UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

AVALIAÇÃO DE ESPÉCIES VEGETAIS NATIVAS E ADAPTADAS DO ESTADO DO AMAZONAS CONTRA AEDES AEGYPTI, VETOR RESPONSÁVEL POR DIFERENTES DOENÇAS DE IMPACTO NA SAÚDE PÚBLICA

Aimêe Almeida de Oliveira

MANAUS
2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

AVALIAÇÃO DE ESPÉCIES VEGETAIS NATIVAS E ADAPTADAS DO ESTADO DO AMAZONAS CONTRA AEDES AEGYPTI, VETOR RESPONSÁVEL POR DIFERENTES DOENÇAS DE IMPACTO NA SAÚDE PÚBLICA

Doutoranda: Aimêe Almeida de Oliveira
Orientador: Prof. Dr. Jefferson Rocha de Andrade Silva

Defesa de tese apresentado ao Programa de Pós-graduação em Química na Universidade Federaldo Amazonas como parte dos requisitos para obtenção do títulode Doutor em Química, com área de concentração em Química de Produtos Naturais e Biomoléculas.

MANAUS
2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

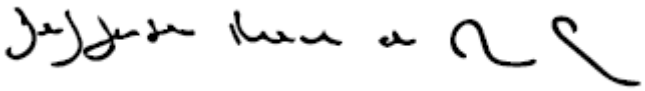
Oliveira, Aimêe Almeida de
O48a Avaliação de espécies vegetais nativas e adaptadas do estado do Amazonas contra Aedes aegypti, vetor responsável por diferentes doenças de impacto na saúde pública / Aimêe Almeida de Oliveira . 2021
165 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Jefferson Rocha de Andrade Silva
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Plantas medicinais. 2. mosquito. 3. óleos essenciais. 4. terpenoides. I. Silva, Jefferson Rocha de Andrade. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor(a) em Química.

Aprovada em, 02 de julho de 2021.



_____

JEFFERSON ROCHA DE ANDRADE SILVA (PPGQ/UFAM)
Presidente/Orientador

_____

RITA DE CÁSSIA SARAIVA NUNOMURA (PPGQ/UFAM)

Membro Interno

_____

JAQUELINE DE ARAÚJO BEZERRA (PPGQ/UFAM)

_____

ALINE DE SOUZA RAMOS (FIOCRUZ-RJ)

Membro Externo

_____

AUREA ECHEVARRIA AZNAR NEVES LIMA (UFRRJ)
Membro Externo

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 02 de julho de 2021

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força, garra e coragem a mim concedidos para vencer esta etapa em um momento tão desafiador.

Aos meus pais, que nunca colocaram objeção alguma aos meus anseios pessoais e profissionais, e me proporcionaram uma maravilhosa formação.

Ao Prof. Dr. Jefferson Rocha de Andrade Silva pela confiança, credibilidade e orientação, paciência e apoio de modo incondicional.

À Dr. Ana Claudia Fernandes Amaral pelas contribuições a este trabalho e por sempre nos receber de portas abertas.

Aos colegas e amigos do "LabCro" pelo companheirismo, ensinamento e incentivo em todas as etapas deste árduo processo.

Ao Dr Wanderli Tadei pelo suporte e pela parceria nesse projeto.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Química de Produtos Naturais – UFAM pelas horas de trabalho juntos.

Ao Programa de Pós-graduação em Química e a CAPES pela bolsa concedida.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

OBRIGADA!

Não importa o que aconteça, continue a nadar, continue a nadar!

Procurando Nemo. Estúdios Pixar de Animação, 2003.

RESUMO

As espécies botânicas alvo deste trabalho, *Ampelozizyphus amazonicus* (Ducke) (Rhamnaceae), *Alpinia zerumbet* (B.L. Burtt & R.M. Sm.) (Zingiberaceae), *Blepharocalyx* sp. (Kiaerskou; L.R. Landrum) (Myrtaceae), *Endlicheria* sp. (Meisn.; C.K. Allen) (Lauraceae), *Virola* sp. (Warb) (Myristicaceae), *Bocageopsis* sp. (Mart.) (Annonaceae), *Origanum vulgare* L. e *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae), podem ser encontradas no estado do Amazonas, e em outras regiões da Amazônia brasileira.Estas plantas possuem ampla utilização na medicina popular e apresentam diversas classes de metabólitos secundários na constituição química de suas partes vegetativas. No presente estudo o extrato de *A. amazonicus* foi testado quanto a sua atividade antioxidante por meio da capacidade de sequestro do radical estável 2,2-difenila-1-picrilhidrazila (DPPH), utilizando quercetina como padrão. Os extratos em metanol dos caules finos e dos caules grossos de *A. amazonicus*, com capacidade de sequestro igual a (CS_{50}) 119,06 ± 0,62 μg/mL e 125,03 ± 0,68 μg/mL, respectivamente, apresentaram atividade semelhante.No teste de toxicidade frente à *Artemia salina* os chás dos caules grossos utilizando duas metodologias diferentes, apresentaram atividade moderada com concentrações letais medianas de 125,8 e 198,0 μg/mL, respectivamente. A simulação digestiva *in vitro* realizada com os chás do caule fresco e seco de *A. amazonicus* permitiu um melhor entendimento das possíveis reações enzimáticas ocorridas no trato gastrointestinal devido às mudanças no perfil cromatográfico observada para os preparados na forma de chá, utilizando metodologias diferentes de extração. As substâncias 5-allil-1-(2,3,4,-tris-O-benzoilpentofuranosil)-2,4(1H,3H)-pirimidinediona (t_R 5,5 min. e [M-H]- *m/z* 595,1665) e phloretin-3',5'-di-glicosideo (t_R 8,6 min. e [M-H]- *m/z* 597,1834) foram identificadas como as substâncias majoritárias nos perfis cromatográficos dos chás de *A. amazonicus* e cujos sinais no cromatograma, após os processos digestivos *in vitro*, diminuiram. As análises dos voláteis da espécie *A. zerumbet* obtidos através da técnica de *Headspace* indicaram os terpenos 1,8-cineol e 1,4-terpineol como substâncias majoritárias para todas asamostras analisadas, como valores acima de 10% da composição dos voláteis. Para as espécies *Blepharocalyx* sp., *Endlicheria* sp., *Virola* sp., *Bocageopsis* sp., *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris*, foi observado que todos os óleos essenciais mostraram toxicidade para as larvas de *Aedes aegypti*, sendo as espécies *Virola* sp. e *O. vulgare* com os menores valores de concentração letal mediana para 24 horas, de 36,6 μg/ mL e 37,5 μg/mL, respectivamente. Nos testes com os mosquitos adultos de *Ae. aegypti* os óleos das espécies *Bocageopsis* sp., *Virola* sp. e *T. vulgaris* apresentaram alta atividade adulticida, com CL_{50} de 12,5 μg/mL, 12,7 μg/mL e 12,8 μg/mL, respectivamente. Os resultados obtidos da ação repelente dos óleos de *O. vulgare* e *T. vulgaris* demonstram potencial nas concetrações de 0,5% com um percentual de escape de 37,8% e 68,9%, respectivamente. Os cálculos de *docking* e a dinâmica molecular realizada para os terpenos 4- terpineol, carvacrol, timol, cimeno e terpineno, no sítio ativo da proteína AeSCP-2, revelou potencial atividade larvicida para os óleos essenciais com maiores concentrações de 4-terpinenol, carvacrol e timol. Os resultados apresentados para os extratos e óleos essenciais estudados demonstram a importância da investigação química e biológica das espécies vegetais elencadas para o desenvolvimento de tratamentos profiláticos ou para ação no combate de vetores responsáveis pela transmissão de doenças de impacto na saúde pública.

Palavras-chave: Plantas medicinais, mosquito, óleos essenciais, terpenoides.

ABSTRACT

The target botanical species of this work, Ampelozizyphus amazonicus (Ducke) (Rhamnaceae), Alpinia zerumbet (B.L. Burtt & R.M. Sm.) (Zingiberaceae), Blepharocalyx sp. (Kiaerskou; L.R. Landrum) (Myrtaceae), Endlicheria sp. (Meisn.; C.K. Allen) (Lauraceae), Virola sp. (Warb) (Myristicaceae), Bocageopsis sp. (Mart.) (Annonaceae), Origanum vulgare L. and Thymus vulgaris L. (Lamiaceae), can be found in the state of Amazonas, and in other regions of the Brazilian Amazon. These plants are widely used in folk medicine and have several classes of secondary metabolites in the chemical constitution of their vegetative parts. In the present study, the extract of A. amazonicus was tested for its antioxidant activity through the ability to scavenge the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), using quercetin as a standard. The methanol extracts of the thin and thick stems of A. amazonicus, with a sequestration capacity equal to (CS50) 119.06 ± 0.62 µg/mL and 125.03 ± 0.68 µg/mL, respectively, showed similar activity. In the toxicity test against Artemia salina, teas from thick stems using two different methodologies, showed moderate activity with median lethal concentrations of 125.8 and 198.0 µg/mL, respectively. The in vitro digestive simulation carried out with teas from the fresh and dry stems of A. amazonicus allowed a better understanding of the possible enzymatic reactions occurring in the gastrointestinal tract due to the changes in the chromatographic profile observed for the preparations in the form of tea, using different extraction methodologies . The substances 5-allyl-1-(2,3,4,-tris-O-benzoylpentofuranosyl)-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione (tR 5.5 min. and [M-H]- m/z 595, 1665) and phloretin-3',5'-di-glycoside (tR 8.6 min. and [M-H]- m/z 597.1834) were identified as the major substances in the chromatographic profiles of A. amazonicus teas and whose signals on the chromatogram, after in vitro digestive processes, decreased. The analysis of the volatiles of the species A. zerumbet obtained through the Headspace technique indicated the terpenes 1,8-cineol and 1,4-terpineol as major substances for all the analyzed samples, with values above 10% of the composition of the volatiles. For Blepharocalyx sp., Endlicheria sp., Virola sp., Bocageopsis sp., Origanum vulgare and Thymus vulgaris species, it was observed that all essential oils showed toxicity to Aedes aegypti larvae, with Virola sp. and O. vulgare with the lowest 24-hour median lethal concentration values of 36.6 µg/mL and 37.5 µg/mL, respectively. In tests with adult mosquitoes of Ae. aegypti the oils of the species Bocageopsis sp., Virola sp. and T. vulgaris showed high adulticidal activity, with LC50 of 12.5 µg/mL, 12.7 µg/mL and 12.8 µg/mL, respectively. The results obtained from the repellent action of O. vulgare and T. vulgaris oils demonstrate potential at concentrations of 0.5% with an escape percentage of 37.8% and 68.9%, respectively. Docking calculations and molecular dynamics performed for the terpenes 4-terpineol, carvacrol, thymol, cymene and terpinene, in the active site of the AeSCP-2 protein, revealed potential larvicidal activity for essential oils with higher concentrations of 4-terpinenol, carvacrol and thymol. The results presented for the studied extracts and essential oils demonstrate the importance of chemical and biological investigation of the plant species listed for the development of prophylactic treatments or for action in the fight against vectors responsible for the transmission of diseases that have an impact on public health.

Keywords: Medicinal plants, mosquito, essential oils, terpenoids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa demostrando a incidência dos vetores *Aedes Aegypti* e *Ae. albopictus*. 17
Figura 2. Distribuição dos casos reportados de dengue, Chikungunya e Zika na Região das Américas no período de 2008-2020. 19
Figura 3. Identificação de sorotipos DENV (A), CHIKV (B) e ZIKV (C), por unidade federativa, no período de 29 de dezembro de 2019 a 14 de novembro de 2020. 21
Figura 4. Mosquito *Aedes aegypti* 22
Figura 5. Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti* 23
Figura 6. Metabolitos secundários presentes nos extratos orgânicos de *Hypericum japonicum* Thunb. (Hypericaceae) 25
Figura 7. Metabolitos secundários presentes nos óleos essenciais da espécie *Myristica fragans* Houtt. (Myristicaceae). 26
Figura 8. Estrutura básica dos isoprenóides (isopreno (C5)). 29
Figura 9. Biossíntese de terpenoides precursores de difosfato de geranila 29
Figura 10. Principais terpenos encontrados nos óleos essências da espécie *Blepharocalyx* sp. 31
Figura 11. Principais terpenos encotrados nos óleos essenciais do gênero *Endlicheria.* 32
Figura 12. Substâncias presentes nos óleos essenciais das espécies do gênero *Bocageopsis* 33
Figura 13. Substâncias presentes nos óleoes essenciais de *Thymus vulgaris* 37
Figura 14. Triterpenos pentacíclicos isolados do extrato das cascas de *Ampelozizyphus amazonicus.* 39
Figura 15. Algumas das espécies vegetais de estudo. (A) *Alpinia zerumbet*, (B) *Thymus vulgaris*, (C) *Origanum vulgare* e (D) *Ampelozizyphus amazonicus.* 45
Figura 16. Preparo dos galhos de *Ampelozizyphus amazonicus* como exemplo da extração por *Headspace*-SPME (A). Exposição da fibra (B). 49
Figura 17. Fluxograma da obtenção dos extratos e chás de *Ampelozizyphus amazonicus.* 50
Figura 18. Obtenção dos chás de *Ampelozizyphus amazonicus.* 51
Figura 19. Sistema Clevenger utilizado no processo de extração dos óleos essenciais. 52
Figura 20. Amostras submetidas à iluminação artificial. 53
Figura 21. Criação e manutenção das colônias de *Aedes aegypti* 54

Figura 22. Bioensaio dos óleos essenciais vegetais frente as larvas de *Aedes aegypti*. . 55
Figura 23. Garrafas impregnadas com óleo essencial para a realização do teste adulticida 56
Figura 24. Avaliação dos mosquitos após o tempo de ação dos óleos essenciais. 57
Figura 25. Estrutura das substâncias presentes no óleo de *Endlicheria* sp..... 68
Figura 26. Cromatograma do óleo essencial de *Endlicheria* sp. 69
Figura 27. Estrutura das substâncias presentes no óleo essencial de *Blepharocalyx salicifolius*..... 73
Figura 28. Cromatograma dos óleos da espécie *Blepharocalyx* sp. 73
Figura 29. Cromatograma dos óleos da espécie *Bocageopsis* sp. 78
Figura 30. Cromatograma do óleo das folhas de *Virola* sp. 81
Figura 31. Estruturas das substâncias presentes nos óleos de *Origanum vulgare*..... 85
Figura 32. Estruturas das substâncias presentes nos óleos de *Thymus vulgaris.*..... 86
Figura 33. Cromatograma do óleo essencial da planta inteira *Origanum vulgare* 86
Figura 34. Cromatograma do óleo essencial da planta inteira de *Thymus vulgaris.* 90
Figura 35. Sobreposição da estrutura cocristalizada de ácido palmítico (em cinza) no local de atividade da proteína AeSCP-2 (PDB ID: 1PZ4), juntamente com a estrutura re-dockada (em azul). Valor RMSD = 1,04. 93
Figura 36. Interações dos aminoácidos da proteína AeSCP-2, em 3D e 2D, respectivamente, com a molécula de (a) Cimeno, (b) γ-Terpineno, (c) Terpinen-4-ol, (d) Timol, (e) Carvacrol, (f) diagrama esquemático das principais interações da proteína com o ácido palmítico. 96
Figura 37. Cromatograma do Chá (Controle) de *Ampelozizyphus amazonicus* 111
Figura 38. Cromatogramas obtidos por CLAE-EM das alíquotas 01, 02 e 03 da simulação digestiva Método 01. 116
Figura 39. Cromatograma dos constituintes voláteis obtidos das folhas frescas de *Alpinia zerumbet* coletadas em Brasília por *Headspace* em microextração de fase sólida. 121
Figura 40. Cromatograma dos constituintes voláteis obtidos das folhas secas de *Alpinia zerumbet* coletadas em Brasília por *Headspace* em microextração de fase sólida 122
Figura 41. Cromatograma dos constituintes voláteis obtidos das folhas frescas de *Alpinia zerumbet* coletadas no Rio de Janeiro por *Headspace* em microextração de fase sólida 123

Figura 42. Cromatograma dos constituintes voláteis obtidos das folhas secas de *Alpinia zerumbet* coletadas no Rio de Janeiro por *Headspace* em microextração de fase sólida. 124
Figura 43. Fotomicrografia das larvas de *Aedes aegypti* tratada com o óleo de *Origanum vulgare* (A), *Thymus vulgaris* (B), DMSO 1,0% (C) e Temefós (D). As imagens foram obtidas em aumento de 50x em microscópio estereoscópio, modelo binocular, Stemi508 (fabricante Carl Zeiss). 136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Extratos submetidos ao teste antioxidante DPPH. 62
Tabela 2. Composição química (%) dos óleos essenciais da espécie *Endlicheria* sp. 70
Tabela 3. Composição química (%) do óleo essencial obtido das folhas de *Blepharocalyx* sp. 75
Tabela 4. Composição química (%) dos óleos essenciais da espécie *Bocageopsis* sp. 79
Tabela 5. Composição química (%) do óleo essencial das folhas de *Virola* sp. 83
Tabela 6. Composição química (%) dos óleos essenciais da planta inteira de *Origanum vulgare* 88
Tabela 7. Composição química (%) do óleo essencial da espécie *Thymus vulgaris.* 91
Tabela 8. Valores de energia de ancoragem (ΔGbind) das moléculas constantes em óleos essenciais ancorados no sítio ativo da proteína AeSCP-2, em ordem decrescente, e interações com resíduos de aminoácidos. 94
Tabela 9. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *Ampelozizyphus amazonicus.* 101
Tabela 10. Resultado do teste de toxicidade frente à *Artemia salina* dos extratos de *Ampelozizyphus amazonicus.* 103
Tabela 11. Identificação dos componentes dos caules frescos de *Ampelozyziphus amazonicus* por *Headspace* em microextração de fase sólida. 105
Tabela 12. Identificação dos componentes dos caules secos de *Ampelozizyphus amazonicus* por *Headspace* em microextração de fase sólida 107
Tabela 13. Tabela das substâncias identificadas no Chá de *Ampelozizyphus amazonicus.* 112
Tabela 14. Identificação dos compostos das folhas de *Alpinia zerumbet* por *Headspace* em microextração de fase sólida. 119
Tabela 15. Valores das CL_{50} e CL_{90} dos óleos essenciais contra larvas de *Aedes aegypti*. 129
Tabela 16. Valores das CL_{50} e CL_{90} dos óleos essenciais para a atividade adulticida de *Aedes aegypti* 132
Tabela 17. Atividade repelente dos óleos essências de *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris* contra *Aedes aegypti* 134

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIAÇÕES

CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CC	Cromatografia em Coluna
EM	Espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
°C	Graus Celsius
eV	Eletrovolts
ppm	Parte por milhão
DP	Desvio padrão
TFA	Ácido trifluoroacético
m/z	Relação massa/carga
T_R	Tempo de retenção
eV	Eletronvolt
V	Volts
Kv	Quilovolts
ESI	Ionização por eletrospray
CL_{50}	Concentração letal para 50 % dos indivíduos
CL_{90}	Concentração letal para 90 % dos indivíduos
DMSO	Dimetilsulfóxido
CS_{50}	Capacidade de sequestro para 50% dos indivíduos
Abs	Absorbância
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
DPPH	Radical 2,2-Difenil-picrilhidrazila
pH	Potencial de hidrogênio
DDT	Dicloro-difenil- tricloroetano
sp.	Espécie
P.A.	Para Análise
g	Grama
min.	Minutos
%	Porcentagem

mL	Mililitro
HS-SPME	Headspace em microextração de fase sólida
PDMS	Polidimetilsiloxano
µm	Micrometro
µg	Micrograma
nm	Nanometro
%CS	Porcentagem da capacidade de sequestro
mM	Milimolar
M	Molar

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 14
1. INTRODUÇÃO 15
1.1. *Aedes aegypti* 22
OBJETIVOS 41
2. OBJETIVOS 42
2.1. OBJETIVO GERAL 42
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 42
MATERIAIS E MÉTODOS 43
3. MATERIAIS E MÉTODOS 44
3.1. Coleta do material vegetal 44
3.2. Solventes e Reagentes 45
3.3. Técnicas de análises 46
3.4. Preparo dos extratos e chás 49
3.5. Obtenção dos óleos essenciais 51
3.6. Ensaios Biológicos 52
3.6.1. Teste frente à *Artemia salina* 52
3.6.2. Criação, Manutenção e Bioensaios com *Aedes aegypti* 53
3.7. Testes Químicos 59
3.7.1. Modelagem Molecular 59
3.7.2. Teste antioxidante – DPPH 61
3.7.3. Simulação Digestiva *in vitro* 63
RESULTADOS E DISCUSSÃO 65
CAPÍTULO I 66
Composição química dos óleos essenciais 66
CAPÍTULO II 99
Análise dos extratos e chás 99
CAPÍTULO III 125
Bioensaios frente às larvas e adultos de *Aedes aegypti* 125
CONCLUSÃO 138
4. CONCLUSÃO 139

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA 142
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 143
PUBLICAÇÕES 160

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As arboviroses são doenças causadas por arbovírus e são transmitidas ao homem por insetos. Os mosquitos são insetos que pertencem à família Culicidae, uma das mais primitivas famílias da ordem Diptera, na qual se reconhecem 3565 espécies e subespécies. A nível global, estes insetos encontram-se amplamente distribuídos, apresentando maior diversidade nas regiões tropicais e subtropicais. Eles pertencem ao mais importante grupo de artrópodes do ponto de vista médico e veterinário pelo fatodas fêmeas picarem e fazerem refeições de sangue em vertebrados, podendo, deste modo, transmitir agentes patogénicos a humanos e animais, nomeadamente vírus (arbovírus), filárias (helmintos) e protozoários. Os mosquitos, mais que qualquer outro grupo de organismos, são a maior causa indireta de morbilidade e mortalidade entre os humanos (Lopes, et al. 2014; Donalisio et al. 2017; Almeida et al. 2020).

Os arbovírus possuem ciclo reprodutivo nos artrópodes hematófagos e esses vírus são repassados destes para os humanos através de sua picada (Lopes, et al. 2014; Almeida et al. 2020). Constituem problema de importância em todos os continentes, onde se apresentam sob forma endêmica ou epidêmica. A natureza da doença produzida no homem varia conforme o tipo de arbovírus responsável pela infecção. A maioria provoca uma síndrome febril benigna com ou sem exantema, enquanto outros determinam quadro hemorrágico ou de encefalite, acompanhado de significante letalidade (Leão et al. 1999; Donalisio et al 2017).

As arboviroses têm se tornado importantes e constantes ameaças em regiões tropicais devido às rápidas mudanças climáticas, desmatamentos, migraçãopopulacional, ocupação desordenada de áreas urbanas e precariedade das condições sanitárias que favorecem a amplificação e transmissão viral (Segata, 2016; Almeida et al. 2020). A maior parte dos arbovírus pertence aos gêneros *Alphavirus* (família

Togaviridae) e *Flavivirus* (família Flaviviridae); outros membros de importância para a saúde humana são das famílias Bunyaviridae, Reoviridae e Rhabdoviridae (Donalisio et al. 2017). Arbovírus, em geral, circulam entre os animais silvestres, com alguma especificidade por hospedeiros e mantendo-se em ciclos enzoóticos em poucas espécies de vertebrados e invertebrados. O homem ou animais domésticos geralmente são hospedeiros acidentais (Donalisio et al. 2017).

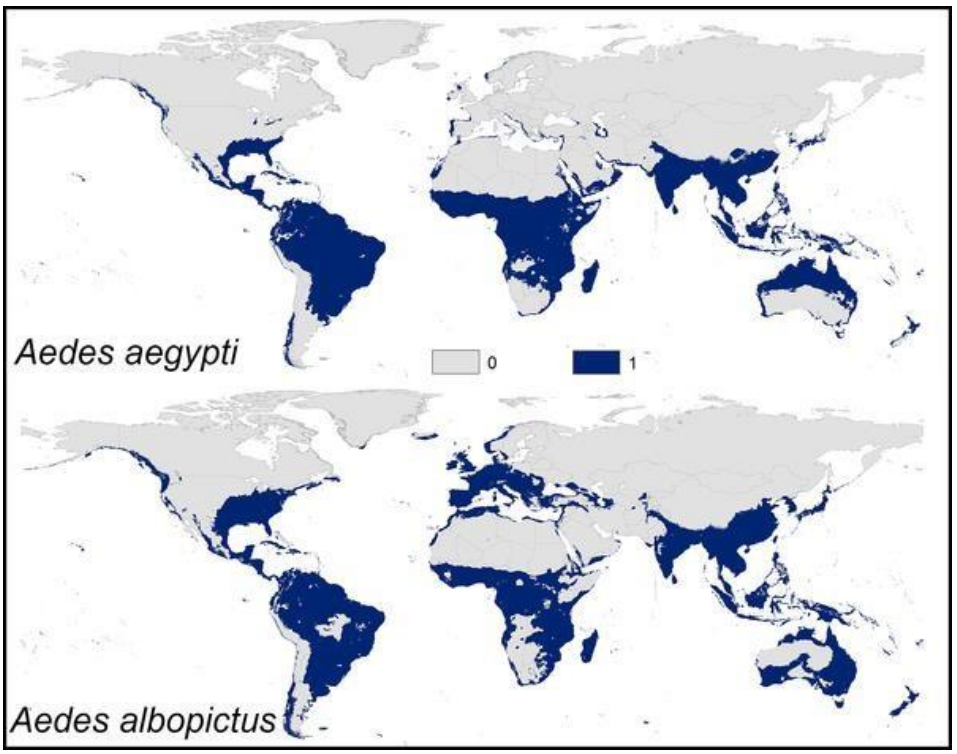
Os principais vetores das arboviroses pertencem ao gênero *Aedes*, onde podemos destacar as espécies *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus* (Braga & Valle, 2007; Teich, et al. 2018; Almeida et al. 2020). Porém, as espécies *Aedes africanus, Ae. luteocephalus, Ae. vittatus, Ae. furcifer, Ae. hensilli* e *Ae. apicoargenteus* também podem transmitir doenças, assim como as espécies dos gêneros *Anopheles*, *Eretmapodites* e *Mansonia*, porém com pouca incidência nas Américas (Almeida et al. 2020). Os agentes dasdoenças infeciosas transmitidas por mosquitos destacam-se, pela sua gravidade, em doenças causadas por parasitas como a malária e as filaríases, mas também por vírus como o Dengue, o Zika e *West Nile*, Batai, Ockelbo, Inkoo, Tahyna, Usutu, alguns menos conhecidos, mas que necessitam de um diagnóstico laboratorial preciso e diferencial. Os flebótomos são responsáveis pela transmissão de agentes como a *Leishmania* e os Flebovírus (Núncio et al. 2019).

O *Ae. albopictus* é um vetor de importância secundária na Ásia, no entanto, em algumas áreas da Indonésia, têm ocorrido surtos com frequência, nas partes rurais do país, onde o *Ae. albopictus* é a espécie predominante (Braga & Valle, 2007; Teich, et al.2018). Nas Américas, o *Ae. albopictus* ainda não é considerado, de maneira consistente, como vetor das arboviroses, embora alguns estudos tenham encontrado mosquitos naturalmente infectados (Braga & Valle, 2007; Teich et al. 2018). De acordo com Guedes e colaboradores (2017), estudos realizados pela Fundação Oswaldo Cruz

(Fiocruz, 2016) detectaram a presença do vírus Zika ativo na glândula salivar do mosquito *Culex quinquefasciatus*, conhecido popularmente como mosquito doméstico, pernilongo ou muriçoca (Almeida et al. 2020). Esse estudo demostra a capacidade do mosquito de replicar o vírus Zika, mas não necessariamente de transmiti-lo. Porém, já aponta a necessidade de monitoramento para um possível novo vetor das arboviroses.

Nas regiões tropicais e subtropicais os principais vetores das arboviroses têm sido o *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*, pois se encontram nos cinco continentes, tendo maior representação nos continentes africano, asiático e americano (Figura 1) (Braga & Valle, 2007; Kraemer, et al. 2015).

Figura 1. Mapa demostrando a incidência dos vetores *Aedes Aegypti* e *Ae. albopictus*.



Fonte: Kamal M, Kenawy MA, Rady MH, Khaled AS, Samy AM (2018). PLOS ONE 13(12): e0210122. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210122.

O vetor *Aedes aegypti* foi introduzido nas Américas por meio de barcos vindosda Europa, que cruzavam o Atlântico durante as primeiras explorações e colonizações

europeias ao Novo Mundo. Os primeiros registros de sua identificação em terras do Brasil foram em 1898, por Lutz, e em 1899, por Ribas (Braga & Valle, 2007).

