Os procedimentos de fracionamento realizados com a amostra EAF foram semelhantes ao desenvolvidos com a EMF. Foram dissolvidos 4,1059 g da amostra em 30 mL de solução metanol: água destilada (2:1) em ultrassom, esta solução formada foi depositada em funil de separação de 250 mL. Nas tabelas 10 e 11, podemos observar as massas das frações obtidas e os códigos que foram atribuídos às mesmas.

Tabela 10 – Frações obtidas da amostra EMF com respectivos códigos atribuídos e rendimentos

Fração	Código	Massa da Fração (g)
Hexânica	MFA	0,1771
Clorofórmica	MFC	0,4783
Acetato de etila	MFH	0,2685
n-Butanol	MFS	0,8358
Metanólica	MFM	0,9395
Hidro alcoólica	MFF	0,2890

Tabela 11 – Frações obtidas da amostra EAF com respectivos códigos atribuídos e rendimentos

Fração	Código	Massa da Fração (g)
Hexânica	AFH	0,1502
Clorofórmica	AFC	0,1848
Acetato de etila	AFA	0,2474
n-Butanol	AFS	0,3960
Hidro alcoólica	AFNB	2,0342

As frações obtidas foram reavaliadas (sub-tópicos 3.3.2 e 3.4) para observar as atividades contra *A. aegypti* e in vitro contra *P. falciparum*.

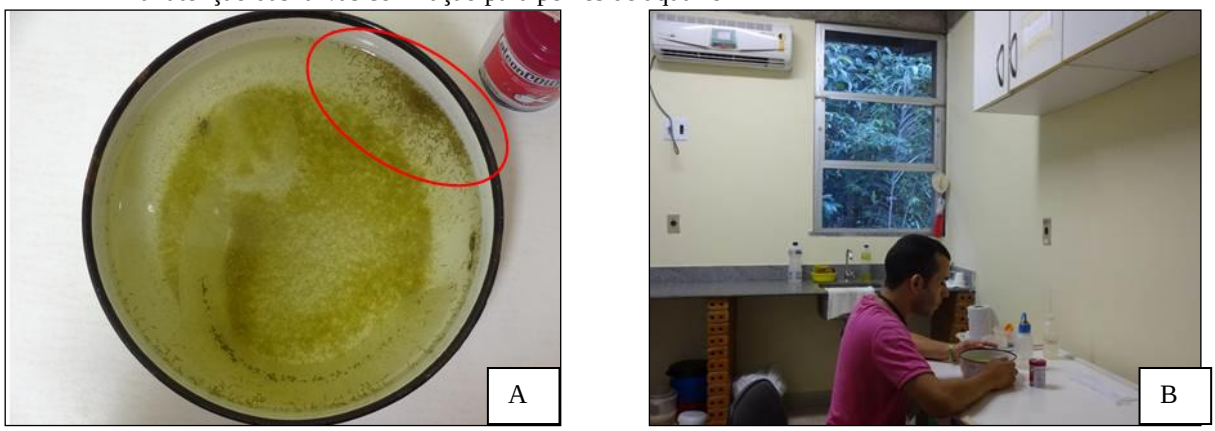
3.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Os extratos e frações obtidos nos processos descritos anteriormente, foram submetidos a sucessivas avaliações contra *A. aegypti* e *P. falciparum*.

3.3.1 Bioensaios Contra *Aedes aegypti*

As criações de *A. aegypti* Linnaeus para bioensaios (larvicida e adulticida), foram estabelecidas conforme a metodologia descrita por Silva; Silva; Lira, (1998). Os ovos de *A. aegypti* foram adquiridos de criações do Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e Dengue, Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde (CSAS) do INPA em Manaus, na incubação utilizou-se: recipientes esmaltados de 18,5 cm de diâmetros por 6 cm de altura (figura 10 – A), água destilada e ração para peixes de aquário. Os ovos foram mantidos nos recipientes com H_2O pura e ração a 27 °C, ao fotoperíodo de 12 horas (figura 10 – B).

Figura 10 – A – Recipientes utilizados para incubação dos ovos de *Aedes aegypti* (larvas no círculo); B – Manutenção das larvas com ração para peixes de aquário



3.3.2 Bioensaios Larvicida Contra *Aedes aegypti*

A atividade larvicida foi avaliada contra *A. aegypti* (larvas de terceiro estádio) de acordo com método descrito por Pohlit et al. (2004). Foi estabelecida a utilização do DMSO a

1 %, de acordo com a verificação da tolerância ao DMSO de 0–5 % pelas larvas de *A. aegypti*, antes dos bioensaios. Como mostra a tabela 12.

Tabela 12 – Resultados do bioensaio teste para estabelecer a tolerância das larvas de *Aedes aegypti* a diferentes porcentagens de DMSO

% de DMSO	% de mortalidade		
	24 h	48 h	72 h
1	0	0	0
2	3	7	20
3	3	27	33
4	17	100	100
5	97	100	100

*Foram realizados os testes em triplicata, utilizando 10 larvas, por copo;

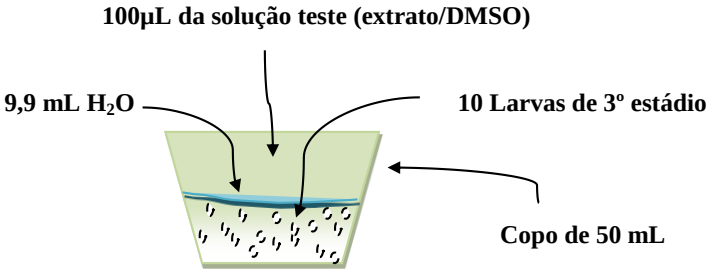
Os extratos e frações foram submetidos a bioensaios iniciais (500 µg/mL no final dos bioensaios), foram retirados 34,5 mg das amostras em balança analítica, depositava-se em tubos tipo eppendorfs, em seguida aplicou-se 690 µL de DMSO. Os bioensaios com concentração final de 500 µg/mL, foi executado de acordo com o padrão adotada pelo grupo de pesquisa do LAPAAM-INPA. Nos bioensaios finais com extratos (concentração final de 5000 µg/mL), foram retirados das amostras 160 mg e adicionadas em eppendorf com 320 µL de solvente. Não foi possível a realização de novos testes com as frações por falta de material.

Os eppendorfs foram levados para banho de ultrassom sob moderada sonicação para dissolução. Após dissolução, foram deixados em freezer até a realização dos bioensaios. Para os testes foram retirados 100 µL das soluções, com pipeta automática e aplicados nos copos de 50 mL, contendo 9,9 mL de H_2O pura, 10 larvas de *A. aegypti* de terceiro estádio e um pouco de alimento (figura 11), tendo atenção com a homogeneização no final o que gerou a concentração de 5000 µg/mL. Foram exatamente depositados 9,6 mL de H_2O nos copos, considerou-se a água adicionada no momento das transferências com volume de 300 µL, totalizando 9,9 mL de H_2O no copo, que somando com os 100 µL das soluções testes aplicados resultou no volume final de 10 mL.

As amostras que mostraram > 50 % de morte das larvas de *A. aegypti* com 24 h de exposição aos extratos, foram submetidas a testes em diluições. Foram retirados em

eppendorfs: 80, 40, 20 e 10 mg de extratos e dissolvidos em 320 µL de DMSO, cada. O que formou as concentrações de 250, 125, 62,5 e 31,25 mg/mL nos eppendorfs, desta maneira economizamos materiais e amostras.

Figura 11 – Instalação dos bioensaios larvicidas em copos de 50 mL, com 10 larvas de *Aedes aegypti*, 9,9 mL de H_2O pura e 100 µL das soluções teste



3.3.2 Bioensaios Contra Fêmeas Adultas de *Aedes aegypti*

Nos bioensaios contra fêmeas adultas de *A. aegypti* utilizaram-se gaiolas de 32 × 35 × 35 cm (figura 12 – A e B) de acordo com a metodologia de Silva; Silva; Lira, (1998), com disponibilidade de alimento (algodão embebido com solução açucarada a 10%), onde as larvas excedentes nos bioensaios larvicidas atingiram seu estágio adulto, até a realização dos bioensaios adulticidas, estabelecidos conforme a metodologia adotada pelo Ministério da Saúde de original Brogdon; McAllister (1998).

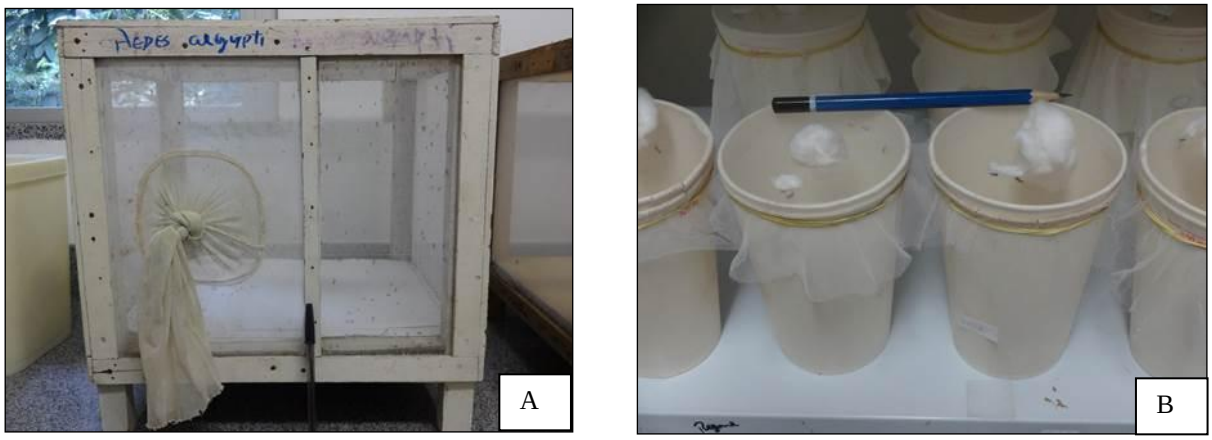
Foram pesadas amostras de 1 mg em balança analítica e aplicadas em frascos de 5 mL. Em seguida, aplicaram-se 2 mL de metanol. Anteriormente, tentou-se dissolver as amostras em acetona, porem as amostras não dissolveram nesse solvente, motivo pela utilização do metanol nesse ensaio.

