

**EFEITO CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DE EXTRATOS DE
STRYPHNODENDRON POLYPHYLLUM Mart. E AÇÃO LARVICIDA SOBRE
*AEDES AEGYPTI***

Sthefanie Brito Oliva Mota

**Montes Claros - MG
Agosto - 2022**

Sthefanie Brito Oliva Mota

**EFEITO CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DE EXTRATOS DE
STRYPHNODENDRON POLYPHYLLUM Mart. E AÇÃO LARVICIDA SOBRE
*AEDES AEGYPTI***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros como parte das exigências do Curso de Mestrado Acadêmico em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vanessa de Andrade Royo

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Thallyta Maria Vieira

**Montes Claros - MG
Agosto - 2022**

Mota, Sthefanie Brito Oliva.

M917e Efeito Citotóxico e genotóxico de extratos de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. e ação larvicida sobre *Aedes Aegypti*. [manuscrito] / Sthefanie Brito Oliva Mota – Montes Claros, 2022.

21 f. : il.

Bibliografia: f. 17-21.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes, Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada /PPGBOT, 2022.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa de Andrade Royo.

Coorientadora: Profa. Dra. Thallyta Maria Vieira.

1 Barbatimão. 2. Extratos vegetais. 3. Toxicologia genética. 4. Citotoxicidade. 5. Larvicida. 6. *Aedes aegypti*. 7. Fitoquímica. I. Royo, Vanessa de Andrade. II. Vieira, Thallyta Maria. III. Universidade Estadual de Montes Claros. IV. Título.

Sthefanie Brito Oliva Mota

**EFEITO CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DE EXTRATOS DE
STRYPHODENDRON POLYPHYLLUM Mart. E AÇÃO LARVICIDA SOBRE
*AEDES AEGYPTI***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros como parte das exigências do Curso de Mestrado Acadêmico em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 22 de Agosto de 2022.

Membro da banca (Prof^a. Dr^a. Vanessa de Andrade Royo-UNIMONTES)

Membro da banca e Sigla instituição (Prof. Dr. Dario Alves de Oliveira – UNIMONTES)

Membro da banca e Sigla instituição (Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Pereira)

**Vanessa de Andrade Royo
Orientadora**

**Montes Claros - MG
Agosto- 2022**

Artigo formatado de acordo com a Revista (Research, Society and Development)

Efeito citotóxico e genotóxico de extratos *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. e ação larvicida sobre *Aedes aegypti*.

Sthefanie Brito Oliva Mota

Vanessa de Andrade Royo

Thallyta Maria Vieira

Sumário

1. Introdução	2
2. Material e métodos	4
2.1 Preparo do Material vegetal	4
2.2 Bioensaios em larvas de <i>Aedes aegypti</i>	5
2.3 Bioensaios de citotoxicidade e genotoxicidade	5
2.4 Análise estatística	7
3. Resultados	7
3.1 Prospecção fitoquímica	7
3.2 Atividade larvicida	8
3.3 Teste de toxicidade em náuplios de <i>Artemia salina</i>	11
3.4 Teste de atividade citotóxica e genotóxica em <i>Allium cepa</i>	12
4. Discussão	15
5. Conclusão	16
Referências	17

Efeito citotóxico e genotóxico de extratos de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. e ação larvicida sobre *Aedes aegypti*.

Cytotoxic and genotoxic effect of extract *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and larvicidal action on *Aedes aegypti*.

Efecto citotóxico y genotóxico de extractos de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. y acción larvicida sobre *Aedes aegypti*.

Resumo

Larvicidas derivados de plantas têm sido indicados como estratégias biodegradáveis e de baixo custo para o controle do mosquito *Aedes aegypti*, transmissor da dengue, zika, chikungunya e febre amarela. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos extratos aquosos, etanólicos e hidroalcóolicos produzidos a partir do barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum* Mart.) como método alternativo no controle de larvas de *Aedes aegypti* bem como o potencial citotóxico e genotóxico. O material vegetal foi coletado em diferentes plantas na cidade de Bocaiúva-MG e os extratos a serem avaliados foram produzidos nas concentrações de 100, 75, 50, 25, 12,5% para extratos aquosos e 7200, 3600, 1800, 900, 700, 600, 400 e 200 ppm para extratos etanólicos e hidroalcóolicos. Para avaliar a toxicidade frente a organismos não alvo, utilizou-se os testes com *Artemia salina* e *Allium cepa*. Testes fitoquímicos preliminares foram realizados para a caracterização dos metabólitos foliares. Observou-se que o extrato aquoso produzido através das folhas de *S. polyphyllum* obteve mortalidade 100% das larvas de *A. aegypti* após 48 horas de exposição. Não foi observada toxicidade frente à *A.salina* e os testes com *Allium cepa* demonstraram interferências no processo mitótico atestando citotoxicidade, contudo não observou-se ação genotóxica. Dessa forma, constatou-se a atividade larvicida do extrato aquoso foliar de *S. polyphyllum* frente às larvas de *Aedes aegypti* e atividade citotóxica do dos extratos.

Palavras-chave: Extratos vegetais; Cerrado; Índice mitótico; *Artemia salina*; Fitoquímica.

Abstract

Plant-derived larvicides have been indicated as low-cost biodegradable strategies for the control of the *Aedes aegypti* mosquito, dengue transmitter, zika, chikungunya and yellow fever, this work aimed to evaluate the effect of aqueous, ethanolic and hydroalcoholic extracts produced to from Barbatimão (*Stryphnodendron Polyphyllum* Mart.) As an alternative method in controlling *Aedes aegypti* larvae as well as cytotoxic and genotoxic potential. Plant material was collected from different trees

in the city of Bocaiúva-MG and the statements to be evaluated were produced at concentrations of 100, 75, 50, 25, 12.5% for aqueous extracts and 7200, 3600, 1800, 900, 700, 600, 400 and 200 ppm for ethanolic and hydroalcoholic extracts. To evaluate toxicity against non-target organisms, tests with *Artemia salina* and *Allium cepa* was used. Preliminary phytochemical tests were performed for the characterization of leaf metabolites. It was observed that the aqueous extract produced through the leaves of *S. polyphyllum* obtained 100% mortality of *A. aegypti* larvae after 48 hours of exposure. Toxicity was not observed against *A. Salina* and *Allium cepa* tests showed interference in the mitotic process attesting cytotoxicity, but genotoxic action was not observed. Thus, the larvicidal activity of the leaf aqueous extract of *S. polyphyllum* against the *Aedes aegypti* larvae and cytotoxic activity of extracts.

Keywords: Vegetable extracts; Scrubland; Mitotic index; *Artemia salina*; Phytochemical.