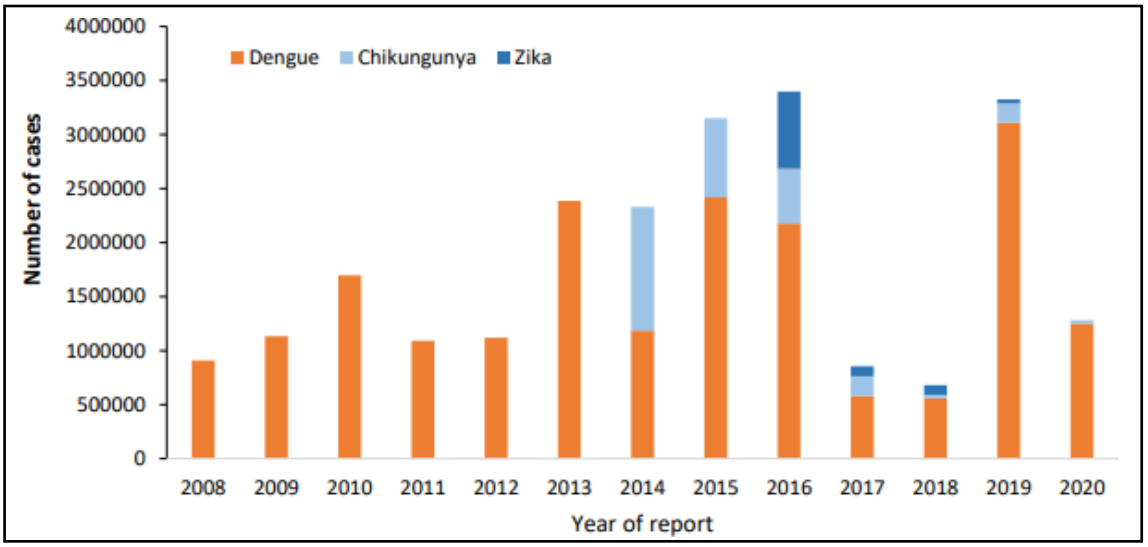
No Brasil, o *Ae. aegypti* está presente nos 26 Estados e no Distrito Federal (OMS, 2018). O combate ao *Ae. aegypti* no Brasil ocorreu a partir do século XX, principalmente enquanto um dos vetores da febre amarela, problema de Saúde Pública nas Américas e cresceu com a transmissão de novas arboviroses (Valle et al, 2019). O Brasil participou dessa campanha de erradicação do *Aedes* e teve êxito na primeira eliminação desse vetor em 1955. Em 1975, entretanto, ele retornou ao país, principalmente em decorrência de falhas na vigilância epidemiológica e de mudanças sociais e ambientais decorrentes da urbanização acelerada dessa época. Neste mesmo ano, confirmaram-se infestações nos estados do Rio Grande do Norte e Rio de Janeiro e,desde então, o Ministério da Saúde tem realizado programas de controle do mosquito. As principais doenças transmitidas por esse mosquito no Brasil são febre amarela, dengue, chikungunya e Zika (Braga & Valle, 2007; Johansen, 2014; Segata, 2016;Teich, et al. 2018; Valle et al. 2019).

Muitas doenças transmitidas por vetores são classificadas como doenças tropicais negligenciadas, por exemplo, doenças arbovirais como dengue e chikungunya, doença de Chagas, tripanossomíase humana africana, leishmaniose e oncocercose. As consequências desta indiferença, provocou nos últimos 10 anos, a falta de priorização e investimentos na investigação de tratamentos para essas doenças. Aspectos importantes da biologia, epidemiologia e prevenção das doenças transmitidas por vetores ainda são mal compreendidos. Entre 1990 e 2013, os acasos de dengue aumentaram mundialmente aproximadamente 450%, e estas doenças continuam a causar altos níveis de mortalidade e representam um número expressivo para a saúde pública, pois

configuram mais de 17% das doenças infecciosas no mundo, causando mais de 700 mil mortes por ano (OMS, 2018; Wilson et al., 2020).

Na região das Américas, entre janeiro e junho de 2020, um total de 1.645.678 casos de doenças provocadas por arbovírus foram reportadas. Destas, 1.600.947 (97,3%) são casos de dengue, 37.279 são casos de chikungunya e 7.452 são casos de Zika (Figura 2) (Pan American Health Organization/World Health Organization. Epidemiological Update: Arbovirus. 10 June 2020, Washington, D.C. PAHO/WHO. 2020).

Figura 2. Distribuição dos casos reportados de dengue, Chikungunya e Zika na Região das Américas no período de 2008-2020.



Fonte: Pan American Health Organization/World Health Organization. Epidemiological Update: Arbovirus. 10 June 2020, Washington, D.C. PAHO/WHO. 2020.

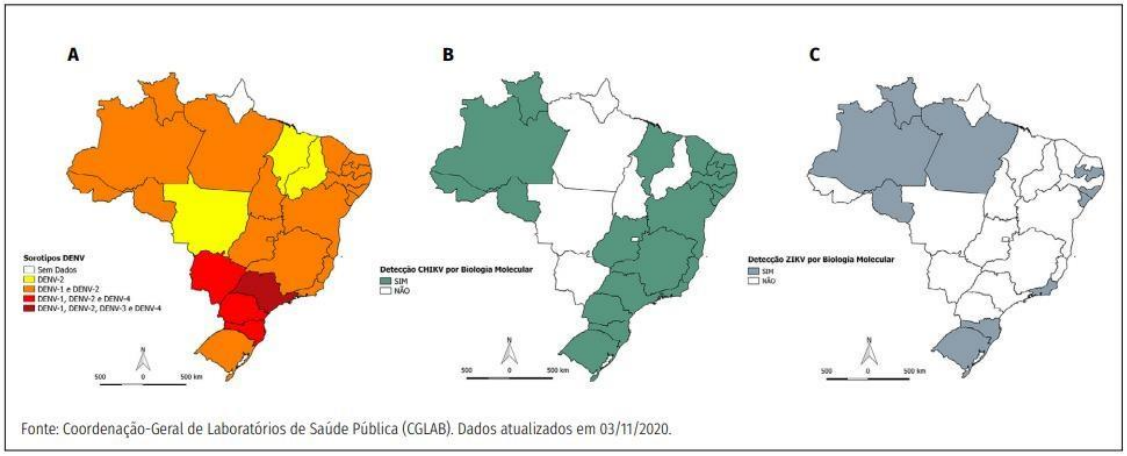
A maioria dos casos de dengue nas Américas foi registrada no Brasil, com 1.040.481 casos, representando 65% do total. Outros países com números significativos são: Paraguai, com 218.798 casos (14%); Bolívia, com 82.460 casos (5%); Argentina, com 79.775 casos (5%); e Colômbia, com 54.192 casos (3%). Altas taxas de incidência de dengue também foram notificadas em Honduras, México e Nicarágua, com menos números em outros países da América Central e do Caribe (OPAS, 2020).

Em 2019, segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde e o Ministério da Saúde, o Brasil notificou 1.544.987 casos prováveis de dengue, onde destacam-se os estados de Minas Gerais, São Paulo e Goiás que concentram 67, 9% dos casos. Verificou-se também um aumento de casos de dengue na região norte, principalmente nos estados do Acre, Roraima e Tocantins (195,8 casos/100 mil habitantes). Sobre os dados de chinkungunya foram notificados 132.205 possíveis casos no país. As regiões sudeste e nordeste apresentam a maior incidência do país, 104,6 casos/100 mil habitantes e 59,4 casos/100 mil habitantes, respectivamente. Com relação aos dados de Zika, foram notificados 10.768 casos no país. A região Nordeste apresentou a maior taxa de incidência com 9,5 casos/100 mil habitantes (Ministério da Saúde, 2020).

Ainda, de acordo com Secretaria de Vigilância em Saúde, até o dia 14 denovembro de 2020 foram notificados 971.136 casos prováveis de dengue no país. Nesse período, a região Centro-Oeste apresentou a maior incidência com 1.187,4 casos/100 mil habitantes, seguida das regiões Sul (931,3 casos/100 mil habitantes), Sudeste (373,2 casos/100 mil habitantes), Nordeste (258,6 casos/100 mil habitantes) e Norte (114,0 casos/100 mil habitantes). Sobre os dados de chikungunya, foram notificados 78.808 casos prováveis no país. As regiões Nordeste e Sudeste apresentam as maiores taxas de incidência, 99,4 casos/100 mil habitantes e 22,7 casos/100 mil habitantes, respectivamente. Com relação aos dados de Zika, até novembro de 2020, foram notificados 7.006 casos prováveis no país. A região Nordeste apresentou a maior taxa de incidência (9,0 casos/100 mil habitantes), seguida das regiões Centro-Oeste (3,6 casos/100 mil habitantes) e Norte (2,0 casos/100 mil habitantes). O estado da Bahia concentra 49,2% dos casos de zika do país (Boletim Epidemiológico 48 - Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, 2020). Observa-se uma diminuição dos casosprováveis em relação ao ano de 2019. Esta redução pode ser atribuída à mobilização que

as equipes de vigilância epidemiológica estaduais estão realizando diante do enfrentamento da emergência da pandemia do coronavírus (Covid-19), o que pode estar ocasionando atraso ou subnotificação das arboviroses.

Figura 3. Identificação de sorotipos DENV (A), CHIKV (B) e ZIKV (C), por unidade federativa, no período de 29 de dezembro de 2019 a 14 de novembro de 2020.



Fonte: Boletim Epidemiológico 48, Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde, 2020.

Diante desses dados, fica claro que a melhor estratégia para a diminuição no número de casos é a eliminação dos vetores de transmissão. Medidas se fazem necessárias para prevenir ou minimizar o número de infecções disseminadas pelo *Ae. aegypti*. Campanhas de vacinação e requisitos legais de países para viajantes internacionais contiveram amplamente a propagação global da febre amarela. Porém, outras abordagens para controlar a propagação do patógeno, como o controle do vetor, são essenciais. Diferentes formas de controle são implementadas contra o vetor *Ae. aegypti*, como por exemplo; intervensão química, utilizando inseticidas e larvicidas químicos; larvicidas não químicos: peixes larvívoros, cobertura de óleo e captura em massa de larvas; técnicas genéticas, como o desenvolvimento de mosquitos transgênicos; ou novos inseticidas naturais (Weeratunga et al. 2017; OPAS, 2018).

1.1. Aedes aegypti

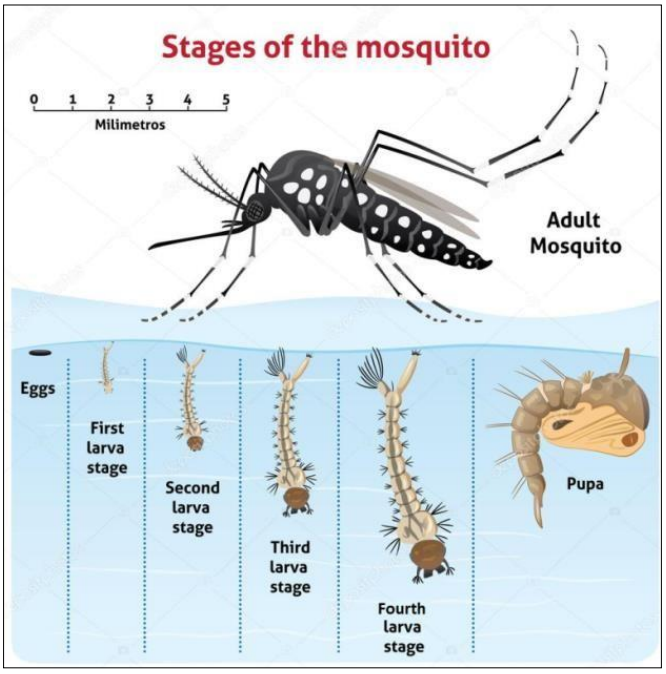
O mosquito *Ae. aegypti* possui tamanho aproximado de 1 cm, é preto com listras brancas no tronco, na cabeça e nas pernas. Suas asas são translúcidas e o ruído que produzem é praticamente inaudível ao ser humano (Figura 4). Os mosquitos macho e fêmea alimentam-se de néctar e seiva, no entanto a fêmea, necessita de sangue para a maturação dos ovos, ocorrendo a partir do segundo ou terceiro dia depois da emergência da pupa e da cópula com o macho. Em média, cada mosquito vive em torno de 30 dias e a fêmea produz aproximadamente 400 ovos (Instituto Oswaldo Cruz. Acesso: 9 de janeiro de 2019).

Figura 4. Mosquito *Aedes aegypti*.

Fonte: acrítica.com.

O ciclo de vida do *Ae. aegypti* varia de acordo com as condições climáticas e disponibilidade de alimento. Em condições ambientais favoráveis, após a eclosão dos ovos, o desenvolvimento dos mosquitos até a forma adulta, pode levar um período de 10 dias, passando pelos quatro estágios larvários, até alcançar o estágio de pupa seguido da transformação para mosquito adulto (Figura 5) (Instituto Oswaldo Cruz. Acesso: 9 de janeiro de 2019).

Figura 5. Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*.



Fonte: depositphotos.com.

O *Ae. aegypti* é um mosquito adaptado ao ambiente urbano que se baseia nas condições de planejamento urbano, presença de saneamento básico, coleta de lixo eficiente e higiene, o que enfatiza a importância do planejamento urbano (Almeida et al. 2020). O inseto utiliza os recipientes mais frequentes nos domicílios para o desenvolvimento de sua fase larvária, como exemplos, tanques de armazenamento de água, vasilhames temporários, potes, barris, pneumáticos usados, latas, garrafas e vasos de plantas. As larvas também podem ser encontradas em calhas de telhado, axilas de folhas, bambus cortados e etc. Essa espécie tem hábitos diurnos, alimentando-se e depositando seus ovos, preferencialmente, ao amanhecer e no período vespertino próximo ao crepúsculo (Rose, 2001; Braga & Valle, 2007; Oliveira et al. 2017).

Para o controle desse vetor são utilizadas metodologias com base na realidade de cada região trabalhada. Sendo as principais medidas, eliminar o vetor e seus focos de criação, drenagem e instalação de telas em portas e janelas, controle biológico, onde são usados peixes predadores que comem as larvas e pupas, ou ainda, agentes patógenos

como fungos e bactérias. O controle químico é uma das metodologias mais adotadas para o controle de vetores em saúde pública. O desenvolvimento de inseticidas que permanecem ativos por períodos longos foi um dos mais importantes avanços no controle de insetos no século XX. O primeiro inseticida de efeito prolongado, oupropriedade residual, foi o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT). Os outros produtos são constituídos, principalmente, pelos grupos dos organofosforados, carbamatos ou piretroides. Todos esses grupos atuam sobre o sistema nervoso central dos insetos e têm sido usados nos programas de controle de doenças transmitidas por vetores (Rose, 2001;Braga & Valle, 2007; Oliveira et al. 2017).

A resistência a esses inseticidas já vem sendo observada, o que faz necessário a aumento das concentrações dos inseticidas químicos utilizados, podendo causar danos à saúde da população, contaminação de rios, solo e animais da região. Um método alternativo para o controle desses vetores é o uso de plantas e seus constituintes como inseticidas naturais, minimizando os efeitos colaterais, provocados pelos inseticidas químicos, e sendo efetivos desde a fase larval do mosquito.

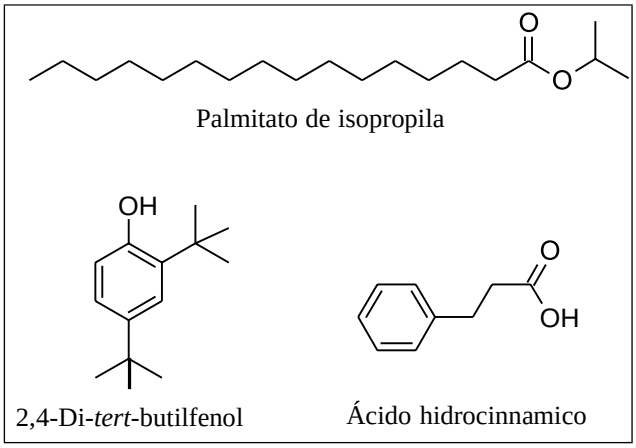
1.2. Produtos naturais para o controle do mosquito *Aedes*

As plantas são organismos que se desenvolvem em simbiose com insetos e outros microorganismos, logo, são fontes naturais de substâncias inseticidas e antimicrobianas, já que as mesmas são produzidas pelas espécies vegetais em resposta a um ataque patogênico ou com o objetivo de atrair polinizadores. Um dos principais grupos de substâncias produzidas pelas plantas são os compostos voláteis, como ácidos, aldeídos e terpenos, que podem apresentar propriedades atrativas (alimentação e polinização) e/ou deterrentes e inseticidas (Benelli, 2020; Benelli et al., 2020; Silverioet al., 2020).

O uso de inseticidas à base de produtos naturais de plantas constitui uma alternativa aos inseticidas sintéticos, pois se degradam mais facilmente e são menos nocivos ao meio ambiente, sem falar na menor toxidade para insetos não-alvo. De modo consequente, inseticidas derivados de produtos naturais de plantas, oferecem uma fonte promissora de novos produtos mais seguros para o controle de mosquitos, devido aos resíduos mínimos de sua degradação natural no campo e na água, minimizando os impactos ao ecossistema (Benelli, 2020; Benelli et al., 2020; Silverio et al., 2020). Dentro deste contexto, algumas famílias destacam-se quanto ao número de estudos de suas espécies vegetais contra o vetor *Ae. Aegypti*, como exemplo as famílias Fabaceae, Asteraceae, Piperaceae e Euphorbiaceae (Silverio et al., 2020).

De acordo com Silverio et al., (2020), os extratos orgânicos de algumas espécies, como *Hypericum japonicum* Thunb. (Hypericaceae) apresentam alta atividade larvicida contra os mosquitos de *Ae. Aegypti*. Sendo os principais constituintes presentes nos extratos testados as substâncias palmitato de isopropil, 2,4-Di-*tert*-butilfenol e ácido hidrocinnamico (Figura 6).

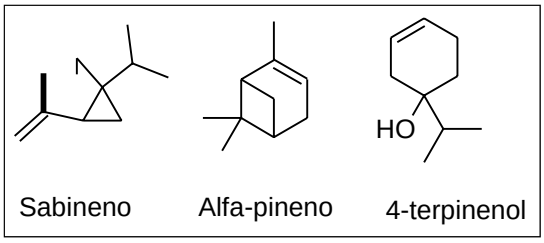
Figura 6. Metabolitos secundários presentes nos extratos orgânicos de *Hypericum japonicum* Thunb. (Hypericaceae)



Outro material vegetal valioso obtido das plantas são os óleos essenciais. Esses óleos essenciais são obtidos principalmente de plantas aromáticas, das quais existem mais de 3.000 espécies. É composto principalmente por substâncias voláteis, que apresentam uma importante vantagem, minimizam os efeitos nocivos ao meio ambiente,diferente dos inseticidas químicos. Dentre as várias famílias de espécies vegetais testadas contra o vetor *Aedes*, a família Asteraceae se destaca nos testes realizados contra o mosquito *Ae. Aegypti*, pois seus óleos apresentam efeitos adulticida, repelente, larvicida e oviposição. As famílias Myrtaceae, Fabaceae, Apiaceae e Lamiaceae também têm grande impacto nos estudos realizados com os óleos essenciais contra o vetor (Silverio et al., 2020).

O óleo da espécie *Myristica fragans* Houtt. (Myristicaceae) apresenta alta atividade contra as larvas de *Ae. Aegypti*, com valores de CL_{50} 28,2 µg/mL, e contra o adulto com CL_{50} 18,5 µg/mg/fêmea. Os principais componentes identificados nesses óleos foram sabineno, α-pineno e 4-terpineol (Figura 7) (Silverio et al., 2020).

Figura 7. Metabolitos secundários presentes nos óleos essenciais da espécie *Myristica fragans* Houtt. (Myristicaceae).



1.3. Óleos essenciais

Os produtos naturais têm servido a humanidade como fontes de agentes terapêuticos desde os primórdios da história. Diferentes culturas, tem se beneficiado das plantas por suas propriedades medicinais, fomentando a estes grupos o mais alto nível de conhecimento sobre os benefícios e malefícios das plantas no tratamento e na cura de doenças (Tangjang et al. 2011; Newman & Cragg, 2020). Estes conhecimentos populares são fontes promissoras para o isolamento de substâncias com atividade

biológica, que são indispensáveis na medicina moderna.

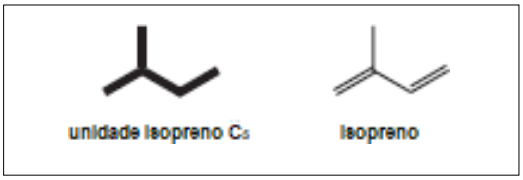
A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera as plantas medicinais como importantes instrumentos da assistência farmacêutica, por meio de vários comunicados e resoluções, expressa sua posição a respeito da necessidade de valorizar a sua utilização no âmbito sanitário ao observar que 70% a 90% da população nos países em vias de desenvolvimento dependem delas no que se refere à Atenção Primária à Saúde (OMS, 2011). O uso dessas práticas alternativas tem persistido pela dificuldade no acesso à assistência de saúde por parte da população, as quais são parcialmente supridas pelo uso das terapias alternativas (Aslam et al. 2016; Oladeji, 2016). Outra ação importante das espécies vegetais é quanto a sua ação de defesa contra isentos oupatógenos. Algumas espécies produzem altas concentrações de terpenos, que são geralmente tóxicos para alguns herbívoros, caracterizando-se como um mecanismo de defesa das espécies vegetais (Anulika et al. 2016; Habermann et al 2016). As substâncias produzidas pelas plantas durante os mecanismos de defesa contra herbívoros podem ter uma ação significativa ao serem isolados e testados *in vivo* contra insetos, larvas e etc. Diferentes autores descrevem ações larvicida e adulticida dos óleos essenciais contra insetos vetores. França et al. (2020) relatam uma atividade dos óleos essenciais de *Piper capitarianum* contra os vetores *Ae. Aegypti* e *Ae. Albopictus,* exibindo respectivamente uma ação larvicida com valores de CL_{50} = 87,6 μg/mL e 76,1 μg/mL, e adulticida com CL_{50} = 126,2 μg/mL e 124,5 μg/mL. O óleo essencial dos frutos de *Callistemon citrinus* apresenta atividade larvicida contra *Culex quinquefasciatus* com CL_{50}=17,3 μg/mL (An et al. 2020). Segundo Salman et al. (2020), os óleos essenciais de *Tagetes minuta* e *Tithonia diversifolia* apresentam uma atividade repelente de 50% contra os ácaros da espécie *Rhipicephalus appendiculatus* nas concentrações de 0,002 mg/cm^2 e 0,26 mg/cm^2, respectivamente.

Os óleos essenciais têm em sua composição classes de substâncias que são consideradas as responsáveis por atrair oponentes naturais de herbívoros, pela proteção contra patógenos, para comunicação entre as espécies vegetais, e na atração de polinizadores de sementes para facilitar a reprodução das plantas (Rehman et al. 2016; Malik et al. 2019). A composição dos óleos essenciais é complexa e rica em substâncias com características hidrofóbicas, com derivados de fenilpropanoides ou terpenos (Rehman et al. 2016; Malik et al. 2019).

Os óleos essenciais podem ser extraídos por meio do processo de hidrodestilação ou por destilação a seco. São insolúveis em água e possuem solubilidade em solventes orgânicos (exemplo: éter e álcool). São líquidos voláteis, com odor característico e baixa densidade. Eles são amplamente utilizados na indústria de perfumaria, aromaterapia e cosmética. Os óleos essenciais são encontrados em diferentes órgãos das plantas, como nas flores, folhas, frutos, cascas, raízes e sementes (Malik et al. 2019 CAP1).

Nas plantas aromáticas os óleos essenciais se originam de três grupos principais, substâncias fenólicas, derivados de ácidos graxos e isoprenoides. Comumente os derivados de isoprenoides predominam na composição dos óleos essenciais extraídos por hidrodestilação (Rehman et al. 2016). A estrutura básica dos isoprenoides é obtida a partir das unidades construtoras chamadas de isopreno (C_5) (Figura 8) (Rehman et al. 2016; Dewick, 2002; Malik et al. 2019).

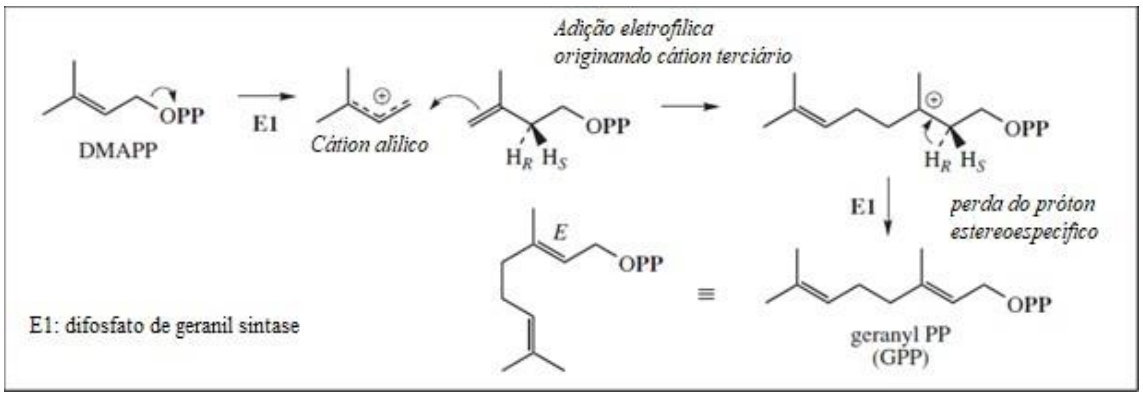
Figura 8. Estrutura básica dos isoprenóides (isopreno (C5)).



Fonte: Modificado de Dewick, 2002 .

A unidade ativa do isopreno C_5, pirofosfato de isopentenila (IPP) e seu isômero pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) são os precursores de todos os terpenoides. A biossíntese de terpenoides ocorre principalmente pela adição de IPP de uma forma cabeça a cauda ao seu isômero DMAPP, resultando na formação de difosfato de geranila (GPP) (Figura 9) (Rehman et al. 2016; Dewick, 2002; Malik et al. 2019).

Figura 9. Biossíntese de terpenoides precursores de difosfato de geranila.



Fonte: Modificado de Dewick, 2002.

O difosfato de prenila sintase, presente na célula vegetal, condensa os precursores IPP e DMAPP para formar difosfato de prenila, que é um substrato para terpeno-sintases (TPS). TPS é um grande grupo de enzimas responsáveis pela formação de os produtos terpenoides finais, presentes nos óleos essenciais.

Os fatores que justificam os estudos das espécies vegetais são diversos, a facilidade de cultivo, baixo custo, fatores culturais, entre outros (Aslam et al. 2016; Oladeji, 2016). As espécies vegetais são verdadeiras precursoras de produtos bioativos e pela necessidade de se explorar novos produtos, fármacos ou inseticidas naturais contra

as arboviroses e vetores, foram selecionadas oito espécies vegetais nativas ou adaptadas no estado do Amazonas, com o objetivo de avaliar seus constituintes químicos e o potencial biológico de cada uma frente ao *Ae. aegypti*.

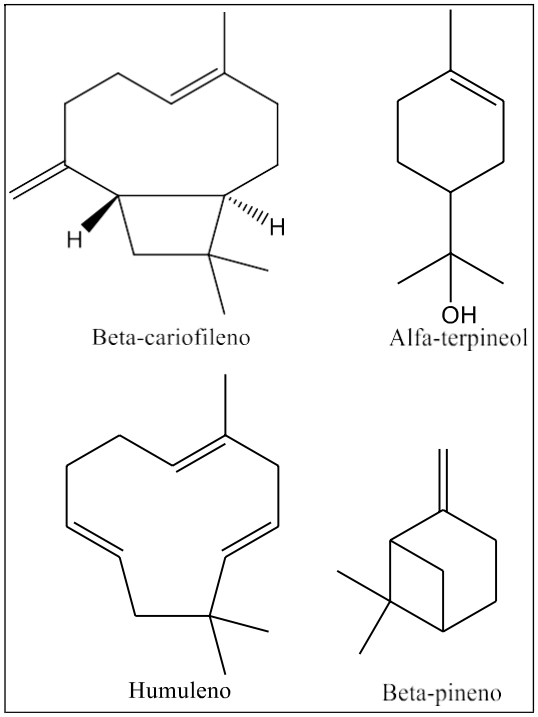
1.4. Espécies de estudo

Blepharocalyx sp.