Das soluções formadas, foi aplicado 1 mL de cada solução em uma garrafa (isso corresponde a transferência de uma massa de 500 µg de extrato por garrafa), realizando a impregnação interna das paredes da garrafa com as soluções (extrato/solvente). Posteriormente, as garrafas foram deixadas em capela com exaustor por 24 h para evaporação do solvente.

Observada a evaporação total do solvente das garrafas, foram colocadas 15 fêmeas adultas de *A. aegypti*, com auxilio do sugador e copos de 500 mL (figura 13 – A). Retiravam-

se os mosquitos das gaiolas com sugador, colocava-os nos copos e levava-os ate as garrafas e realizavam-se as transferências dos mosquitos para dentro das garrafas tratadas (figura 13 – B). A partir desse momento, eram feitas leituras de 15 em 15 minutos até completar os 90 minutos para avaliação da atividade adulticida.

Figura 12 – A – Gaiolas utilizadas para manutenção dos mosquitos adultos de *Aedes aegypti*; B – Copos usados para transferências dos mosquitos das gaiolas para as garrafas tratadas



A quantidade de cada extrato aplicada em cada garrafa foi de 500 µg. As garrafas possuíam uma área interna de aproximadamente 150,7 cm^2, portanto a densidade por unidade de área foi de 3,33 $\mu g/cm^2$**.** Os testes foram realizados em triplicata. Na figura 14, podemos observar o esquema de como se procederam os processos descritos anteriormente.

Figura 13 – A – Transferência dos mosquitos das gaiolas para as garrafas; B – Garrafas tratadas em observação com fêmeas adultas de *Aedes aegypti*.

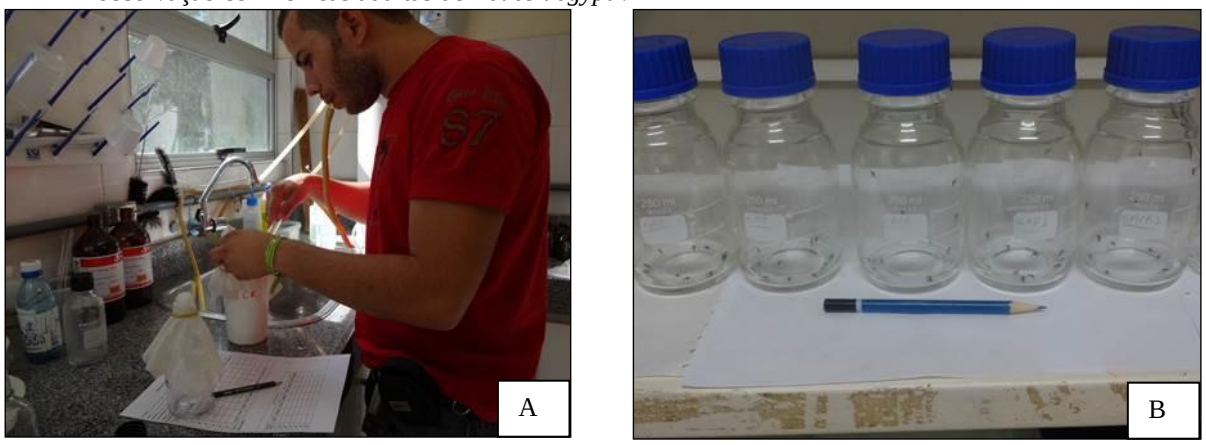
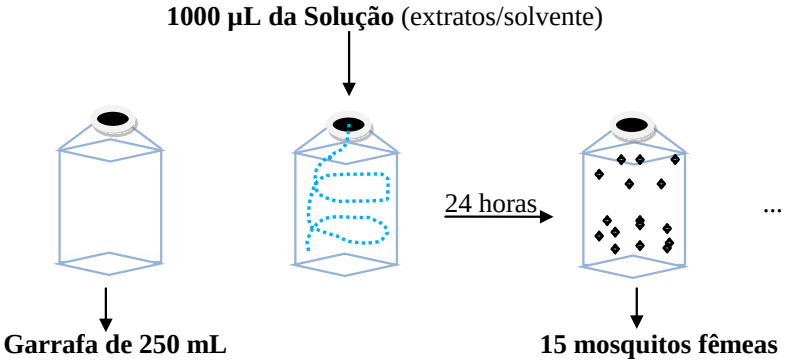


Figura 14 – Esquema da aplicação das soluções testes nas garrafas de 250 mL



3.4 ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA *IN VITRO*

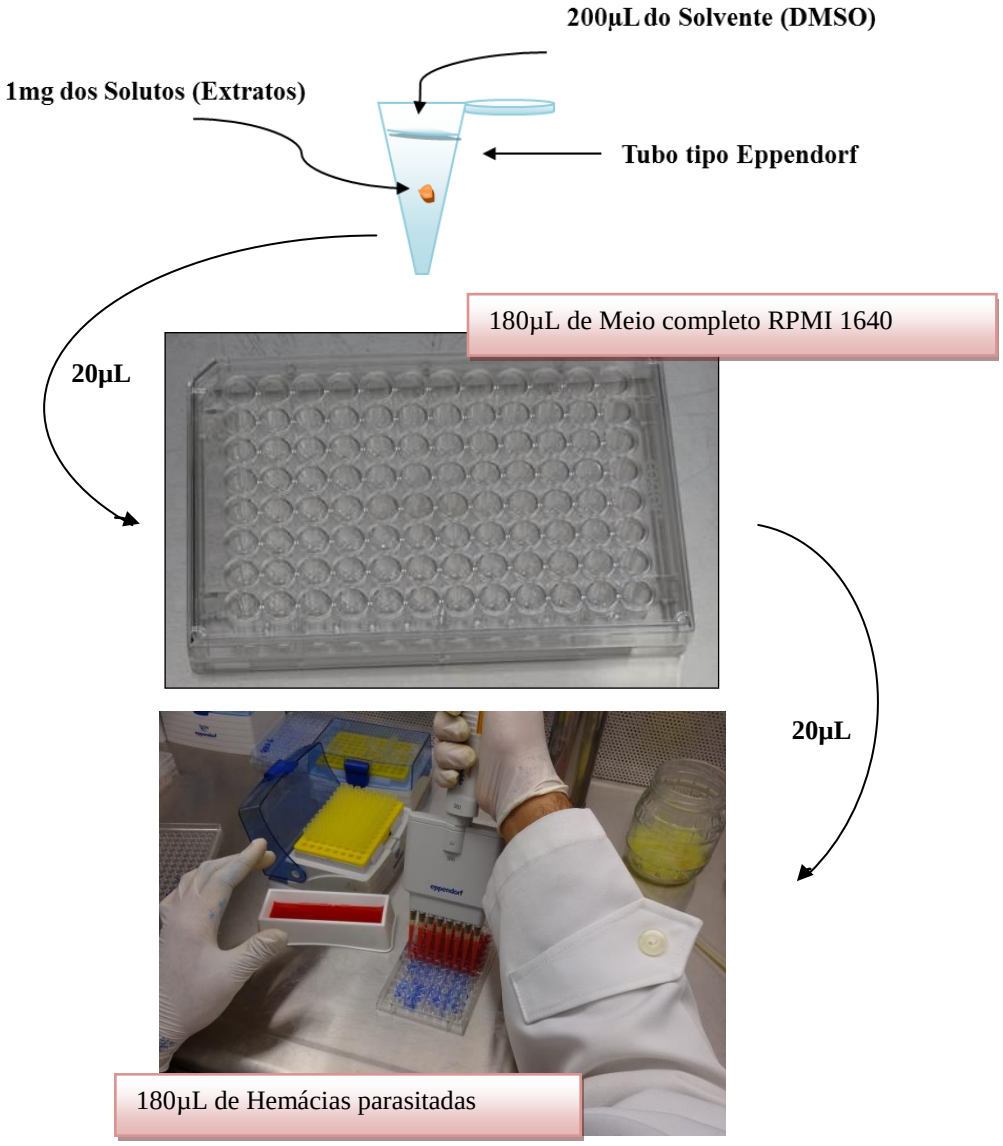
Para os testes antiplasmódicos com extratos e frações de *A. indica* e controles (cloroquina e DMSO a 1%) foi utilizado cepa K1 (MR4) de *P. falciparum*. Os parasitas foram mantidos em eritrócitos humanos A+ utilizando meio RPMI suplementado com 10 % de soro humano em cultivo contínuo segundo o método de Trager; Jensen (1976).

