

# Control del vector del dengue utilizando fracciones etéreas de dos plantas (Asteraceae) como larvicidas

## Dengue vector control using ether fractions from two plants (Asteraceae) as larvicide

Juan C. Álvarez-Londoño<sup>1</sup>, Irene Duarte-Gandica<sup>1</sup>, Oscar A. Aguirre-Obando<sup>2</sup> y Jorge A. Jiménez-Montoya<sup>1</sup>

1 Universidad del Quindío. Colombia. ayora21@gmail.com; iduarte@uniquindio.edu.co; jorjinmon@gmail.com

2 Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Departamento de Zoologia. Paraná, Brasil. oaaobando@gmail.com.

Recibido 24 Febrero 2012/Enviado para Modificación 3 Mayo 2012/Aceptado 7 Noviembre 2012

### RESUMEN

**Objetivo** Evaluar la actividad larvicida de dos fracciones etéreas de *Heliopsis oppositifolia* (L.) Drucey *Jaegeria hirta* (Lag.) Less en larvas de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) de 3-4 instar, en el municipio de Armenia, Quindío.

**Métodos** Se realizó la colecta y análisis fitoquímico preliminar de dos especies vegetales, *H. oppositifolia* y *J. hirta*. Fueron preparadas fracciones etéreas de las dos especies. Con estas fracciones, fueron evaluadas 11 concentraciones para determinar las concentraciones letales CL50, CL90 y CL95 después de 24 y 48h. Con los resultados de las CL50, CL90 y CL95, se simuló y construyó un modelo que describe la dinámica población-concentración letal.

**Resultados** La marcha fitoquímica preliminar permitió caracterizar en *H. oppositifolia* y *J. hirta* la presencia de: Taninos, flavonoides, quinonas, glicósidos cardiotónicos, esteroides, lactonas, terpenos, coumarinas y alcaloides. Las CL, 48 después para *J. hirta* (CL5024 CL9070 y CL9593 ppm) fueron menores que *H. oppositifolia* (CL5039, CL9077y CL9594 ppm). El ANOVA factorial confirmó esta tendencia, *J. hirta* (66 %, F=18.5, p<0.05) y *H. oppositifolia* (34 %, F=18.5, p<0.05). La simulación matemática sugiere que la aplicación cada 15 días de la CL50, y cada 30 días de las CL90 y CL95 de cualquiera de las dos especies, tienen la misma respuesta que la utilización de las CL90 y CL95 cada 30 días o la CL50 cada 15 días.

**Conclusión** Ambas especies poseen efecto larvicida. Sin embargo, *J. hirta* se mostró más promisorio como futuro bioinsecticida para el control de estados inmaduros de *Ae. aegypti*.

**Palabras Clave:** *Aedes*, relación dosis-respuesta a droga, epidemiología, extractos vegetales (fuente: DeCS, BIREME).

## ABSTRACT

**Objective** Evaluating the larvicidal activity of two ether fractions from Asteraceae (the aster, daisy or sunflower family, i.e. *Heliopsis oppositifolia* (L.) Druce (oxeye, sunflower-like) and *Jaegeria hirta* (Lag.) Less (weed-like)) on *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) final third instar or initial fourth instar larvae near the town of Armenia in the Quindío Department in Colombia.

**Methods** *H. oppositifolia* and *J. hirta* plants were collected and submitted to phytochemical analysis. Ether fractions were prepared from both species to assess 11 concentrations for determining LC50, LC90 and LC95 lethal concentrations after 24 and 48h. The LC50, LC90 and LC95 results were used to create a mathematical model for describing lethal population-concentration dynamics.