A família Myrtaceae, uma das grandes famílias de Angiospermas, engloba quase 6.000 espécies de plantas, apresenta ampla distribuição geográfica, com centros de diversidade na Austrália, sudeste da Ásia e América do Sul (Wilson et al. 2005). No Brasil ocorrem quase 1.000 espécies distribuídas em 23 gêneros, o que coloca a família entre as com maior riqueza de espécies na flora do país. O gênero *Blepharocalyx* possui 41 espécies catalogadas, que se apresentam na forma de arbusto ou árvores com altura de 10 a 20 metros (Giaretta et al. 2016). *Blepharocalyx* sp. pode ser encontrada nas regiões Norte (Amazonas), Nordeste (Bahia), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás,Mato Grosso do Sul, Mato Grosso) Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio deJaneiro, São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina) (Giaretta et al. 2016). Os componentes majoritários de seus óleos essenciais são β-cariofileno, α- terpineol, humuleno, β-pineno (Figura 10) e possui atividade antifúngica e antibacteriana (Bianchini et al. 2018). A espécie *Blepharocalyx salicifolius* possui vários estudos para avaliar a ação de seus óleos essenciais para o controle de doenças cardíacas, asma e tosse (Hernandez et al. 2018), além de inibir a ação fúngica de *Gloeophyllum trabeum* em móveis de madeira (Bianchine et al. 2018). Os extratos das folhas e cascas da espécie *Blepharocalyx cruckshanksi* apresentam atividade *in vitro* contra linhagens de células cancerígenas, demonstrando potencial para o uso quimioterápico (Baez et al. 2020). São

observados poucos estudos para as espécies do gênero *Blepharocalyx*, o que demonstra a necessidade de uma investigação quanto a suaação química.

Figura 10. Principais terpenos encontrados nos óleos essências da espécie *Blepharocalyx* sp.

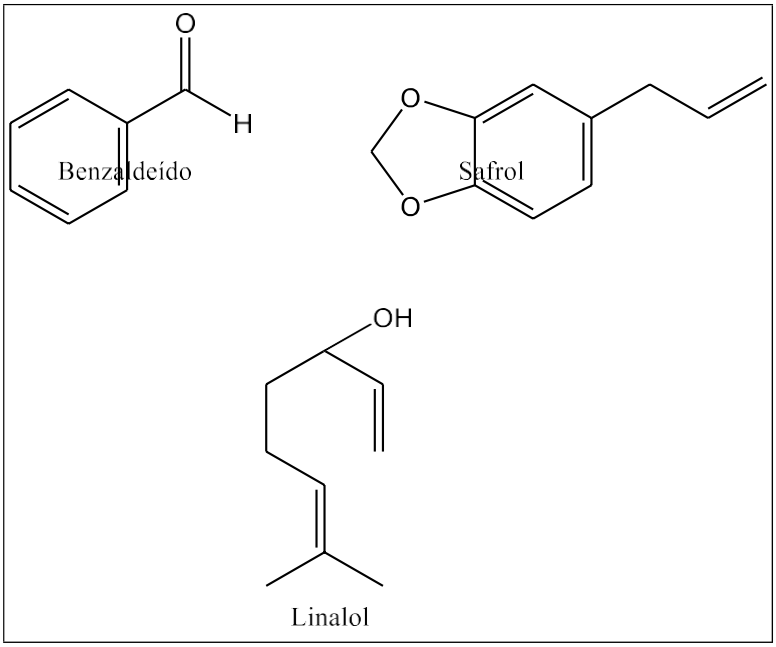


Endlicheria sp.

A família Lauraceae possui cerca de 2500 espécies distribuídas em 70 gêneros, presente em todos os continentes, especialmente na Ásia e na América do Sul (Teles et al. 2019). As plantas do gênero *Endlicheria* são utilizadas no tratamento de doenças de pele e para fins cosméticos. Nos estudos envolvendo as espécies desse gênero a composição de extratos apresenta neolignanas hexahidrobenzofuranóides (disodantina A, disodantina B, burchelina) e derivados bioativos de benzoato de benzila (2-hidróxibenzoato de benzila; 2-hidróxi-6-metóxibenzoato de benzila; 2,6-dimetóxibenzoato de benzila e 2,5-dimetóxibenzoato de benzila) (Yamaguchi & Veiga-Junior, 2013). Seus óleos essenciaissão ricos em componentes aromáticos (benzaldeído,

benzilbenzoato), fenilpropanoides (safrol, eugenol, miristicina), monoterpenos e sesquiterpenos, comumente utilizadospara fins comerciais e farmacológicos, como o linalol, geranato de metila e β- cariofileno (Figura 11) (Yamaguchi & Veiga-Junior, 2013; Oliveira et al. 2015).

Figura 11. Principais terpenos encotrados nos óleos essenciais do gênero *Endlicheria.*



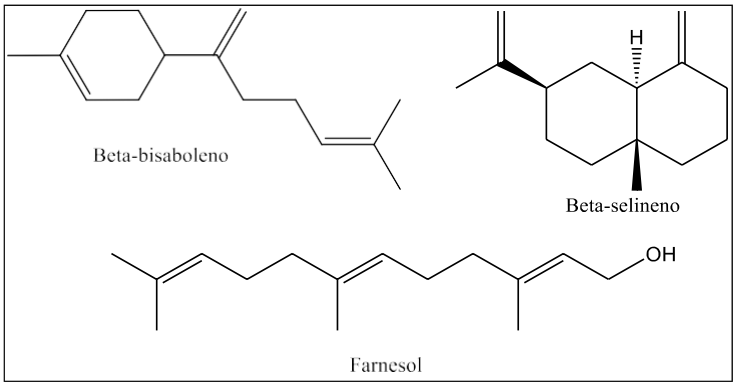
Estudos *in vitro* dos óleos essenciais da espécie *Endlicheria bracteolata* contra *Leishmania amazonensis* indicam a capacidade de induzir danos as formas amastigotas e promastigotas do parasita, demonstrando uma alternativa no modo de ação do tratamento da doença (Rottini et al. 2019). A espécie *Endlicheria arenosa* demonstra promissora atividade antimicrobiana (Silva et al. 2016) e fitopatogênica (Albarracin et al. 2017). Não se tem muitos estudos sobre a composição química ou ação farmacológica das espécies do gênero *Endlicheria*, o que enfatiza a necessidade de novas investigações a respeito das diferentes aplicações de suas espécies.

Bocageopsis sp.

A família Annonaceae possui muitos gêneros com pouco ou nenhum estudo, embora muitos deles tenham sido expandidos do ponto de vista fitoquímico, existem atividades que ainda precisam ser exploradas. O gênero *Bocageopsis* é constituído por quatro espécies, *B. mattogrossensis, B. canescens, B. multiflora* e *B. pleiosperma*, todas restritas a América do Sul, e no Brasil é encontrada na região Amazônica, nos estadosdo Amazonas e Pará (Soares et al. 2015).

O gênero *Bocageopsis* tem sido quimicamente explorado, sendo os óleos essenciais de suas folhas caracterizados e avaliados quanto a sua atividade bacteriana (Alcântara et al. 2017; Bay et al 2019). Na composição química dos seus óleos foram identificados como os seus principais constituintes os terpenos β-bisaboleno, bergamoteno, β-farneseno, β-selineno, α-selineno e farnesol (Figura 12) (Oliveira et al. 2014; Soares et al. 2015; Alcântara et al. 2017). Oliveira et al. (2014) relata a atividade dos óleos essencias de *B. multiflora* contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, o que possibilita uma alternativa de ação contra o parasita. Para a espécie *B. multiflora* também são relatadas as atividades bactericida e antimicrobiana (Alcantara et al. 2017; Bay et al. 2019). As atividades observadas para as espécies de *Bocageopsis* demosntram alto potencial químico e farmacológico das espécies, demosntrando a importancia da continuidade do estudo mais abragente dessas espécies.

Figura 12. Substâncias presentes nos óleos essenciais das espécies do gênero *Bocageopsis*.



Virola sp.

Virola é um gênero da família Myristicaceae, com ocorrência nas Américas e pode ser encontrada no Panamá, Brasil, Guiana, Bolívia, Colômbia, Equador e Peru. No Brasil, está distribuída entre os estados do Acre, Amazonas, MatoGrosso, Pará, Rondônia e Roraima. Espécies de *Virola* são utilizadas por grupos indígenas como veneno nas flechas para caça, na produção de "cheiros" alucinógenos, onde seus efeitos são muito intensos e desagradáveis para a maioria das pessoas, causando náuseas, dores de cabeça e outros desconfortos relacionados, juntamente com estados de sonho, sonho lúcido e alucinações (Cretton et al. 2016). Suas espéciespossuem aplicação medicinal para o tratamento de infecções, reumatismo, asma, hemorroidas, tumores e inflamações (Coutinho et al. 2017; Fernandes et al. 2019). Possui relatos de alcalóides, flavonóides, lignanas e neolignanas em sua composição (Coutinho et al. 2017; Fernandes et al. 2019), o que tornam as espécies desse gênero objetos de vários estudos quanto a sua composição química ou ação farmacológica.

A espécie *Virola surinamensis* apresenta atividade contra as formas promastigotas de *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis* (Veiga et al. 2017). A resina obtida das cascas de *Virola oleífera* é utilizada no tratamento de úlceras estomacais e proporcionam atividade gastroprotetora (Pereira et al. 2017). Os óleos essenciais das espécies *Virola calophylla*, *Virola multinervia,* e *Virola pavonis* apresentam baixa atividade contra as larvas de *Ae. Aegypti*, de acordo com Mesquita et al. (2020).

Origanum vulgare

O gênero *Origanum*, pertencente à família Lamiaceae, possui 205 espécies, onde se destaca a espécie *Origanum vulgare*, nativa da região mediterrânea (Europa, Norte da África e Oriente Médio) e aclimatada na América do Norte e nas regiões áridas da América do Sul. Foi transportado pelos romanos do Mediterrâneo para a Europa e considerado por eles como símbolo da paz. Está aclimatado no Brasil, mas não é cultivado em larga escala. É uma planta perene, tem entre 25 a 40 cm de altura, com folhas opostas, ovais, verde-escuras (Rodrigues et al. 2005). Possui propriedades terapêuticas como antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias, antioxidantes, anticancerígenas, emolientes e digestivas (Lima et al. 2007; Souza et al. 2010).

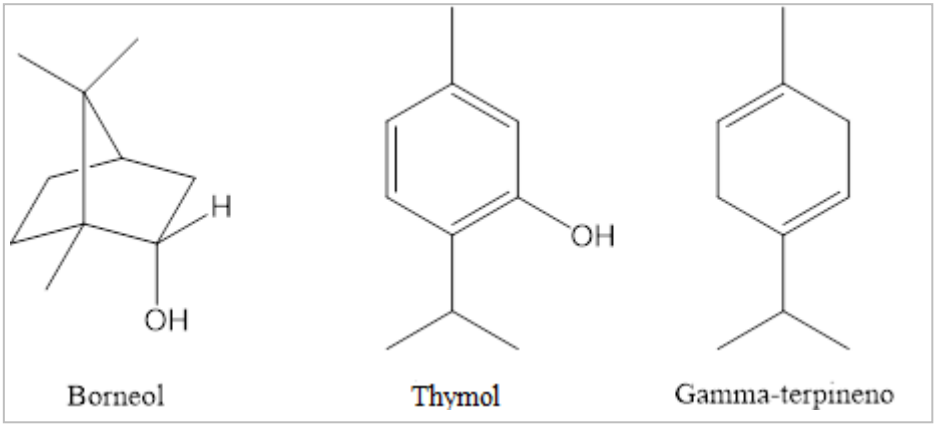
Os óleos essenciais dessa espécie são ricos em substâncias com atividade biológica como timol, carvacrol e terpineol, além de monoterpenos, sesquiterpenos, ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, resinas e etc. (Rodrigues et al. 2005). Seus óleos apresentam atividade antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatórias e antioxidantes (Rodrigues et al. 2005; Lima et al. 2007; Souza et al 2010; Giatropoulos et al. 2018).

O óleo essencial de *O. vulgare* possui atividade inseticida relatada contra larvas de farinha, pragas de insetos agrícolas, baratas, mosquitos e moscas adultas (Paiva et al., 2011; Govindarajan et al., 2016; Xie et al., 2019). Os estudos com os óleos da espécies *Origanum* descrevem atividade biológica relevante contra as larvas de *Ae. albopictus* (Giatropoulos et al., 2018) e seus principais compostos apresentam atividade contra as larvas dos vetores da malária, *Anopheles stephensi* e *Anopheles subpictus* (Govindarajan et al., 2016; Giatropoulos et al., 2018). Esses estudos enfatizam a importancia da continuidade da insvestigação química e de novos testes envolvendo essas espécies.

Thymus vulgaris L.

Thymus vulgaris, pertecente à família Lamiaceae, é um arbusto que apresenta folhas pequenas. Esta espécie vegeta é nativa da Europa, com ocorrência ao sudeste da Itália, onde é cultivado para consumo como condimento e do óleo essencial. O gênero *Thymus* possui 350 espécies, seus óleos são ricos em timol, com apreciável poder antisséptico, muito utilizado contra infecções pulmonares e como estimulante digestivo (Rota et al. 2007; Dauqan & Abdullah, 2017). Adicionalmente, são descritas para espécies do gênero propriedades tônicas, antiespasmódicas, expectorantes e vermífugas (Rota et al. 2007; Borges et al. 2012). Em infusão, as folhas de *T. vulgaris* são usadas no combate a infecções de garganta, pulmonares e na eliminação de parasitas(Rota et al. 2007; Borges et al. 2012). A espécie *T. vulgaris* apresenta diversas aplicações, entre as quais se sobressaem: adstringente, digestiva, antisséptica, estimulante da circulação, antioxidante e antibacteriana. Seu óleo antisséptico é eficaz no combate a infecções, tem forte efeito antibacteriano e antifúngico, auxiliando o sistema imunológico (Rota et al. 2007; Siqueira et al. 2015). A composição química de seus extratos engloba terpenos, saponinas, flavonoides e taninos. Seus óleos são compostos por substâncias químicas, como ésteres, fenóis, álcool, aldeídos e hidrocarbonetos. Como substâncias principais são identificadas borneol, timol, linalol e γ- terpineno (Figura 13) (Borges et al. 2012).

Figura 13. Substâncias presentes nos óleoes essenciais de *Thymus vulgaris*.



Segundo Sheng et al., (2020), quando testado contras larvas de *Ae. albopictus*, o óleo essencial de *T. vulgaris* apresenta uma CL_{50} 31,60 µg/mL, sendo timol o seu principal constituinte químico. Traboulsi et al. (2002) também relata a atividade larvicida dos monoterpenos timol e carvacrol contra o mosquito *Culex pipiens* com valores de CL_{50} 36,0 e 37,6 mg/L, respectivamente.

Ampelozizyphus amazonicus Ducke

Ampelozizyphus amazonicus pertence à família Rhamnaceae e é vulgarmente conhecida como “cerveja de índio” pelos ribeirinhos e pelos povos indígenas pertencentes à Amazônia brasileira, venezuelana, colombiana e peruana.

No Brasil esta espécie é encontrada nos estados do Amazonas, Pará e Roraima (Lima, 2006), onde recebe outros nomes, tais como saracura-mira, cerveja-do-mato, cervejeira, cervejinha e curupirá-mira (Santos et al. 2005; Amaral et al., 2008; Carmo et al., 2015). A espécie está associada ao bem-estar e na fortificação do corpo (Andrade-Neto et al. 2008), este uso medicinal é milenar e bastante difundido na região do Rio Negro e também em outras regiões da Amazônia, os habitantes destas regiões relatam o

efeito energético da espécie quando faz-se a mistura da entrecasca das raízes com o caule em água (Santos et al. 2005).

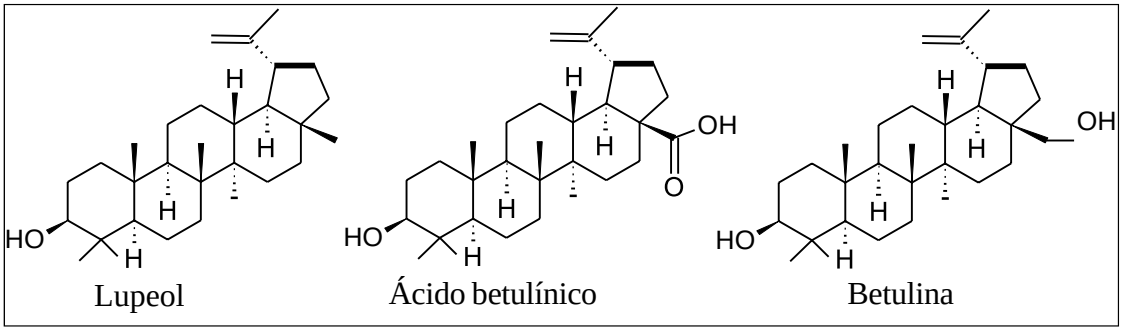
As propriedades terapêuticas dos chás de *A. amazonicus* não se limitam, somente, ao seu efeito energético, sendo também empregada no tratamento de distúrbios gastrintestinais, inflamações e quadros de febre (Rodrigues, 2006), anemia, diabetes e no tratamento de veneno de cobra e na prevenção da malária. Estas propriedades farmacológicas são obtidas a partir do chá das raízes ou do caule de *A. amazonicus*. Sendo que estes apresentam efeitos de prevenção e cura da malária (Brandão, 1991; Amaral et al., 2008; Carmo et al., 2015).

As informações adquiridas da sabedoria popular necessitam do acompanhamento científico para a comprovação do potencial farmacológico da espécie mencionada, alguns estudos fitoquímicos já foram realizados e é com pertinência que citamos os estudos realizados por Krettli (2001) e colaboradores, onde mostraram que o extrato bruto das raízes de *A. amazonicus* é ativo contra os esporozoítos (forma infectante do *Plasmodium*) do *Plasmodium gallinaceum* e /ou contra os parasitas que se encontram nos estágios iniciais do ciclo de vida parasitário desenvolvido nas células parênquima hepático (esquizogonia tecidual). Posteriormente, Valter (2008) e colaboradores comprovaram atividade do extrato etanólico 80% contra as formas infectantes de *P. berghei*. Estas observações justificam o uso popular das raízes dessa planta na profilaxia da malária.

Estudos fitoquímicos registram o isolamento e identificação de triterpenos e saponinas. Essas substâncias apresentam diferentes atividades biológicas (Andrade-Neto et al. 2008, Carmo et al. 2015), por exemplo, saponinas do tipo dammarano foram associadas ao efeito hepatoprotetor (Yoshikawa et al. 2003) e atividade antioxidantes observadas (Tung et al. 2010). As saponinas também estão associadas à indução do

organismo a uma maior resistência, o que poderia explicar o papel imunológico de *A. amazonicus* ao impedir as recaídas da malária (Panossian et al. 1999). Carmo e colaboradores (2015) relatam atividade antiplasmódica contra o *Plasmodium falciparum* para os triterpenos lupeol, ácido betulínico e betulina (Figura 14), isolados do extrato clorofórmio das cascas de *A. amazonicus.* O ácido betulínico isolado apresentou maior atividade antiplasmódica contra o *P. falciparum* (CI_{50} 5,6 µM), e os extratos com maiores concentrações do triterpeno apresentaram melhores atividades contra o plasmódio.

Figura 14. Triterpenos pentacíclicos isolados do extrato das cascas de *Ampelozizyphus amazonicus.*



Algumas das espécies selecionadas já foram estudadas pelo grupo de pesquisa e demonstraram a necessidade de uma continuação e ampliação do seu entendimento farmacológico e químico, quanto a ação, aplicação e composição das substâncias presentes nessas espécies vegetais.

Alpinia zerumbet B.L. Burtt & R.M. Sm.

Zingiberaceae é uma família de plantas medicinais altamente eficaz que tem sido amplamente utilizadas como especiarias e/ou no tratamento de várias doenças. A família está amplamente distribuída nos trópicos da Ásia, África e Américas com cerca de 49 gêneros e 1200 espécies (Abubakar et al. 2018; Cruz et al. 2020). Além disso, as

espécies da família Zingiberaceae também são utilizadas para fins não medicinais, como tinturas, especiarias, perfumes e estética (Abubakar et al. 2018; Cruz et al. 2020).

O gênero *Alpinia* é o maior e mais amplamente distribuído, possui 230 espécies. Estudos relatam o potencial fitoquímico, farmacológico e atividades medicinais e não medicinais das espécies desse gênero (Abubakar et al. 2018; Cruz et al. 2020). São descritas para essas espécies diferentes ações farmacológicas, como o uso no tratamentode reumatismo e doenças gastrointestinais. Apresentam efeito diurético, sedativo e hipertensivo (Abubakar et al. 2018; Cruz et al. 2020; Kawai et al. 2020). As flores, folhas e rizomas da espécie *Alpinia zerumbet* tem características aromáticas e sãoamplamente utilizadas na medicina popular (Kawai et al. 2020).

Os óleos essenciais de *A. zerumbet* possuem alta atividade antioxidante e são utilizados nas indústrias alimentícia e cosmética, como aromatizantes ou para o controle de fungose bactérias, além de relatos do auxilio no controle e regulação da pressão arterial (Abubakar et al. 2018; Cruz et al. 2020; Kawai et al. 2020). A composição química do óleo essencial obtido das folhas de *A. zerumbet* mostrou uma variedade de compostos terpênicos, como terpinen-4-ol e 1,8-cineol, que apresentam atividade vasorelaxante, efeito hipotensivo, ansiolítico e sedativo (Cruz et al. 2020).

No Brasil, *A. zerumbet* é popularmente conhecida como “colônia” e suas folhas são vendidas para a produção de chás, como infusão para o tratamento de hipertensão arterial e sintomas de ansiedade (Cruz et al. 2020). Nos extratos de *A. zerumbet* são identificados compostos fenólicos, flavonoides e kavalactonas (Abubakar et al. 2018; Cruz et al. 2020; Kawai et al. 2020).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliação química e farmacológica dos óleos essenciais e extratos de *Alpinia zerumbet*, *Ampelozizyphus amazonicus*, *Blepharocalyx* sp., *Endlicheria* sp., *Virola* sp., *Bocageopsis* sp., *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris* visando o aprimoramento do conhecimento químico das espécies e verificação de suas propriedades para o controle do vetor *Aedes aegypti*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil químico das espécies vegetais;
- Avaliar a atividade larvicida e adulticida dos extratos e óleos essenciais frente ao vetor *Ae. aegypti*;
- Avaliar a atividade antioxidante e a ação toxicológica dos extratos de *A. amazonicus* e *A. zerumbet*;
- Analisar o processo digestivo do chá de *A. amazonicus*;
- Avaliar a ação repelente dos óleos essências frente aos adultos de *Ae. aegypti*;

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta do material vegetal

As espécies vegetais *Ampelozizyphus amazonicus*, *Blepharocalyx* sp., *Endlicheria* sp., *Virola* sp. e *Bocageopsis* sp. foram coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke, Km 26, da AM-010, com exsicatas depositadas no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). A espécie *Ampelozizyphus amazonicus* foi coletada em dezembro de 2016 e sua identificação foi realizada por comparação da exsicata depositada no herbário do INPA sob o número 191532. As plantas *Blepharocalyx* sp., *Endlicheria* sp., *Virola* sp. e *Bocageopsis* sp. foram coletadas em maio de 2017, e as exsicatas foram depositadas no herbário do INPA e aguardam a identificação botânica das respectivas espécies.

As folhas da espécie *Alpinia zerumbet* foram coletadas na área de cultivo da FIOCRUZ no Rio de Janeiro – RJ e Brasília – DF, em abril de 2016. A exsicata da espécie foi depositada no herbário da Farmanguinhos/FIOCRUZ com os códigos de identificação CBPM 672 e CBPM 1077, respectivamente.

As plantas *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris* foram compradas em julho de 2018 no mercado Municipal Adolpho Lisboa, localizado na rua dos Barés, Manaus, Amazonas e as respectivas identificações foram realizadas pelo Dr. José Luiz Pinto Ferreira da Universidade Federal Fluminense/RJ.

Figura 15. Algumas das espécies vegetais de estudo. (A) *Alpinia zerumbet*, (B) *Thymus vulgaris*, (C) *Origanum vulgare* e (D) *Ampelozizyphus amazonicus.*

Fonte:http://www.plantasonya.com.br/cultivos-e-cuidados/cultivo-do-gengibre-concha alpinia zerumbet.html; https://theoriginalgarden.com/p/plants/vegetables/vegetable/origanum-vulgare-oregano; https://floradigital.ufsc.br/busca.php. Acesso em: 24 de janeiro de 2021.

3.2. Solventes e Reagentes

Os solventes e reagentes das marcas – Tedia ou Merck grau HPLC e P.A. A água utilizada nos experimentos foi água Mili–Q.

A avaliação dos perfis cromatográficos das frações obtidas nos processos de fracionamento foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD), com sílica gel 60 e RP-18. Para as cromatografias analíticas foram utilizadas cromatofolhas de alumínio 20x20 cm recobertas com gel de sílica GF_{254} com 0,2 mm de espessura da marca Merck. A detecção das substâncias sobre CCD ocorreu pela visualização sob luz

visível e ultravioleta (UV) em comprimentos de onda de 254 e 365 nm, seguida pela aplicação de agentes de revelação, por exemplo, vanilina sulfúrica ou Komarosky.

Reagente Químico Vanilina Sulfúrica (Mattos, 1997).

O revelador é constituído por duas soluções:

Solução A - 1g de vanilina, solubilizada em 100 m de etanol

Solução B - 5g H_2SO_4 concentrado, dissolvidos em 100 mL de etanol (96%) sob resfriamento.

A cromatoplaca foi pulverizada com a solução A, seguida da solução B e aquecida por 10 min a 100 ^{0}C (reagente geral; saponinas: coloração rósea ou azul (núcleo triterpenoidal oleanólico).

Reagente Químico Komarowvsky

O revelador é constituído por duas soluções:

Solução A - ácido sulfúrico a 50%.

Solução B - solução de 4–hidroxibenzaldeído a 2%, em metanol.

Antes do uso, misturam-se 2 mL de solução A com 3 mL de solução B.

A cromatoplaca foi pulverizada com a mistura das soluções A e B e aquecida por 10 min a 60 ^{0}C (saponinas e as agliconas desenvolvem coloração do amarelo ao azul).

3.3. Técnicas de análises

Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

As análises foram realizadas em um sistema integrado a um detector de feixe de diodos (DAD - Shimadzu SPD-M20A) na região de 190 a 800 nm e fluxo de 0,5

mL/min. Todas as análises em CLAE foram efetuadas em coluna de fase reversa, C-18 Shimpack XR-ODSII 2,0 mm x 15 cm, partícula de 2,2 µm. Equipamento Shimadzu, utilizando uma injeção de 2 µL. Todos os solventes utilizados foram de alto grau de pureza da marca TEDIA, e a água obtida por destilação em sistema Milli-Q. Os solventes foram filtrados em filtro 0,45 µm (Millipore®) antes da utilização.

Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas – CLAE-EM

As separações cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo Bruker equipado com um sistema de bombas binárias. As separações cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu equipado com um sistema de bombas binárias. Fase estacionária C-18 Shimpack XR-ODSII 2,0 mm x 15 cm, partícula de 2,2 µm. Injeção de 2 µL com fluxo de 0,3 mL/min, com monitoramento em 270 nm. O sistema de CLAE está acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo- quadrupolo. Foi utilizada uma fonte de eletrospray (ESI) do tipo Z-spray. Os dados foram obtidos no modo SCAN usando uma faixa de 100 a 2000 *m/z*. As condições de ionização da fonte foram: voltagem no capilar: 4kV; temperatura da fonte: 200 °C, fluxo de gás no cone: (4L/min.). Gás Nitrogênio (pureza >99%) foi utilizado como gás de nebulização. Todas as alíquotas foram injetadas na concentração de 1 mg/mL.