Na realização do screening, prepararam-se soluções estoques a 5 mg/mL dos extratos e frações, posteriormente foram diluídas (1:10) em meio completo RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) a 10 % (figura 15)

A atividade antiplasmódica dos extratos e frações foi estabelecida pela percentagem de inibição do crescimento de *P. falciparum*, como descrito por Andrade-Neto et al. (2007) baseado em fases eritrocitárias do ciclo de vida do parasita. 20 µL das soluções diluídas foram aplicadas em microplaca contendo 180 µL de hemácias parasitadas (1 a 2 % de parasitemia) para obtenção das concentrações testes (50 e 5 µg/mL) e esta incubada a 3 % - O_2 (oxigênio), 5 % - CO_2 (gás carbônico), 92 % - N_2 (nitrogênio) e colocada em estufa 37 °C por 48 h.

Os testes foram realizados em triplicata e comparados com os controles. Nos testes seguintes para estabelecer CI_{50} das amostras ativas, foram realizados testes com 7 concentrações (100-0,0001 µg/mL).

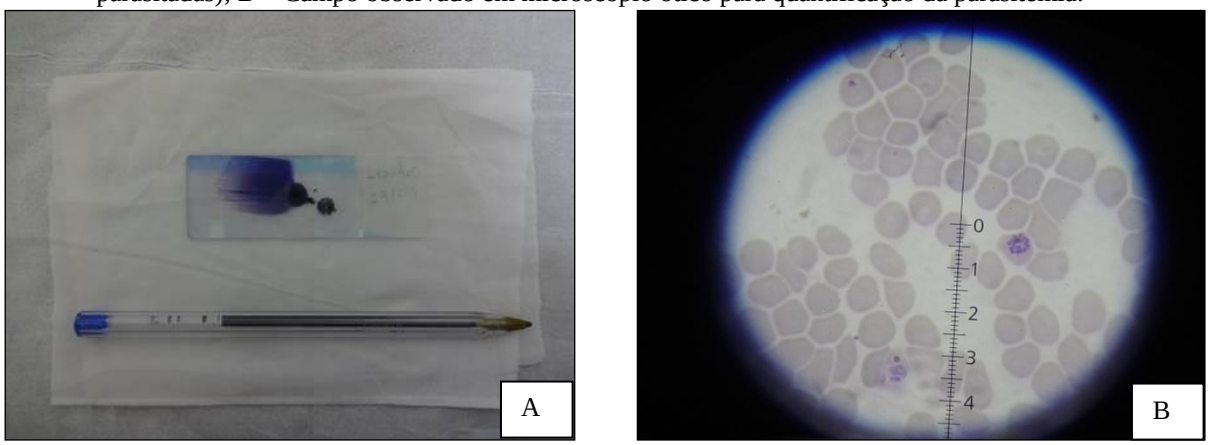
Figura 15 – Esquema de preparação das soluções a 5mg/mL e aplicação na microplaca de 96 poços com parasitas para realização dos testes *in vitro*



Após a incubação, o conteúdo dos poços foi observado em lâminas utilizando-se microscopia ótica (figura 16 – A e B). Foram preparadas 64 lâminas somando 256 esfregaços. A inibição do crescimento dos parasitos foi determinada pela comparação com os controles de crescimento sem amostra, segundo a fórmula abaixo:

$$\% \text{ inibição} = \left(\frac{\text{parasitemia do controle} - \text{parasitemia com amostra}}{\text{parasitemia do controle}} \right) \times 100$$

Figura 16 – A – Lâminas de microscopia com esfregaços corados (soluções testes com hemácias parasitadas); B – Campo observado em microscópio ótico para quantificação da parasitemia.



3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os testes foram realizados em triplicata com leituras após 24, 48 e 72 h de instalação. Os resultados da $Cl_{50,}$ foram estabelecidos dentro das 48 h em comparação com os controles sem tratamento (DMSO <1% e H_2O) estimados por análise de Probit utilizando o software Microsoft Excel®.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos de cada metodologia aplicada nas avaliações estão descritos nos sub-tópicos abaixo.

4.1 RESULTADOS DOS BIOENSAIOS LARVICIDA

Nos bioensaios preliminares realizados com os extratos na concentração final de 500 µg/mL, os extratos metanólicos obtidos dos frutos (EMF1), mostraram maior atividade com 37, 43 e 43 % de mortalidade dentro das 24, 48 e 72 h de avaliação, respectivamente. Diferente do verificado pelo extrato metanol/água da mesma parte da planta (EAF1), que obteve somente de 10 % depois das 72 h de exposição. O extrato metanólico do caule dos ramos (EMCR) mostrou segunda maior atividade de mortalidade com 10, 13 e 33 % dentro das 24, 48 e 72 h de avaliação, assim como os extratos metanol/água das folhas, na mesma concentração. Os demais extratos avaliados na concentração de 500 µg/mL demostraram atividade < 23 % (EACC, EACR, EACR1, EACR2, EMF, EMCR2, EMCR1 e EMCC) nas 72 h de exposição. Nas avaliações das frações com a mesma concentração dos testes preliminares (500 µg/mL) com os extratos, apenas a fração hexânica do extrato metanólico das folhas (MFH), mostrou resultado >50 %, com 83 % depois das 72 h de avalição.

Tais resultados preliminares demostraram que a concentração necessária para haver efeito de 100% na mortalidade das larvas de *A. aegypti* precisaria ser elevada pelo menos 10 vezes. Assim como alguns extratos de espécies (das famílias annonaceae, apocynaceae, meliaceae, e outras) avaliados por Coelho; Paula; Espindola (2009), que não demostraram atividade larvicida relevante contra *A. aegypti*¸ porem outros extratos avaliados na mesma pesquisa estabeleceram após 24 h, CL_{50} de 120,79 µg/mL a 1% de DMSO.

Alouani; Rehimi; Soltani (2009), estabeleceram uma CL_{50} de 0,35 µg/mL e 85,24 % de atividade na concentração mãe de 0,1 µg/mL, em solução estoque de azadiractina (princípio ativo inseticida obtido da *A. indica*), mais ativo que a concentração preliminar dos bioensaios com extratos de *A. indica* introduzida em Boa Vista Roraima.

De acordo com os resultados alcaçados os princípios ativos presentes na espécie estudada desenvolvem melhores resultados empregados isoladamente. Porem, estudos de

Maheswaran; Ignacimuthu (2012), com a formulação de *A. indica* e *Pongamia glabra* (óleo e extrato de nim, nome comercial PONNEEM), contra larvas de *A. aegypti* nas concentrações de 1; 0,5; 0,3 e 0,1 µg/mL estabeleceram 100% mortalidade das larvas em 24 h, superior ao inseticida sintético Temephos. Mostrando que a combinação (sinergismo) de compostos presentes em diferentes vegetais fortalece a ação inseticida.

Os resultados com a concentração de 5000 µg/mL dos extratos metanólicos e metanol/água estão descritos nas tabelas 13 e 14 juntamente com os resultados das concentrações de 2500, 1250, 635 e 312,5 µg/mL dos bioensaios após 24, 48 e 72 h de instalação. Com essa concentração foi possível estabelecer a CL_{50} de algumas amostras, tanto dos extratos metanólicos quanto metanol/água, após as 48 h.

Tabela 13 - Resultados dos bioensaios larvicidas contra *Aedes aegypti* utilizando extratos metanólicos de *Azadirachta indica* em diferentes concentrações e intervalos de tempo, com resultados da CL_{50} e percentual de atividade para cada concentração

Código da Amostra	Concentração Final (µg/mL)	% de Mortalidade			CL_{50} (mg/mL)	CL_{50} (ppm)
		24 h	48 h	72 h		
EMF1	5000	**97**	**100**	**100**	0,6	600
	2500	**100**	**100**	**100**		
	1250	**97**	**100**	**100**		
	625	23	27	27		
	312,5	10	13	13		
EMCR1	5000	30	**100**	**100**	1,5	1500
	2500	23	57	**73**		
	1250	30	40	50		
	625	0	13	27		
EMCR3	5000	**100**	**100**	**100**	1,3	1300
	2500	**83**	**93**	**100**		
	1250	30	47	**70**		
	625	0	3	17		
	312,5	0	0	0		
EMCR2	5000	**100**	**100**	**100**	**1,1**	**1100**

Tabela 13 – Cont.

EMCR2	2500	**90**	**93**	**93**	**1,1**	**1100**
	1250	50	50	**57**		
	625	10	10	10		
	312,5	0	0	0		
EMF	5000	20	33	53	> 5,0	>5000
	2500	13	33	33		
	1250	0	0	0		
	625	7	13	13		
H_2O	-	0	0	0		
DMSO	-	0	0	0		

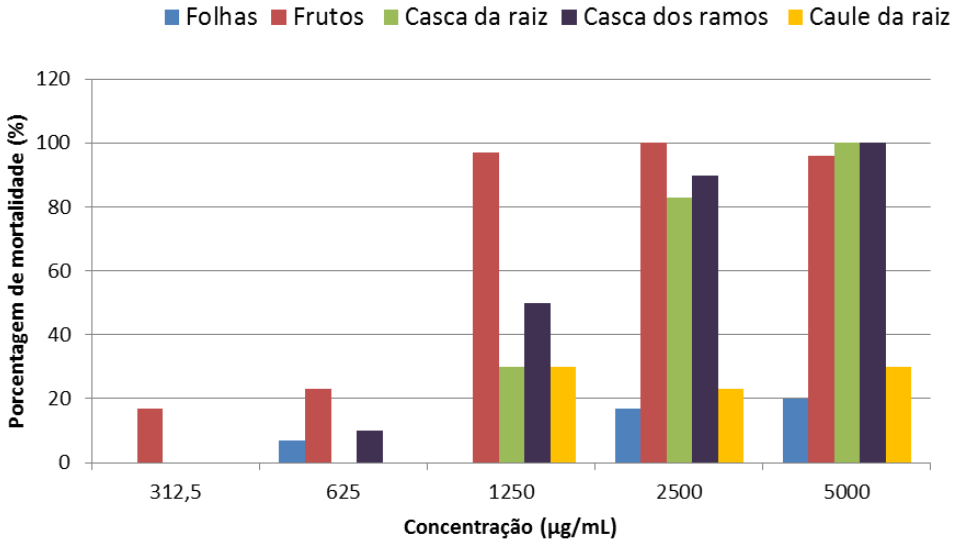
Nos testes foram utilizadas 10 larvas por copo;
Controles: DMSO a 1 %; H_20.