**Results** Phytochemical analysis identified tannins, flavonoids, quinones, cardiac glycosides, sterols, lactones, terpenes, coumarins and alkaloids in *H. oppositifolia* and *J. hirta*. LC after 48h regarding *J. hirta* (LC50 24, LC90 70 and LC95 93ppm) was lower than those for *H. oppositifolia* (LC50 39, LC90 77 and LC95 94 ppm). A factorial ANOVA test confirmed this trend: 66 %, F=18.5 and p<0.05 for *J. hirta* and 34 %, F=18.5 and p<0.05 for *H. oppositifolia*. The mathematical simulation model suggested that using LC50 every 15 days and LC90 and LC95 every 30 days from either of these species led to the same response compared to using LC90 and LC95 every 30 days or LC50 every 15 days.

**Conclusion** Both species had a larvicidal effect. However, *J. hirta* turned out to be more promising as an eventual bioinsecticide for controlling *A. aegypti* immature states.

**Key Words:** *Aedes*, dose-response relationship, drug, epidemiology, plant extract (source: MeSH, NLM).

El virus del dengue, es la arbovirosis más importante que afecta al hombre, su transmisión es dada a través del proceso alimenticio de hembras de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762). Se han realizados estudios para desarrollar una vacuna contra la enfermedad, pero dada su complejidad, la mejor forma de control continúa siendo el uso de insecticidas químicos. Sin embargo, el uso continuo de estos insecticidas ha seleccionado poblaciones resistentes, generando problemas en los programas de control de vectores (1-5). Una alternativa para el control del vector es la búsqueda de larvicidas de origen botánico, por ser una opción accesible, de bajo costo y menos nociva para el hombre y el ambiente (6-7).

Los larvicidas de origen botánico, son productos naturales que pertenecen al grupo de los llamados metabolitos secundarios, los cuales, incluyen una gama de productos químicos, entre los que sobresalen alcaloides, terpenoides, cumarinas, y fenoles. Los metabolitos secundarios no tienen una función conocida en los procesos fisiológicos de las plantas. Sin embargo, su

actividad biológica, como por ejemplo: control de vectores, entre otras, está bien documentada en la literatura sobre ecología química (8).

*H. oppositifolia* y *J. hirta*, pertenecen a la familia Asteraceae, una de las familias más grandes comparable en complejidad y número de especies con las orquídeas (9). *H. oppositifolia* y *J. hirta* se localizan principalmente en las zonas montañosas húmedas, comúnmente en condiciones de disturbio (10) y, desde el punto de vista fitoquímico, por pertenecer a la familia Asteraceae, podrían tener un potencial insecticida (11-15). Este trabajo evaluó la actividad larvicida de dos fracciones etéreas de *H. oppositifolia* (L.) Druce y *J. hirta* (Lag.) Less, en larvas de *Ae. (Stegomyia) aegypti* (L.) de 3-4 instar, en el municipio de Armenia, Quindío.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Fase de campo y manutención del material: Se colectaron ejemplares en horas de la mañana de *H. oppositifolia* y *J. hirta* en los municipios de Salento, Filandia y Armenia, en el Departamento del Quindío, Colombia. Se colectó material vegetal en óptimo estado fitosanitario de todas las partes vegetativas de la planta (hojas, tallos, raíces, flores y/o frutos).

Las larvas de *Ae. aegypti* fueron colectadas en 8 barrios (Gaitán, Berlín, Proviteq, La Mariela, El Placer, La María, Miraflores y Uribe) de la zona urbana de la ciudad de Armenia, siguiendo la metodología de la Organización Mundial de la Salud (PAHO) para determinar índices de infestación de *Ae. Aegypti* (16). Las larvas fueron almacenadas hasta la emergencia de los adultos bajo condiciones controladas ( $25 \pm 10^\circ\text{C}$ , humedad  $80 \pm 10\%$  y fotoperíodo 12:12 h) en el laboratorio de Biología de la Universidad del Quindío. Cuando emergieron los adultos, éstos fueron identificados a nivel de especie. Todos los adultos de *Ae. aegypti* fueron reunidos para establecer una colonia base, la cual fue denominada ARM08. Los adultos fueron alimentados con una solución azucarada al 10%. Para inducir la oviposición de las hembras, fue suministrada alimentación sanguínea dos veces por semana utilizando ratones (*Mus musculus* Swiss).