Cromatografia com fase gasosa acoplada a espectrometria de massas - CG-EM

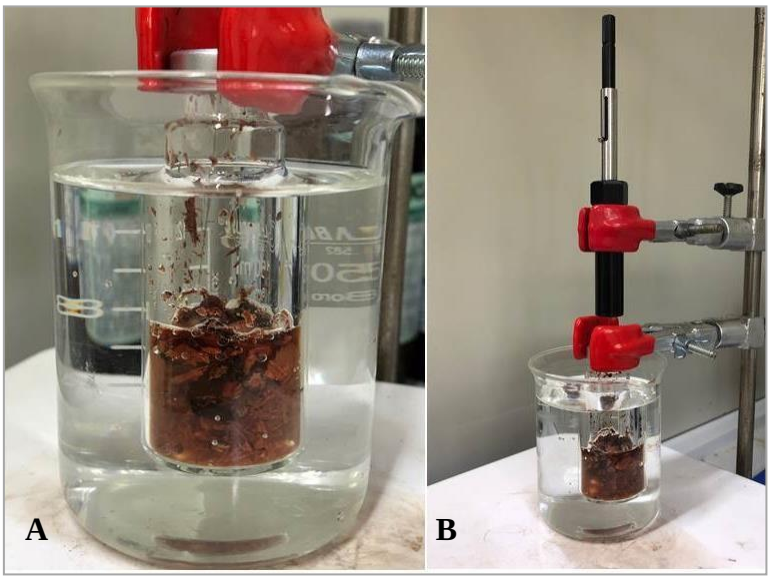
A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foi realizada em um cromatógrafo a gás Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra, nas seguintes condições: Coluna capilar: Rtx®-5MS (5% difenil e 95% dimetil polisiloxano) com dimensões de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; Injetor: 260°C; Impacto de elétrons: 70 eV;

Gás de arraste: Hélio; Vazão: 1,5 mL/min; Injeção sem divisão de fluxo; Programa de Temperatura: 50 – 260 °C (7 °C min^{-1}). A interpretação e identificação dos espectros de massa foram realizadas por comparação com a base de dados de espectro de massa Wiley NBS contida no aparelho e com a literatura (ADAMS, 2007). Os resultados foram expressos como porcentagem relativa da área do pico no cromatograma.

Headspace em microextração de fase sólida – HS-SPME

As análises em *headspace* das folhas de *Alpinia zerumbet* e dos galhos de *Ampelozizyphus amazonicus* foram realizadas utilizando a fibra PDMS (Polidimetilsiloxano) 100 µm, a qual foi condicionada em uma solução de água:metanol 50% durante 30 minutos e mantida na porta de injeção do CG a 260 °C por 10 minutos. Para as extrações foram utilizados 3 g do material vegetal a ser analisado, juntamente com NaCl 25% e 5 mL de água Milli-Q. A extração foi realizada utilizando vails de vidro com volume de 20 mL, selados com lacre de alumínio e septo. Os *vials* foram submetidos a aquecimento em banho-maria a 40 °C com agitador magnético parafacilitar a liberação das substâncias voláteis (Figura 16A). Após 10 minutos de equilíbrio entre a solução e a câmara de expansão, a fibra foi exposta para adsorção dos analitos durante 40 minutos (Figura 16B). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Figura 16. Preparo dos galhos de *Ampelozizyphus amazonicus* como exemplo da extração por *Headspace*-SPME (A). Exposição da fibra (B).



Fonte: Oliveira, A. A. 2020.

Após o tempo de adsorção, a fibra foi novamente exposta na porta de injeção do cromatógrafo para início da análise cromatográfica. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foi realizada em um cromatógrafo a gás Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra, nas seguintes condições: Coluna capilar: Rtx®-5MS (5% difenil e 95% dimetil polisiloxano) com dimensões de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm; Injetor: 260°C; Impacto de elétrons: 70 eV; Gás de arraste: Hélio; Vazão: 1,5 mL/min; Injeção sem divisão de fluxo; Programa de Temperatura: 50 – 260 °C (7 °C min^{-1}).

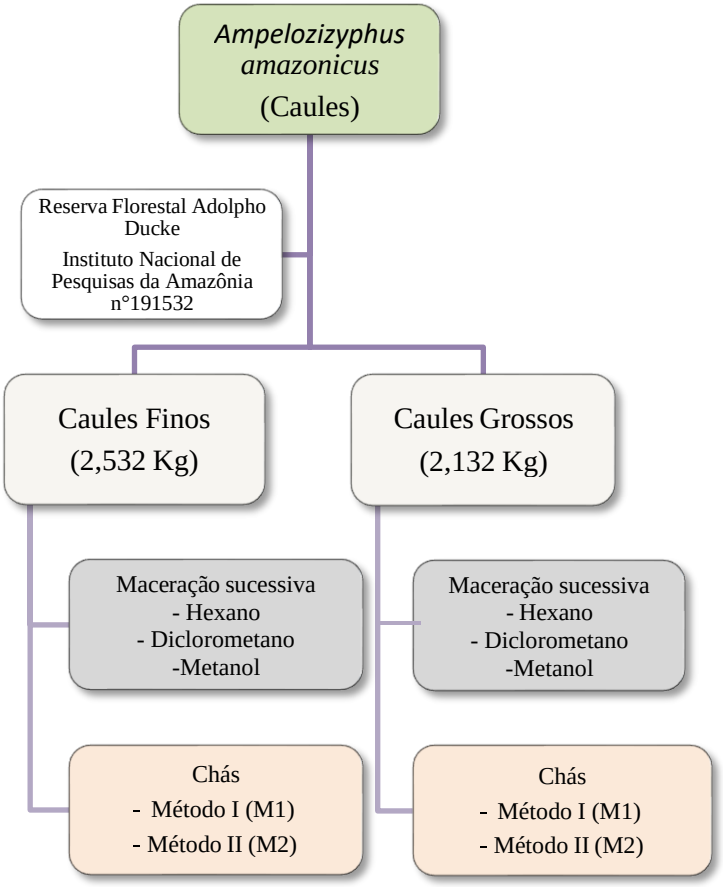
3.4. Preparo dos extratos e chás

Ampelozizyphus amazonicus

Os caules de *Ampelozizyphus amazonicus* foram separados em caules finos (CF) (2,532 Kg) e caules grossos (CG) (2,132 Kg) e submetidos à secagem em temperatura ambiente, e posteriormente triturados para obtenção dos extratos.

Extrações sucessivas do material vegetal foram efetuadas por maceração em frasco tipo Mariote com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano e metanol), por um período de 5 (cinco) dias para cada solvente. Após filtração, os solventes foram concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotatório para obtenção dos extratos.

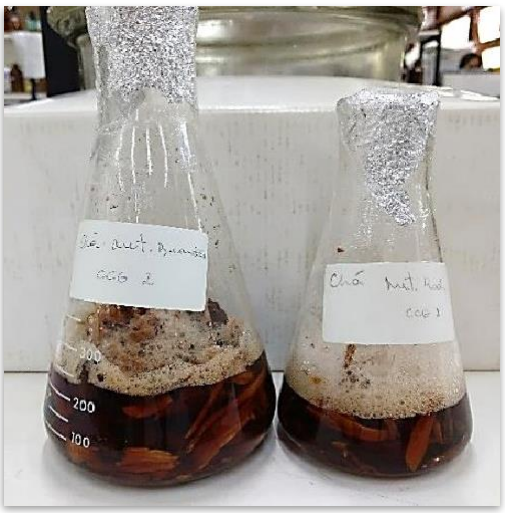
Figura 17. Fluxograma da obtenção dos extratos e chás de *Ampelozizyphus amazonicus.*



Para a produção dos chás de *A. amazonicus* foram utilizandas duas metodologias diferenciadas; Método I (Brandão et al., 1991) (M1) e Método II (Rodrigues et al., 1989) (M2) (Figura 18). O Método I (1991) consiste em utilizar 9,8 g de material vegetal em 38 mL de água destilada agitando-o por 24 horas. Após esse intervalo o material é filtrado e liofilizado. Para o Método II, utilizou-se 1g de material vegetal em

10 mL de água destilada, agitou-se por 5 minutos seguidos de repouso por 24 horas. Após esse intervalo o material foi filtrado e liofilizado.

Figura 18. Obtenção dos chás de *Ampelozizyphus amazonicus.*



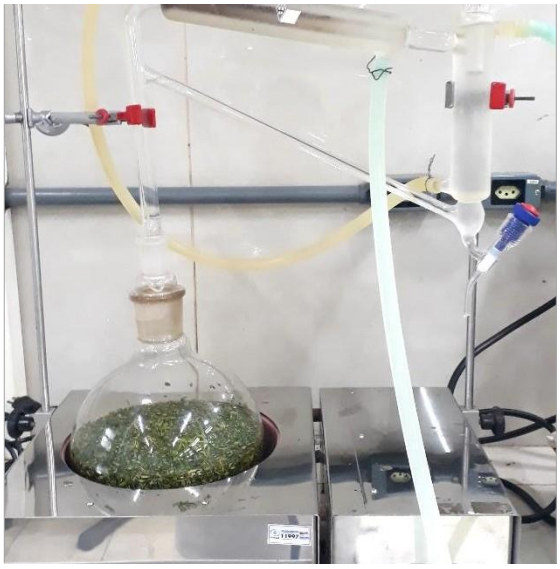
Fonte: Oliveira, A. A. 2016.

3.5. Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais das espécies *Blepharocalyx* sp., *Endlicheria* sp., *Virola* sp., *Bocageopsis* sp., *O. vulgare* e *T. vulgaris* foram extraídos por meio do processo de hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger (Figura 19). Foram utilizados 100 g do material vegetal de cada espécie em 1000 mL de água destilada, em aquecimento por um período de 4 horas. Ao final, aos óleos essenciais obtidos foi adicionado cerca 1 mgde sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e após centrifugação foram armazenados a uma temperatura de -20°C. O cálculo do rendimento para cada óleo foi realizado com a fórmula abaixo.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Massa do óleo essencial obtido (g)}}{\text{Massa do material vegetal (g)}} x\,100$$

Figura 19. Sistema Clevenger utilizado no processo de extração dos óleos essenciais.



Fonte: Oliveira, A. A. 2016.

3.6. Ensaios Biológicos

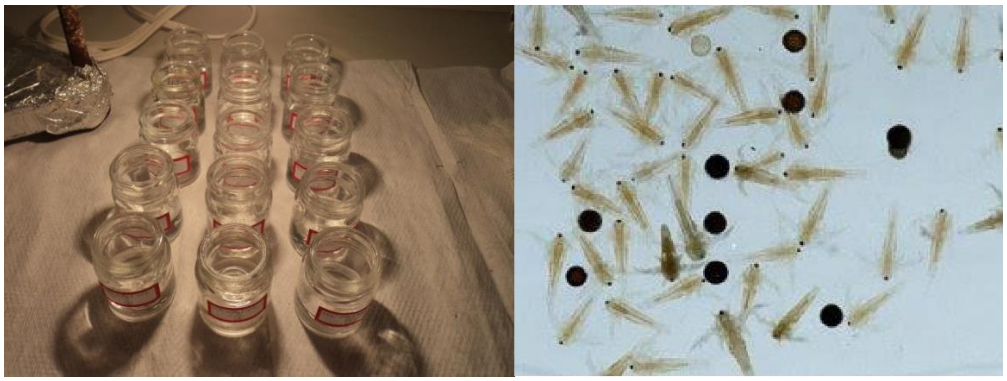
3.6.1. Teste frente à *Artemia salina*

O bioensaio com *A. salina* foi baseado na técnica descrita por Meyer et al. (1982). Em um aquário de vidro, os cistos de *A. salina* (10 mg) foram incubados na solução salina (38 g de sal marinho sintético dissolvidos em 1L de água destilada), sob iluminação artificial a 28 °C. Após 24 horas foram transferidos os náuplios (primeiro estágio larval) para outro aquário contendo solução salina e mantendo-os em nova incubação por mais 24 horas, iluminação artificial e a 28 °C. Após a segunda incubação,obteve-se apenas o estágio de metanáuplios dos microcrustáceos.

Foram preparadas, em triplicata, soluções dos extratos e óleos a serem testados em seis concentrações diferentes (1000, 750, 500, 250, 100 e 50 µg/mL), utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente. Essas soluções foram adicionadas em tubos contendo 5 mL de solução salina com 10 larvas de *A. salina* em estágio metanáuplios. As amostras foram submetidas à iluminação artificial durante 24 horas (Figura 20), após

esse período foram contabilizadas as larvas vivas e mortas (indivíduos imóveis e/ou depositados no fundo do tubo).

Figura 20. Amostras submetidas à iluminação artificial.



Fonte: Oliveira, A.A. (2019); http://enigmasdosaquarios.blogspot.com/2016/05/artemia-salina-pequenos-truques-i.html. Acesso em 06 de fevereiro de 2021.

A partir dos valores dos microcrustáceos vivos e mortos em cada concentração testada, determinou-se a CL_{50} (com 95% de confiança) através do método PROBIT de análise. A classificação dos óleos e extratos seguiu os critérios estabelecidos por Meyer et al. (1982), onde são considerados tóxicos extratos com $CL_{50} < 1000$ μg/mL e atóxicos se $CL_{50} > 1000$ μg/mL.

3.6.2. Criação, Manutenção e Bioensaios com *Aedes aegypti*

Criação e manutenção da colônia de *Ae. aegypti*

Os bioensaios larvicida, adulticida e de repelência contra o mosquito *Ae. aegypti* foram realizados no Laboratório de Malária e Dengue, no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA.

As palhetas de papel filtro contendo os ovos de *Ae. aegypti* foram submersas em recipientes plásticos contendo 500 mL de água para a eclosão dos ovos. Após eclosão, as larvas foram alimentadas diariamente com ração triturada para gato (Whiskas®). A limpeza dos recipientes foi realizada três vezes por semana com remoção de 1/3 da água para evitar a formação de película na superfície, seguindo a metodologia implementada

no Laboratório de Malária e Dengue (Santos et al 1980, Scarpassa & Tadei, 1990). Ao atingirem o estágio de pupa, as larvas foram transferidas para novos recipientes plásticos com água, os quais foram telados com um tecido do tipo tule contendo uma abertura central. Essa abertura facilita o acesso do capturador (aspirador entomológico), ao coletar os adultos recém-emergidos, e pode ser fechada com algodão. Após alcançarem a fase adulta, os insetos são identificados e introduzidos em gaiolas para a criação da colônia (Figura 21). As colônias de mosquitos foram mantidas a uma temperatura de 28 ±2 °C e a umidade relativa de 80 ± 10% e providas de solução de 10% de sacarose. As fêmeas foram alimentadas duas vezes por semana, utilizando *hamsters* anestesiados, para promover o desenvolvimento de ovos, seguindo o ProtocoloCEUA 054/2018 do Comitê de Ética para o Uso de Animais – INPA.

Figura 21. Criação e manutenção das colônias de *Aedes aegypti.*

Fonte: Oliveira, A.A. 2019.

Bioensaio larvicida

Os ovos de *Ae. aegypti* foram adquiridos no Insetário do Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Os ovos foramimersos em água destilada contida em uma bacia plástica para eclosão. Após eclosão,

as larvas foram monitoradas e alimentadas com ração de gato (Whiskas®), por um período de 3 a 4 dias, até que atingissem o terceiro e quarto estádio de desenvolvimento,quando então foram utilizadas para o ensaio larval (Govindarajan et al., 2016).

Os bioensaios de mortalidade larval foram realizados de acordo com o teste de suscetibilidade, sugerido pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2005). Foram utilizadas dez larvas no final do terceiro ao início do quarto instar para os testes. Os óleos foram testados em cinco concentrações diferentes (100, 75, 50, 25 e 10 µg/mL), utilizando solução de dimetilsulfóxido (DMSO) 1,0% para diluição. Todos os experimentos foram realizados em quintuplicata com controle positivo (Temephos® 0,12 µg/mL) e negativo (DMSO 1,0% em água destilada), para as 5 concentrações estadas (Figura 22). Após 24 e 48 horas foram contabilizadas as larvas vivas e mortas (indivíduos imóveis e/ou depositados no fundo do copo). Os dados obtidos de cada bioensaio foram submetidos a análise de *Probit*, na qual os valores de CL_{50}, CL_{90} foram gerados considerando o nível de significância de 95%.

Figura 22. Bioensaio dos óleos essenciais vegetais frente as larvas de *Aedes aegypti*.

Fonte: Oliveira, A.A. 2019.

Atividade Adulticida

O bioensaio adulticida foi realizado de acordo com as diretrizes do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (2012) (CDC, Centers for Disease Control and

Prevention). Os óleos foram solubilizados em acetona, para a obtenção das cinco concentrações testadas (50, 20, 15, 10 e 7 µg /mL). Garrafas de vidro de 295 mL foram utilizadas para o teste, onde 1 mL da solução de cada concentração foi adicionada ao frasco. O conteúdo de cada garrafa foi agitado girando suavemente, de modo que todos os lados da garrafa fossem revestidos. Em seguida, as tampas foram removidas e as garrafas rolaram continuamente na horizontal até que todos os sinais visíveis do líquido desaparecessem e as garrafas estivessem completamente secas (Figura 23).

Figura 23. Garrafas impregnadas com óleo essencial para a realização do teste adulticida.
Fonte: Oliveira, A.A. 2019.

Após 12 horas, utilizando um aspirador bucal, 15 mosquitos fêmeas são introduzidos em cada frasco de teste, incluindo os frascos de controle positivo e negativo. O número de mosquitos vivos e mortos foi registrado a cada 15 minutos por um período de 90 minutos de exposição (Figura 24). Todos os experimentos foram realizados em triplicata com controle positivo Deltamethrine (0,6 µg/mL) e controle negativo acetona. De acordo com definições da OMS, um mosquito é classificado como vivo se for capaz de voar, independentemente do número de pernas ainda intactas ou derrubadas, se imóvel ou incapaz de voar ou ficar de pé de maneira coordenada ele deveser considerado

morto.

Figura 24. Avaliação dos mosquitos após o tempo de ação dos óleos essenciais.

Fonte: Oliveira, A.A. 2019.

Todos os bioensaios foram realizados em temperatura ambiente de 28 ± 2 ° C e umidade relativa de 80 ± 10%. Os cálculos de CL_{50} e CL_{90} foram realizados de acordo com Soonwera & Sittichok (2020), aplicando os valores obtidos na fórmula apresentada e com auxílio do programa Polo Plus version 1.0 (LeOra Software) (CDC, 2012; Govindarajan et al., 2016).

$$\%\ \text{Mortalidade} = \frac{\text{Número de adultos mortos}}{\text{Número de adultos introduzidos}}\ \text{x}\ 100$$

Atividade repelente

Para o teste de repelência de cada óleo a avaliação foi baseada na contagem de escapes dos mosquitos, aplicando um protocolo previamente desenvolvido (Govindarajan et al., 2016; Nararak et al., 2019). Os óleos essências e o N, N-diethyl-3-methylbenzamide (DEET) (controle positivo) foram diluídos com etanol absoluto para fornecer concentrações de 0,5, 1,0, 2,5 e 5,0% (v/v). A solução teste contendo o óleo

testado e etanol (2,8 mL) foi espalhada uniformemente sobre a superfície do papel de filtro (14,7 × 17,5 cm) usando uma pipeta automática.

Os papéis tratados com as soluções foram preparados para cada concentração e os papéis de controle foram tratados apenas com etanol absoluto. Todos os papéis tratados foram secos ao ar na posição horizontal à temperatura ambiente durante 1 h antes de iniciar o teste. Todas as soluções e papéis tratados foram preparados precisamente antes do teste.

O teste foi realizado em um sistema de câmaras, contendo uma câmara de exposição (32 x 32 x 34 cm), e, uma segunda câmara (30 x 30 x 32 cm) com proteção que, quando colocada na primeira câmara, impede que os mosquitos façam contato físico com os papéis de teste (Nararak et al., 2019). Quinze mosquitos fêmeas foram introduzidos na câmara de teste, utilizando um capturador, permitindo uma ambientação dos insetos dentro da câmara por 3 minutos. A porta de saída da câmara de teste foi aberta para possibilitar que os mosquitos escapassem para uma caixa de papel receptora conectada à câmara. O escape dos mosquitos foi registrado em intervalos de 1 minutoaté 30 minutos. Após o tempo de exposição, os mosquitos que escapavam e os restantes eram mantidos separadamente por 24 horas. A mortalidade após 24 horas foi observada. Foram necessárias três repetições para cada tratamento e controle de concentração. A porcentagem de repelência foi calculada usando a fórmula:

$$\%\,\text{Repelência} = \frac{\text{Ta} - \text{Tb}}{\text{Ta}}\ \text{x}\ 100$$

onde, T_a é o número de mosquitos no grupo controle e T_b é o número de mosquitos no grupo testado (Govindarajan et al., 2016; Nararak et al., 2019).

Ensaio Fotomicrográfico

O estudo fotomicrográfico foi realizado no Laboratório de Malária e Dengue do Instituto de Pesquisas da Amazônia. As larvas de 3º estádio do *Ae. aegypti* foram criadas em temperatura de 28 ± 2 °C, umidade relativa de 80 ± 10% e preparadas seguindo a metodologia do ensaio larval. Foram utilizadas as concentrações letais para cada óleo e como controle foram utilizados DMSO 1,5% e temefós. Após o período de 24 horas as larvas foram conservadas em paraformaldeído a 4% e tampão cacodilato de sódio (0,1M), a temperatura ambiente. Posteriormente a esse procedimento, o material foi submetido a desidratação em uma concentração crescente de etanol (50, 70, 80, 90 e 95%) por dez minutos para cada concentração. As imagens foram realizadas utilizando microscópio estereoscópio (Zeiss, Stemi 508) com ampliação de 40x.

3.7. Testes Químicos

3.7.1. Modelagem Molecular

As avaliações de modelagem molecular dos óleos essenciais foram realizadas no laboratório de Química Teórica e Computacional, no Instituto de Ciências Exatas – UFAM, pelo professor Doutor Kelson M. T Oliveira. Nessas avaliações as moléculas presentes nos óleos essenciais são geometricamente otimizadas para posteriormenteserem avaliadas através do método de *docking* quanto a afinidade e interação entre ligantes e proteínas. Os cálculos teóricos de química quântica foram realizados utilizando o programa Gaussian 09 (Revision D.01) (Frisch et al, 2019) no Debian LINUX (versão 5.0), plataforma INTEL CORETM i7, com 32 Gb de memória RAM. Aabordagem DFT foi usada para otimizar a geometria molecular utilizando os conjuntos de base 6-311G+(d, p) e o funcional B3LYP. A estrutura cristalográfica da proteína AeSCP-2 foi retirada do Protein Data Bank Repository (PDB ID: 1PZ4). O software AutoDock 4.2 foi usado para o estudo da proteína-alvo, usando o algoritmo

Lamarckiano. As coordenadas da região do sítio ativo da proteína foram validadas por re-*docking* do ligante cocristalizado, ácido palmítico, presente no arquivo pdb. Asdimensões na caixa de grade no eixo cartesiano foram fixadas em 50 × 50 × 50 com espaçamento de 0,375 Å, centralizado no local da proteína AeSCP-2 (x = 23,381, y = 28,256 e z = 54,388). O re-*docking* foi realizado para validação do protocolo de docking, utilizando o critério RMSD ≤ 1,5. Após a validação, as moléculas otimizadas foram submetidas ao *docking* molecular utilizando as mesmas dimensões da gradeutilizadas no re-*docking*. O cálculo RMSD foi realizado entre a estrutura *docked* e a estrutura de raios-X. Para todos os cálculos realizados, os valores de RMSD obtidos foram menores ou próximos a 1. As análises das interações proteína-ligante foram realizadas usando o software Discovery Studio. Para o cálculo da energia livre de solvatação, o servidor oficial de campo da força geral CHARMM (CGenFF) (Mackerell & Vanommeslaeghe, 2020) foi usado para as moléculas em estudo. Para moléculas de água, foi utilizado o modelo TIP3.

Em todos os experimentos, uma caixa cúbica de $30nm^3$ foi usada para as simulações. Os sistemas formados pelos constituintes dos óleos essenciais solvatados com moléculas de água, continham respectivamente: com o terpinenol, 2.276 átomos; com carvacrol, 2.014 átomos; com timol, 2.269 átomos; com cimeno, 2.013 átomos;com terpineno, 2.279 átomos. As simulações de todos os átomos na dinâmica molecular foram realizadas com o campo de força CHARMM36 (Huang & Mackerell, 2013) usando o GROMACS versão 2019 (GROMACS, 2019).

Para o cálculo das interações iônicas de longo alcance, foi utilizado o método Particle Mesh Ewald (PME) (Essmann et al, 1995). As ligações covalentes nas quais os átomos de hidrogênio estão presentes foram restringidas pelo LINCS (LINear Constraint Solver) (Hess et al, 1997). Para cada sistema, uma minimização de 50.000

etapas foi usada seguida por uma corrida de equilíbrio de 125 ps com um tamanho de etapa de 1 fs. Isso foi seguido pela produção de NPT (pressão/temperatura constante) a 300 K usando etapas de 2 fn de tempo por 11 ns. A pressão de referência (1 bar) foi controlada pelo método de Berendsen (Berendsen et al, 1984) com um acoplamento a cada 2 ps, e a temperatura foi controlada pelo termostato de Berendsen modificado com acoplamento a cada 0,1 ps (Bussi et al, 2007). As energias de hidratação das moléculas foram calculadas utilizando a metodologia usada por Klimovich (Klimovitch et al,2015), em simulações explícitas de dinâmica molecular. A taxa de aceitação multiestado de Bennett (MBAR) foi usada para calcular as diferenças na energia livre para cada perturbação (Shirts et al, 2008).

3.7.2. Teste antioxidante – DPPH

A atividade antioxidante foi testada segundo metodologia descrita por Mensor et al. (2001), monitorando o consumo do radical estável DPPH (2,2-difenil-1- picrilhidrazil) através do decréscimo da absorbância de soluções em diferentes concentrações. As medidas da absorbância foram feitas em um espectrofotômetro UV- Vis EZ-Reader 2000, tendo como controle positivo Quercetina comercial. Um volume de 30 µL de Quercetina foi adicionado a um dos 96 poços de uma placa de Eliza, em seis concentrações diferentes (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 µg/mL), seguidos de 170 µL de etanol, proporcionando a leitura do branco. Em seguida, foram adicionados 100 µL de DPPH e a leitura da absorbância da mistura reacional foi realizada a 517 nm após 30 minutos. O mesmo procedimento foi realizado para os extratos apresentados na Tabela 1. O controle negativo foi preparado apenas utilizando 200 µL de etanol e 100µL de DPPH. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 1. Extratos submetidos ao teste antioxidante DPPH.

Ampelozizyphus amazonicus	
Extratos	**Descrição dos extratos**
EHGF	Extrato hexano dos caules finos
EDGF	Extrato diclorometano dos caules finos
EMGF	Extrato metanol dos caules finos
EHGG	Extrato hexano dos caules grossos
EDGG	Extrato diclorometano dos caules grossos
EMGG	Extrato metanol dos caules grossos
CGFM1	Chá dos caules finos/Método I
CGFM2	Chá dos caules finos/Método II
CGGM1	Chá dos caules grossos/Método I
CGGM2	Chá dos caules grossos/Método II

Fonte: Oliveira, A. A. 2019.

Os valores das absorbâncias foram convertidos em porcentagem da capacidade de sequestro (%CS), determinada pela seguinte equação:

$$\%CS = 100 - \frac{\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}}{\text{Abs controle}}\ x\ 100$$

A CS_{50} foi determinada por interpolação da curva de calibração: capacidade de sequestro versos a absorbância da amostra.

3.7.3. Simulação Digestiva *in vitro*

Método 01 (Pinacho et al., 2015)

O segundo chá foi preparado utilizando 500 mg do caule de *A. amazonicus* em 12,5 mL de H_2O concentração de 40 mg/mL. Para a primeira etapa do processo da simulação digestiva foram adicionados a essa solução do chá preparado, 125 µL de uma mistura de α-amilase (1,30 mg/mL em $CaCl_2$ 0,01 M). Ajustou-se o pH da mistura para 6,5utilizando $NaHCO_3$ 1 M e incubou-se a 37 °C, em banho maria, por 10 minutos com agitação constante. Após o tempo de incubação, foi retirada uma alíquota de 2,5 mL e armazenada a uma temperatura de -20 °C (Alíquota 01), no freezer com temperatura controlada. A solução remanescente teve o seu pH ajustado para 2,5 com HCl 3 M e a mistura foi incubada com 132,4 µL de uma solução de pepsina (160 mg/mL em HCl 0,1M), a 37 °C, em banho quente, por 2 horas com agitação constante. Após o tempo de incubação, o pH da mistura foi condicionado para 6,5 e uma segunda alíquota foi retirada e armazenada conforme recomendações anteriores (Alíquota 02). O pH da mistura foi novamente ajustado para 7,5 e 910 µL de uma solução de pancreatina/sais biliares (25 mg de pancreatina + 4 mg de sais biliares em 1 mL de $NaHCO_3$ 1 M) foi adicionada a mistura e incubada novamente a 37 °C por 2 horas com agitação constante. Após 2 horas de incubação, foi retirada uma terceira alíquota (Alíquota 03) e armazenada a -20 °C para análises posteriores (Pinacho et al., 2015).