Os melhores resultados alcançados para extratos metanólicos foram com os extratos obtidos dos frutos e casca dos ramos (EMF1 e EMCR2). Que mostraram maiores atividades em menores concentrações como 97 e 50 % após 24 h na concentração final de 1250 µg/mL. Já os extratos obtidos dos frutos e do caule da raiz (EMF1 e EMCR1) mostraram 100 % de atividade dentro das 48 h de avalição. Na figura 17, observamos a mortalidade das larvas de *A. aegypti* relacionada com o aumento da concentração dos extratos.

Os resultados da pesquisa colaboram com os obtidos por Koumaglo et al. (2004), onde avaliou o rendimento dos extratos de diferentes partes da árvore de *A. indica* (casca da raiz, casca do caule, madeira do caule, folhas, frutos e flores), concluiu que o rendimento dos extratos está relacionado com os solventes empregados para extração e que os frutos verdes possuem maior porcentagem de gedunin (figura 2 – C), explicando porque o extrato metanólico dos frutos mostrou maior atividade contra larvas de *A. aegypti*, onde segundo Gurulingappaa et al. (2009), larvas de *A. aegypti* são susceptiveis ao gedunim, pricípio ativo presente em frutos de nim.

Adewole et al. (2013), estudou extratos metanólicos obtidos das folhas de três plantas presentes no estado de Ogun, Nigeria, dentre estas *A. indica*, que teve os extratos avaliados nas concentrações de 2; 5 e 10 mg/mL, demostrou atividade porcentual de 43,3; 50 e 61,6 respectivamente e CL_{50} de 6 mg/mL para os extratos das folhas de nim.

Figura 17 – Gráfico com resultados dos bioensaios larvicidas contra *Aedes aegypti* utilizando extratos metanólicos de *Azadirachta indica* em diferentes concentrações (µg/mL) no período de 24 h



Em trabalho de Nour; Sandanasamy; Nour (2012), extratos de diferentes partes da árvore do nim cultivada na Malásia (casca, folha, raiz e semente) foram preparados com acetona, clorofórmio e etanol. Esses extratos foram testados contra larvas de *A. aegypti* em quatro concentrações (50, 100, 500, e 1000 ppm) com porcentagem de DMSO de 2 % nos bioensaios. Estabeleceu CL_{50} entre 50-837,5 ppm. Os ensaios mostraram que o extrato acetônico das folhas e clorofórmico das raízes foram mais tóxicos contra as larvas e provocaram mortalidades de 100% na concentração de 1000 ppm dentro das 24 h. Os demais extratos avaliados mostraram atividade relevante de 100%, após as 48 h de estudo. Porém vimos que os testes de observação da tolerância das larvas ao DMSO, que na porcentagem de 2 % influência na sobrevivência das larvas, chegando a 20 % de mortalidade com 72 h.

Os extratos metanol/água avaliados mostraram resultados com maior tempo de exposição, assim como os resultados obtidos por Pereira et al. (2009), com extratos de folhas de *A. indica* cultivada no município de São José de Espinharas (PE) os extratos não mataram instantaneamente as larvas, mais as impede de continuarem se alimentando, interferindo no seu desenvolvimento demonstrando ser um regulador de crescimento de insetos.

O extrato das cascas dos ramos (EACR1) chegou a 97 % de mortalidade nas larvas de *A. aegypti* após 24 h com concentração de 5000 µg/mL, maior resultado dentre as amostras avaliadas. Com base nos resultado da concentração de 5000 µg/mL as amostras EAF1, EACR2 e EACR1, foram avaliadas em diferentes concentrações como mostra o gráfico da figura 18.

Tabela 14 – Resultados dos bioensaios larvicidas contra *Aedes aegypti* utilizando extratos metanol/água de *Azadirachta indica* em diferentes concentrações e intervalos de tempo, com resultados da CL_{50} e percentual de atividade para cada concentração

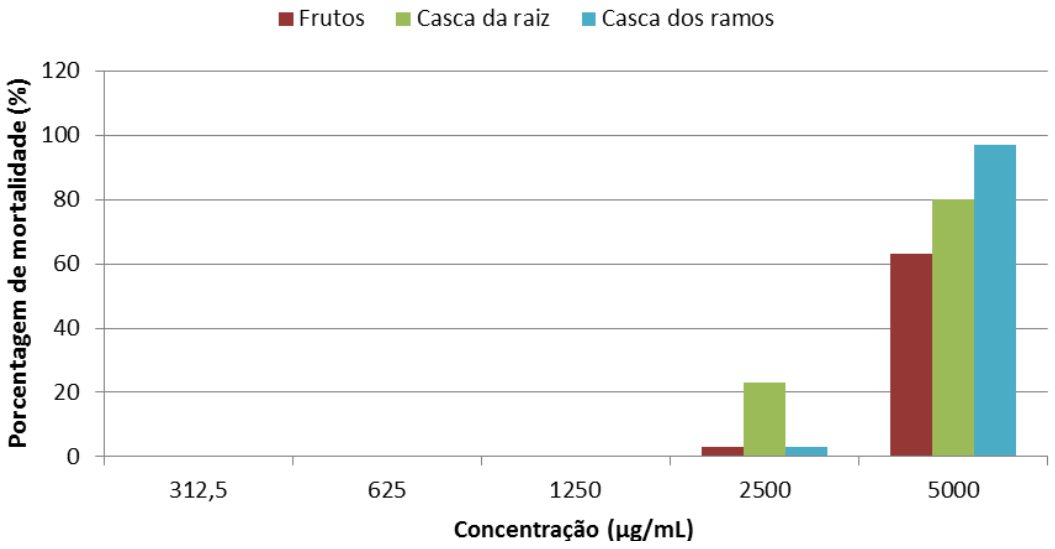
Código da Amostra	Concentração final (µg/mL)	% de Mortalidade			CL_{50} (mg/mL)	CL_{50} (ppm)
		24 h	48 h	72 h		
EACR1	**5000**	**97**	**97**	**97**	2,6	2600
	2500	**3**	**27**	**27**		
	1250	**0**	**3**	**3**		
	625	**0**	**0**	**0**		
	312,5	**0**	**0**	**0**		
EACR2	**5000**	**80**	**100**	**100**	2,5	2500
	2500	**23**	**50**	**53**		
	1250	**0**	**0**	**0**		
	625	**0**	**0**	**3**		
EAF1	**5000**	**63**	**93**	**100**	2,2	2200
	2500	**3**	**60**	**67**		
	1250	**0**	**7**	**7**		
	625	**0**	**3**	**3**		
	312,5	**0**	**0**	**0**		
H_2O	**-**	**0**	**0**	**0**		
DMSO	**-**	**0**	**0**	**0**		

Nos testes foram utilizadas 10 larvas por copo;
Controles: DMSO a 1 %; H_20.

O extrato metanol/água dos frutos avaliado na pesquisa surpreendeu por não apresentar relevante atividade contra *A. aegypti*, pois são dos mesmos que se extrai o óleo do nim que possui grande atividade biológica. Furtado et al. (2005), avaliou o óleo de dez espécies vegetais contra larvas de *A. aegypti*, com 2% de DMSO. Obteve CL_{50} de 15,9 mg/mL após 24 h. O trabalho mostrou que óleos essências são compostos por substâncias tóxicas para larvas de *A. aegypti*, assim como Manzoor, Samreen e Parveen (2013), que avaliaram cinco óleos essenciais extraídos de folhas e raízes de cinco espécies de plantas, os quais foram investigados biologicamente contra larvas de *A. aegypti* e *Culex quinquefaciatus*. As larvas

foram expostas a diferentes concentrações de óleos essenciais (1,95- 1000.00 ppm). Após 24 h todos os óleos mostraram atividade significativa contra as duas espécies de mosquitos vetores. Com menor valor da CL_{50} de 75,35 ppm contra *A. aegypti*.

Figura 18 – Gráfico com resultados dos bioensaios larvicidas contra *Aedes aegypti* utilizando extratos metanol/água de *Azadirachta indica* em diferentes concentrações de 312,5, 625, 1250, 2500, 5000 µg/mL no período de 24 h



Os demais extratos que não constam nas tabelas mostraram atividade inferior a 50 %, dentro das 48 h de avalição na concentração e 5000 µg/mL. Os resultados alcançados diferem dos de Dua et al. (2009), que mostrou à atividade larvicida de óleo nim contra *A. aegypti*, estabelecendo CL_{50} de 1,7 µg/mL ápos 24 h.