Resumen

Los larvicidas derivados de la planta se han indicado como estrategias biodegradables de bajo costo para el control del mosquito *Aedes aegypti*, el transmisor del dengue, el Zika, el chikungunya y la fiebre amarilla, este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de extracto acuoso, etanólico e hidroalcohólico producido de Barbatimão (*Stryphnodendron Polyphyllum* Mart.) Como un método alternativo para controlar las larvas de *Aedes aegypti*, así como el potencial citotóxico y genotóxico. El material vegetal se recogió de diferentes árboles en la ciudad de Bocaiúva-MG y las declaraciones a evaluar se produjeron a concentraciones de 100, 75, 50, 25, 12.5% para extractos acuosos y 7200, 3600, 1800, 900, 700, 600, 400 y 200 ppm para extractos etanólicos e hidroalcohólicos. Para evaluar la toxicidad contra los organismos no objetivo, se utilizaron pruebas con artemia salina y *Allium cepa*. Se realizaron pruebas fitoquímicas preliminares para la caracterización de los metabolitos de la hoja. Se observó que el extracto acuoso producido a través de las hojas de *S. polyphyllum* obtuvo el 100% de mortalidad de larvas de *A. aegypti* después de 48 horas de exposición. La toxicidad no se observó contra las pruebas de *A. salina* y *Allium cepa* mostraron interferencia en el proceso mitótico que atestigua la citotoxicidad, pero no se observó acción genotóxica. Por lo tanto, la actividad larvicida del extracto acuoso de la hoja de *S. polyphyllum* contra los *Aedes aegypti* larvas y de la actividad citotóxica de los extractos.

Palabras clave: Extractos de plantas; Matorral; Índice mitótico; *Artemia Salina*; Fitoquímica.

1. Introdução

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

Algumas espécies pertencentes ao gênero *Stryphnodendron* são muito utilizadas por populações tradicionais devido às suas propriedades medicinais anti-inflamatórias (Melo et al., 2007), antimicrobianas (Baldivia et al., 2018; Ishida et al., 2006; Lopes et al., 2005), antiulcerogênicas (Baldivia et al., 2018; Audi et al., 1999), antioxidantes e cicatrizantes (Lopes et al., 2005)

que possui. Entretanto, apesar da comprovação do uso medicinal da espécie estudada, os elevados teores de terpenóides, em especial taninos (Souza et al., 2018), podem ser tóxicos para o homem e outras espécies animais (Santoro et al., 2004). O pólen das flores de *S. polyphyllum* foi identificado como causador de sintomas semelhantes às doenças provocadas pelo sacbrood vírus (SBV e TSBV) em abelhas, sendo nomeada de ‘Cria Ensacada Brasileira’ (Carvalho et al., 2004). Outros estudos relacionam *S. polyphyllum* à nefrotoxicidade em bovinos (Santoro et al., 2004), atividade acaricida (Vinaud et al., 2008), caramujicida (Vinaud et al., 2008; Bezerra, et al., 2002), tripanocida (Holetz et al., 2005), toxicidade hepática, alterações fetais e morte embrionária em ratos (Vital & Guerra, 1987).

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

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

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

Dados recentes apontam que *A. aegypti* apresenta mecanismos de resistência aos inseticidas e larvicidas sintéticos utilizados nas desinsetizações necessárias à redução populacional desta espécie, o que dificulta o controle da disseminação das doenças por ele transmitidas (Matos et al., 2022; Torawane et al., 2021; Brasil, 2019). Em razão destas informações, vislumbra-se os metabólitos secundários bioativos, oriundos principalmente de plantas, como alternativa para a produção de novas moléculas capazes de exercer atividade no controle dos vetores sem gerar resíduos agressores no meio ambiente (Silva, 2019). Desta forma, registra-se que a busca de estratégias de controle de reprodução dos mosquitos, o combate eficaz e seguro

da disseminação constituem desafios técnico-científicos cada vez mais requisitados pelos órgãos públicos de saúde e diferentes setores da iniciativa privada (Matos et al., 2022).

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

2. Material e métodos

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

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

2.1 Preparo do Material vegetal

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

O extrato aquoso de pólen foi produzido por meio da adição de 2 gramas de pólen em 200 mL de água destilada, e o aquoso das folhas obtido a partir de 100g do material vegetal moído adicionado em 1000 mL de água destilada. Ambos foram aquecidos em banho-maria a 40°C, durante 60 minutos. Após o período supracitado, a solução foi filtrada em funil de vidro com gaze e algodão (Cruz; Ribeiro & Vasconcelos, 2022; Nery et al., 2010).

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

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

Aliquotas dos extratos foram submetidas à determinação da matéria seca a 105 °C, para determinação das concentrações testadas (Cunniff, 1995) (Tabela 1).

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

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

Fonte: Autores.

2.2 Bioensaios em larvas de *Aedes aegypti*

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

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

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

2.3 Bioensaios de citotoxicidade e genotoxicidade

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

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

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

Para as diferentes concentrações foram utilizados um total de 45 bulbos pequenos de cebolas, da mesma variedade e de tamanho uniforme, submetidos a 15 tratamentos: treze concentrações acima descritas, mais um controle positivo (CP) composto por solução de sulfato de cobre ($0,0006 \text{ mg.mL}^{-1}$) e um controle negativo (CN) composto por água destilada. O ensaio foi realizado em triplicata e montado em recipientes plásticos de 50 mL (Silva et al., 2013).

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

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

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

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

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

2.4 Análise estatística

A aplicação dos extratos sobre os náuplios de *Artemia salina* e larvas de *Aedes aegypti* foi realizada em delineamento inteiramente casualizado em parcelas subdivididas (tratamentos definidos como as concentrações e períodos como as sub parcelas). Os dados foram submetidos à análise de variância e os valores médios comparados por meio do teste Scott-Knott ($p < 0,05$), utilizando-se o pacote estatístico SAEG 9.1 (SAEG, 2007). A concentração capaz de ocasionar mortalidade de 50% e 90% das larvas foi estimada pela análise de regressão Probit ($p < 0,05$).

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

As médias de células normais e anormais foram submetidas à análise de variância e, para as causas de variações significativas, foi utilizado o teste de Skott Knott ao nível de $p < 0,05\%$ de probabilidade para comparação das médias. Foi usado o mesmo programa estatístico (SAEG, 2007).

3. Resultados

3.1 Prospecção fitoquímica

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

Tabela 2: Testes identificadores empregados na análise fitoquímica do extrato aquoso foliar (EAF) de *Stryphnodendron polyphyllum*.

Classe fitoquímica	Extrato Aquoso
Flavonoides	
Cloreto férrico 2%	+++
Cloreto de alumínio	++

Hidróxido de sódio	++
Reação de Shinoda	++ (a)
Saponinas	

Teste qualitativo da espuma	
1	+
2	++
3	++
4	++
5	+++
6	+++
7	+++
8	+++
9	+++
10	+++
Taninos	

Gelatina 2,5%	+++
Cafeína 1%	+++
Acetato de cobre	+++
Cloreto férrico	+++
Alcaloides	

Ácido sulfúrico	-
Mayer	Precipitado
Dragendorff	Precipitado
Bertrano	Precipitado
Liebermann-Burchard	Precipitado
Compostos fenólicos	

Cloreto férrico	+++
Hidróxido de sódio	+++
Cloreto de magnésio	++

Fonte: Autores (2022).