Fase experimental:

Marcha fitoquímica preliminar

La extracción vegetal y análisis fitoquímico preliminar de *H. oppositifolia* y *J. hirta* se realizó siguiendo la metodología descrita por Bilbao (17).

## Bioensayos

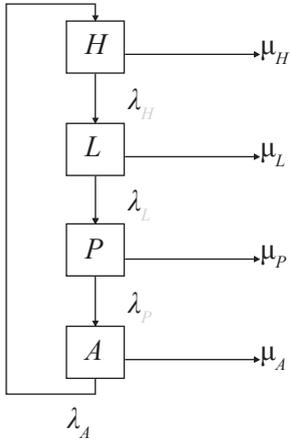
La preparación de los extractos etéreos de *H. oppsitifolia* y *J. hirta* para la realización de los bioensayos siguió la metodología descrita por Bilbao (17). Los bioensayos fueron realizados utilizando larvas de la generación F1 de *Ae. Aegypti* provenientes de la colonia ARM08. Los bioensayos con múltiples concentraciones fueron realizados siguiendo la metodología descrita por la Organización Mundial de la Salud (WHO) (18). Tres experimentos con cuatro réplicas cada uno fueron usados para evaluar 11 concentraciones [13,17,20,24,26,31,34,37,40,43 y 46 ppm] para determinar mortalidad larval entre 5 y 95 %. Cada réplica con 10 larvas de *Ae. aegypti* de 3-4 instar totalizando 440 larvas por experimento. Se añadieron 20 ml de agua filtrada con las larvas en todos los vasos plásticos. Se utilizaron dos grupos como control de los experimentos, uno utilizando agua filtrada y otro etanol absoluto al 95 % (el solvente de los extractos etéreos).

Las CL50, CL90 y CL95 fueron expresadas como porcentaje de mortalidad y fue analizada utilizando el método log-probit de Finney (19) utilizando el programa Probit de Raymond et al. (20). Estas CL, fueron calculadas 24 y 48h después de realizados los bioensayos. Adicionalmente, a la variable porcentaje de mortalidad se le comprobó la distribución y homogeneidad de varianzas para la realización de un análisis de varianza factorial (ANOVA)  $2 \times 2 \times 11 \times 2$ , con el fin de evaluar las diferencias para los factores: especie (*H. oppsitifolia* y *J. hirta*), tiempo (24 y 48 h) y concentración (13,17,20,24,26,31,34,37,40,43 y 46 ppm) con dos réplicas. Cuando las diferencias fueron significativas se utilizó la prueba de Tukey para explicar las diferencias entre niveles de cada factor. Los análisis fueron realizados con el software STATISTICA 7 (Statsoft Inc. 1984-2004).

## Modelo matemático

Se construyó un modelo matemático en ecuaciones diferenciales que representa el comportamiento de las poblaciones. Se consideraron los cuatro instares del vector: huevo (*H*), larva (con sus cuatro estados larvales) (*L*), pupa (*P*) y adulto (*A*). Las variables  $H(t)$ ,  $L(t)$ ,  $P(t)$ ,  $A(t)$ , representan el número de individuos en el tiempo, medido en días, en todos los instares del vector. A través de cada instar, las tasas vitales se asumen constantes y las tasas de transferencia incluyen sobrevivencia por instar.

Se considera el diagrama compartimental:



Donde:

$\lambda_H, \lambda_L, \lambda_P$ , son las proporciones de huevos que pasan a larva, de larvas que pasan a pupa, de pupas que pasan a adulto, respectivamente, y  $\lambda_A$  es el número de huevos que oviposita una hembra.

$\mu_H, \mu_L, \mu_P, \mu_A$  son las tasas de muerte de huevos, larvas, pupas y adultos, respectivamente.

$\theta$  es la proporción hembra-macho.

El sistema que interpreta la dinámica poblacional es el siguiente:

Las simulaciones de la dinámica poblacional de *Ae. Aegypti* fueron realizadas con el paquete matemático MATLAB (2007, The Math Works, Natick, MA). Los parámetros utilizados en la simulación fueron estimados a partir de los datos registrados por varios autores (21-24).