Em estudo com extratos obtidos das sementes de nim presentes na India, George; Vicent (2005), determinaram CL_{50} de 39 µg/mL em bioensaios contra larvas de *A. aegypti*. Porem, relatam que apesar do nim apresentar potêncial bioinseticida, nao é aconselhado o uso indiscriminado de produtos a base de nim e sempre procurar atentar-se na resistência dos insetos. Siddiqui et al. (2000), isolaram e avaliaram biologicamente dois compostos: 6α-O-acetotyl-7-deacetylnimocinol e meliacinol, a partir do extrato metanólico das folhas frescas de *A. indica*, onde obtiveram valores de CL_{50} de 21 e 83 ppm.

Em estudos realizados por Caraballo (2000), em aldeias do estado de Bolívar, Venezuela. Produto constituído por extrato de Nim (mistura de extracto de nim, citronella, a base de gel carbômero sem quaisquer perfumes ou corantes “NEEMOS”) demostro atividade repelente contra o vetor da malária *Anopheles darlingi* Root.

Para descrever possíveis atividades biológicas dos extratos de *A. indica* de Boa Vista, seria necessário verificar atividades indiretas (antialimentar, efeitos reguladores de crescimento e de reprodução) dos extratos, assim como as atividades confirmadas por Mordue; Blackwell (1993), com azadiractina de provocar os efeitos citados.

Os solventes empregados para extração foram estabelecidos por conta do maior rendimento alcançado assim como Koumaglo et al. (2004), que alcançou maior rendimento nas extrações empregando como solvente o metanol (CH_3OH).

4.2 RESULTADOS DOS BIOENSAIOS ADULTICIDAS

Os bioensaios adulticidas realizados mostraram resultados inferiores a 50 % de atividade contra as fêmeas adultas de *A. aegypti*. A amostra que resultou em maior efeito nos 90 min de avaliação na densidade de 3,33 $\mu g/cm^2$ foi o extrato metanólico dos frutos (EMF1) com 27 % dentro 45 min. Em algumas amostras como o extrato metanólico dos frutos e extrato metanólico da casca do caule (EMF1 e EMCC), foi observado movimentos retardados dos insetos. Com movimento da garrafa os insetos não se mantinham firmes aos 30/45 min; o extrato metanólico da caule dos ramos (EMCR): movimentos retardados com 60 min. de exposição e o extrato metanol/água da casca da raiz (EACR2): movimentos retardados com 30 min.

4.3 RESULTADOS DA ATIVIDADE *IN VITRO*

Nas tabelas 15 e 16, podemos observar os resultados das atividades antiplasmódicas *in vitro* dos extratos avaliados.

Dos extratos de *A. indica* introduzida no município de Boa Vista, RR, submetidos a testes *in vitro* contra cepa K1 de *P. falciparum*, apenas os extratos metanólicos e metanol/água das folhas (EMF e EAF) foram classificados como ativos com 100 e 80,79 % respectivamente de inibição dos parasitas (figura 19), enfatizando os resultados alcançados por MacKinnon et al. (1997), na avaliação de Meliáceas contra *P. falciparum* em testes *in vitro*, verificou 12 espécies incluindo *A. indica* (extratos das folhas coletadas em Togo,

África) obteve IC_{50} de 2,5 µg/mL. Tais resultados reforçam dizer que as folhas que *A. indica* possuem compostos antimaláricos.

Tabela 15 – Inibição do crescimento *in vitro* da cepa K1 de *Plasmodium falciparum* frente aos extratos metanólicos de diferentes partes de *Azadirachta indica*.

Códigos	Classificação* da atividade	Redução do crescimento do parasito (%)	
		50 (µg/mL)	5 (µg/mL)
EMCC	I	34,8	6,4
EMF	**A**	**100,0**	0,0
Tabela 15 – Cont.			
EMCR 2	I	36,3	0,0
EMF 1	I	27,6	0,0
EMCR1	I	8,8	0
EMCR3	I	13,9	4,7

*Como critério de atividade *in vitro* foi estabelecido que as amostras que inibirem o crescimento dos parasitos de: 80 a 100% = ativas (A); 50 a 79% = parcialmente ativas (PA); < 50% = inativa (I)

Tabela 16 – Inibição do crescimento *in vitro* da cepa K1 de *Plasmodium falciparum* frente os extratos metanol/água de diferentes partes de *Azadirachta indica*.

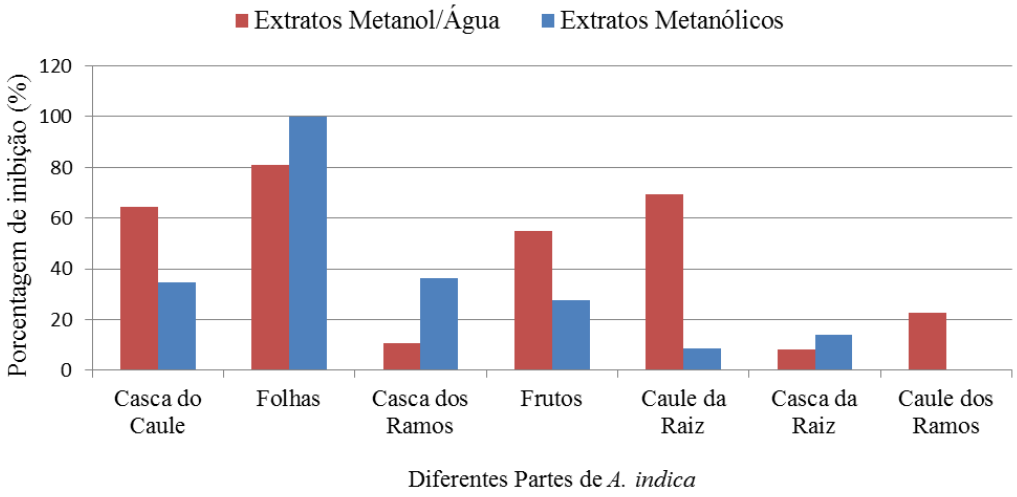
Códigos	Classificação* da atividade	Redução do crescimento do parasito (%)	
		50 (µg/mL)	5 (µg/mL)
EACC	PA	64,27	0,0
EAF	**A**	**80,79**	0,0
EAF 1	PA	54,85	0,0
EACR 3	PA	69,26	0,0
EACR	I	22,7	6,9
EACR1	I	10,6	0,0
EACR2	PA	8,27	0,0

*Como critério de atividade *in vitro* foi estabelecido que as amostras que inibirem o crescimento dos parasitos de: 80 a 100% = ativas (A); 50 a 79% = parcialmente ativas (PA); < 50% = inativa (I)

Em Burkina Faso, África, Chianese et al. (2010), realizaram a fitoquímica de frutos do nim verificando que nesta parte da planta contem compostos antimaláricos (figura 20 – azadirone (A); azadiradione (B); epoxyazadiradione (C); gedunin e deactylgedunin (D); desmethyllimocin B (E); protoxylocarpin G (F); spicatin (G); neemfruitin A (H) e neemfruitin

B (I), com média de CI_{50} de 4,52 µg/mL). Testaram frações do extrato metanólico contra *P. falciparum* (parasitas cultivado *in vitro* descrito por Trager; Jensen, 1976) e *Plasmodium berghei* (*in vivo*) em camundongos tratados com dose oral de 200 mg/kg.

Figura 19 – Gráfico com resultados do screening dos extratos de *Azadirachta indica* a concentração de 50 µg/mL contra *Plasmodium falciparum*