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

3.2 Atividade larvicida

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

Tabela 3: Mortalidade das larvas de *A. aegypti* expostas aos extratos aquoso do pólen (EAP), extrato aquoso das folhas (EAF), extrato etanólico das folhas (EEF), e extrato hidroalcoólico das folhas (EHF) de *Stryphnodendron polyphyllum* em função dos períodos de 24 e 48 horas em diferentes concentrações.

Tratamentos	24h	48h	Desvio Padrão 24h	Desvio Padrão 48h
EAP(mg/mL)				
21,11	0Aa	0Aa	0	0
10,55	0Aa	0Aa	0	0
5,75	0Aa	0Aa	0	0
2,73	0Aa	0Aa	0	0
Água Destilada	0Aa	0Aa	0	0
EAF (mg/mL)				
25,53	98,33 Aa	100 Aa	0,023	0
19,14	93,33 Ba	98,33 Bb	0,023	0,023
12,76	76,66 Ca	90 Cb	0,062	0
6,38	13,33 Da	71,66 Db	0,09	0,143
3,19	3,33 Ea	8,33 Eb	0,047	0,084
Água Destilada	0 Fa	0 Fb	0	0
EEF (ppm)				
7200	7,5 Aa	13,75 Ab	0,04	0,062
3600	1,25 Ba	17,5 Bb	0,023	0,023
1800	5 Ca	15 Cb	0,047	0,07
900	16,25 Da	43,75 Db	0,154	0,239
700	5 Da	22,5 Eb	0,094	0,248
600	1,25 Ea	11,25 Fb	0,023	0,04

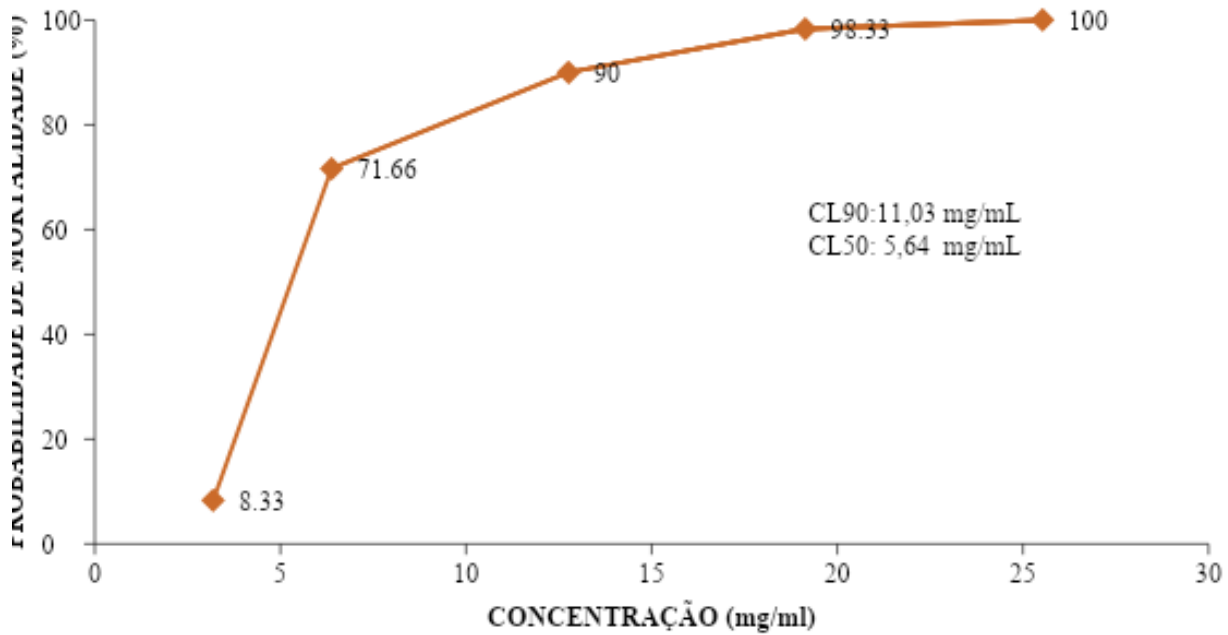
400	10 Fa	35 Gb	0,0623	0,0623
200	2,5 Fa	30 Hb	0,023	0,04
Água Destilada	0 Ga	0 Ia	0	0
EHF (ppm)				
7200	13,33 Aa	58,33 Ab	6,236	10,274
3600	16,66 Ba	48,33 Bb	10,27	8,498
1800	11,66 Ca	20 Bb	9,428	14,719
900	11,66 Da	31,66 Db	6,236	2,357
700	3 Da	15 Eb	4,714	4,082
600	10 Ea	16,66 Fb	4,082	8,498
400	10 Ea	43,33 Gb	4,082	6,236
200	21,66 Fa	46,66 Hb	6,236	10,274
Água Destilada	0 Ga	0 Ia	0	0

Fonte: Autores (2022).

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

A concentração letal capaz de ocasionar a morte de 50% (CL_{50}) e 90% (CL_{90}) dos indivíduos sob efeito do EAF foi estimada em $\geq 5,64$ e em $\geq 11,03$ mg/mL, respectivamente (Gráfico 1.) No entanto, não foi possível estabelecer valores para as CL_{50} e CL_{90} dos EEF e EHF, pois ambos não demonstraram relação entre as doses utilizadas no presente estudo e o tempo de exposição, apontando, desta forma, mortalidade ocasional (aleatória).

Gráfico 1. Probabilidade de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* depois de 48 horas de tratamento com o extrato aquoso das folhas de *Stryphnodendron polyphyllum*.



Fonte: Autores (2022).

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



Fonte: Autores (2022).