## RESULTADOS

### Marcha fitoquímica preliminar

La marcha fitoquímica preliminar permitió caracterizar en *H. oppositifolia* y *J. hirta* la presencia de: Taninos, flavonoides, quinonas, glicósidos cardiotónicos, esteroides, lactonasterpénicas, coumarinas, azúcares y alcaloides.

**Tabla 1.** Perfil de susceptibilidad de fracciones etéreas de *H. oppositifolia* y *J. hirta* frente a larvas de *Ae. Aegypti* provenientes del Departamento del Quindío, mostrando media (intervalo de confianza) para las CL.

Especie	$\chi^2$ (df)*	24h			48h		
		CL (ppm)			CL (ppm)		
<i>H. oppositifolia</i>	0.9 (11)	41 (38-49)	80 (63-127)	97 (73-168)	39 (35-44)	77 (61-121)	94 (71-162)
<i>J. hirta</i>	0.4 (11)	24 (22-29)	71 (50-116)	96 (62-171)	24 (21-28)	70 (49-112)	93 (62-166)

\*Diferencias no significativas. El valor de  $\chi^2$  corresponde a las CL 48h.

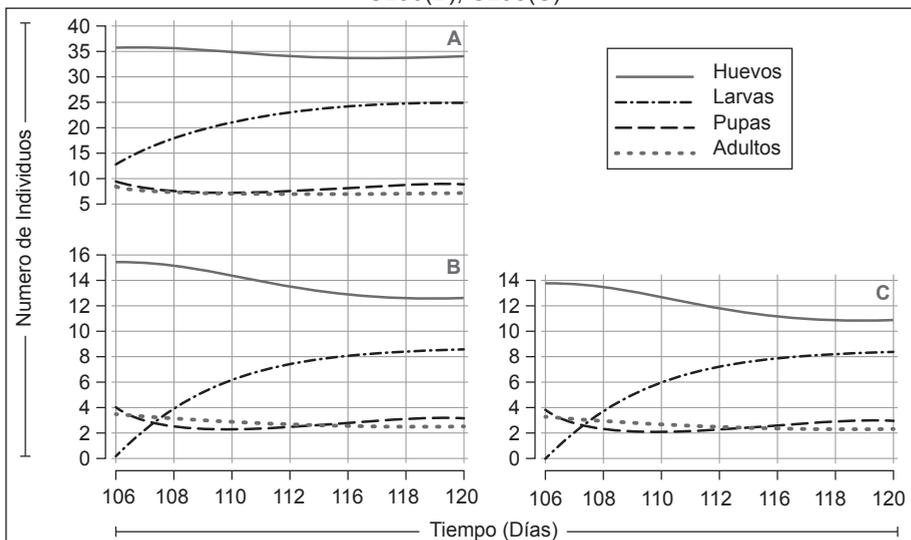
Se observa que las aplicaciones cada 15 días de la dosis letal 50, y cada 30 días de las dosis letales 90 y 95, tienen esencialmente el mismo efecto larvicida, es decir, para efectos prácticos, son equivalentes el uso de las dosis letal 90 o 95 cada 30 días, y el uso de la dosis letal 50 con la mitad de la frecuencia, 15 días.

**Tabla 2.** Resultados del análisis de varianza factorial para la variable porcentaje de mortalidad de larvas de *Ae.aegypti* provenientes del departamento del Quindío

Fuente de variación	F	P
Especie (E)	1837,1	0,000000*
Concentración (C)	523,4	0,000000*
Tiempo (T)	14,1	0,000227*
E x C	18,5	0,000000*
E x T	3,7	0,055495
T x C	0,3	0,980672
E x C x T	0,3	0,981652

\*Diferencias significativas (p<0,05).