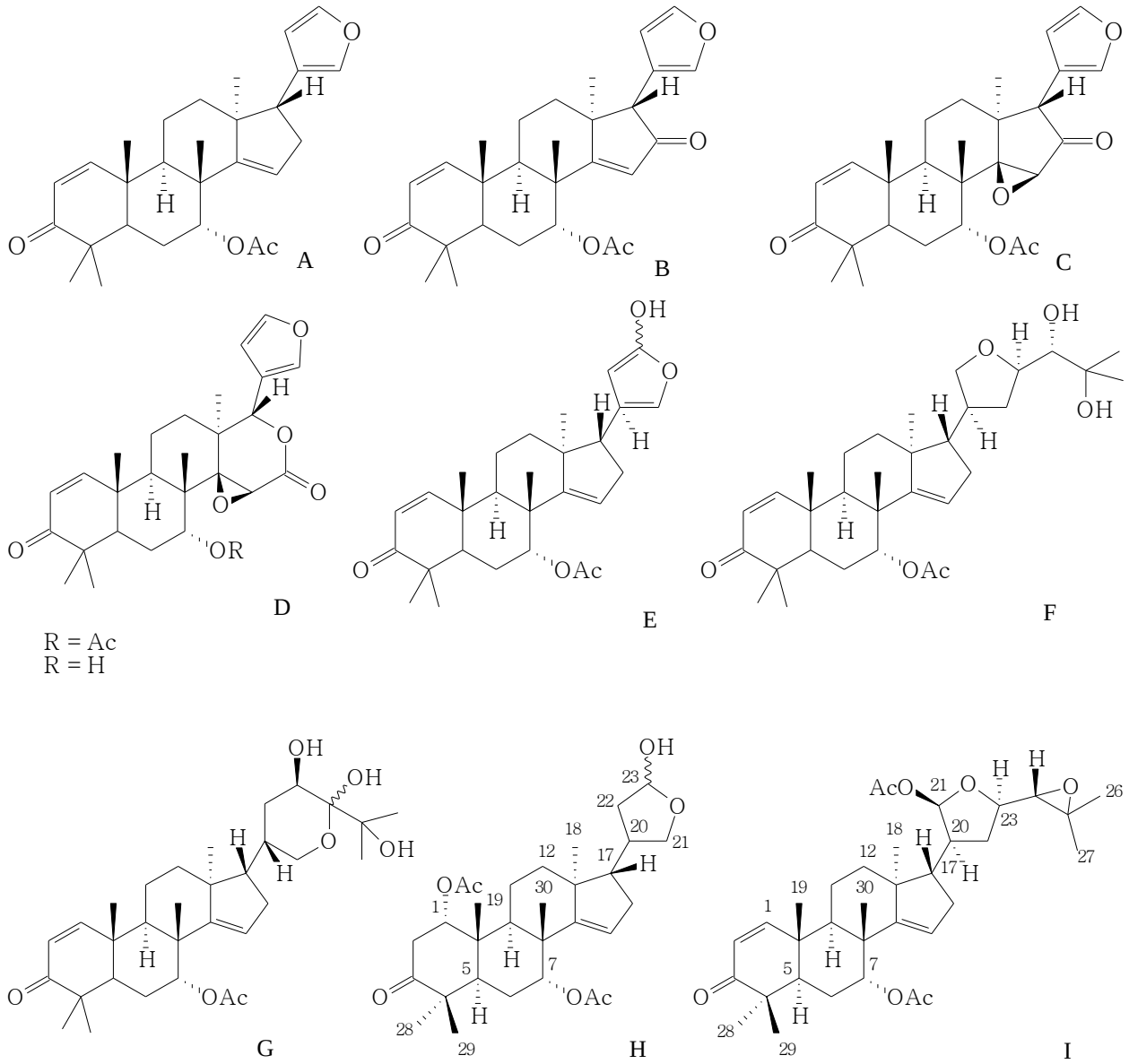


Nos testes *in vitro* as frações e triterpenóides obtidas do extrato metanólico dos frutos, obteve valores de CI_{50} contra *P. falciparum*: > 50 µg/mL pra fase aquosa, neemfruitin B, 9,49 µg/mL; neemfruitin A, 2,82 µg/mL; fase acetato de etila, 1,31 µg/mL; fase n-butanólica, 3,18 µg/mL e com cloroquina como controle positivo 0,03 µg/mL. A fase acetato de etila foi a mais promissora nos testes, a concentração final de DMSO foi menor que 1% nos ensaios.

Na avaliação de gedunin isolado de cascas de *A. indica* coletadas em Cartum, Sudão, Khalid; Duddeck e Gonzalez-Sierra (1989), obtiveram CI_{50} de cerca 1 µg/mL após 48 h de exposição (0,3 µg/mL após 96 h), aproximadamente equivalente a quinina (controle positivo).

Em estudos de Udeinya et al. (2006), com frações obtidas de extratos das folhas de nim colhidas na Nigéria, em atividade *in vitro* contra *P. falciparum*, estabeleceram CI_{50} de 0,1 ppm, mostrando resultados superior a cloroquina. As frações dos extratos ativos foram submetidas a testes com resultados futuros.

Figura 20 – Estruturas de compostos antimaláricos presentes na composição química dos frutos de *Azadirachta indica.*



Fonte: Chianese et al., (2010).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A hipótese alternativa promotora da pesquisa em questão foi refutada, pois houve diferenças nas atividades observadas pelos extratos avaliados das diferentes partes de *A. indica* introduzida no município de Boa Vista, RR. Apenas os extratos das folhas mostraram atividade de inibição ao desenvolvimento de *P. falciparum* e contra *A. aegypti* as amostram precisaram de concentrações elevadas (>5000 µg/mL) para mostrar efeito de 100 % de mortalidade das larvas e estabelecer a CL_{50}.

Os resultados alcançados revelam que a eficiência de produtos naturais obtidos a partir de *A. indica* presente no município de Boa Vista RR não sejam eficientes contra larvas de *A. aegypti*, necessitando estudos posteriores como: ação antialimentar, efeitos reguladores de crescimento e de reprodução, como os produtos obtidos da árvore do nim são conhecidos e documentados. Quanto os resultados alcançados nos bioensaios adulticidas, mostrou necessidade do aumento da concentração aplicada nas garrafas para novos bioensaios, por conta da logística disponível para planejamento e execução não foi possível realizá-los.

REFERÊNCIAS

ADAMS, M. et al. Malaria in the Renaissance: Remedies from European herbals from the 16 and 17th century. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 133, p. 278–288, 2011.

ADEWOLE, A. et al. Larvacidial activities of three plant extracts of common wire weed (*Sida acuta*), Catnip (*Nepeta cataria*) and Neem (*Azadirachta indica*) against the larva of mosquito (*Anopheles gambiae*). **Academia Journal of Medicinal Plants**. v. 1, n. 2, p. 037–040, feb. 2013.

ALECRIM, M. G. C. et al. Tratamento de Crianças com Malária pelo *Plasmodium falciparum* com Derivados da Artemisinina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropica**l, v. 36, n. 2, p. 223-226, mar./abr. 2003.

ALOUANI, A.; REHIMI, N.; SOLTANI, N. Larvicidal Activity of a Neem Tree Extract (Azadirachtin) Against Mosquito Larvae in the Republic of Algeria. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 1, p. 15–22, mar. 2009.

ALVES, D. A. **Avaliação Cromatográfica e Atividade Antimicrobiana de Produtos Preparados com Nim (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae)**. 2007. 75 p. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-graduação, em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia/UFMG, Belo Horizonte, MG, 2007.

ANDRADE-NETO, V. F. et al. In vitro inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Memórias do Instituo Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, RJ, v. 102, n. 3, p. 359–365, jun. 2007.

ARAÚJO, L. V. C.; RODRIGUEZ, L. C. E.; PAES, J. B. Características Físico-químicas e Energéticas da Madeira de Nim Indiano. **Scientia forestalis,** n. 57, p. 153-159, jun. 2000.

BARATA, E. A. M. F. et al. População de *Aedes aegypti* (l.) em Área Endêmica de Dengue, Sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n. 3, p. 237-242, fev. 2001.

BISWAS, K. et al. Biological Activities and Medicinal Properties of Neem (*Azadirachta indica*). **Current science**, v. 82, n. 11, Jun. 2002.

BOTELHO, M. A. et al. Antimicrobial Activity of the Essential Oil From *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol Against Oral Pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research,** v. 40, p. 349–356, 2007.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, DF, v. 16, n. 4, p. 295–302, out./dez. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Núcleo de Controle de Febre Amarela e Dengue – NCFAD. Diretoria de Vigilância Epidemiológica – DVE. Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde – CGVS. **Secretaria de Estado da Saúde de Roraima – SESAU/RR**. Dengue, 2013b.

BRASIL. Ministério da Saúde. SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde. CGPNCM – Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Malária. **Malária no Brasil**. Brasília, DF: SVS, 2009. 48 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde. DVE – Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica:** série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, DF: SVS, 2005. 816 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde. SIVEP – Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica – Malária. **Notificações de Casos**. Brasília, DF, 2013a.

BRITO, H. M. et al. Toxicidade de Formulações de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) ao Ácaro-Rajado e a *Euseius alatus* De Leon e *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae). **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 4, p. 500–505, jul./ago. 2006.

BROGDON, W. G; MCALLISTER, J. C. Insecticide Resistance and Vector Control. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, oct./dec. 1998.

BUTTERWORTH, J. H.; MORGAN. E . D. Isolation of a Substance that suppresses Feeding in Locusts. **Chemical Communications**, 1968.

CABONI, P. et al. Residues and Persistence of Neem Formulations on Strawberry after Field Treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 54, n. 26, p. 10026−10032, 2006.

CALMASUR, O.; ASLAN, I.; SAHIN, F. Insecticidal and Acaricidal Effect of Three Lamiaceae Plant Essential Oils Against *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn. **Science direct**, v. 23, p. 140–146, 2006.

CARABALLO, A. J. Mosquito Repellent Action of Neemos. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Bolívar, Venezuela, v. 16, n. l, p.45–46, mar. 2000.

CASER, C. R. S. et al. Atividade Biológica das Folhas Secas de Neem, *Azadirachta indica*, Sobre Larvas de *Aedes aegypti*. **Natureza on line, v.** 5, n. 1, p. 19–24, 2007.

CDC. **Malária.** [S. I.]. 2010.
Disponível em:<http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/parasites.html>. Acesso em: 28 set. 2012.

CHIANESE, G. et al. Antiplasmodial Triterpenoids from the Fruits of Neem, *Azadirachta indica*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 8, p. 1448–1452, jul. 2010.

CHIN, W. et al. A Naturally Acquired Quotidian-Type Malaria in Man Transferable to Monkeys. **Science**, v. 149, n. 3686, p. 865, aug. 1965.

CODEÇO, C. T. et al. Seasonal Dynamics of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Northernmost State of Brazil: a likely port-of-entry for dengue virus 4. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, RJ, v. 104, n. 4, p. 614–620, jul. 2009.

COELHO, A. A. M.; PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. Atividade Larvicida de Extratos Vegetais Sobre *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidade), em Condições de Laboratório. **BioAssay**, Brasília, DF, v. 4, n. 3, p. 1–6, 2009.

COELHO, F. B. R. et al. Levantamento Etnofarmacológico Realizado na Comunidade Mumbuca Localizada no Jalapão–TO. **Revista Eletrônica de Farmácia Suplemento**, v. 2, n. 2, p. 52–55, 2005.