3.3 Teste de toxicidade em náuplios de *Artemia salina*

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

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

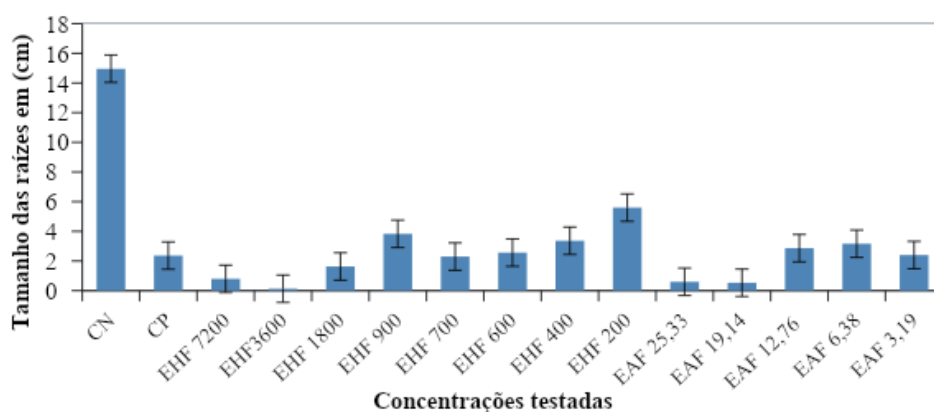
<i>Artemia salina</i>		
EAF (mg/mL)	24 h	Desvio Padrão 24h
25,53	100a	0
19,14	100a	0
12,76	100a	0
6,38	100a	0
3,19	63,33b	0,942
Água Destilada	0	0
EEF (ppm)		
7200	83,33a	0,047
3600	43,33b	0,047
1800	43,33b	0,094
900	26,67c	0,094
700	23,33c	0,047
600	16,67c	0,094
400	16,67c	0,047
200	13,33c	0,047
Água Destilada	0	0
EHF (ppm)		
7200	80a	1,11
3600	63,33a	0,124
1800	40b	0,081
900	30b	0,047
700	30b	0,081
600	26,67b	0,081
400	23,33b	0,124
200	23,33b	0,124
Água Destilada	0	0

Fonte: Autores (2022).

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

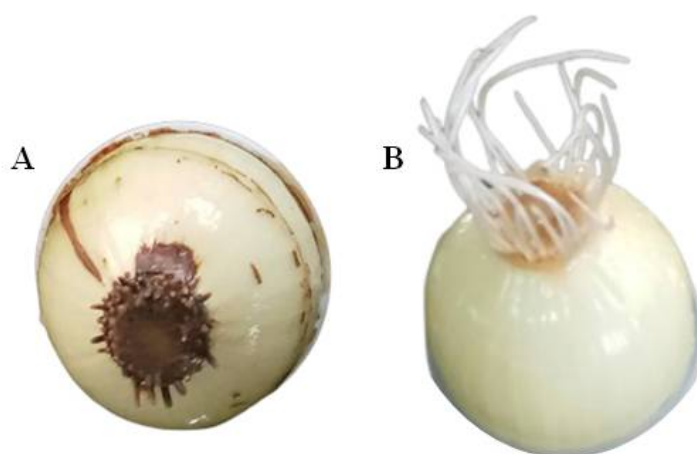
O período de exposição de 120 horas dos bulbos de cebola aos extratos permitiu observar variações no tamanho e aparência das raízes, com diferenças significativas entre os tratamentos (Gráfico 2). Os diferentes os extratos, nas concentrações intermediárias, inibiram o crescimento radicular de forma semelhante ao controle positivo (CuSO_4), indicando interferências no ciclo de divisão celular, além de causarem escurecimento e enrijecimento (Figura 2).

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



Fonte: Autores (2022).

Figura 2. A- Cebola com alterações no crescimento radicular e na coloração, após exposição de 120 horas ao extrato aquoso foliar (23,35 mg/mL). B- Cebola utilizada como controle negativo após 120 horas de exposição, apresentando características normais de desenvolvimento radicular.



Fonte: Autores (2022).

Verificou-se que não ocorreram alterações cromossômicas nos bulbos submetidos aos extratos de *S. polyphyllum* (Tabela 5.). Contudo foi possível observar a interrupção do processo de divisão celular, pois além de estacionar visualmente o

crescimento das raízes, o número de células em interfase foi superior ao de células em processo mitótico em todas as concentrações avaliadas. Anomalias cromossômicas foram observadas apenas nas raízes expostas ao controle positivo (Figura 3).

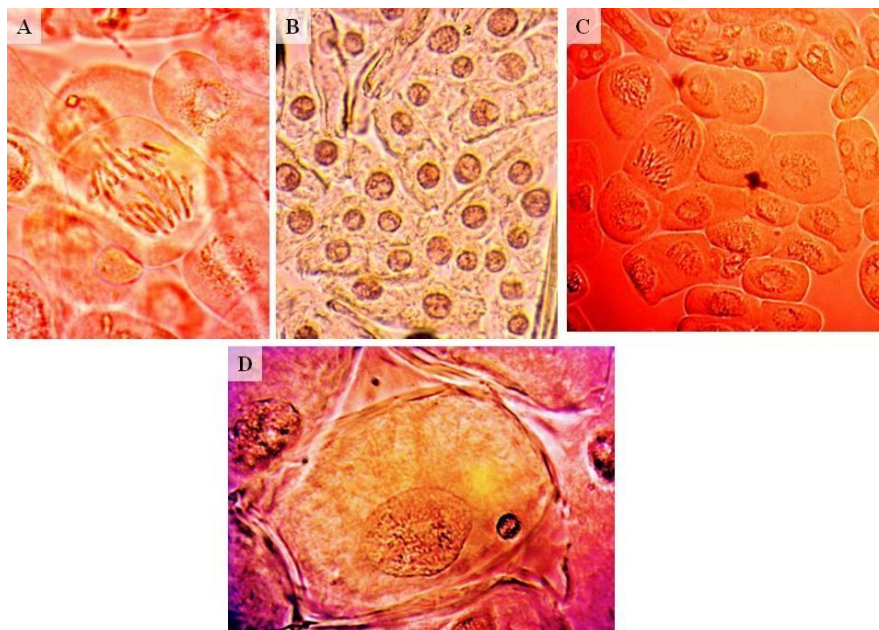
Tabela 5. Índice mitótico (IM) e de anomalias (%) encontradas nas células meristemáticas de cebola tratadas com diferentes infusões de *Stryphnodendron polyphyllum*.

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

Número total de células analisadas por tratamento=2250

Fonte: Autores (2022).

Figura 3. A- Célula em estágio de anáfase. B- Conjunto de células em interfase. C- Células em diferentes estágios de divisão celular. D- Célula de *A. cepa* com presença de micronúcleo após 120 horas em contato com o controle positivo de (CuSO₄).



Fonte: Autores (2022).

4. Discussão

O presente trabalho evidenciou por meio de análises fitoquímicas grupos moleculares encontrados nas folhas de barbatimão (*S. polyphyllum*) condizentes com os estudos pré existentes. Santos et al., 2002 e Oliveira & Figueiredo, 2007 ao realizarem análises fitoquímicas de diferentes espécies do gênero *Stryphnodendron*, descreveram a presença de polifenóis, delfinidinas, flavonoides glicosídicos, ácido gálico, catequinas, epicatequinas, polímeros, compostos fenólicos, ácido cafeico, rutina, saponinas e cumarinas além de taninos condensados e fenólicos nas folhas de *S. polyphyllum*, que corroboram com os dados fitoquímicos preliminares gerados.