**Figura 1.** Comportamiento de las poblaciones de *Ae. aegypti* durante los últimos 15 días, después de 6 aplicaciones sucesivas cada 15 días, de: CL50(A); CL90(B); CL95(C)



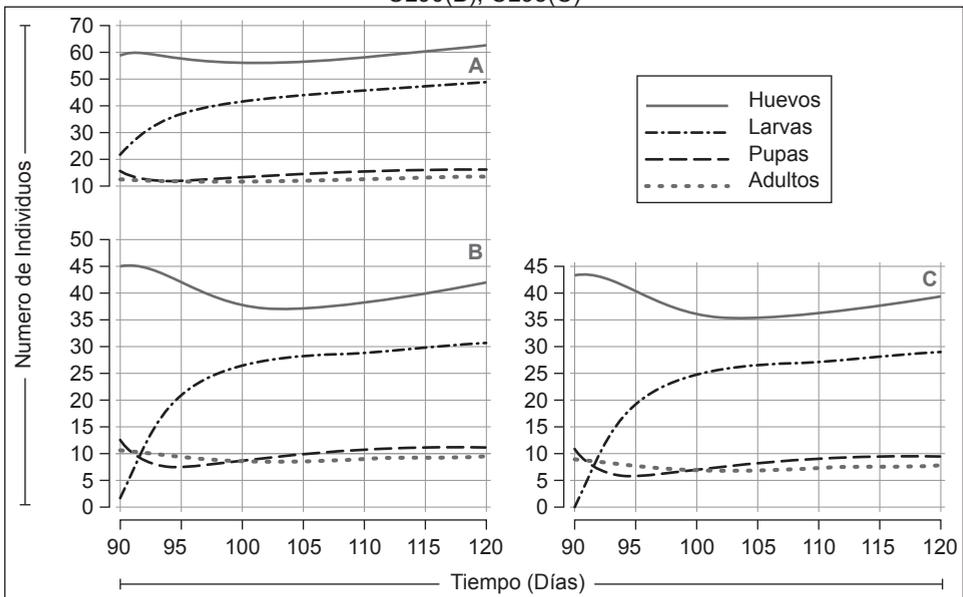
Bioensayos

Las CL50,CL90 y CL9524 y 48h, después de realizados los bioensayos para los extractos etéreos de *J. hirta*, fueron menores cuando comparados con *H. oppositifolia* (Tabla 1). El ANOVA factorial y la prueba de Tukey confirmaron esta tendencia, *J. hirta* (66 %, F=18.5, p<0.05) y *H. oppositifolia* (34 %, F=18.5, p<0.05) (Tabla 2).

Modelo Matemático

Se simuló el comportamiento de las poblaciones con aplicaciones sucesivas de cada una de las dosis letales 50, 90 y 95, cada 15 días y cada 30 días. La población inicial en todos los casos fue de 20 adultos y cero individuos en los demás estadios. Las Figuras 1 y 2 muestran el comportamiento de las poblaciones durante el último período, cuando se hacen aplicaciones sucesivas de las dosis letales elaboradas partir de las fracciones etéreas *H. oppositifolia* y *J. hirta*, cada 15 días y 30 días, respectivamente.

**Figura 2.** Comportamiento de las poblaciones de *Ae. aegypti*, durante los últimos 30 días, después de 3 aplicaciones sucesivas cada 30 días, de: CL50 (A); CL90(B); CL95(C)



## DISCUSIÓN

Los insecticidas de origen botánico están constituidos por ingredientes activos de diversa naturaleza química, entre ellos los metabolitos secundarios. Trabajos con metabolitos secundarios han demostrado su actividad biológica sobre insectos, por ejemplo, la alteración de la actividad alimenticia, desarrollo, reproducción y/o comportamiento (25). Entre las diversas especies vegetales, la familia Asteraceae forma parte de este grupo de plantas con actividad biológica. Varios son los metabolitos secundarios encontrados en la familia Asteraceae, por ejemplo, terpenos, alcaloides, fenoles, esteroides, entre otros (26).