COX, F. E. G. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. **Parasites e Vectors**, Inglaterra, London, v. 3, n. 5, p. 1–9, feb. 2010.

DEQUECH, S. T. B. et al. Efeito de Extratos de Plantas com Atividade Inseticida no Controle de *Microtheca ochroloma* Stal (Col.: Chysomelidae), em Laboratório. **Biotemas,** v. 21, n. 1, p. 41–46, mar. 2008.

DHAR, R. et al. Inhibition of the Growth and Development of Asexual and Sexual Stages of Drug-sensitive and Resistant Strains of the Human Malaria Parasite *Plasodium falciparum* by Neem (*Azadirachta indica*) Fractions. **Journal of Ethnopharmacology**, Baltimore, USA, v. 61, n. 1, p. 31–39, jan. 1998.

DUA, V. K. et al. Larvicidal Activity of Neem Oil (*Azadirachta indica*) Formulation Against Mosquitoes. **Malaria Journal**, v. 8, n. 124, p. 1–6, jun. 2009.

DRABU, S.; KHATRI, S.; BABU, S. Neem: Healer of All Ailments. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 3, n. 121, p. 120–126, jan./mar. 2012.

EXPERT Reviews of Anti-infective Therapy. v. 11, n. 1, p. 9–11, jan. 2013.

FANG, J. A World Without Mosquitoes. **Nature**, v. 466, p. 432–434, jul. 2010.

FIGUEIREDO, L. T. M. Dengue in Brazil: Past, Present and Future Perspective. **Dengue Bulletin**, v. 27, p. 25–33, 2003.

FORIM, M. R. et al. Uso de CLAE no Controle de Qualidade em Produtos Comerciais de Nim: reprodutibilidade da ação inseticida. **Química Nova**, v. 33, n. 5, p. 1082–1087, mai. 2010.

FURTADO, F. R et al. Atividade Larvicida de Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology,** Fortaleza, CE, v. 34, n. 5, p. 843–847, sep./oct. 2005.

GEORGE, S.; VINCENT, S. Comparative efficacy of *Annona squamosa* Linn. and *Pongamia glabra* Vent. to *Azadirachta indica* A. Juss against mosquitoes. **Journal of Vector Borne Diseases,** Chennai, India, v. 42, p. 159–163, dec. 2005.

GIL, D. C. Q.; BENÍTEZ, J. E. O.; GUTIÉRREZ, M. M. Competencia Vectorial: Consideraciones Entomológicas y su Influencia Sobre la Epidemiología del Dengue. **Iatreia**, v. 23, n. 2, jun. 2010.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, nov. 2007.

GUIGUEMDE, W. A. et al. Global Phenotypic Screening for Antimalarials. **Chemistry e Biology**, v. 19, n 1, p. 116–129, jan. 2012.

GURULINGAPPAA, H. et al. Susceptibility of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* Larvae to Gedunin-Related Limonoids. **Chemistry e Biodiversity**, v. 6, p. 897–902, 2009.

HEINZMANN, B. M.; BARROS, F. M. C. Potencial das Plantas Nativas Brasileiras para o Desenvolvimento de Fitomedicamentos Tendo como Exemplo *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown (Verbenaceae). **UFSM**, Santa Maria, RS, v. 33, n. 1, p. 43–48, 2007.

HOANG, L. T. et al. The Early Whole-Blood Transcriptional Signature of Dengue Virus and Features Associated with Progression to Dengue Shock Syndrome in Vietnamese Children and Young Adults. **Journal of Virology**, v. 84, n. 24, p. 12982–12994, dec. 2010.

HORTA, M. A. P. et al. Resistance of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to Temephos in Brazil: A Revision and New Data for Minas Gerais State, **BioAssay,** v. 6, n. 7, p. 1–6, 2011.

IDU, M.; ONYIBE, H. I. Medicinal Plants of Edo State, Nigeria. **Research Journal of Medicinal Plant**, Academic Journols Inc., Pakistan, v. 1, n. 2, p. 32–411, 2007.

JÚNIOR, C. V. Terpenos com Atividade Inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, São Paulo, SP, v. 26, n. 3, p. 390–400, mai./jun. 2003.

KAPPE, S. H. I.; MIKOLAJCZAK, S. A. Another Shot at a Malaria Vaccine. **Science,** v. 334, n. 6055, p. 460–461, oct. 2011.

KAUR, K. et al. Antimalarials From Nature. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 3229–3256, 2009.

KHALID, S. A.; DUDDECK, H.; GONZALEZ-SIERRA, M. Isolation and Characterization of an Antimalarial Agent of the Neem Tree *Azadirachta indica.* **Journal of Natural Products**,v. 52, n. 5, p. 922-927 , sep./oct. 1989.

KOUMAGLO, K. et al. Évaluation de la Teneur en Gédunine dans Différents organs d'*Azadirachta indica* A. Juss. **Journal Comptes Rendus Chimie**, v. 7, p. 1047–1050, sep. 2004.

KRETTLI, A. U. Grandes Endemias no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, Belo Horizonte, MG, v. 78, n. 1, p.74–78, 2008.

LIMA, J. T. F. Risco de Urbanização da Febre Amarela no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública,** Rio de Janeiro, RJ, v. 1, n. 3, p. 377–384, jul./set. 1985.

LOVATTO, P. B.; MAUCH, C. R.; SCHIEDECK, G. Efeito de Extratos Aquosos de *Melia azedarach* (Meliaceae) Sobre a Biologia e Preferência Alimentar de *Brevicoryne brassicae* (L., 1758) (Hemiptera: Aphididae) em Condições de Laboratório. **Cadernos de Agroecologia**, v. 6, n. 2, dez. 2011.

LUZ, F. J. F. Plantas Medicinais de Uso Popular em Boa Vista, Roraima, Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 19, n. 1, p. 88-96, mar. 2001.

MACKINNON, T. D. S. et al. Antimalarial Activity of Tropical Meliaceae Extracts and Gedunin Derivatives. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 4, p. 336-341, abr. 1997.

MADALENO, I. M. Etno-farmacología en Iberoamérica, una Alternativa a la Globalización de las Prácticas de Cura. Cuadernos Geográficos, v. 41, n 2, p. 61–95, 2007.

MAHESWARAN, R.; IGNACIMUTHU, S. A Novel Herbal Formulation Against Dengue Ectormosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Parasitology Research,** v. 110, p. 1801–1813, 2012.

MANZOOR, F.; SAMREEN, K. B.; PARVEEN, Z. Larvicidal Activity of Essential Oils Against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* Larvae (Diptera: Culicidae). **Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 23, n. 2, p. 420–424, 2013.

MARIATH, I. R. et al. Plants of the American Continent With Antimalarial Activity. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1A, p. 158–192, jan./mar. 2009.

MATOS, A. P. et al. Constituintes Químicos e Atividade Inseticida dos Extratos de Frutos de *Trichilia elegans* e *T. catigua* (Meliaceae). **Química nova**, v. 32, n.6, p. 1553–1556, 2009.

MEDEIROS, C. A. M.; JUNIOR, A. L. B.; TORRES, A. L. Efeito de Extratos Aquosos de Plantas na Oposição da Traça-das-crucíferas, em Couve. **Fitossanidade**, Campinas, SP, v. 64, n. 2, p. 227–232, 2005.

MENDONÇA, F. A. C. et al. Activities of Some Brazilian Plants Against Larvae of the Mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 629–636, 2005.

MICHELETTI, S. M. F. B. et al. Ação de Extrato e Óleo de Nim no Controle de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em Laboratório. **Parasitologia Veterinária,** Jaboticabal, SP, v. 19, n. 1, p. 44–48, jan./mar. 2010.

MICHALAKIS, Y.; RENAUD, F. Evolution in Vector Control. **Nature**, v. 462, n.19, p. 298–300, nov. 2009.

MILHOUS, W. K.; WEINA, P. J. The Botanical Solution for Malaria. **Science,** v. 327, n. 5963, p. 279–280, jan. 2010.

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: Uma Abordagem da Química à Ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892–896, abr. 2005.

MORDUE, A. J.; BLACKWELL, A. Azadirachtin: an Update. **Journal of Insect Physiology**, v. 39, n. 11, p. 903–924, 1993.

MORGAN, E. D. Azadirachtin, a Acientific Gold Mine. **Bioorganic & Medicinal Chemistry,** v. 17, p. 4096–4105, jun. 2009.

MOSSINI, S. A. G.; KEMMELMEIER, C. A Árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 24, n. 1, p. 139–48, 2005.

MOURÃO, V. et al. Toxicity of Neem Extracts (*Azadirachta indica*) to the Coffee Red Mite *Oligonychus ilicis.* **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.39, n.8, p.827–830, ago. 2004.

NAGM, L. et al. Affinity and Diversity Indices for Anopheline Immature Forms. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 5, p. 309–316, sep./oct. 2007.

NAHAK, G.; SAHU, R. K. In Vitro Antioxidative Acitivity of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* Leaves by DPPH Scavenging Assay. **Journal of American Science**, v. 6, n. 6, p. 123–128, 2010.

NATA, J. M. V. D. et al. Ethnopharmacognostical Survey of *Azadirachita indica* A. Juss (Meliacea). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 35, n .1, p. l–24, nov. 1991.

NATAL, D. Bioecologia do *Aedes* aegypti. **Biológico**, São Paulo, SP, v. 64, n.2, p. 205–207, jul./dez. 2002.