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

Os extratos produzidos a partir dos grãos de pólen de *Stryphnodendron polyphyllum* não apresentaram toxicidade para as larvas do mosquito *A. aegypti* nas concentrações utilizadas no presente trabalho, embora represente um grande problema para a apicultura brasileira por provocar a morte das larvas de diversas espécies abelhas (Mendes, 2019). Por outro lado, os resultados obtidos através do extrato aquoso foliar (EAF) de *S. polyphyllum* sugerem viabilidade em sua utilização como potencial larvicida, pois foram notados sintomas de intoxicação de forma mais intensa, e ainda que as larvas tenham utilizado mecanismos de defesa como expulsão do conteúdo intestinal, não foram capazes de sobreviver (Matos et al., 2022 e Santos et al., 2015).

Nos resultados obtidos pode ser observado que a adoção de tal estratégia não foi o suficiente para evitar os efeitos nocivos do extrato, uma vez que a taxa de sobrevivência das larvas diminuiu significativamente após o teste larvicida, e atingiu

100% de mortalidade na concentração de 25, 53 mg/mL, no intervalo de avaliação de 48 horas. Já os extratos etanólicos e hidroalcoólicos foliares foram capazes de ocasionar a morte das larvas, contudo não foi possível definir a relação entre as concentrações utilizadas e os índices de mortalidade. Apesar disso, sintomas de toxicidade frente às sobreviventes foram observados. As larvas apresentaram perda de mobilidade, o que segundo Barreto et al., 2007 é o primeiro indicativo de ação larvicida de um extrato. Foram observados também a utilização de alguns mecanismos de defesa como deterioração e indução de eliminação do conteúdo intestinal. Matos et al., 2022 e Gusmão et al., 2002 descrevem este mecanismo como uma tentativa de eliminar substâncias tóxicas do organismo.

As diferenças observadas nos padrões de atividade dos extratos vegetais podem ser em parte atribuídas à natureza química dos compostos e à composição química dos extratos (AhbiRami et al., 2014; Porto et al., 2017). Os extratos vegetais podem ter uma variedade de efeitos e mostrar atividades larvicidas segundo o solvente utilizado (Zhu e Tian, 2011; Chapman, 2012; Lija-Ecaline et al., 2015). Lima et al., 2009 ao realizar análises fitoquímicas de extratos obtidos a partir de diferentes solventes com *Sonchus oleraceus* observou que o extrato etanólico não era capaz de extrair Taninos A-I nem cumarinas, compostos estes com ação antimicrobiana e antiparasitária já descritas.

No que se diz respeito à fitotoxicidade dos extratos deste trabalho em náuplios de *Artêmia salina* é possível afirmar que estes apresentaram baixa toxicidade, uma vez que a Organização Mundial da Saúde (OMS) considera tóxicas substâncias com valores de CL_{50} abaixo de 1000 ppm em *Artemia salina* (Meyer et al., 1982) e os extratos utilizados no presente estudo tiveram sua CL_{50} estabelecidas em ≥ 3094 ppm (EEA) e ≥ 37067 ppm (EHA). Esses testes em *A. salina* permitem caracterizar as ações de extratos naturais sobre organismos de vida aquática, ajudando a identificar compostos com possíveis aplicações de controle em ambientes naturais, seja antifúngico, inseticida ou moluscicida, sem afetar espécies não-alvo como peixes, crustáceos, zooplânctons e demais organismos (Rosa et al., 2016; Cansian et al., 2017; Cruz, Ribeiro & Vasconcelos, 2022).

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

Não foram observadas anomalias cromossômicas nas raízes de *Allium cepa* expostas aos extratos de *S. polyphyllum*, contudo a diminuição do IM sugere a presença de substâncias capazes de promoverem a anulação da atividade mitótica, isso se deve à presença de constituintes químicos com potencial citotóxico no ciclo celular das plantas, afetando o desenvolvimento meristemático (Haq et al.; 2017; Ruiz et al.; 2016).

5. Conclusão

O extrato aquoso das folhas de *Stryphnodendron polyphyllum* apresentou potencial larvicida frente ao *Aedes aegypti*, e causou altos índices de mortalidade em todas as concentrações avaliadas. Por outro lado, para nos extratos alcoólicos e hidroalcoólicos, embora apresentem ação larvicida, não foi observado padrão na taxa de mortalidade que possibilitasse a

determinação do CL₅₀ e CL₉₀, parâmetros consagrados em ensaios biológicos para determinação do potencial larvicida. Além disso, os extratos apresentaram baixa toxicidade em espécies não-alvo e não demonstraram atividade mutagênica, ou seja genotóxico, porém interferiram no índice mitótico sugerindo atividade citotóxica dos extratos.

Agradecimentos

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

Referências

- AhbiRami, R.; Zuharah, W. F.; Thiagaletchumi, M.; Subramaniam, S. & Sundarasekar, J. (2014). Larvicidal efficacy of different plant parts of railway creeper, Ipomoea cairica extract against dengue vector mosquitoes, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Insect Science*, 14 (1), 180–186.
- Andrade, N. F.; Prado, E. A. J.; Albarado, Á. J.; Sousa, M. F. D. & Mendonça, A. V. M. (2020). Análise das campanhas de prevenção às arboviroses dengue, zika e chikungunya do Ministério da Saúde na perspectiva da educação e comunicação em saúde. *Saúde em Debate*, 44, 871-880.
- Audi, E. A.; Toledo, D. P.; Peres, P. G.; Kimura, E.; Pereira, W. K. V.; De Mello, J. C. P.; Nakamura, C.; Alves-do-Prado, W.; Cuman, C. A.; Bersani-Amado, C. A. (1999). Efeitos antiulcerogênicos gástricos de *Stryphnodendron adstringens* em ratos. *Phytother*, 13, 264-266.
- Bagatini, M. D.; Silva, A. C. F. D. & Tedesco, S. B. (2007). Uso do sistema teste de Allium cepa como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17, 444-447.
- Baldivia D. D. S.; Leite D.F.; Castro D. T. H.; Campos J. F.; Santos U. P. D.; Paredes-Gamero E.J.; Carollo C. A.; Silva D. B.; de Picoli Souza K.; Dos Santos E. L. (2018). Evaluation of In Vitro Antioxidant and Anticancer Properties of the Aqueous Extract from the Stem Bark of *Stryphnodendron adstringens*. *Int J Mol Sci*. 17, 19(8):2432. doi: 10.3390/ijms19082432. PMID: 30126115; PMCID: PMC6121951.
- Barreto, C. F., Cavasin, G. M., Garcia da Silva, H. H., & Da Silva, I. G. (2007). Study of Morpho-histological Changes in *Aedes aegypti* Larves (Diptera, Culicidae) Submitted to the *Sapindus saponaria* Lin (Sapindaceae) Gross Ethanolics. *Revista de Patologia Tropical*, 35 (1), 37-57. <https://doi.org/10.5216/rpt.v35i1.1891>.
- Benelli, G.; Govindarajan, M.; Rajeswary, M.; Senthilmurugan, S.; Vijayan, P.; Alharbi, N. S.; Kadaikunnan, S. & Khaled, J. M. (2017). Larvicidal activity of *Blumea eriantha* essential oil and its components against six mosquito species, including Zika virus vectors: the promising potential of (4E,6Z)-allo-ocimene, carvotanacetone and dodecyl acetate. *Parasitology Research*, 116 (4), 1175–1188. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5395-0>.
- Bezerra, J. C. B., Silva, I. A., Ferreira, H. D., Ferri, P. H., & Santos, S. C. (2002). Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. *Fitoterapia*, 73 (5), 428-430.
- Brasil. (2001). Fundação Nacional de Saúde. Dengue. Instruções para pessoal de combate ao vetor. Brasília; Funasa. http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf.
- Brasil. (2019). Ministério da Saúde alerta para aumento de 149% dos casos de dengue no país. www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45257-ministerio-da-saude-alerta-para-aumento-de-149-dos-casos-de-dengue-no-pais.
- Brasil. (2016). Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica. *Boletim epidemiológico*, 47 (27), 1-10. <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/30/2016-021.pdf>
- Cabrera, G. L. & Rodriguez, D. M. G. (1999). Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. *Mutation Research Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 426 (2), 211-214.
- Cansian, R. L.; Vanin, A. B.; Orlando, T.; Piazza, S. P.; Puton, B. M. S.; Cardoso, R. I.; Gonçalves, I. L.; Honaiser, T. C.; Paroul, N., & Oliveira, D. (2017). Toxicity of clove essential oil and its ester eugenyl acetate against *Artemia salina*. *Brazilian Journal of Biology, São Paulo*. 77 (1), 155 – 161.