A simulação digestiva *in vitro* foi feita com o chá dos caules finos de *A. amazonicus*. Para cada simulação foram obtidas três alíquotas que foram codificadas e encaminhadas para análise em CLAE-EM.

As separações cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu equipado com um sistema de bombas binárias. Fase estacionária C-18 e como fase móvel acetonitrila:água (Ácido fórmico 0,01 %), em composição gradiente de 5% a18% de acetonitrila em 6 minutos, 18% a 25% de acetonitrila em 3 minutos e de 25% a 40% de acetonitrila em 7 minutos, de 40% a 100% de acetonitrila em 2 minutos, 100% de acetonitrila por 2 minutos, de 100% a 5% de acetonitrila em 2 minutos e 5% de acetonitrila por 2 minutos. Utilizando uma injeção de 2 µL com fluxo de 0,3 mL/min. O espectrômetro de massas do tipo triplo-quadrupolo acoplado ao CLAE utiliza uma fonte de eletrospray (ESI) do tipo Z-spray. As análises de EM foram adquiridas no modo negativo de polaridade. Os dados dos espectros de massas foram obtidos no modoSCAN usando uma faixa de 100 a 2000 *m/z*. As condições de ionização da fonte foram: voltagem no capilar: 4kV; temperatura da fonte: 200 °C, fluxo de gás no cone: (4L/min.). Gás Nitrogênio (pureza >99%) foi utilizado como gás de nebulização. Todas as alíquotas foram injetadas na concentração de 1 mg/mL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO I
Composição química dos óleos essenciais

INTRODUÇÃO

Óleos essenciais são misturas complexas compostas de substâncias voláteis e não voláteis extraídos de diferentes partes de espécies vegetais por processos de destilação, compressão ou extração com solventes, geralmente na presença de calor. A composição dos óleos essenciais é bastante complexa e com um número significativo de substâncias derivados do fenil propanoíco ou terpenos. Essas substâncias presentes nesses óleos têm aplicações valiosas em vários campos, como cosmética, farmacologia, indústria alimentícia, agricultura e medicinal (Dewcki, 2009; Malik et al. 2019).

Os óleos essenciais são biossintetizados e acumulados em estruturas específicas, como osmóforos, tricomas glandulares, idioblastos, dutos e cavidades. Essas estruturas têm uma variedade de formas, tamanhos e composições e podem ser encontrados em plantas e órgãos reprodutivos de plantas. Nas plantas, os óleos essenciais desempenham papéis importantes na adaptação ao meio ambiente, defesa contra patógenos, herbívoros, interações com polinizadores e fungos, sinalização entre plantas e proteção contra estresses abióticos, como luz, água, temperatura, nutrientes, tipos de solo, pH e altitude, entre outras. Em sua composição são encontrados hidrocarbonetos (isopreno, éa principal unidade de hidrocarboneto básico encontrada nos óleos essenciais), terpenos (sesquiterpenes, monoterpenes, and diterpenes), álcoois (os álcoois mais comuns presentes nos são linalol, nerol e geraniol), aldeídos (citral, citronelal e citrus), em menor quantidade os ácidos (ácido benzoico e ácido cinamico), esteres (acetato delinalil e bergamota) e cetonas (carvona, mentona, jasmona e thujone) (Dewcki, 2009; Malik et al. 2019).

Endlicheria sp.

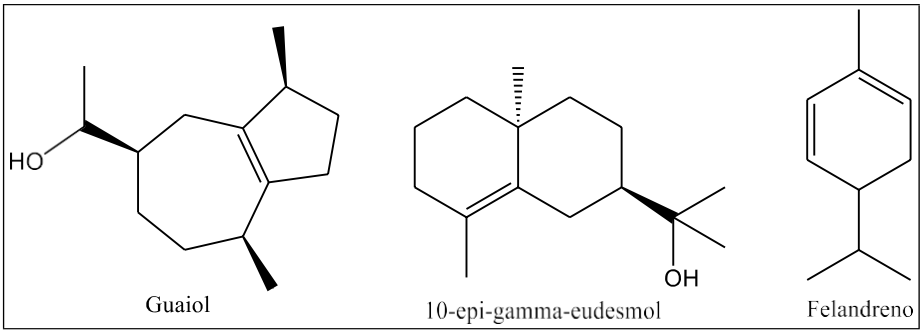
O gênero *Endlicheria* é um dos 68 gêneros pertencentes à família Lauraceae, a maior família das angiospermas. Com 3500 espécies, está entre as cinco famílias com o maior

número de espécies encontrada em regiões tropicais e subtropicais, com distribuição no sudeste da Ásia, Madagascar, América Central e América do Sul (Suarez & Acosta, 2018). No Brasil, esta família está distribuída nos estados do Amapá, Acre, Pará e Amazonas (Rottini et al. 2019).

Dentro dessa família é reportada uma grande variedade de aplicações etnofamacológicas, utilizando diferentes partes das plantas e processos de infusão e maceração. O óleo da espécie *Ocotea caparrapi* é utilizado no tratamento de picadas de insetos, mordidas de cobras e picadas de arraias (Rozo, 2015; Suarez & Acosta, 2018). O extrato das folhas de *Litsea glutinosa* é utilizado no tratamento de doenças respiratórias (Pradeera et al. 2011; Suarez & Acosta, 2018). O extrato hexano das folhasde *Endlicheria paniculata* apresenta efeitos antiinflamatórios, fibrogênicos e antiangiogênicos em tratamentos com camundongos, demonstrando potencial terapêutico (Souza et al. 2020). Estudos dos seus óleos essenciais das espécies do gênero *Endlicheria* relatam uma ação antiprotozoaria *in vitro* contra as formas amastigotas e promastigotas do protozoário *Leishmania amazonensis* (Rottini et al. 2019). Além da atividade antifúngica e antimicrobiana (De Jesus et al. 2020).

Na composição química dos óleos essenciais das espécies desse gênero estão identificados os terpenos guaiol, 10-epi-γ-eudesmol, bulnesol, (E)-cariofileno e α-felandreno (Albarracín et al. 2019; Rottini et al. 2019) (Figura 25).

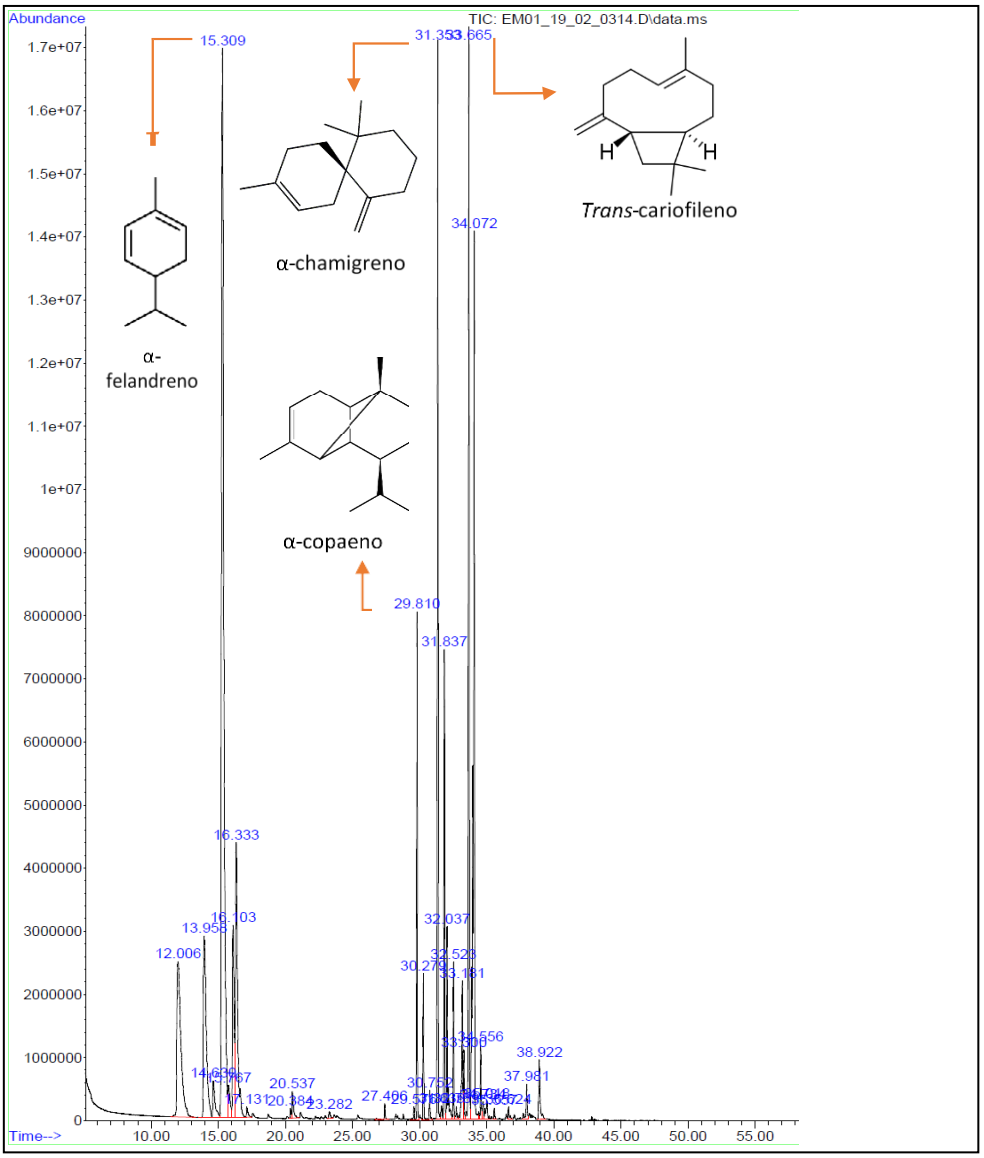
Figura 25. Estrutura das substâncias presentes no óleo de *Endlicheria* sp.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

O óleo essencial das folhas da espécie *Endlicheria* sp. foi obtido utilizando a técnica de hidrodestilação e resultou emum óleo de coloração amarelada com rendimento de 3,0% (p/v). A análise do cromatograma obtido por CG-EM (Figura 26)do óleo essencial de *Endlicheria* sp. permitiu a identificação das substâncias presentes em sua composição. As substâncias identificadas utilizando os espectros de massas dos sinais do cromatograma foram analisadas e organizadas de acordo com a Tabela 2.

Figura 26. Cromatograma do óleo essencial de *Endlicheria* sp.



Entre as substâncias identificadas (Tabela 2) na composição química dos óleosde *Endlicheria* sp. foram observados 56,2 % de monoterpenos e 42,5 % de sesquiterpenos. O monoterpeno felandreno foi o principal constituinte correspondendo a 27,37% da composição do óleo. Outros constituintes de destaque foram o α-guajeno (11,71%), o *trans*-cariofileno (9,76%) e o β-chamigreno (9,76%).

Tabela 2. Composição química (%) dos óleos essenciais da espécie *Endlicheria* sp.

Constituintes	**% Composição**
Monoterpenos	
α-pineno	6,63
Sabineno	6,27
β-pineno	5,58
β-mirceno	0,93
Felandreno	27,37
p-cimeno	3,14
1,8-cineole	6,27
Sesquiterpenos	
α-copaeno	3,82
β-elemeno	1,09
Trans-cariofileno	9,76
α-guaieno	3,59
α-humuleno	1,17
β-chamegreno	9,76
α-guajeno	11,71
Ledeno	1,57
Classes Terpenóides	

Monoterpenos	56,2
Sesquiterpenos	42,5
Total	98,7

Fonte: Oliveira, A. A. 2020.

Estudos apontam diferentes atividades para os óleos essenciais que possuem em sua composição os terpenóides identificados nos óleos de espécie *Endlicheria* sp. De acordo com Dias & Moraes (2013), os terpenos *trans*-cariofileno e felandreno apresentam ação larvicida contra as larvas do mosquito *Ae. aegypti*. Além de atividades relatadas, como ação antioxidante para dos óleos essenciais com alta concentração dos terpenos felandreno e α-pineno (Ribeiro et al. 2020). De acordo com Silva et al., (2017),a análise do óleo essencial das folhas da espécie *Endlicheria arenosa* apresenta em sua composição os terpenos biciclogermacreno (42,2%), germacreno D (12,5%) e β- cariofileno (10,1%), como os constituintes majoritários. O óleo dessa espécie apresenta notável atividade antibacteriana e antifúngica (Silva et al., 2017; Rottini et al., 2019). Nas folhas da espécie *Endlicheria braceolate* o principal constituinte do óleo essencial éo sesquiterpeno β-cariofileno com 20,0 % de sua composição (Silva et al., 2017). Essas diferenças observadas na composição química dos óleos, pode estar relacionada com os diferentes fatores ambientais de coleta das espécies.

***Blepharocalyx* sp.**

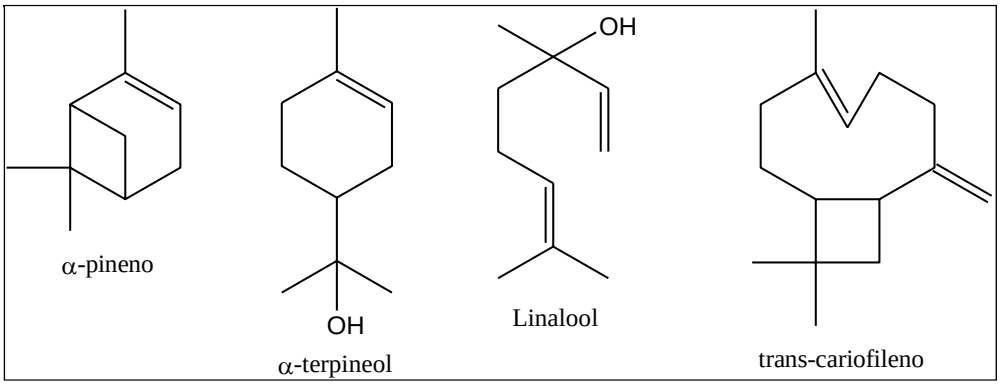
A família Myrtaceae é a família mais relatada em estudos florísticos e fitossociológicos, e está presente em mais de 80% do território brasileiro (Françoso et al., 2016; Silva et al. 2018). Algumas espécies de frutas exóticas são encontradas na

família Myrtaceae, por exemplo *Eugenia uniflora* L., *Plinia cauliflora* (Mart.) e *Syzygium cumini* (L.). Seus frutos são utilizados para o consumo na forma de doces e sucos e suas folhas são utilizadas na medicina tradicional (Silva et al. 2018). Estudos recentes sobre os óleos essenciais das espécies de Myrtaceae têm mostrado que eles possuem propriedades importantes, como inseticida (Kumar et al., 2016), parasiticida (Rodrigues et al., 2015), fungicida (Hamini-Kadar et al., 2014), bactericida (Sousa et al.,2015), antimicrobiano (Mouna & Segni, 2014) e antioxidante (Victoria et al., 2013), entre outros. Além disso, os óleos essenciais ou seu princípio ativo isolado podem ser usados para o controle de pragas por aplicação direta em plantações ou ainda em regiõesurbanas para o controle de pragas (Pavela & Benelli, 2016; Silva et al., 2018).

O gênero *Blepharocalyx* é um dos 121 gêneros que pertencem a família Myrtaceae. Esse gênero possui apenas quatro espécies, que se distribuem por toda a extensão da América do Sul, são elas *Blepharocalyx cruckshanksii, Blepharocalyx eggersii, Blepharocalyx myriophyllus* e *Blepharocalyx salicifolius* (Mazine & Souza, 2007). Estudos com os extratos das cascas de *B. cruckshanksii* apresentam excelente atividade citotóxica *in vitro* contra as linhagens de células cancerígenas (Baez et al. 2020). Hernandez et al. (2018) confirmaram as atividades observadas pela população para o uso de óleos essenciais das folhas da espécie *B. salicifolius* no tratamento de doenças respiratórias, sendo eficazes no tratamento da tosse e broncoespasmo.

Furtado e colaboradores (2018) identificaram nos óleos essenciais das folhas da espécie*Blepharocalyx salicifolius* vários terpenos como 1,8-cineol, α-pineno, limoneno, β-pineno, α-terpineol, (E)-cariofileno e linalool, como substâncias majoritárias (Figura 27).

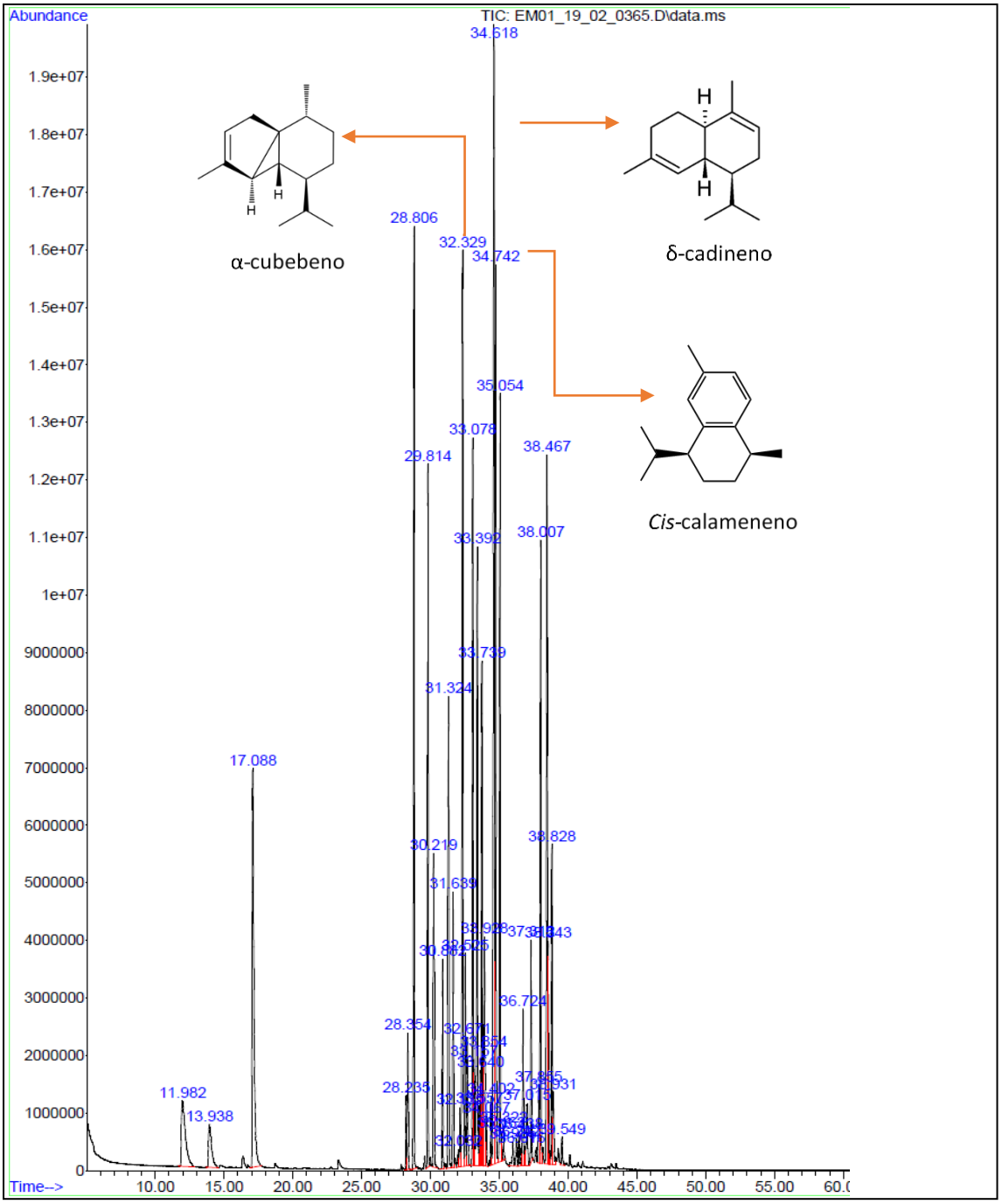
Figura 27. Estrutura das substâncias presentes no óleo essencial de *Blepharocalyx salicifolius.*



RESULTADOS E DISCUSSÃO

O óleo essencial das folhas de *Blepharocalyx* sp. foi obtido utilizando a técnica de hidrodestilação com rendimento de 0,49%p/v. A análise do cromatograma obtido porCG-EM do óleo essencial de *Blepharocalyx* sp. conduziu (Figura 28) a montagem da Tabela 3 onde estão listadas as substâncias presentes em sua composição.

Figura 28. Cromatograma dos óleos da espécie *Blepharocalyx* sp.



No cromatograma obtido para o óleo essencial das folhas de *Blepharocalyx* sp. foi observada a presença de uma mistura complexa de substâncias, sendo as majoritárias identificadas como δ-cadineno, responsável por 10,4 %, *cis*-calameneno por 7,1%, α-cubebeno por 6,8% e α-cubeno por 6,1% da composição do óleo essencial obtido.

Tabela 3. Composição química (%) do óleo essencial obtido das folhas de *Blepharocalyx* sp.

Constituintes	**% Composição**
Monoterpenos	
α-pineno	2,13
β-pineno	1,03
Sesquiterpenos	
Biciclo-elemeno	0,43
δ-elemeno	0,8
α-cubeno	6,08
α-copaeno	4,45
β-cubebeno	2,88
Ciclopropeazuleno	1,22
Trans-cariofileno	4,37
Calorene	1,99
α-cubebeno	6,8
α-humuleno	1,25
Germacreno D	4,39
δ-cadineno	10,43
Cis-calameneno	7,1
α-guajeno	1,04
Ledol	1,45
α-cadinol	2,32
Copaeno	5,78
Outros	
Octatrieno	5,54
NI	4,91

NI	5,09
NI	4,28
Classes Terpenóides	
Monoterpenos	3,16
Sesquiterpenos	62,0
Outros	19,8
Total	85,0

Fonte: Oliveira, A. A. 2020.

De acordo com Maleski et al. (2019), o óleo de *Raulinoreitzia crenulata* (Asteraceae), que possui o terpeno δ-cadineno em sua composição, apresenta ação inseticida contra o pulgão-da-raiz (*Aphis forbesi*), e ainda, segundo Zhu et al. (2015), o óleo essencial das partes aéreas de *Salvia plebeia* (Labiate), que possui o terpeno em sua composição, possui atividade larvicida relatada para as larvas de *Ae. aegypti* com CL_{50} 46,26 μg/mL. No óleo essencial da espécie *Blepharocalyx salicifolius* os principais constituintes identificados foram biciclogermacreno (17,50%), globulol (14,13%), viridiflorol (8,83%), γ-eudesmol (7,89%) e α-eudesmol (6,88%). O óleo essencial apresenta atividade citotóxica contra a linhagens de células de câncer de mama MDA-MB-231, com concentração de 46,60 μg/mL, e atividade antifúngica contra *Paracoccidioides brasiliensis* com concentração 156,25 μg/mL, mas foi inativo contra outros fungos e bactérias (Furtado et al, 2018). Silva et al., (2021) realata a ação larvicida do óleo essencial das folhas de *Eugenia calycina* (Myrtaceae) contra as larvas de *Ae. aegypti*, sendo valores de CL_{50} 199, 3 e 166,4 μg/mL para 24 e 48 horas, respectivamente.

***Bocageopsis* sp.**

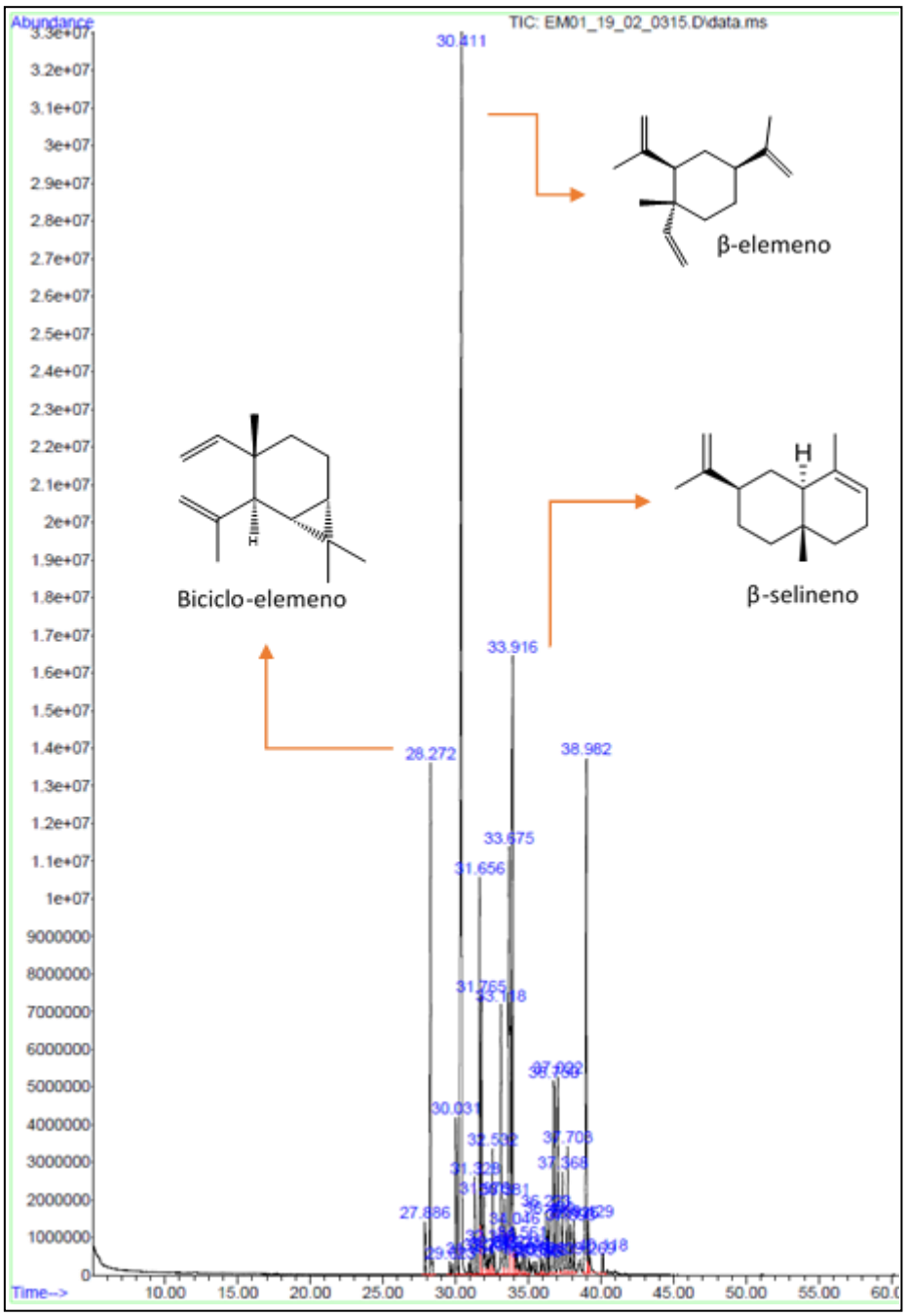
A família Annonaceae é uma das mais antigas das Angiospermas, e está distribuída por todas região tropical e sub-tropical. Possui 5130 espécies reconhecidas distribuídas em 128 gêneros (Chacón et al. 2016). O gênero *Bocageopsis* é constituído por quatro espécies, *B. mattogrossensis, B. canescens, B. multiflora* e *B. pleiosperma*, todas restritas a América do Sul, e no Brasil é encontrada na região Amazônica, nos estados do Amazonas e Pará (Soares et al. 2015).

O gênero *Bocageopsis* tem sido quimicamente explorado, sendo os óleos essenciais de suas folhas caracterizados e avaliados quanto a sua atividade bacteriana (Alcântara et al. 2017; Bay et al 2019). Na composição química dos seus óleos foram identificados como os seus principais constituintes os terpenos β-bisaboleno, bergamoteno, β-farneseno, β-selineno, α-selineno e farnesol (Oliveira et al. 2014; Soares et al. 2015; Alcântara et al. 2017). Oliveira et al. (2014) relatam a atividade dos óleos essencias de *B. multiflora* contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, o que possibilita uma alternativa de ação contra o parasita. Para a espécie
B. multiflora também são relatadas as atividades bactericida e antimicrobiana (Alcantara et al. 2017; Bay et al. 2019).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O óleo essencial das folhas de *Bocageopsis* sp. foi obtido utilizando a técnica de hidrodestilaçãocom um rendimento de 1,30% p/v. A análise do cromatograma (Figura 29) deste óleo obtido por CG-EM resultou na identificação das substâncias listadas na Tabela 4.