*H. Oppositifolia* y *J. Hirta*, mostraron efecto larvicida sobre larvas de *Ae. Aegypti*. Iguales resultados fueron encontrados en otras especies de la familia Asteraceae, como, por ejemplo, *Bidens pilosa*, *Emilia sonchifolia*, *Artemisia vulgaris*, *Eupatorium microphyllum*, *Tagetes erecta*, *Chrysanthemum umcinerarii folium* y *Ageratum conyzoides* (2,15,27-28). Sin embargo, la actividad biológica de *H. Oppositifolia* y *J. Hirta*, fue diferente. Probablemente los metabolitos secundarios presentes en *J. hirta*, actuaron de forma sinérgica más eficiente que los presentes en *H. Oppositifolia*. Aunque cada metabolito secundario posea un efecto tóxico diferente, el complejo metabólico presente en las fracciones etéreas, optimizan su efecto larvicida (efecto sinérgico), siendo más difícil para las larvas de *Ae. Aegypti* detoxificar un complejo de metabolitos secundarios, que una sola molécula de éstos (29). Sin embargo, la identificación de cada metabolito secundario, así como la evaluación en laboratorio de cada compuesto químico, son necesarias para establecer el efecto insecticida de las dos plantas.

Dos mecanismos, probablemente sean las rutas de acción de los metabolitos secundarios presentes en *H. oppositifolia* y *J. hirta* sobre las larvas de *Ae. Aegypti*: Alimentación y contacto. Al alimentarse las larvas por filtración, y no poseer una ingestión selectiva de partículas, los metabolitos presentes en *H. oppositifolia* y *J. hirta* pueden ingresar libremente al sistema digestivo de las larvas, produciendo toxicidad digestiva (28). Por contacto con las larvas, los metabolitos secundarios actuarían mediante tres mecanismos interdependientes: transporte desde la cutícula al sitio de acción, inhibición enzimática y efecto sobre el sistema nervioso central, y como consecuencia, causarían su muerte (1). Sin embargo, son necesarios más estudios para confirmar estas hipótesis.

Las cantidades de producto necesarias para matar el 95 % (CL95) de las larvas de *Ae. Aegypti*, utilizando fracciones etéreas de *H. oppositifolia* y *J.*

*hirta* fueron bajas, cuando fueron comparadas con otros estudios (30-31), lo que sugiere estudios más detallados para encontrar el metabolito o complejo de metabolitos que causan la muerte de larvas de *Ae. aegypti*. Se puede concluir que ambas especies poseen efecto larvicida, sin embargo, *J. hirta* se mostró más promisorio como futuro bioinsecticida para el control de estados inmaduros de *Ae. aegypti* ♦

**Agradecimientos:** A la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Quindío por el apoyo económico, y al Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Quindío, por el apoyo logístico al proyecto.

## REFERENCIAS

1. Pérez D, Iannaccone J. Efecto insecticida de sacha yoco (*Paulliniaclia vigera* var. *Bullata simpson*) (sapindaceae) y oreja de tigre (*Tradescantia zebryna* hort ex bosse) (commelinaceae) en el control de *Anopheles benarrochigabaldon*. *Ecología Aplicada*. 2004; 3:1-5.
2. Pohlit AM, Quignard EL, Nunomura SM, Tadei WP, Hidalgo AF, Pinto AC, et al. Screening of plants found in the State of Amazonas, Brazil for larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae. *Acta Amazônica*. 2004; 34:97-105.
3. Rawlins SC, Wan JO. Resistance in some Caribbean populations of *Aedes aegypti* to several insecticides. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 1995; 11(1):59-65.
4. Mareggiani G. Manejo de insectos plaga mediante sustancias semioquímicas de origen vegetal. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*; 2001. p. 22-30.
5. Parra GJ, García CM, Cotes JM. Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vector del dengue en Colombia. *CES Medicina*. 2007; 21(1):47-54.
6. Geris R, Garcia IS, Garcia SH, Barison A, Rodrigues EF, Ferreira AG. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* DUCKE with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 2008; 50(1):25-28.
7. Roza A, Zapata C, Bello FJ. Evaluación del efecto tóxico de extractos de *Eupatorium microphyllum* (Asteraceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. *Rev. Cienc. Salud*. 2008; 6(2):64-73.
8. Ottaway PB. *Chemical*. 2nd Edition. New York: McGraw-Hill Press; 2001.
9. Murillo E, Viña A, Pérez CA, Ruíz VH. Actividad alelopática de las arvenses asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) en el Tolima-Colombia. *Universidad del Tolima. Información Tecnológica*. 2006; 17(2):15-24
10. Rzedowski GC, Rzedowski J. *Compositae, Tribu Heliantheae (II). Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 157*. Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México; 2008.
11. Sanabria A. *Análisis Fitoquímico Preliminar. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae*. Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia. Bogotá DC; 1983.
12. Torrenegra GR, Pedrozo PJ, Ramos MA. Química y actividad antifúngica de *Senecio pampae*. *Revista Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*. 2000; 12(1):56.
13. Binns SJ, Hudson S, Merali JT. Antiviral activity of characterized extracts from *Echinacea* spp. (Heliantheae: Asteraceae) against herpes simplex virus (HSV-1). *Planta Medica*. 2002; 68(9):780-783.