Carvalho, A. C. P. & Message D. (2004). A scientific note on the toxic pollen of *Stryphnodendron polyphyllum* (Fabaceae, Mimosoidae) wich causes sacbrood-like symptoms. *Apidologie*, 35, 89-90.

Chapman, RF. (2012). The insects structure and function. *Cambridge: Cambridge University Press*,5. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139035460>.

Cruz, J. P.; Ribeiro, F. & de Oliveira Vasconcelos, V. (2022). Molluscicidal activity of extracts of plants from the Cerrado against *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Research, Society and Development*, 11 (8), e20611830656-e20611830656.

do Carmo, L. R.; Leal, L. S. & Ribeiro, L. R. (2020). Allium cepa e teste do Micronúcleo como bioindicadores de citogenotoxicidade em extratos aquosos de plantas medicinais. *Brazilian Journal of Development*, 6 (10), 82419-82430.

Galvão, M.; Miranda, D. P.; Costa, G. D. M.; Silva, A. B. D. & Karsburg, I. V. (2015). Potencial mutagênico em águas coletadas em diferentes pontos no perímetro urbano no município de Alta Floresta–MT através do teste Allium (*Allium cepa*). *Enciclopédia Biosfera*, 11 (21), 2373.

Gusmão, D. S.; Páscoa, V.; Mathias, L.; Vieira, I. J. C.; Braz-Filho, R. & Lemos, F. J. A. (2002). Derris (*Lonchocarpus*) urucum (*Leguminosae*) Extract Modifies the Peritrophic Matrix Structure of *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(3), 371-375. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000300017>.

Haq, I.; Kumar, S.; Raj, A.; Lohani, M. & Satyanarayana, G. N. V. (2017). Genotoxicity assessment of pulp and paper mill effluent before and after bacterial degradation using Allium cepa test. *Chemosphere*, 169, 642-650.

Holetz, F. B.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B. P.; Mello, J. C. P.; Morgado-Díaz, J. A.; Toledo, C. E. M. D. & Nakamura, CV (2005). Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpessoai*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100, 397-401.

Ishida, K.; de Mello, J. C. P.; Cortez, D. A. G.; Filho, B. P. D.; Ueda-Nakamura, T. & Nakamura, C. V. (2006). Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58 (5), 942-949.

Khan, I. S.; Ali, M. N., Hamid, R. & Ganie, S. A. (2020). Genotoxic effect of two commonly used food dyes metanil yellow and carmoisine using *Allium cepa* L. as indicator. *Toxicology reports*, 7, 370-375.

Lija-Escaline, J.; Senthil-Nathan, S.; Thanigaivel, A.; Pradeepa, V.; Vasantha-Srinivasan, P.; Ponsankar, A.; Edwin, ES.; Selin-Rani, S. & Abdel-Megeed, A. (2015). Physiological and biochemical effects of botanical extract from *Piper nigrum* Linn (Piperaceae) against the dengue vector *Aedes aegypti* Liston (Diptera: *Culicidae*). *Parasitology research*, 114 (11), 4239-4249. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4662-1>.

Lima, A.G.; Souza, V.C.; Paula-Souza, J.; Scalon, V.R. (2020). *Stryphnodendron* in Flora do Brasil 2020. *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. <https://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB83739>.

Lima, J. M.; Silva, C. A.; Rosa, M. B.; Santos, J. B.; Oliveira, T. G. & Silva, M. B. (2009). Prospecção fitoquímica de *Sonchus oleraceus* e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. *Planta daninha*, 27, 7-11.

Lopes, G.C.; Sanches, A C.C.; Nakamura, C.V.; Dias Filho B.P.; Hernandez, L.; Mello, J. C. P. (2005). Influência de extratos de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. e *Stryphnodendron obovatum* Benth. na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *Journal of Ethnopharmacology*, 99, 265-272.

Lorenzi, H. (1998). Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa, SP. *Plantarum*, 2, 186.

Matos, R. L. F.; Souza, N. N.; Santos, S. M.; Rafael, A. F.; Duarte, E. R.; Oliveira, K. B. A.; Abreu, F. V. S.; Morais-Costa, F.; Arrudas, S. R.; de Azevedo, I. F. P.; Nunes, Y. R. F.; Moura, A. P. V. & Vieira, T. M. (2022). *Journal of Agricultural Science*, 14 (2), 63-69. ISSN 1916-9752 E-ISSN 1916-9760.

Melo, J.O.; Endo, T.H.; Bersani-Amado, L.E.; Svidzinski, A.E.; Baroni, S.; Mello, J.C.P.; Bersani-Amado, C.A. (2007). Efeito da casca de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) em modelos animais de nocicepção. *Revista Brasileira de Ciência e Farmacologia*, 43, 465-469.

Menezes Filho, A. C. P. & de Souza Castro, C. F. (2019). Classes fitoquímicas de metabólitos secundários em extratos etanólicos foliares de espécies do cerrado brasileiro. *Revista Saúde & Ciência Online*, 8 (1), 45-61.

Message, D.(1997). Management and disease problems of africanized bees in Brazil. Londres: *The Central Association of Bee-Keepers*, 15.

Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E. & McLaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta médica*, 45 (05), 31-34.

Mondin, M.& Aguiar-Perecin, M.L.R. (2009). Coloração pelo Método de Feulgen. [HTTP://www.genetica.esalq.usp.br/citogenetica/protocolos/Feulgen.pdf](http://www.genetica.esalq.usp.br/citogenetica/protocolos/Feulgen.pdf).