Figura 29. Cromatograma dos óleos da espécie *Bocageopsis* sp.



As principais substâncias identificadas foram os sesquiterpenos β-elemeno, responsável pela composição de 28 % do óleo essencial dessa espécie, α-selineno com 9,8 % da composição do óleo, β-selineno com 8,6 % e o 5-epi-neointermedeol com 7,94% da composição do óleo essencial.

Tabela 4. Composição química (%) dos óleos essenciais da espécie *Bocageopsis* sp.

Constituintes	**% Composição**
Sesquiterpenos	
Biciclo-elemeno	6,21
Ciclohexeno	2,07
β-elemeno	28,83
Trans-cariofileno	1,46
γ-elemeno	4,83
Biciclo-hepteno	3,54
Aromadendreno	1,21
α-gurjuneno	0,55
α-humuleno	1,51
Germacreno D	1,18
β-selineno	8,64
β-bisaboleno	0,36
δ-cadineno	0,65
β-sesquifelandreno	0,29
α-selineno	9,84
α-guajeno	2,51
Viridiflorol	3,49
Ledol	1,52
5-epi-neointermedeol	7,94
Ledeno	0,71
Outros	
NI	3,78
NI	1,64
Classes Terpenóides	

Sesquiterpenos	87,3
Outros	5,42
Total	92,7

Fonte: Oliveira, A. A. 2020.

Na literatura estão relacionadas diferentes atividades para esses sesquiterpenos, como as atividades antimicrobiana e antifúngica. Govindarajan e colaboradores (2016) descreveram a atividade larvicida para o β-elemeno com CL_{50} de 90,45 µg/mL frente as larvas de *Ae. albopictus*. O óleo essencial de *B. multiflora* apresenta atividade contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, o que possibilita uma alternativa de ação contra o parasita, além de atividades bactericidas e antimicrobianas relatadas para o óleo da espécie (Oliveira et al., 2014; Alcantara et al. 2017; Bay et al. 2019). Essas atividades referenciadas e a composição do óleo indicam uma ação promissora para o óleo da espécie *Bocageopsis* sp.

***Virola* sp.**

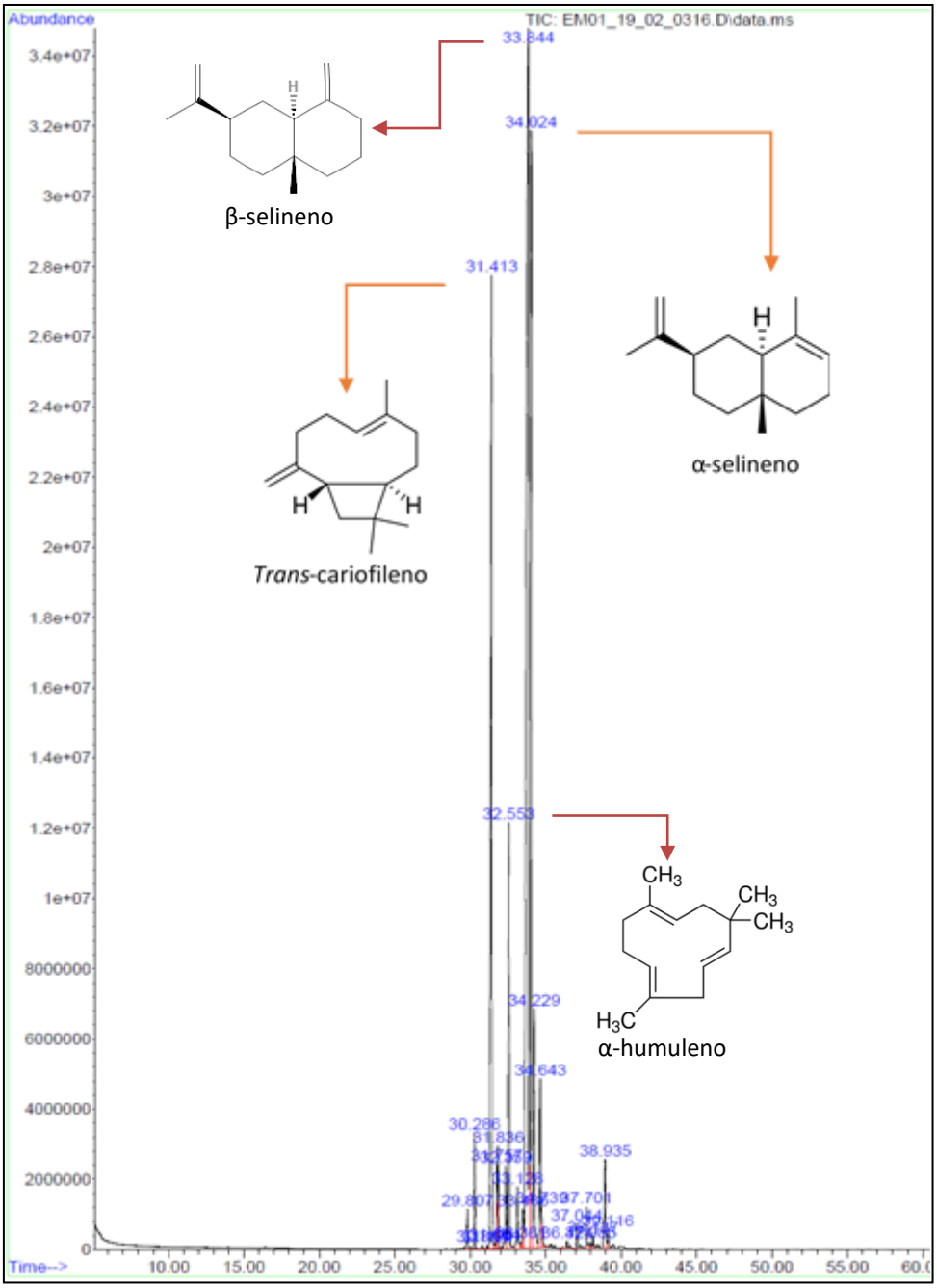
Myristicaceae é uma família de plantas que inclui 21 gêneros com cerca de 500 espécies, com distribuição natural nos trópicos de todos os continentes. A família inclui diversas espécies utilizadas como especiaria, com destaque para *Myristica fragrans*, a noz moscada, o produto comercialmente mais importante da família. Algumas espécies, especialmente dos gêneros *Myristica* e *Virola*, são utilizadas como planta medicinal, como especiarias e como fonte de alucinógenos (Schultes, 1979;Mesquita et al. 2020).

O gênero *Virola* possui 60 espécies e, dentro de sua família, é o mais abundante nas Américas (Santamaría-Aguilar et al., 2019). Os frutos da Virola são distintos e marcantes: descem por duas válvulas quando maduros, exibindo sua única semente, que é recoberta por um arilo laciniado de cor viva, rico em proteínas, lipídios e açúcares (Von Roosmalen et al., 1996; Santamaría-Aguilar et al., 2019). É um gênero amplamente explorado do ponto de vista fitoquímico, sendo identificados em suasespécies diferentes lignoides, policetídeos, flavonoides, diarilpropanoides e alcaloides de N, N-dimetiltriptamina (Mesquita et al. 2020). O óleo extraído de sementes de espécies de *Virola* é popularmente usado para dores reumáticas, asma, tumores nas articulações, vermes intestinais, halitose, hemorroidas e doenças de pele (Pereira et al., 2017). A casca ralada produz uma resina que se utiliza contra feridas crônicas, diarreia, leucorreia e hemoptise (Bôa et al., 2015; Pereira et al., 2017).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento do óleo essencial com coloração amarelada obtido das folhas de *Virola* sp. utilizando a técnica de hidrodestilação foi de 0,69% p/v, percentual alto para as espécies do gênero que demosntram rendimento entre 0,1 e 0,2% p/v (Mesquita et al., 2020). A análise deste óleo por CG-EM resultou no cromatograma da Figura 30. As substâncias identificadas no cromatograma e nos espectros de massas foram organizadas e seguem apresentadas na Tabela 5.

Figura 30. Cromatograma do óleo das folhas de *Virola* sp.



As principais substâncias identificadas foram o β-selineno com 40,71%, α-selineno com 20,3%, o *trans*-cariofileno com 17,8% e o α-humuleno com 5,42% da composição do óleo.

Tabela 5. Composição química (%) do óleo essencial das folhas de *Virola* sp.

Constituintes	**% Composição**
Sesquiterpenos	
α-copaeno	0,42
β-elemeno	1,26
Trans-cariofileno	17,84
Biciclo-hepteno	0,05
α-guaieno	1,13
α-gurjuneno	1,09
α-humuleno	5,42
β-selineno	40,71
β-sesquifelandreno	0,59
α-selineno	20,32
Guaiol	0,28
5-epi-neointermedeol	1,59
Total	89,02

Foram identificados apenas sesquiterpenos nos óleos de *Virola* sp. Segundo Govindarajan e colaboradores (2016), o *trans*-cariofileno possue atividade larvicida frente as larvas de *Ae. aegypti* com CL_{50} 88,30 µg/mL. Para o óleo de *Virola surinanensis* foram identificados sesquiterpenos como o nerolidol que apresenta atividade contra espécies de *Leishmania* (Veiga et al., 2017). Gonzáles-Rodríguez et al.,(2021) apontam que o óleo essencial obtido das folhas de *Virola surinamensis* é composto principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides. Esse óleo foi resonsável por 100% de inibição do crescimento e desenvolvimento do protozoário *Trypanosoma cruzi*, e o sesquiterpeno nerolidol foi identificado como um dos constituintes ativos, indicando

potencial uso de antimaláricos. Essas atividades podem indicar uma ação do óleo da espécie *Virola* sp. contra as larvas e adultos de *Ae. aegypti*.

Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris

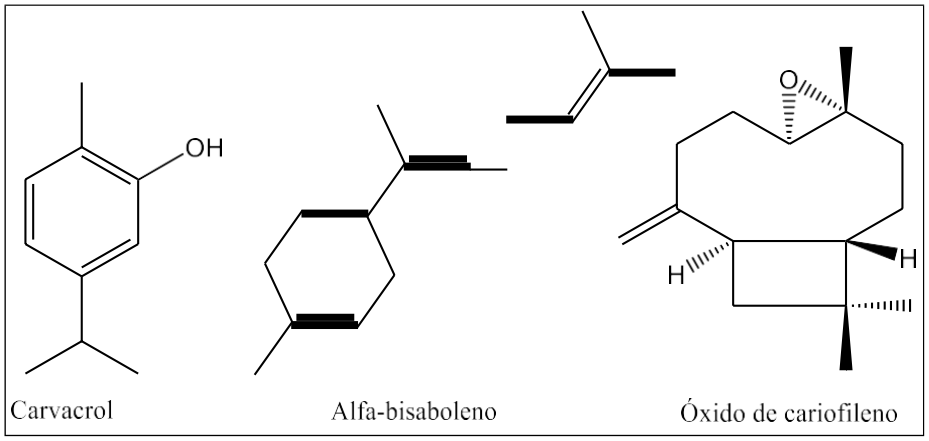
A família Lamiaceae, possui 205 espécies, onde se destacam as espécies *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris*, nativas da região mediterrânea (Europa, Norte da África e Oriente Médio) e aclimatada na América do Norte e nas regiões áridas da América do Sul (Vinciguerra et al., 2019).

O. vulgare e *T. vulgaris* possuem propriedades terapêuticas como antibacterianas (Busatta et al., 2007), antifúngicas (Vittorio et al., 2019), anti-inflamatórias (Han & Parker, 2017), antioxidantes, anticancerígenas (Han & Parker, 2017), emolientes e digestivas (Elshafie et al. 2017; Leyva-López et al. 2017; Majdi et al. 2017; Bhat et al. 2018; Giatropoulos et al. 2018; Fikry et al., 2019). Os óleos essenciais obtidos de *O. vulgare* e *T. vulgaris* são ricos em substâncias com atividade biológica como timol, carvacrol e terpineol, além de monoterpenos, sesquiterpenos, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, entre outras classes químicas (Govindarajan et al., 2016; Bouguerra et al., 2016; Elshafie & Camele 2017; Dhinakaran et al., 2019; Fikry et al., 2019; Xie et al 2019).

Os estudos com os óleos das espécies do gênero *Origanum* descrevem atividade biológica relevante contra as larvas de *Ae. albopictus* (Giatropoulos et al., 2018) e seus principais constituintes apresentam atividade contra as larvas dos vetores da malária, *Anopheles stephensi* e *Anopheles subpictus*. O óleo essencial de *O. vulgare* possui

atividade inseticida relatada contra larvas de farinha, pragas de insetos agrícolas, baratas, mosquitos e moscas adultas (Paiva et al., 2011; Govindarajan et al., 2016; Xie et al., 2019). Seus óleos são compostos principalmente por carvacrol, acetato de linalila,(*Z*)-α-bisaboleno, (*E*)-*β*-cariofileno e óxido de cariofileno (Morshedloo et al. 2018)(Figura 31).

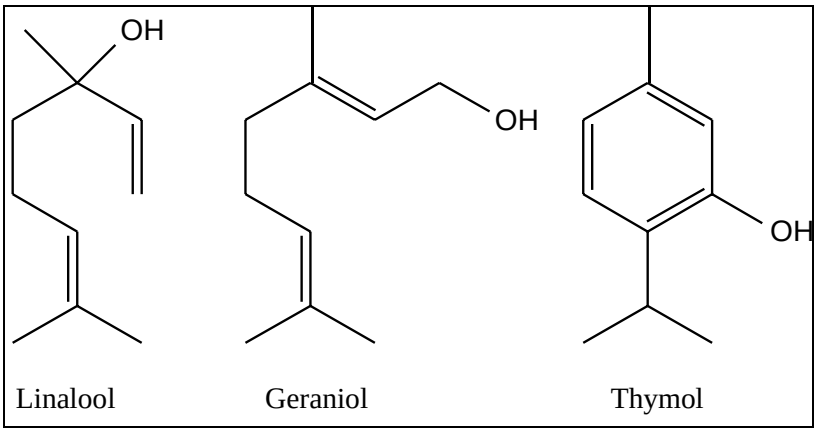
Figura 31. Estruturas das substâncias presentes nos óleos de *Origanum vulgare*.



A espécie *T. vulgaris* é uma planta medicinal que tem sido usada há milhares de anos para tratar alopecia, placa dentária, infecções por dermatófitos, bronquite, tosse, doenças inflamatórias da pele e desconforto gastrointestinal (Satyal et al. 2016). Segundo Sheng et al., (2020), quando testado contras larvas de *Ae. albopictus* o óleo essencial de *T. vulgaris* apresentou uma CL_{50} 31,60 µg/mL, sendo timol o seu principal constituinte químico. Estudos apontam efeito tóxico significativo do timol contra as larvas de *Ae. albopictus*, com uma CL_{50} 24,83 µg/mL (Govindarajan et al., 2016; Sheng et al 2020). O o-cimeno presente no óleo de *T. vulgaris* também apresenta atividade contra as larvas de *Ae. albopictus*, com uma CL_{50} 46,70 µg/mL (Cheng et al 2009; Sheng et al 2020). Traboulsi e colaboradores (2002) também relata a atividade larvicida dos monoterpenos timol e carvacrol contra o mosquito *Culex pipiens* com valores de CL_{50} 36,0 e 37,6 mg/L, respectivamente. Os componentes principais (Figura 32)

presentes nos óleos de *T. vulgaris* são linalool, borneol, geraniol, sabineno hidratado, timol e carvacrol (Satyal et al. 2016).

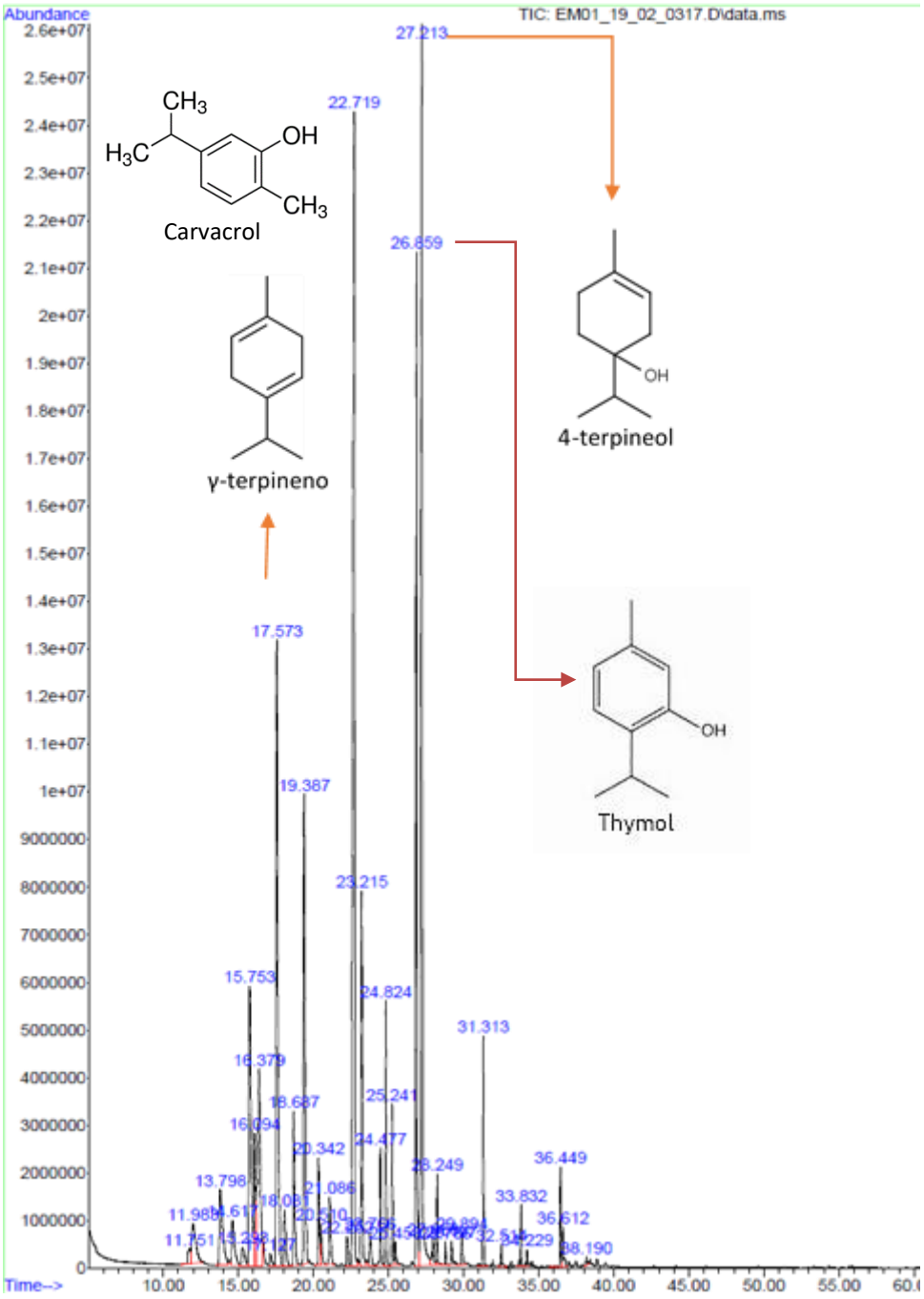
Figura 32. Estruturas das substâncias presentes nos óleos de *Thymus vulgaris.*



RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento do óleo essencial com coloração amarelada obtido da espécie *O. vulgare* utilizando a técnica de hidrodestilaçãofoi de 0,20% p/v, valor dentro da porcentagem comumente obtida para as espécies do gênero *Origanun* (Khan et al., 2019). A análise deste óleo por CG-EM resultou no cromatograma da Figura 33. As substâncias identificadas no cromatograma e nos espectros de massas foram organizadase seguem apresentadas na Tabela 6.

Figura 33. Cromatograma do óleo essencial da planta inteira *Origanum vulgare.*



Os principais componentes do óleo essencial de *O. vulgare* foram o 4- terpineol com 17,42% da composição de seu óleo, seguido do carvacrol com 16,0%, timol (10,44%) e γ-terpineno (10,17%).

Tabela 6. Composição química (%) dos óleos essenciais da planta inteira de *Origanum vulgare.*

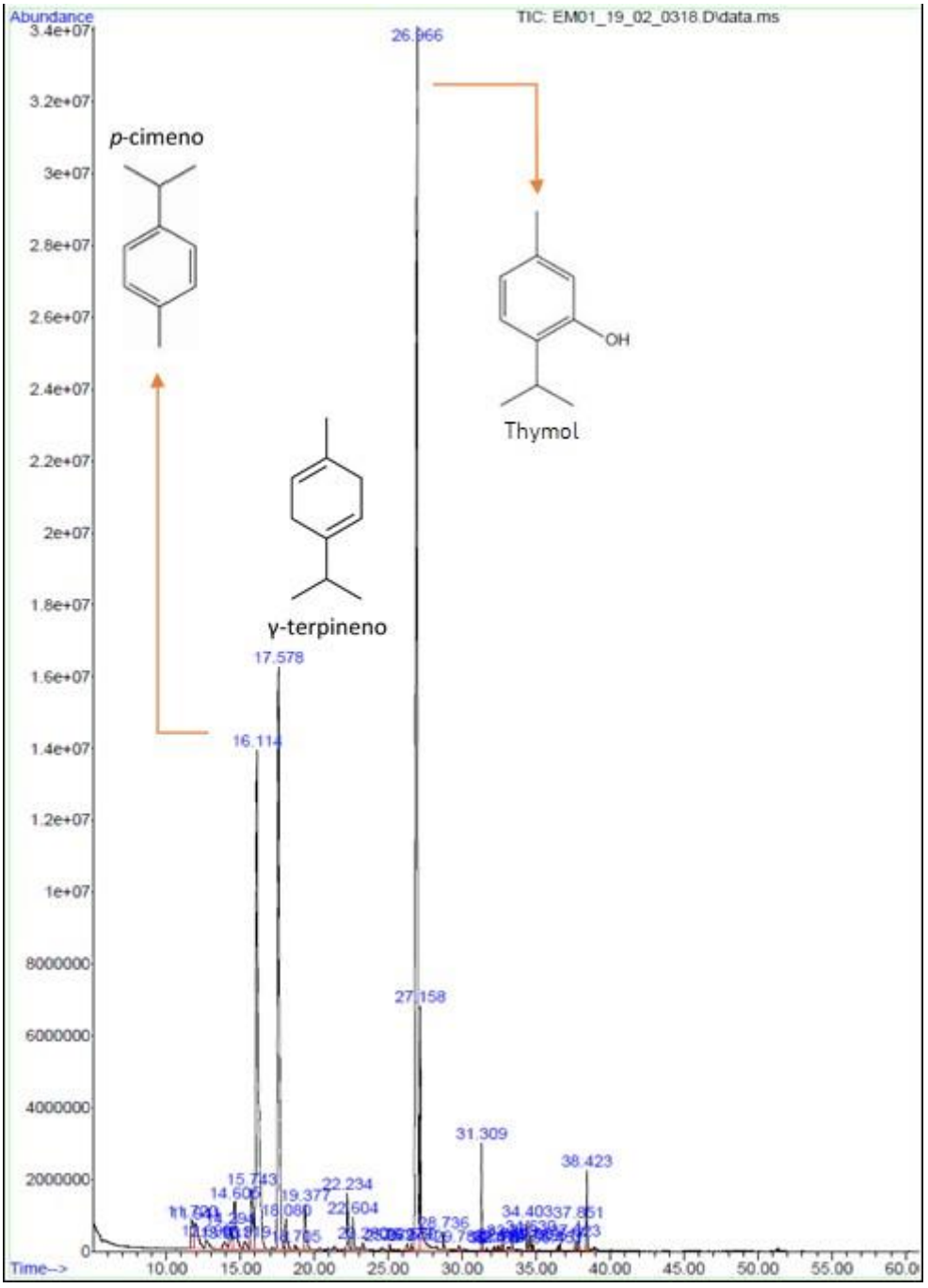
Constituintes	**% Composição**
Monoterpenos	
Tujeno	0,35
α-pineno	1,44
Sabineno	2,32
β-mirceno	1,12
Felandreno	0,48
α-terpineno	5,87
p-cimeno	2,13
1,8-cineole	4,61
Octatrieno	0,19
γ-terpineno	10,27
α-terpinoleno	2,08
Linalol	6,6
2-ciclohexenol	1,23
Terpinen-4-ol	17,42
α-terpineol	4,14
Acetato de linalil	1,34
Geraniol	0,24
Timol	10,4
Carvacrol	16,0
Sesquiterpenos	
Trans-cariofileno	1,61
α-humuleno	0,21
β-bisaboleno	0,15
Óxido de cariofileno	0,4

Classes Terpenoides	
Monoterpenos	88,2
Sesquiterpenos	23,7
Total	90,6

O carvacrol tem sido constantemente relatado como um dos constituintes principais do óleo de *O. vulgare,* a variação na concentração de carvacrol nesse óleo pode ser devido a fatores ambientais, métodos de extração ou diferenças genéticas (Govindarajan et al., 2016; Elshafie & Camele 2017; Xie et al 2019).

O rendimento do óleo essencial com coloração amarelada obtido da espécie *Thymus vulgaris* utilizando a técnica de hidrodestilaçãofoi de 0,30% p/v. A análise deste óleo por CG-EM resultou no cromatograma da Figura 34. As substâncias identificadas no cromatograma e nos espectros de massas foram organizadas e seguem apresentadas na Tabela 7.

Figura 34. Cromatograma do óleo essencial da planta inteira de *Thymus vulgaris.*



Os principais componentes identificados em seu óleo são timol, componente majoritário com 39,97% da composição do óleo, *p*-cimeno com 17,3% e γ-terpineno com 19,25%. Todas as substâncias identificadas nos óleos de *T. vulgaris* estão organizadas na Tabela 7.

Tabela 7. Composição química (%) do óleo essencial da espécie *Thymus vulgaris.*

Constituintes	**% Composição**
Monoterpenos	
Tujeno	1,25
β-pineno	0,4
β-mirceno	2,18
Felandreno	0,41
α-terpineno	2,27
p-cimeno	19,25
γ-terpineno	17,3
Trans-sabineno	0,9
α-terpinoleno	0,12
Linalol	1,19
Terpinen-4-ol	0,7
α-terpineol	0,23
Timol	39,97
Carvacrol	4,0
Ciclohexeno	1,69
Sesquiterpenos	
Trans-cariofileno	1,42
Germacreno D	0,1
Óxido de cariofileno	0,1
α-cadinol	1,26
Classes Terpenoides	
Monoterpenos	91,9
Sesquiterpenos	2,88
Total	94,8

Fonte: Oliveira, A. A. 2020.

A composição química da espécie *T. vulgaris* são observadas diferentes classes de substâncias como, substâncias fenólicas (flavonoides e flavonas) (D & Mathew, 2017), triterpenos (ácido ursólico e ácido oleanoico) e terpenoides, presentes principalmente nos óleos essenciais (D & Mathew, 2017; Kuete, 2017). O óleo essencialdessa espécie é principalmente composto de monoterpenos e sesquiterpenos, e seus componentes majoritários são timol, cimeno e terpineno (Fierascu et al., 2019). As variações na composição desse óleo também poderão ser atribuídas aos fatores ambientas ou climáticos da região de coleta do material vegetal.

Modelagem Molecular

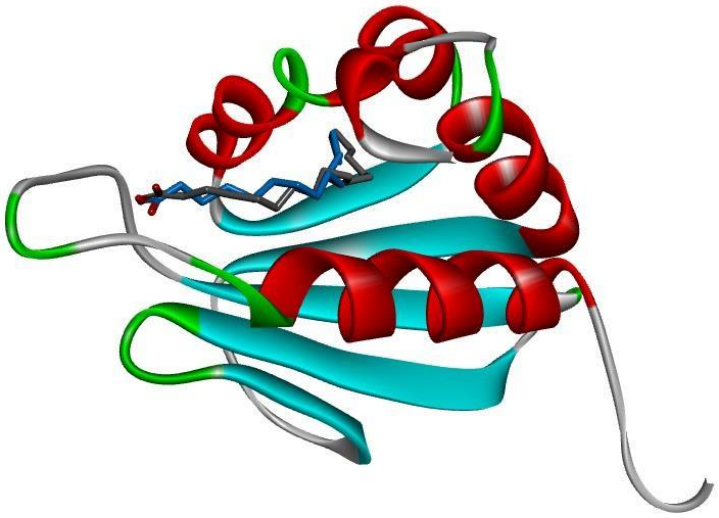
A proteína AeSCP-2 (Aedes aegypti Sterol Carrier Protein-2), usada no *docking* molecular, foi obtida do Protein Data Bank Repository (http://www.rcsb.org/pdb/) com PDB ID 1PZ4. A proteína AeSCP-2 foi cristalizada junto com o ligante do ácido palmítico, conforme trabalho de Dyer e colaboradores (2003). O teste de protocolo de *docking* consistiu na remoção do ácido palmítico co-cristalizado da proteína e, em seguida, docking-lo no mesmo local. A sobreposição das estruturas resultou em um RMSD (desvio padrão médio da raiz) de 1,04, conforme esperado para valores aceitáveis até 2Å para um protocolo de docking confiável (Kirchmair, 2008).