NEVES, E. J. M.; CARPANEZZI, A. A. **Prospecção do Cultivo do Nim (*Azadirachta indica*) no Brasil**. Embrapa Florestas, Colombo, PR, nov. 2009.

NOUR, A. H.; SANDANASAMY, J. D. O.; NOUR, A. H. Larvicidal activity of extracts from different parts of Neem (*Azadirachta indica*) against *Aedes Aegypti* mosquitoes' larvae. **Scientific Research and Essays,** v. 7, n. 31, p. 2810–2815, aug. 2012 .

OGBUEWU, I. P. et al. The Growing Importance of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) in Agriculture, Industry, Medicine and Environment: A Review. **Research Journal of medicinal Plant** , v. 5, n. 3, p. 230–245, 2011.

OMAR, S. et al. Traditionally-used Antimalarials From the Meliaceae. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 137–139, jan. 2003.

OMS. **Malária**. 2011.
Disponível em:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/es/index.html>. Acesso em: 07 jan. 2012.

OSANAI, C. H. et al. Surto de Dengue em Boa Vista, Roraima. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 25, n. 1, p. 53–54, jan./fev. 1983.

PEREIRA, A. V. et al. Efeito Ovicida e Larvicida do Extrato de *Azadirachta Indica* Sobre Mosquito *Aedes Aegypti*. **Agropecuária Técnica**, v. 30, n. 2, p. 107–111, 2009.

PETROSKI, R. J.; STANLEY, D. W. Natural Compounds for Pest and Weed Control. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8171–8179, aug. 2009.

POHLIT, A. M. et al. Patent Literature on Mosquito Repellent Inventions Which Contain Plant Essential Oils – A Review. **Planta Médica**, feb. 2011a.

POHLIT, A. M. et al. Plant Extracts, Isolated Phytochemicals, and Plant-Derived Agents Which Are Lethal to Arthropod Vectors of Human Tropical Diseases. **Planta Médica,** v. 77, p. 618–630, 2011b.

POHLIT, A. M. et al. Screening of Plants Found in Amazonas State, Brazil for Activity Against *Aedes aegypti* larvae. **Acta Amazonica,** Manaus, AM, v. 34, n. 1, p. 97–105, 2004.

QUADROS, D. S.; TADEI, W. P.; NONUMURA S. M. Estudo da Relação da Estrutura Química de Fenilpropanóides, Limonóides e Flavonóides e a Atividade Larvicida Contra Vetores de Doenças Tropicais. **XIX Jornada de Iniciação Científica, PIBIC, INPA** - CNPq/FAPEAM, Manaus, 2010.

QUITÉRIO, G. C. M. **Produção de Artemisinina por *Artemisia annua* l. Sob Influência de Micorriza Arbuscular**. 2006. 39p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Curso de pós-graduação em Agricultura Tropical e Subtropical, Instituto Agronômico, Campinas, SP, 2006.

RAHMATULLAH, M. et al. Medicinal Plants Used by Various Tribes of Bangladesh for Treatment of Malaria. **Malaria Research and Treatment**, v. 2012, p. 1–5, 2012.

RAJA, R. V.; RAMANATHAN, T.; SAVITHA, S. Studies on wound healing property of coastal medicinal plants. **Journal of Bioscience and Technology**, v. 1, n. 1, p. 39–44, 2009.

RAJKUMAR, S.; JEBANESAN, A. Repellent Activity of Selected Plant Essential Oils Against the Malarial Fever Mosquito *Anopheles stephensi*. **Tropical Biomedicine,** v. 24, n. 2, p. 71–75, 2007.

REDAÇÃO. **Malária em Roraima: número de casos aumenta 35,28% em 2010.** 2011. Disponível em:<http://www.roraimahoje.com.br/home/cidade/5278-malaria-em-roraima-numero-de-casos-aumenta-3528-em-2010.html>.
Acesso em: 07 dez. 2011.

REGULES, J. A.; CUMMINGS, J. F.; OCKENHOUSE, C. F. The RTS,S Vaccine Candidate for Malaria. **Expert Reviews**, v. 10, n. 5, p. 589–599, 2011.

RIBEIRO, P. E. A. et al. Isolamento de Azadiractina de Sementes de Nim (*Azadirachta indica*) para Estudos de Concentração na Planta e Bioensaios como Inseticida Natural. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 26, 2006, Sete Lagoas. **Simpósio brasileiro sobre a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda***. Belo Horizonte: Inovação para sistemas integrados de produção: ABMS, 2006. 1 CD-ROM.

ROSA, A. P. A. T. et al. The First Laboratory Confirmed Cases of Dengue Fever in Brazil: virus isolation and serological results. **Instituto Evandro Chagas**, Belém, PA, p.164–167, 1998.

SAKTHIVADIVEL, M.; DANIEL, T. Evaluation of Certain Insecticidal Plants for the Control of Vector Mosquitoes viz. *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. **Applied Entomology and Zoology**, v. 43, n. 1, p. 57–63, 2008.

SANCHEZ, B. A. M. **Plasmódios Transfectados com a Proteína de Fluorescência Verde (GFP) para Ensaios de Quimioterapia Experimental**. 2007. 522p. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, MG, 2007.

SARAIVA, M. G. G. et al. Expansão Urbana e Distribuição Espacial da Malária no Município de Manaus, Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v. 42, n. 5, p. 515–522, set./out. 2009.

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

SIDDIQUI, B. S. et al. Two insecticidal tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica*. **Phytochemistry,** v. 53, p. 371–376, oct. 2000.

SIDDIQUI, B. S. et al. Two New Triterpenoids From *Azadirachta indica* and Their Insecticidal Activity. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 8, p. 1216–1218, 2002.

SILVA, A. B.; BATISTA, J. L.; BRITO, C. H. Atividade Inseticida do Nim (*Azadirachta indica*). **Revista Verde**, Mossoró, v. 4, n. 4, p. 07–15, out./dez. 2009.

SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G. Estudos do Ciclo Evolutivo de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) a Partir de Ovos com Quatro Meses de Estocagem em Laboratório. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, GO, v. 29, n. 1, p. 95–100, jan./jun. 2000.

SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G.; LIRA, K. S. Metodologia de Criação, Manutenção de Adultos e Estocagem de Ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em Laboratório. **Revista de Patologia Tropical**, v. 27, n. 1, p. 53–63, jan./jun. 1998.

SILVA, W. W. et al. Efeitos do Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) e do Capim Santo [Cymbopogon citratus (DC) Stapf] Sobre os Parâmetros Reprodutivos de Fêmeas Ingurgitadas de Boophilus microplus e Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) no semiárido paraibano. **Revista Brasileira Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 9, n. 3, p. 1–5, 2007.

SIMAS, N. K. et al. Produtos Naturais Para o Controle da Transmissão da Dengue – Atividade Larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de Terpenóides e Fenilpropanóides. **Química nova**, Rio de Janeiro, RJ, v. 27, n. 1, p. 46–49, 2004.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia**. 5. ed. Porto Alegre-Florianópolis, UFRGS, 2003. 1097 p.

SINGH, A. et al. Assessment of genetic diversity in *Azadirachta indica* using AFLP markers. **Theoretical and *Applied* Genetics**, v. 99, p. 272–279, jul. 1999.

SINGH, O.; KHANAM, Z.; AHMAD, J. Neem (*Azadirachta indica*) in Context of Intellectual Property Rights (IPR). **Recent Research in Science and Technology**, v. 3, n. 6, p. 80–84, 2011.

SNOW, R. W. et al. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature**, v. 434, p. 214–217, mar. 2005.

SRISAWAT, R. et al. Point mutations in domain II of the voltage-gated sodium channel gene

in deltamethrin-resistant *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 45, n. 2, p. 275–282, 2010.

TAN, Q. G.; LUO, X. D. Meliaceous Limonoids: Chemistry and Biological Activities. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 11, p. 7437–7522, sep. 2011.

TAUIL, P. L. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 275–277, mai./jun. 2006.

TAVEIRA, L. A.; FONTES, L. R.; NATAL, D. Manual de diretrizes e procedimentos no controle do *Aedes aegypti*. **Centro de controle de zoonoses divisão de controle de vetores e animais peçonhentos**, Ribeirão Preto, SP, 2001.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, n. 4254, p. 673–675, aug. 1976.

UDEINYA, I. J. et al. Fractions of an Antimalarial Neem-leaf Extract Have Activities Superior to Chloroquine, and are Gametocytocidal. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 100, n. 1, p. 17–22, 2006.

VALDÉS, A. F. C. et al. *In vitro* antimalarial activity and cytotoxicity of some selected cuban medicinal plants. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo,** SP, v. 52, n. 4, p. 197–201, jul./ago. 2010.

VALE JÚNIOR, J. F.; SCHAEFER, C. E. G. R. **Solos sob savanas de Roraima: gênese, classificação e relações ambientais**. Boa Vista-RR: Ioris, 2010. 219 p.

VAUGHAN, A. M.; KAPPE, S. H. Malaria vaccine development: persistent challenges. **PubMed**, Seattle Biomedical Research Institute, USA, 2012.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 1785 p.

VIDAL, P. O. **Estudo genético e morfológico de populações de *Aedes aegypti* (Culicidae) na área metropolitana de São Paulo – SP**. 2010. 25p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

VOGEL, G. A. Complex New Vaccine Shows Promise. **Science**, v. 306, n. 5696, p. 587–589, oct. 2004.

WANDSCHEER, C. B. et al. Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. **Toxicon**, v. 44, p. 829–835, 2004.