Monteiro, L. C. C. F.; Araújo, E. I. M.; Oliveira, A. D.; Alves, L. A. & Bertini, L. M. (2015). Atividade antioxidante, teor de fenóis e atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti* de *Vitex gardneriana* Schauer. *Blucher Chemistry Proceedings*, 3 (1), 292-300.

Monteiro, V. B. & Araujo, J. A. D. (2020). Aspectos socioeconômicos e climáticos que impactam a ocorrência de dengue no Brasil: análise municipal de 2008 a 2011 por regressões quantílicas para dados em painel. <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/53224>.

Mouco, G. B., Bernardino, M. J. & Cornélio, M. L. (2003). Controle de qualidade de ervas medicinais. *Biotecnologia, ciência e desenvolvimento* 31, 68-73.

Nery, P. S., Nogueira, F. A., Martins, E. R., & Duarte, E. R. (2010). Effects of *Anacardium humile* leaf extracts on the development of gastrointestinal nematode larvae of sheep. *Veterinary Parasitology*. 171, 361-364.

Oliveira, A. L. S. & Figueiredo, A. D. L. (2007). Prospecção Fitoquímica das Folhas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). *Revista Brasileira de Biociências*, 5 (52), 384-386.

Oliveira, V. R.; Scapim, C. A.; Oliveira J. R. & PIRES, N. M. (1996). Efeito do herbicida trifluralin sobre a germinação de sementes e índice mitótico em raízes de milho (*Zea mays* L.). *Revista Unimar*, 18, 537-544.

Parvan, L. G.; Leite, T. G.; Freitas, T. B.; Pedrosa, P. A. A.; Calixto, J. S. & de Andrade Agostinho, L. (2020). Bioensaio com *Allium cepa* revela genotoxicidade de herbicida com flumioxazina. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 11, 10-10.

Pérez, G. L. (2006). Dengue, un problema social reemergente en América Latina. Estrategia para su erradicación. *Biotecnología Aplicada*, 23(2), 130-136.

Pires, N. D. M.; Souza, I. R. P.; Prates, H. T.; Faria, T. C. L. D.; Filho, I. A. P. & Magalhães, P.C. (2001). Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13, 55-65.

Porto, K. R. D. A.; Motti, P. R.; Yano, M.; Roel, A. R.; Cardoso, C. A. L. & Matias, R. (2017). Screening of plant extracts and fractions on *Aedes aegypti* larvae found in the state of Mato Grosso do Sul (Linnaeus, 1762) (*culicidae*). *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 89 (2), 895–906. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720150017>.

Rawani, A.; Haldar, K. M.; Ghosh, A. & Chandra, G. (2009). Larvicidal activities of three plants against filarial vector *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 105 (5), 1411–1417. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1573-z>.

Rosa, C. S.; Veras, K. S.; Silva, P. R.; Lopes-Neto, J. J.; Cardoso, H. L. M., Alves, L. P. L.; Brito, M. C. A.; Amaral, F. M. M.; Maia, J. G. S.; Monteiro, O. S., & Moraes, D. F. C. (2016). Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 18(1), 19–26.

Ruiz, J. C.; Rebaza, L. C.; Villalobos, K. H.; SilvaPereda, L.; & Cunya, F. V. (2016). Efecto del aluminio y el pH en el crecimiento de raíces de *Phaseolus vulgaris* var. caballero en condiciones de laboratorio. *REBIOL*, 36 (2), 4-15.

Santoro, K. R.; Vieira, M. E. Q.; Queiroz, M. L.; Queiroz, M. C.; Barbosa, R. P. (2004). Efeito do tanino de *Stryphnodendron spp.* sobre a longevidade de abelhas *Apis mellifera* L. (abelhas africanizadas). *Archivos de zootecnia*, 53 (203), 281-291.

Santos, A. M.; Marques da Fonseca, A.; da Silva Quirino, T.; Lisboa Guterres Fernandes, O. & Silva Souza, M. M. (2019). Avaliação da atividade larvicida do extrato etanólico das folhas e flores do Cambará de Chumbo (*Lantana camara*) frente ao *Aedes aegypti*. 57º Congresso Nacional de Química. <http://www.abq.org.br/cbq/2017/trabalhos/7/12519-23110.html>.

Santos, I. P. ; dos, Cruz, R. C. D.; da, Carvalho, K. da S.; Silva, S. L. da C. & Gualberto, S. A. (2015). Bioatividade de extratos aquosos da parte aérea de *Poinciana bracteosa* sobre larvas de *Aedes aegypti*. *Enciclopédia Biosfera*, 11(21), 2908-2915. Retrieved from [http://www.conhecer.org.br/enciclop/2015b/multidisciplinar/Bioatividade de extratos.pdf](http://www.conhecer.org.br/enciclop/2015b/multidisciplinar/Bioatividade%20de%20extratos.pdf)

Santos, S. C.; Costa, W. F.; Ribeiro, J. P.; Guimaraes, D. O.; Ferri, P. H.; Ferreira, H. D. & Seraphin, J. C. (2002). Tannin composition of barbatimão species. *Fitoterapia*, 73 (4), 292-299.

Silva, B. C. G.; Silva, A. P. R.; Karsburg, I. V.; Castro, J. C.; Barros, G. S. & Lucca, C. Z. (2021). A citotoxicidade do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville) com o uso dos sistemas *Allium cepa* e *Pisum sativum*. *Brazilian Journal of Development*, 7(3), 31230-31241.

Silva, B.M.; Nishimuta, H.A.; Santos, E.T.B.; Costa, C.D.N.G.; Rossi, A.A.B. (2013). Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de citotoxicidade de substâncias usadas na conserva de *Olea europaea* L. UNEMAT/AF.

Silva, N. L. A.; Miranda, F. A. A. & da Conceição, GM (2010). Triagem fitoquímica de plantas de Cerrado, da área de proteção ambiental municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. *Scientia plena*, 6 (2), 1-17.

Silva, T. M. S. D. (2019). *Indigofera suffruticosa* Mill (*Fabaceae*): estudo da biologia reprodutiva de machos de *Aedes aegypti* (Master's thesis, Universidade Federal de Pernambuco).

Souza-Moreira, T. M.; Queiroz-Fernandes, G. M. & Pietro, RCLR (2018). *Stryphnodendron* species known as “barbatimão”: a comprehensive report. *Molecules*, 23 (4), 910.

Subramaniam, J.; Kovendan, K.; Kumar, P. M.; Murugan, K. & Walton, W. (2012). Mosquito larvicidal activity of *Aloe vera* (Family: *Liliaceae*) leaf extract and *Bacillus sphaericus*, against Chikungunya vector, *Aedes aegypti*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19 (4), 503–509. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.07.003>.