O ácido palmítico na estrutura do PDB utilizada, não atua exatamente como um inibidor da proteína AeSCP-2, mas serve para avaliar as moléculas que competem pelo sítio ativo da proteína. Essas moléculas podem bloquear o transporte de colesterol, desempenhando um papel importante nas doenças virais transmitidas por insetos, como o mosquito *Ae. aegypti*, por não possuírem enzimas essenciais para a síntese do colesterol, resultando na dependência de vias externas para sua obtenção (Zdobnov et al. 2002).

De acordo com Radek e colaboradores (2010), a proteína AeSCP-2 se liga ao colesterol e os aminoácidos críticos na estrutura da proteína parecem ser os responsáveis pela mudança na afinidade de ligação ao ligante, o que implica em um papel muito importante para a descoberta de novos compostos antivirais. Nesse contexto, o colesterol é um agente crítico nos processos fisiológicos, sem os quais, com os insetos, eles não podem crescer e se reproduzir (Larson et al. 2008). Proteínas carreadoras, comoa Sterol Carrier Protein (SCP), têm a função de levar colesterol para certas regiões do organismo hospedeiro, sendo alvo de estudo no desenvolvimento de compostos que possam inibir a atividade larvicida (Larson et al, 2008; Silva et al, 2015).

Ao calcular o *docking* molecular, a interação do ácido palmítico no sítio ativo original da proteína foi calculada primeiro para testar o protocolo de *docking*. Assim, a interação ligante-proteína (ácido palmítico no sítio ativo da proteína) mostrou energia de ligação de re-*docking* igual a -8,05 kCal / mol Figura 35).

Figura 35. Sobreposição da estrutura cocristalizada de ácido palmítico (em cinza) no local de atividade da proteína AeSCP-2 (PDB ID: 1PZ4), juntamente com a estrutura re-dockada (em azul). Valor RMSD = 1,04.



Os compostos hidroxilados apresentaram afinidade de ligação com valores intermediários muito próximos, mas abaixo da energia do ligante padrão. Estes

compostos podem apresentar atividade inibitória se estiverem em quantidades apreciáveis na mistura, que é o caso da mistura do óleo essencial de *O. vulgare* com γ- terpineno (10,3%), terpinen-4-ol (17,4%), timol (10,4%) e carvacrol (16,0%). Essas quatro moléculas apresentaram valores de energia de ligação (ΔGbind), inferiores a -7 Kcal/mol, o que nos permite afirmar que óleos essenciais que contenham maior concentração dessas moléculas podem apresentar razoável atividade (Tabela 8).

Tabela 8. Valores de energia de ancoragem (ΔGbind) das moléculas constantes em óleos essenciais ancorados no sítio ativo da proteína AeSCP-2, em ordem decrescente, e interações com resíduos de aminoácidos.

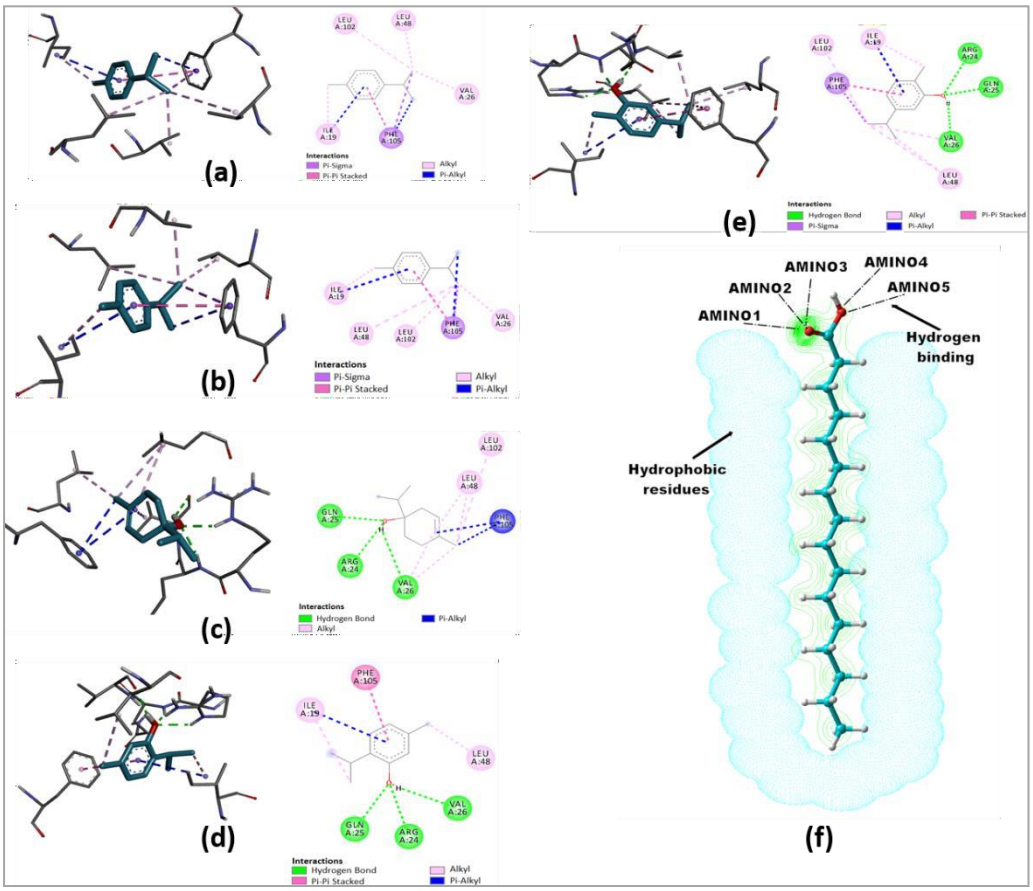
Molécula	**ΔG_{bind} (kcal/mol)**	**Interações Hidrofóbicas**	**Interações Ligação de Hidrogênio**
Ácido Palmítico	-8,05	* Leu16, Val26, Ser108, Leu48, Phe105, Met46, Ile106, Leu102, Ile12, Ile99, Met71, Leu64, Phe32, Met90, Ile74, Met66	* Arg24, Gln25
4-Terpineol	-6,91	Leu102, Leu48, Phe105	Gln25, Arg24, Val26
Carvacrol	-6,76	Leu102, Ile19, Phe105, Leu48	Gln25, Arg24, Val26
Timol	-6,75	Ile19, Phe105, Leu48	Gln25, Arg24, Val26
Cimeno	-5,23	Leu102, Leu48, Val26, Ile19, Phe105	
γ-Terpineno	-5,08	Ile19, Leu48, Leu102, Phe105, Val26	

* Dyer et al., 2003.

A mistura presente nos óleos de *T. vulgaris*, que contém como substanciais majoritárias os terpenos cimeno (19,2%), γ-terpineno (17,3%) e timol (40%), por sua vez,

também deve apresentar atividade antilarvicida apreciável, mesmo que os valores das energias de Afinidade Cimeno e γ-Terpineno sejam comparativamente baixo, -5,23e -5,08 kCal/mol, respectivamente. Deve-se considerar que a percentagem de timol na mistura é superior à dos outros dois constituintes, o que aumenta consideravelmente a sua atividade anti-larvicida. Uma forma simples de comparar o grau teórico de atividadeanti-larvicida das misturas é calcular o índice médio das energias de afinidade teórica com as porcentagens dos constituintes da mistura experimental. Logo, se o material testado contendo ácido palmítico puro (neste caso, índice igual a 8,05) for tomado comopadrão, a mistura do óleo de *T. vulgaris* mostrará um índice de atividade de 57% do valor padrão (indice igual a 4,58), enquanto a mistura do óleo essencial de *O. vulgare* mostrará um índice de 44% (indice igual a 3,51). Ambos são valores apreciáveis de atividade anti-larvicida para misturas. As interações de cada composto com resíduos de aminoácidos da proteína AeSCP-2 estão resumidas na Figura 36.

Figura 36. Interações dos aminoácidos da proteína AeSCP-2, em 3D e 2D,respectivamente, com a molécula de (a) Cimeno, (b) γ-Terpineno, (c) Terpinen-4-ol, (d) Timol, (e) Carvacrol, (f) diagrama esquemático das principais interações da proteína com o ácido palmítico.



Os hidrocarbonetos monoterpênicos, cimeno e γ-terpineno, foram as moléculas que apresentaram as interações menos favoráveis (Figura 36 a e b). Por possuírem estruturas menores, comparadas aos sesquiterpenos avaliados, não são tão favorecidos por possuírem cadeia carbonada para interações hidrofóbicas. Por outro lado, localizados em uma faixa intermediária de afinidade, 4- terpinenol, Timol e Carvacrol apresentaram afinidades mais favoráveis do que estruturas não oxigenadas de mesmo tamanho (Figura 36 c, d e e). Porém, a quantidade de interações apolares existentes para sesquiterpenos com cadeias maiores é maior, a ponto de estabilizar melhor a interação com a proteína do que com estruturas oxigenadas via ligação de hidrogênio. As interações das moléculas estudadas com os aminoácidos da proteína AeSCP-2 sãosemelhantes às interações do ácido palmítico, o ligante original no modelo de *docking*.

Segundo Dyer et al. (2003), as interações não polares do ácido palmítico, responsáveis pela forte estabilidade de ligação, estão localizadas dentro da cavidade do sítio da proteína ativa (Figura 35 e Figura 36f). A estrutura tridimensional da proteína AeSCP-2 mostra que os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos alinham a cavidade de ligação do ligante interior, o quesugere que as moléculas com longas cadeias não polares podem exibir boa atividade antiparasitária contra os mosquitos *Ae. aegypti*. Dentre as moléculas constituintes dos óleos essenciais, apenas aquelas contendo hidroxila apresentaram interações do tipo ligação de hidrogênio, no caso, 4-terpinenol, Carvacrol e Timol. Essas moléculas, com três ligações de hidrogênio cada, não apresentaram os melhores índices de afinidade quando comparadas ao ácido palmítico, que apresentou apenas duas ligações de hidrogênio, o que enfraquece a hipótese tradicional de que as ligações de hidrogênio sãoas principais responsáveis pela afinidade da ligação (Tabela 8). Essas moléculas apresentam resultados muito próximos de ΔG e todas interagem, via ligação de hidrogênio, com os mesmos resíduos de aminoácidos (Gln25, Arg24 e Val26).

A molécula Terpinen-4-ol, que apresentou o melhor resultado ΔG_{bind} entre as moléculas estudadas, apresentou interações do tipo alquil hidrofóbico com o Leu102, resíduos Leu48 e interação Pi-Alquil com o resíduo Phe105, interações residuais que coincidem com as do palmítico ácido. As moléculas de timol e carvacrol, além de apresentarem interações com os resíduos Leu48 e Phe105, exibiram interações do tipo Pi-Alquil do anel aromático presente em suas estruturas com o resíduo Ile19, este não apresentado pelo ácido palmítico. As moléculas cimeno e γ-terpineno, por sua vez, apresentaram resultados de ΔG_{bind} semelhantes, porém muito baixos em comparação com o ácido palmítico.

Em relação às interações apresentadas na Figura 36, a estrutura do cimeno apresentou interações hidrofóbicas do tipo alquil com os resíduos Leu102, Leu48 e

Val26 e do tipo pi-alquil com Ile19 e Phe105. Dentre estes, apenas a interação com o resíduo Ile19 não foi observada no ácido palmítico. A molécula de γ-terpineno apresentou interações hidrofóbicas do tipo alquil com os resíduos Leu48, Leu102 e Val26, do tipo pi-alquil com os resíduos Phe105 e Ile19, e do tipo pi-pi com Phe105 (destes, apenas a interação com Ile19 não foi observado no ácido palmítico). Embora tenham apresentado interações coincidentes com as do ácido palmítico, por apresentarem energia de ligação muito baixa, é improvável que essas duas substâncias sejam capazes, isoladamente e em pequenas quantidades, de inibir o transporte de colesterol ou exibir atividade antiparasitária satisfatória.

CAPÍTULO II
Análise dos extratos e chás

Ampelozizyphus amazonicus

A espécie *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae) é amplamente utilizada na medicina popular, principalmente por comunidades ribeirinhas, através dos chás de suas cascas e raízes. Essa espécie é conhecida como "cerveja de índio", "cervejinha", "cervejeira" ou "cerveja do mato", isso porque seus chás apresentam coloração intensa, espuma e sabor amargo, semelhante à cerveja (Brandão et al. 1985; Andrade Neto et al. 2008; Oliveira et al. 2011).

Em toda região amazônica *A. amazonicus* é considerada uma espécie de extrema importância na prevenção e no tratamento da malária. Sendo a atividade profilática já comprovada *in vitro* e *in vivo*, contra a forma esporozoíta da malária (Andrade Neto et al. 2008; Oliveira et al. 2011). É considerada uma planta com ação estimulante, energética, afrodisíaca e tonificante, e também é empregada no tratamento de distúrbios gastrointestinais, inflamações e febre (Oliveira et al. 2011; Mendonça et al. 2020). Essas propriedades estão relacionadas a alta concentração de saponinas presentes nessa espécie (Mendonça et al. 2020). Saponinas pertencem à classe de compostos bioorgânicos encontradas em abundância na composição química de espécies vegetais. Mais especificamente, são substâncias glicosídicas com uma ou mais unidades de açúcares hidrofílicos combinados a um triterpeno lipofílico, de ocorrência natural nas espécies vegetais (El Aziz et al. 2019; Mendonça et al. 2020). São relatadas diferentes ações farmacológicas para essa classe de substâncias, como hemolíticas, fator anti-inflamatório, antibacteriano, antifúngico, antiviral, inseticida, anticâncer, citotóxico e ação moluscicida (El Aziz et al. 2019). Nesse contexto, fica evidente a importância da avaliação antioxidante e citotóxica dos extratos de *A. amazonicus.*

Teste Químico – DPPH

Substâncias com ação antioxidante são de grande importância para o sistema biológico, pois, de modo geral, contribuem para a manutenção e o bom funcionamento do organismo, diminuindo o estresse oxidativo e suas possíveis sequelas. A avaliação dacapacidade de sequestro do radical estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) é uma das técnicas empregadas para medir a ação antioxidante de substâncias isoladas, extratos e infusões (Oliveira, 2014).

Os resultados da avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *A. amazonicus* estão dispostos na Tabela 9 e foram expressos em capacidade de sequestro (CS_{50}), que é a concentração do extrato necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50%. Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a CS_{50} e maior a sua atividade antioxidante. O padrão utilizado para a determinação da atividade antioxidante foi a quercetina comercial que apresentou CS_{50} igual a 3,33 ± 0,19 μg/mL.

Tabela 9. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *Ampelozizyphus amazonicus.*

Extratos*	**CS_{50} ± DP (μg/mL)**
EHGF	2742,36 ± 0,56
EDGF	1520,48 ± 0,80
EMGF	119,06 ± 0,62
EHGG	3117,01 ± 1,01
EDGG	1476,68 ± 0,83
EMGG	125,03 ± 0,68

CGFM1	590,00 ± 0,56
CGFM2	476,06 ± 0,67
CGGM1	493,01 ± 0,57
CGGM2	398,06 ± 0,49

DP (desvio padrão). Fonte: Oliveira, A. A. 2020. *Extratos: EHGF – Extrato hexano dos caules finos; EDGF – Extrato diclorometano dos caules finos; EMGF – Extrato metanol dos caules finos; EHGG – Extrato hexano dos caules grossos; EDGG – Extrato diclorometano dos caules grossos; EMGG – Extrato metanol dos caules grossos; CGFM1 – Chá dos caules finos/método I; CGFM2 – Chá dos caules finos/método II; CGGM1 – Chá dos caules grossos/método I; CGGM2 – Chá dos caules grossos/método II.

Os extratos com os melhores valores de atividade antioxidantes foram EMGF e o EMGG, com CS_{50} 119,06 ± 0,62 μg/mL e 125,03 ± 0,68 μg/mL, respectivamente. Os extratos polares normalmente possuem substâncias com grupo hidroxila, as quais podem ser responsáveis pela melhor atividade antioxidante destes extratos brutos. Estas substâncias são responsáveis por retardar a ação oxidativa, reduzindo a velocidade de processos de oxidação no organismo e apresentam diferentes propriedades protetivas, já que elas têm a capacidade de proteger o organismo dos danos causados pelos radicais livres, prevenindo ou adiando o início de várias doenças. Esse resultado mostra a importância da espécie para o controle do estresse oxidativo e sequestro dos radicais livres, que favorecem a formação de agentes pró-oxidativos no organismo (Halliwell & Gutteridge, 2007; Fabbri, 2012).

Estudos relatam que o estresse oxidativo pode ser determinante no desenvolvimento de complicações sistêmicas na malária, como por exemplo, o processo envolvendo a degradação da hemoglobina, durante a infecção (Dockrell et al., 1986; Guha et al., 2006; Sohail et al., 2010). Para os extratos EHGF (2742,36 μg/mL), EDGF

(1520,48 µg/mL), EHGG (3117,01 µg/mL) e EDGG (1476,68 µg/mL) não foi observada atividade antioxidante significativa para o sequestro de radicais livres DPPH, podendo ser associada a esse comportamento a origem desses extratos (solvente utilizado no processo de extração), indicando a ausência de substâncias com capacidade de estabilizar o radical DPPH, porém se faz necessária a avaliação frente a outros testes antioxidantes.

Teste de toxicidade frente à *Artemia salina*

Testes de toxicidade têm o intuito de estudar e quantificar os efeitos que uma substância pode causar em organismos vivos. Existem diversos organismos que podem ser utilizados nos testes de toxicidade, dentre eles ratos e coelhos, entretanto, tem um custo elevado e apresentam difícil manejo. Uma alternativa é a utilização de microcrustáceos, como por exemplo, *Artemia salina*, que são de pequeno porte e de fácil manuseio, acessíveis, de baixo custo, e já são utilizados para o monitoramento de efluentes, como a determinação da toxicidade aguda, facilitando assim o procedimento das análises e viabilizando os testes (Lima et al. 2011; Bueno & Piovezan, 2015; Maia et al. 2018).

Os resultados do ensaio de toxicidade foram expressos em CL_{50} (com intervalo de confiança de 95%), foram utilizados Lapachol e DMSO como controles positivo e negativo, respectivamente. Os dados obtidos estão descritos na Tabela 10.

Dentre os extratos testados os que apresentaram maior toxicidade foram CGGM1 e CGGM2 com as concentrações de 125,8 e 198,0 µg/mL, respectivamente.

Tabela 10. Resultado do teste de toxicidade frente à *Artemia salina* dos extratos de *Ampelozizyphus amazonicus.*

Extratos*	**CL_{50} µg/mL**

EMGF	276,0
EMGG	380,8
CGFM1	250,2
CGFM2	287,1
CGGM1	125,8
CGGM2	198,0
Lapachol	52,3

Fonte: Oliveira, A. A. 2020. *Extratos: EMGF – Extrato metanol dos caules finos; EMGG – Extrato metanol dos caules grossos; CGFM1 – Chá dos caules finos/método I; CGFM2 – Chá dos caules finos/método II; CGGM1 – Chá dos caules grossos/método I; CGGM2 – Chá dos caules grossos/método II.

Segundo critérios estabelecidos por Meyer et al. (1982), todos os extratos listados na Tabela 10 acima podem ser considerados de toxicidade moderada (CL_{50} de 100 a 500 µg/mL), indicando uma ação preliminar não tóxica, o que corrobora para o estudo etnofarmacologico quanto ao consumo de chás dessa espécie pela população. Sendo assim, o teste de letalidade é considerado essencial como bioensaio preliminar noestudo de extratos e substâncias com potencial atividade biológica, sendo atualmente aceito pela comunidade científica (Hamidi et al., 2014).

Amarante e colaboradores (2011) destacam a relação entre ensaios biológicos de toxicidade frente à *A. salina* e a atividade contra o *Plasmodium falciparum*, parasita causador da malária. Onde a toxicidade apresentada para o microcrustáceo pode servir como um indicador para a atividade antiplasmódica.

***Headspace* em microextração de fase sólida – HS-SPME**

Os aromas são misturas complexas de componentes voláteis, nos quais estão presentes várias classes de substâncias como ésteres, aldeídos, cetonas, álcoois e outros. Os aromas naturais podem ser obtidos por extração de folhas, flores, caules e frutos das plantas (Valduga, et al, 2010). A técnica de Micro-Extração em Fase Sólida (*Solid Phase Micro-Extraction* - SPME) foi utilizada como ferramenta para identifcação dos constituintes voláteis, dos caules frescos de *A. amazonicus*.

Após a análise do cromatograma e espectros de massas obtidos por CG-EM identificação dos constituintes foi feita a partir da comparação do índice de retenção e dos espectros de massas da biblioteca Wiley do aparelho e dados da literatura (Adams, 2007). Para os caules frescos de *A. amazonicus* foi possível identificar como substâncias majoritárias os sesquiterpenos α-gurjuneno (5,11%), α-selineno (4,14%) e δ-cadineno (2,38%), substâncias comumente encontradas em plantas aromáticas e óleos essenciais, estando associadas a mecanismos de comunicação, atração de insetos polinizadores ou repelência de insetos predadores (Reisenman et al., 2013; Asmare et al., 2017). Todas as substâncias identificadas no cromatograma obtido estão organizadas e apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11. Identificação dos componentes dos caules frescos de *Ampelozyziphus amazonicus* por *Headspace* em microextração de fase sólida.

T_R (min.)	**IR**	**Área %**	**Subtâncias**
3,4	1525	6,2	NI
11,2	28047	6,4	3-Octanol
12,4	14896	1,1	2,4-Hexanediona

16,2	52976	3,5	Ácido benzoico
16,8	-	2,9	Nonanoato de metila
18,3	69348	0,7	5-(2-propenila)-1,3-Benzodioxola
18,8	-	2,9	Decanoato de metila
20,0	152287	1,8	α-Copaeno
20,2	151783	1,1	Zingibereno
20,3	152383	1,4	β-Elemeno
20,7	152200	5,1	α-Gurjuneno
20,9	151908	1,6	trans-Cariofileno
21,1	152175	3,0	α-Bergamoteno
21,2	152287	1,1	NI
22,2	15251	3,6	NI
22,3	152397	4,1	α-Selineno
22,4	151799	0,7	β-Bisaboleno
22,5	-	1,0	NI
22,6	174526	1,2	Ácido Dodecanoico
22,8	152048	2,4	δ-Cadineno
25,9	241481	2,0	Ácido Tetradecanoico

28,9	307423	7,1	Ácido Hexadecanoico
31,1	371092	2,3	1-Eicosanol
31,2	361819	2,5	Ácido 9,12-Octadecadienoico
31,3	366334	4,4	Ácido 9-Octadecenoico
Total (%)		72,2	

IR – Índice de Retenção; T_R – Tempo de Retenção; NI – Não Identificado.

A análise dos caules secos de *A. amazonicus* seguiu a mesma metodologia estabelecida para os caules frescos. Após as análises do cromatograma e espectros de massas foi possível verificar a presença de terpenos e outras classes de substâncias na composição volátil. As substâncias com maior composição foram os ácidos decanoico (2,9%), 1,2-benzeno dicarboxílico (5,6%) e hexadecanoico (9,1%). Também foram identificados os terpenos δ-cadineno (1,8%), α-longipineno (1,1%) e α- copaeno (1,3%) (Tabela 12).

Tabela 12. Identificação dos componentes dos caules secos de *Ampelozizyphus amazonicus* por *Headspace* em microextração de fase sólida.

T_R (min.)	**IR**	**% Composição**	**Compostos**
11.217	28047	1,92	3-Octanol
18.835	113853	2,91	Ácido Decanoico
19.900	151937	1,00	NI
20.230	151783	1,47	Zingibereno
20.744	152311	1,12	α-Longipineno
21.016	152516	1,28	Biciclo[5.2.0]nonano

21.125	152173	1,78	α-Bergamoteno
21.519	152543	1,97	NI
21.952	152287	1,27	α-Copaeno
22.355	152135	1,14	NI
22.766	152048	1,85	δ-Cadineno
23.837	366737	1,35	Heptadecano
25.444	592031	1,61	Ácido Decanodioico
25.892	241481	1,67	Ácido Tetradecanoico
27.017	475991	1,12	Pentacosano
27.164	335439	1,02	Hexadecano
28.195	324690	5,59	Ácido 1,2-benzeno dicarboxílico
28.896	307410	9,12	Ácido Hexadecanoico
30.949	204291	2,53	Dipropil-nonan-5-ona
31.248	387347	1,28	Ácido 9,12-Octadecadienoico
31.313	366302	2,57	Ácido 9-Octadecenoico
31.625	370806	0,85	Ácido Octadecanoico
Total (%)		52,63	

IR – Índice de Retenção; T_R – Tempo de Retenção; NI – Não Identificado.

É possível observar uma variação na concentração dos ácidos presentes nos voláteis dos caules frescos e secos de *A. amazonicus* analisados. Essa variação observada na concentração das substâncias pode estar associada a aspectos como armazenamento, mudança de temperatura e degradação de substâncias. Esta é a primeiradescrição dos componentes voláteis dos caules de *A. amazonicus*. Estes resultados são importantes porque evidenciam a presença de substâncias voláteis nos caules frescos e secos de *A.*

amazonicus, possibilitando a otimização da extração das susbtâncias através de seus chás, de modo a obter maior concentração das susbtâncias observadas.

Simulação Digestiva *in vitro*

A digestão é um processo de desintegração dos alimentos pelo trato gastrointestinal, onde os macronutrientes são transformados em moléculas menores, a fim de facilitar a absorção desses nutrientes pelo nosso organismo (Tortora & Derrickson, 2009; Ménard et al., 2014; Ding et al. 2019). A ingestão de alimento conduz a diversas mudanças no trato gastrointestinal, pois ocorrem três fases principais no processo digestivo: a fase oral que ocorre na boca, a fase gástrica no estômago e a fase final que ocorre no intestino (Axson et al. 2015; Pinacho et al., 2015; Ding et al. 2019). Determinar como a ingestão afeta as substâncias dos chás ingeridos pela população para o tratamento de doenças é fundamental para garantir uma dosagem adequada e eficaz, além de contribuir para o entendimento do uso popular da espécie vegetal estudada.