14. Wei-Ping L, Zhi-Guang Z. *Astershennong jjaensis* (Asteraceae), a new species from central China. Botanical Bulletin Academy. 2004; 45:95-99.
15. Da Silva A. In-vitro trypanocidal activity evaluation of crude extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2004; 56(9):1195-1201.
16. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 1995.
17. Bilbao M. Análisis Fitoquímico Preliminar. Oficina de Publicaciones Universidad del Quindío; 1997.
18. WHO. Instructions for determining the susceptibility resistance of mosquito larvae to insecticides. Geneva, World Health Organization, VBC; 1981.
19. Finney DJ. Probit Analysis. 3rd Ed. Cambridge, University Press; 1971.
20. Raymond M. PROBIT software. France, CNRS UMII, Licence L93019 Avenix, 1993; 1995.
21. Bar-Zeev M. The effect of temperature on the growth rate and survival of the immature stages of *Aedes aegypti* (L). Bulletin of Entomological Research. 1958; 49:157-163.
22. Li CF, Lim TW, Han LL, Fang R. Rainfall, abundance of *Aedes aegypti* and dengue infection in Selangor, Malaysia. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 1985; 16(4):560-568.
23. Manrique-Saide P, Delfín H, Parra V, Ibáñez S. Desarrollo, mortalidad y sobrevivencia de las etapas inmaduras de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en neumáticos. Biomédica. 1998; 9:84-91.
24. Rebelo JM, Costa JM, Silva FS, Pereira YN, da Silva JM. Distribuição de *Aedes aegypti* e do dengue no Estado de Maranhão, Brazil. Cadernos Saúde Pública. 1999; 15:477-486.
25. Schoonhoven LM. Biological aspect of antifeedants. Entomological Experimental and Applied. 1982; 31: 57-69.
26. Harborne JB. Advances in chemical ecology. Natural Product Reports. 1993; 10:327-350.
27. Amer A, Mehlhorn H. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). Parasitology Research. 2006; 99:466-472.
28. Macêdo M, Consoli R, Grande T, Anjos A, Oliveira A, Mendes N, et al. Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for larvicidal activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1997; 92:565-570.
29. Isman BM. Neem and other botanical insecticides: barriers to commercialization. Phytoparasitica. 1997; 25(4): 339-344.
30. Santos R, Nunes P, Ronaldo F, Gilvandete P, Henrique A, Silveira R, et al. Chemical Composition and Larvicidal Activity of the Essential Oils of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the Northeast of Brazil Journal of the Brazilian Chemical Society. 2006; 17( 5):1027-1030.
31. Geris R, Silva IG, Silva HH, Barison A, Rodriguez\_Filho E, et al. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (diptera, culicidae) Instituto Medicina Tropical de Sao Paulo. 2008; 1: 25-28.