Taylor, N. M.; Boya, C. A.; Herrera, L.; Moy, J.; Ng, M.; Pineda, L.; Almanza, A.; Rosero, D.; Coronado, L. M.; Correia, R.; Santamaria, R.; Caballero, Z.; Durant-Archibold, A. A.; Tidgewell, K. J.; Balunas, M. J.; Gerwick, W. H.; Spadafora, A.; Gutierrez, M. & Spadafora, C. (2019). Analysis of the antiparasitic and anticancer activity of the coconut palm (*Cocos nucifera* L. *Arecaceae*) from the natural reserve of Punta Patiño, Darién. *Plos one*, 14 (4), e0214193.

Torawane, S.; Andhale, R.; Pandit, R.; Mokat, D & Phuge, S. (2021). Screening of some weed extracts for ovicidal and larvicidal activities against dengue vector *Aedes aegypti*. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 82 (1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s41936-021-00233-y>.

Vanhaecke, P., Persoone, G., Claus, C., & Sorgeloos, P. (1981). Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 5 (3), 382-387.

Vinaud, M C.; Lino Junior, R. D. S. & Bezerra, J. C. B. (2008). Activity of *Stryphnodendron polyphyllum*, a plant from the Brazilian savannah, against hemocytes of *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Revista de patologias tropicais*. 237-246.

Vitral, G. S. F.; Peters, V. M. & Guerra, M. O. (1987). Mecanismos da ação embriotóxica do barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum* M.). *Reprodução e Climatério*, 3, 222-226.

WHO. (1981). Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquitoes larvae to insecticide (No.Who/Vbc/81.807). World Health Organization.

WHO. (2009). Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food: summary (Environmental health criteria; 240). iris.pps.who.int/bitstream/handle/10665/44065/WHO_EHC_240_15_summary_por.pdf;jsessionid=9396224C8B8875AFE612F00781DD267?sequence=155.

Zhu, L. & Tian, Y (2011). Chemical composition and larvicidal effects of essential oil of *Blumea martiniana* against *Anopheles anthropophagus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4 (5), 371–374. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60106-5](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60106-5).

ANEXO 1

Submission Preparation Checklist

As part of the submission process, authors are required to check off their submission's compliance with all of the following items, and submissions may be returned to authors that do not adhere to these guidelines.

- The file in Microsoft Word submitted to the Journal **does not have** the names of the authors; The contribution is original and unpublished, and is not being evaluated for publication by another journal; The text follows the style standards and bibliographic requirements described in [Author Guidelines](#).
- Publication cost (APC) | For Brazilian authors, the publication fee is R \$ 300,00 BRL (three hundred reais). For other authors, the publication fee is US\$ 100,00 (one hundred American dollars). The publication fee is charged only for accepted papers. **There is no submission fee.**

Author Guidelines

1) Text structure:

- Title in this sequence: English, Portuguese and Spanish.
- The authors of the article (must be placed in this sequence: name, ORCID, institution, e-mail). NOTE: The ORCID number is individual for each author, and it is necessary for registration at the DOI, and in case of error, it is not possible to register at the DOI).
- Abstract and Keywords in this sequence: Portuguese, English and Spanish (the abstract must contain the objective of the article, methodology, results and conclusion of the study. It must have between 150 and 250 words);
- Body of the text (must contain the sections: 1. Introduction, in which there is context, problem studied and objective of the article; 2. Methodology used in the study, as well as authors supporting the methodology; 3. Results (or alternatively, 3. Results and Discussion, renumbering the other subitems), 4. Discussion and, 5. Final considerations or Conclusion);
- References: (Authors, the article must have at least 20 references as current as possible. Both the citation in the text and the item of References, use the formatting style of the APA - American Psychological Association. References must be complete and updated Placed in ascending alphabetical order, by the surname of the first author of the reference, they must not be numbered, they must be placed in size 8 and 1.0 spacing, separated from each other by a blank space).

2) Layout:

- Word format (.doc);
- Written in 1.5 cm space, using Times New Roman font 10, in A4 format and the margins of the text must be lower, upper, right and left of 1.5 cm .;
- Indents are made in the text editor ruler (not by the TAB key);

- Scientific articles must be longer than 5 pages.

3) Figures:

The use of images, tables and illustrations must follow common sense and, preferably, the ethics and axiology of the scientific community that discusses the themes of the manuscript. Note: the maximum file size to be submitted is 10 MB (10 mega).

Figures, tables, charts etc. (they must have their call in the text before they are inserted. After their insertion, the source (where the figure or table comes from ...) and a comment paragraph in which to say what the reader must observe is important in this resource The figures, tables and charts ... must be numbered in ascending order, the titles of the tables, figures or charts must be placed at the top and the sources at the bottom.

4) Authorship:

The word file sent at the time of submission must NOT have the names of the authors.

All authors need to be included only in the journal's system and in the final version of the article (after analysis by the journal's reviewers). Authors should be registered only in the metadata and in the final version of the article in order of importance and contribution to the construction of the text. NOTE: Authors write the authors' names in the correct spelling and without abbreviations at the beginning and end of the article and also in the journal's system.

The article must have a maximum of 10 authors. For exceptional cases, prior consultation with the Journal Team is required.

5) Ethics and Research Committee:

Research involving human beings must be approved by the Research Ethics Committee.

6) Tutorial videos:

- New user registration: <https://youtu.be/udVFytOmZ3M>
- Step by step of submitting the article in the journal system: <https://youtu.be/OKGdHs7b2Tc>

7) Example of APA references:

- Journal article:

Gohn, M. G. & Hom, C. S. (2008). Theoretical Approaches to the Study of Social Movements in Latin America. *CRH Notebook*, 21 (54), 439-455.

- Book:

Ganga, G. M. D. ; Soma, T. S. & Hoh, G. D. (2012). *Course conclusion work (TCC) in production engineering*. Atlas.

- Web page:

Amoroso, D. (2016). *What is Web 2.0?* <http://www.tecmundo.com.br/web/183-o-que-e-web-2-0->

8) The journal publishes original and unpublished articles that are not postulated simultaneously in other journals or editorial bodies.

9) Doubts: Any doubts send an email to rsd.articles@gmail.com or dorlivete.rsd@gmail.com or WhatsApp (55-11-98679-6000)

Copyright Notice

Authors who publish with this journal agree to the following terms:

- 1) Authors retain copyright and grant the journal right of first publication with the work simultaneously licensed under a Creative Commons Attribution License that allows others to share the work with an acknowledgement of the work's authorship and initial publication in this journal.
- 2) Authors are able to enter into separate, additional contractual arrangements for the non -exclusive distribution of the journal's published version of the work (e.g., post it to an institutional repository or publish it in a book), with an acknowledgement of its initial publication in this journal.
- 3) Authors are permitted and encouraged to post their work online (e.g., in institutional repositories or on their website) prior to and during the submission process, as it can lead to productive exchanges, as well as earlier and greater citation of published work.

Privacy Statement

The names and addresses reported to this journal are for its exclusive use and will not be forwarded to any third party whatsoever.

Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/about/submissions>