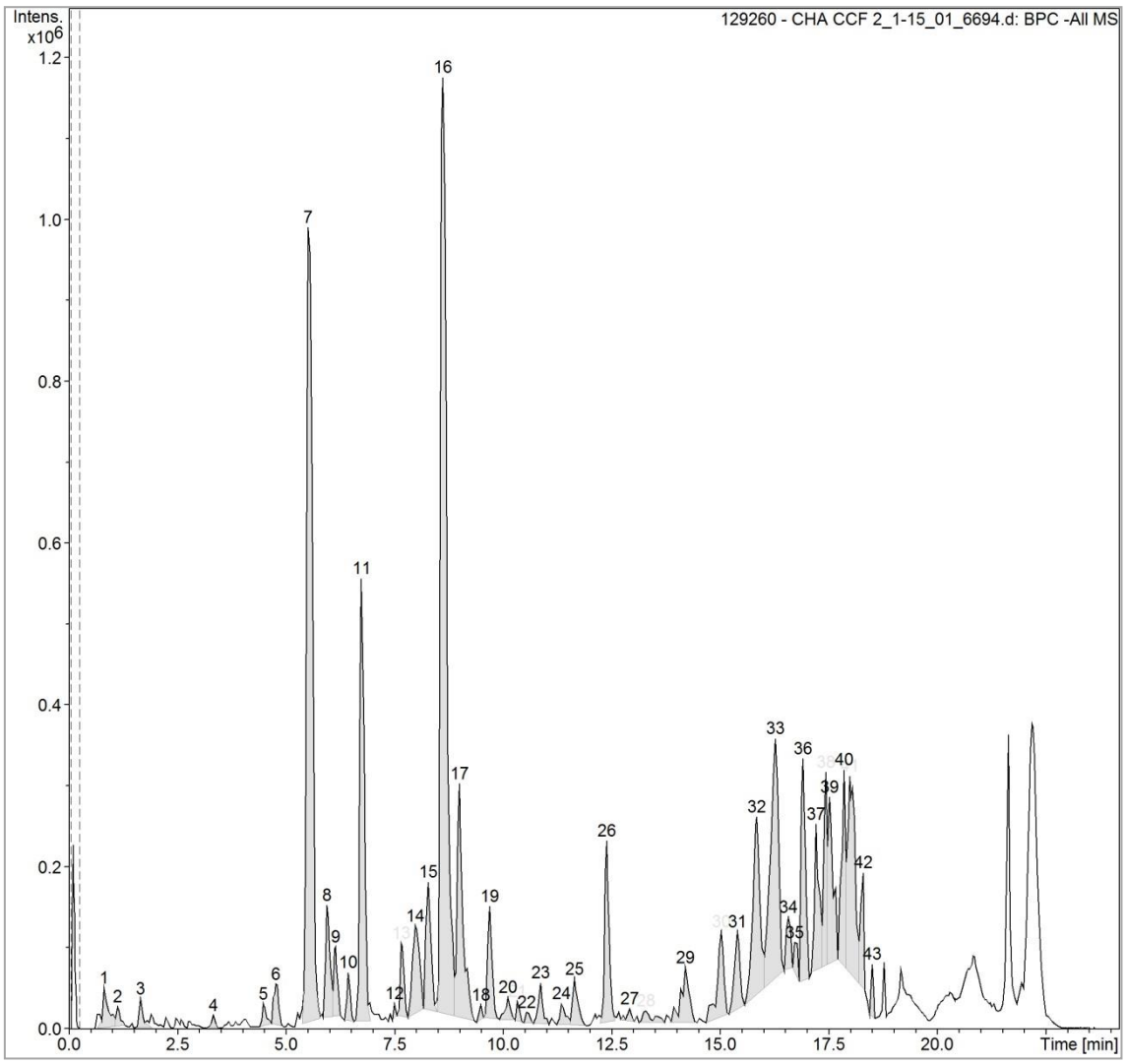
Os ensaios *in vitro* realizados para a simulação digestiva consistem numa sucessão de etapas que recriam o ambiente nos diferentes compartimentos do trato digestivo por onde o alimento passa. Em cada compartimento (boca, estomago e intestino) as condições de pH, temperatura e concentrações enzimáticas são recriadas. Estes modelos são simples e relativamente fáceis de reproduzir, mas, no entanto, não são fisiologicamente realistas uma vez que é extremamente complicado recriar todas as condições complexas existentes no trato gastrointestinal, porém permitem visualizar parâmentros e possíveis comportamentos para o material testado, o que o torna eficaz (Ferreira, 2014; Axson et al. 2015; Pinacho et al., 2015; Desrosiers & Weathers, 2016;Ding et al. 2019).

Análises por CLAE-EM do chá de *Ampelozizyphus amazonicus*

Análises por CLAE-EM do chá de *A. amazonicus* e simulação gástrica das amostras obtidas pelos Método 1.

O cromatograma do chá de *A. amazonicus* (Controle) (Figura **37**37), obtido por CLAE-EM, apresenta dois sinais principais em 5,5 e 8,6 minutos, sendo que o sinal com tempo de retenção de 5,5 minutos tem íon molecular [M-H]- *m/z* 595,1687 e fragmentação *m/z* 385 e 355 correspondente a substância 5-allil-1-(2,3,4,-tris-O-benzoilpentofuranosil)-2,4(1H,3H)-pirimidinediona (Pu et al. 2017), e o pico com t_R 8,6 minutos tem íon molecular [M-H]- *m/z* 597,1840 e fragmentações *m/z* 477, 387 e 357 características da substância Ploretin-3',5'-di-glucosideo (Pu, et al. 2017).

Figura 37. Cromatograma do Chá (Controle) de *Ampelozizyphus amazonicus*.



Foi possível identificar as saponinas Jujubosideo H, Jujubosideo J, 3-O-R-L-rhamnopiranosil-(1f2)-[(4-sulfo)-α-D-glucopiranosil-(1β)]-α-D-galactopiranosil-(20R,22R)-16α,22:16R,30-diepoxidammar-24-ene-3α,20-diol e Jujubosideo B, com os tempos de retenção de 1,1 (*m/z* 1087,3047), 8,3 (*m/z* 1249,4923), 15,0 (*m/z* 1021,5255) e 18,0 (*m/z* 1043,5502) minutos, respectivamente (Maciuk, et al., 2004; Wu et al., 2013; Yang et al., 2013; Fu et al., 2016) (Tabela 13).

Tabela 13. Tabela das substâncias identificadas no Chá de *Ampelozizyphus amazonicus.*

Chá de *Ampelozizyphus amazonicus.*						
T_R	**[M-H]- *m/z***	**Fragmentação (*m/z)***	**[M-H]- *m/z* Lit.**	**Fragmentação (*m/z)* Lit.**	**Substância**	**Referência**
0.8	517,1105	-	517	517, 473, 455, 493	23,24-dihidrocucurbitacina D	Pu, 2017
1.1	1.087,3047	899,2670; 637,1619; 449,1299	1087,5668	-	Jujubosideo H	Fu, 2016
1.6	685,1844	397,0748; 329,0884	-	-	-	-
3.3	839,0000	417,1052	-	-	15-Acetoxi-lotosideo IV	Bozicevic, 2017
4.5	935,3409	559,1271; 491,1413;300	-	-	-	-
4.8	611,1627	411	-	-	-	-
5.5	595,1687	-	595,1694	595, 475, 385, 355	5-allil-1-(2,3,4,-tris-O-benzoilpentofuranosil)-2,4(1H,3H)-pirimidinediona	Pu, 2017
5.9	1.019,2693	-	-	-	-	-

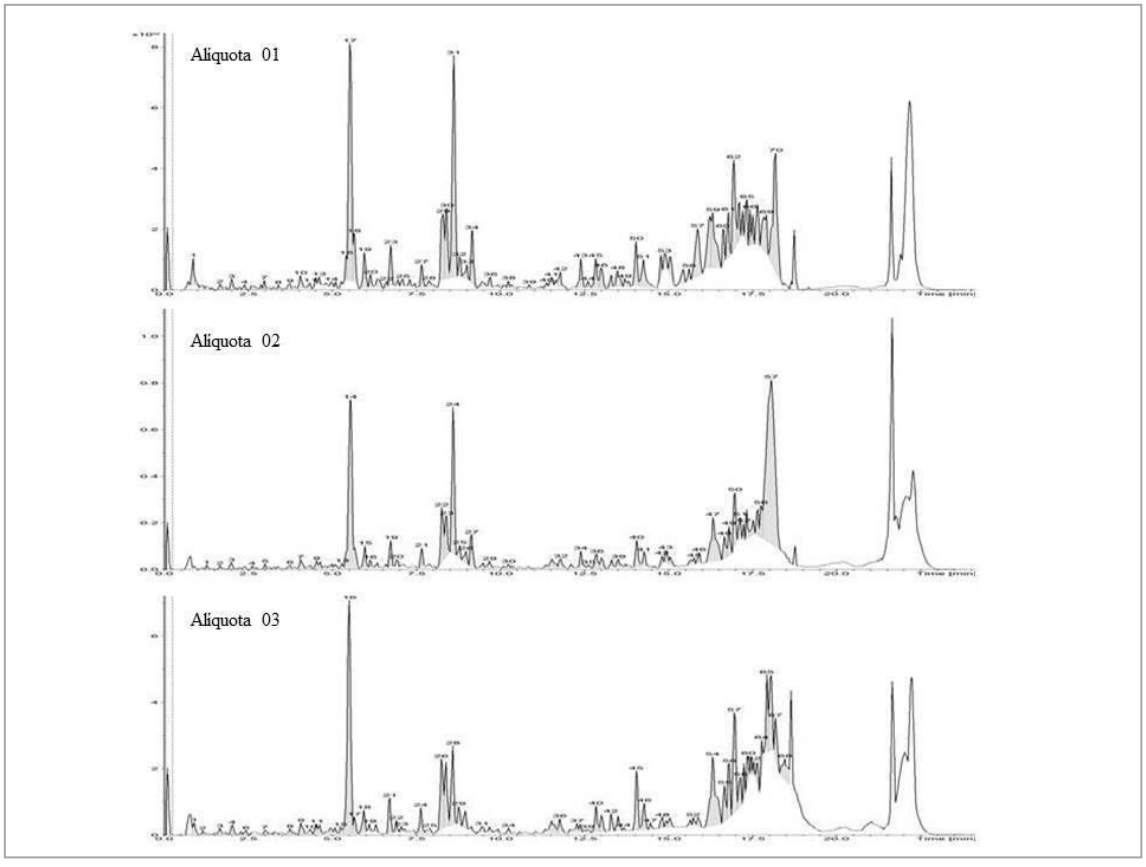
6.1	959,2498	479,1208	959,5225	941, 817, 655	16-keto-tetrahidroxidammar-23-ene glicisideos	Simen, 2016
6.4	599,1626	304,0472	-	-	-	-
6.7	965,3310	621,1839	-	-	-	-
7.5	943,3384	613,1780; 433,1129			Lotosideo III	Bozicevic, 2017
7.6	868,2301	647,1578; 579,1727;288,0521	-	-	-	-
8.0	597,1837	-	-	-	-	
8.3	1249,4923	743,2787; 551,2148	1249,6188		Jujubosideo J	Fu, 2016
8.6	597,184	479,1202	597,1825	597, 477, 387, 357, 315	phloretin-3',5'-di-glucoside	Pu, 2017
9.0	459,1305	-	-	-	-	-
9.5	1057,4717	745,1996;493,1343	-	-	-	-
9.7	771,2159	527,1167; 459,1305	-	-	-	-
10.1	993,3027	771,2168; 523,2057;317,1976	-	-	-	-
10.3	1039,5297	771,2157; 659,1630; 417,1179	-	-	-	-

10.5	969,3055	-	969,515	-	22a-Acetoxi-christinina A	Bozicevic, 2017
10.9	1057,3255	747,2171; 565,2302; 327,1083	-	-	-	-
11.3	1053,5448	969,3076; 729,2074; 533,0943; 335,0390	-	-	-	-
11.6	921,4365	659,1235;503,0841; 401,0786	-	-	-	-
12.4	747,2171	-	-	-	-	-
12.9	1197,5604	803; 567; 499	-	-	-	-
13.3	1137,5746	951;643;499	-	-	-	-
14.2	1005,5312	686	-	-	-	-
15.0	1021,5255	875,5022; 717,2025	-	-	3-O-R-L-rhamnopiranosil-(1f2)-[(4-sulfo)-D-glucopiranosil-(1f3)]-D-galactopiranosil-(20R,22R)-16,22:16R,30-diepoxidammar-24-ene-3,20-diol	Maciuk, 2004

15.4	1035,5413	-	-	-	-	-
15.8	1035,5428	297	-	-	-	-
16.3	1035,5423	665,3914; 329,2331	-	-	-	-
16.6	1151,5718	1021,5599; 873,4887	-	-	-	-
16.7	1177,5696	989,4997	-	-	-	-
16.9	1119,5637	975,5435	-	-	-	-
17.2	1045,5256	873,486	-	-	-	-
17.4	1019,5479	-	-	-	-	-
17.5	987,5216	857,4929	-	-	-	-
17.9	1001,5383	-	-	-	-	-
18.0	1043,5502	971,4894; 503,3391	1043	911,749, 310.6	Jujubosideo B	Wu, 2013; Yang, 2013
18.3	485,3295	-	485,3269	-	Ácido 3-hidroxilup-20(29)-eno-27,28-dioico	Simen, 2016
18.5	471,3496	-	-	-	-	-

Ao analisar por CLAE-EM os cromatogramas das alíquotas 01, 02 e 03 (Figura 38) foi possível observar a presença das substâncias 5-allil-1-(2,3,4,-tris-O-benzoilpentofuranosil)-2,4(1H,3H)-pirimidinediona (t_R 5,5 min. e [M-H]- *m/z* 595,1665) e Ploretin-3',5'-di-glucosideo (t_R 8,6 min. e [M-H]- *m/z* 597,1834), porém, em menor concentração. A alíquota 01 foi obtida após o primeiro processo digestivo, a fase oral. Durante esse processo são reproduzidas as condições da boca, na qual a saliva possui a enzima amilase, que digere o amido e polissacarídeos, reduzindo-os a moléculas menores. Essa ação pode ser a responsável pela diminuição da concentração das substâncias mencionadas. A enzima amilase perde sua ação em pH ácido, logo sua ação é inibida após novo condicionamento para o segundo processo de incubação (Pinacho et al., 2015; Desrosiers & Weathers, 2016).

Figura 38. Cromatogramas obtidos por CLAE-EM das alíquotas 01, 02 e 03 da simulação digestiva Método 01.



Para a segunda alíquota, os parâmetros foram ajustados para a simulação do sistema gástrico. O suco gástrico é constituído principalmente de ácido clorídrico, o que mantém o seu pH em 2,5. Esse pH favorece a ação da enzima pepsina, que quebra as ligações químicas entre aminoácidos e proteínas (Pinacho et al., 2015; Desrosiers & Weathers, 2016). Essas quebras de ligações justificam as mudanças observadas no perfil cromatográfico da alíquota 02, onde há um aumento da intensidade dos picos com t_R 17,0 e 18,2 minutos. O sinal com tempo de retenção em 17,0 minutos possui íon molecular [M-H]- *m/z* 1119,5630 e fragmentações com *m/z* 1073,927 característico da perda de uma unidade de deoxihexose, *m/z* 911 perda de hexose e *m/z* 749 características da substância Jujubosideo I (Simen et al., 2016; Pu, et al., 2017). O sinal com tempo de retenção em 18,2 minutos possui íon molecular [M-H]- *m/z* 1171,5266 e fragmentações com *m/z* 1065 e 909 (Simen et al., 2016; Pu, et al., 2017).

Para a análise cromatográfica da alíquota 03 foram condicionados parâmetros do intestino delgado. No intestino delgado ocorre a maior parte da digestão e absorção dos nutrientes, isso é ocasionado devido as mudanças no pH e a adição de sais biliares, o que permite a quebra de lipídeos em digestão para a formação de micelas, facilitando a absorção pelo intestino (Pinacho et al., 2015; Desrosiers & Weathers, 2016). Na alíquota 03 os sinais com tempo de retenção entre 15 e 19 minutos apresentam maior intensidade, e a diminuição do pico com tempo de retenção em 8,6 minutos o que pode ser justificado pelas mudanças nas condições de incubação.

Essas mudanças nos perfis cromatográficos ocorrem devido ao processo enzimático da simulação digestiva, que provoca uma alteração no perfil químico das substâncias. Essa análise da simulação digestiva proporciona um melhor entendimento do processo enzimático que ocorre durante a ingestão, fornecendo informações sobre o

funcionamento do Chá de *A. amazonicus* como uma alternativa eficaz e acessível para a prevenção da malária.

Alpinia zerumbet

Alpinia zerumbet é uma espécie da família Zingiberaceae muito utilizada pela população por apresentar propriedades medicinais. Para essa espécie são descritas diferentes ações farmacológicas, como o uso no tratamento de reumatismo, doenças gastrointestinais, efeito diurético, sedativo e hipertensivo (Abubakar et al. 2018; Da Cruz et al. 2020; Kawai et al. 2020).

As flores, folhas e rizomas da espécie *A. zerumbet* tem características aromáticas e são amplamente utilizadas devido aos seus óleos essenciais (Kawai et al. 2020). Os óleos essenciais de *A. zerumbet* possuem atividade antioxidante e são utilizados nas indústrias alimentícia e cosmética, como aromatizantes ou para o controle de fungos e bactérias, além de relatos populares no auxilio do controle e regulação da pressão arterial (Abubakar et al. 2018; Da Cruz et al. 2020; Kawai et al. 2020). A composição química do óleo essencial obtido das folhas de *A. zerumbet* mostrou uma variedade de constituintes terpenoides, como terpinen-4-ol e 1,8-cineol, que apresentam atividade vasorelaxante, efeito hipotensivo, ansiolítico e sedativo (Cruz et al. 2020). Suas folhas são vendidas para a produção de chás, como infusão para o tratamento de hipertensão arterial e sintomas de ansiedade (Cruz et al. 2020). Nos extratos de *A. zerumbet* são identificados compostos fenólicos, flavonoides e kavalactonas (Abubakar et al. 2018; Cruz et al. 2020; Kawai et al. 2020).

Headspace em microextração de fase sólida – HS-SPME

A identificação dos constituintes voláteis presentes nas folhas frescas e secas de *A. zerumbet* coletadas no Rio de Janeiro e Brasília foi feita a partir da comparação dos espectros de massas da biblioteca do equipamento e dos dados da literatura (Adams, 2007). As substâncias identificadas são apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14. Identificação dos compostos das folhas de *Alpinia zerumbet* por *Headspace* em microextração de fase sólida.

T_R (min.)	Compostos	% Composição			
		FFDF	FSDF	FFRJ	FSRJ
7,015	Hexanal	2,38		5,0	
9,2	7-Hidroxihepteno-1	3,6		4,66	
12,375	α-tujeno	1,9	1,38	1,1	
12,63	α-pineno	0,94	0,71	0,68	0,23
14,419	Sabineno	10,02	9,25		
14,504	β-pineno	7,21		1,52	0,97
15,152	1,6-Octadieno		0,6	0,35	
15,179	β-mirceno	0,85			
15,668	α-pineno		0,39		
15,698	Felandreno	0,29		0,18	
16,214	α-terpineno	2,36	3,1	0,6	0,35
16,573	p-cimeno	6,14	3,59	10,86	2,83
16,706	Dl-limoneno				5,84
16,958	1,8-cineole	15,91	17,76	17,92	12,77
18,023	γ-terpineno	6,30	6,31	6,36	1,91
18,341	*Trans*-sabineno	2,9	3,07	0,08	0,63
19,179	α-terpinoleno	1,89	2,02	0,85	
19,599	*Trans*-sabineno	4,64	3,08		
19,645	Linalool		2,75	1,19	5,11
20,653	Ciclo octanona	0,2		0,24	
21,388	Camfora	0,18	0,84	0,13	1,95

21,702	Citronela		0,40		2,93
22,822	1,4-terpineol	11,77	10,8	15,37	12,95
23,193	α-terpineol	1,0	1,46	1,35	2,14
26,040	Citral		0,22		1,33
26,841	Fenol	0,10	0,43		2,41
27,361	Ascaridola	0,68	0,61	1,59	0,80
28,773	Acetato de alfa terpinenil		0,31		1,83
31,226	*Trans*-cariofileno	4,33	4,66	1,80	4,46
31,627	α-bergamoteno	0,65	0,6	0,21	0,51
31,752	α-guaieno	0,17		0,05	
32,283	α-humuleno	1,08	1,21	0,37	1,02
33,3	β-selineno	0,68	0,55	0,25	0,51
33,879	β-bisaboleno	0,49	0,53	0,22	0,39
34,410	γ-gurjuneno	1,27	1,23		0,30
35,491	Nerolidol	0,4	0,91	0,54	0,52
36,293	Óxido de cariofileno	1,77	3,09	2,84	3,01
Total		92,1	81,9	76,3	67,7

Os aromas são misturas complexas de componentes voláteis, nos quais estão presentes várias classes de substâncias como ésteres, aldeídos, cetonas, álcoois e outros. O aroma dos compostos naturais pode ser obtido por meio da extração de folhas, flores, caules e frutos das plantas (Valduga, et al, 2010). De maneira a aperfeiçoar o processo de identificação dos componentes voláteis das espécies vegetais.

As espécies coletadas no Distrito Federal e no Rio de Janeiro apresentam perfis semelhantes, porém com algumas particularidades. Foi observada a presença dos monoterpenos sabineno e *trans*-sabineno apenas nas folhas frescas (Figura 39) e secas (Figura 40) coletadas em Brasília. O monoterpeno sabineno estava presente nas folhas frescas e secas de *A. zerumbet* na composição de 10,02% e 9,25%, respectivamente, e o *trans*-sabineno em 4,64% e 3,08%, respectivamente.

Figura 39. Cromatograma dos constituintes voláteis obtidos das folhas frescas de *Alpinia zerumbet* coletadas em Brasília por *Headspace* em microextração de fase sólida.

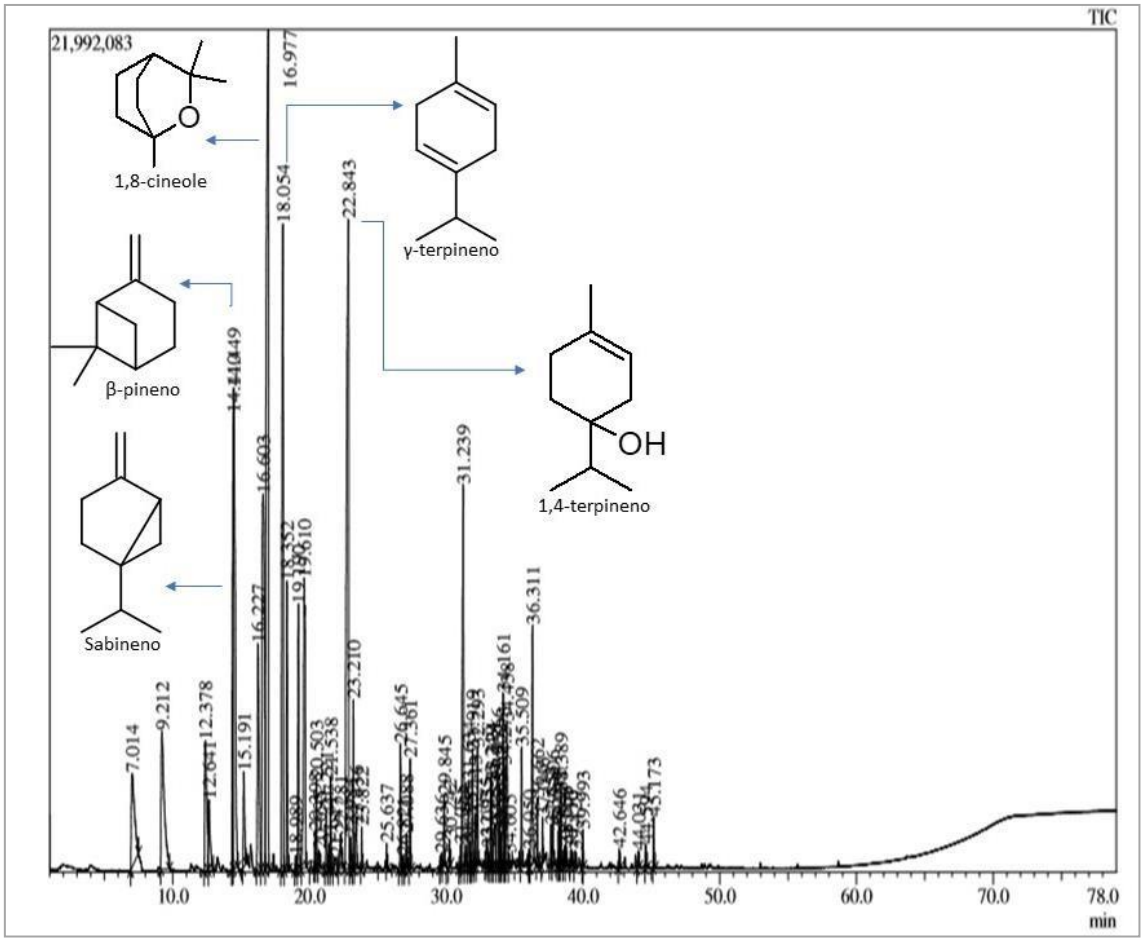
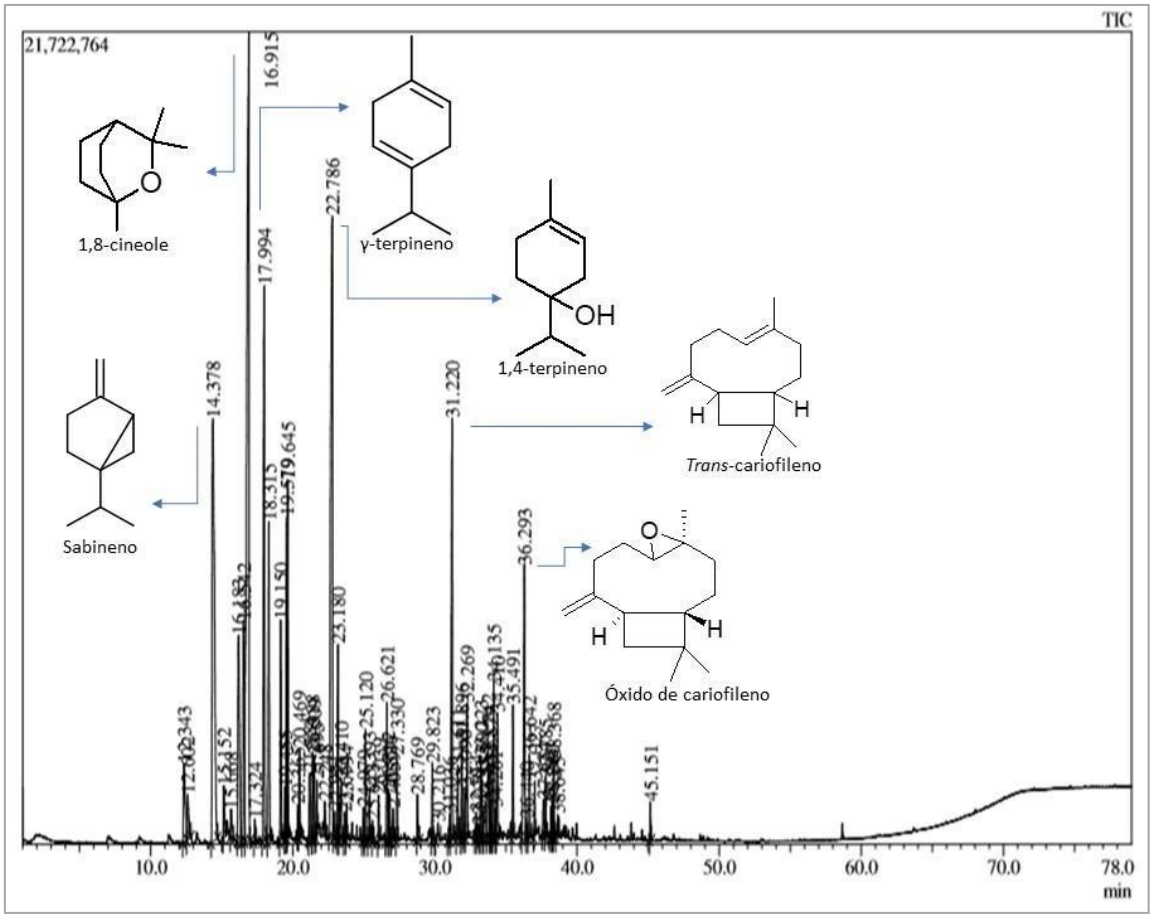


Figura 40. Cromatograma dos constituintes voláteis obtidos das folhas secas de *Alpinia zerumbet* coletadas em Brasília por *Headspace* em microextração de fase sólida.



Estudo demonstram que o sabineno possui propriedades antiinflamtórias, antifúngica, antimicrobiana, antioxidante e antibacteriana, podendo a sua presença na composição da espécie vegetal estar associada a possíveis ataques de predadores naturais da espécie, ou ainda a ação de fungos ou bactérias (Cao et al. 2017; Kuraya et al. 2017; Ghareeb et al. 2018; Cruz et al, 2020; Souissi et al. 2020). O monoterpeno *p*- cimeno foi uma das substâncias presentes em todas as amostras das folhas de *A. zerumbet* analisadas, incluindo os diferentes locais de coleta. O *p*-cimeno foi uma das substâncias majoritárias na composição dos aromas da espécie com porcentagem de 6,14% e 3,59% para as folhas frescas e secas coletadas no Distrito Federal, respectivamente.

Para a espécie coletada no Rio de Janeiro o *p*-cimeno representa 10,86%, nas folhas frescas (Figura 41) e 2,83% nas folhas secas (Figura 42). As substâncias presentes nos constituintes voláteis que podem estar mais associadas às propriedades farmacológicas da espécie vegetal são os terpenos 1,8 cineole e 1,4-terpineol, que estão presentes em altas concentrações em todas as amostras analisadas, e possuem propriedades antimicrobiana e antifúngicas relatadas (Kuraya et al. 2017; Ghareeb et al. 2018; Cruz et al, 2020).

Figura 41. Cromatograma dos constituintes voláteis obtidos das folhas frescas de *Alpinia zerumbet* coletadas no Rio de Janeiro por *Headspace* em microextração de fase sólida.

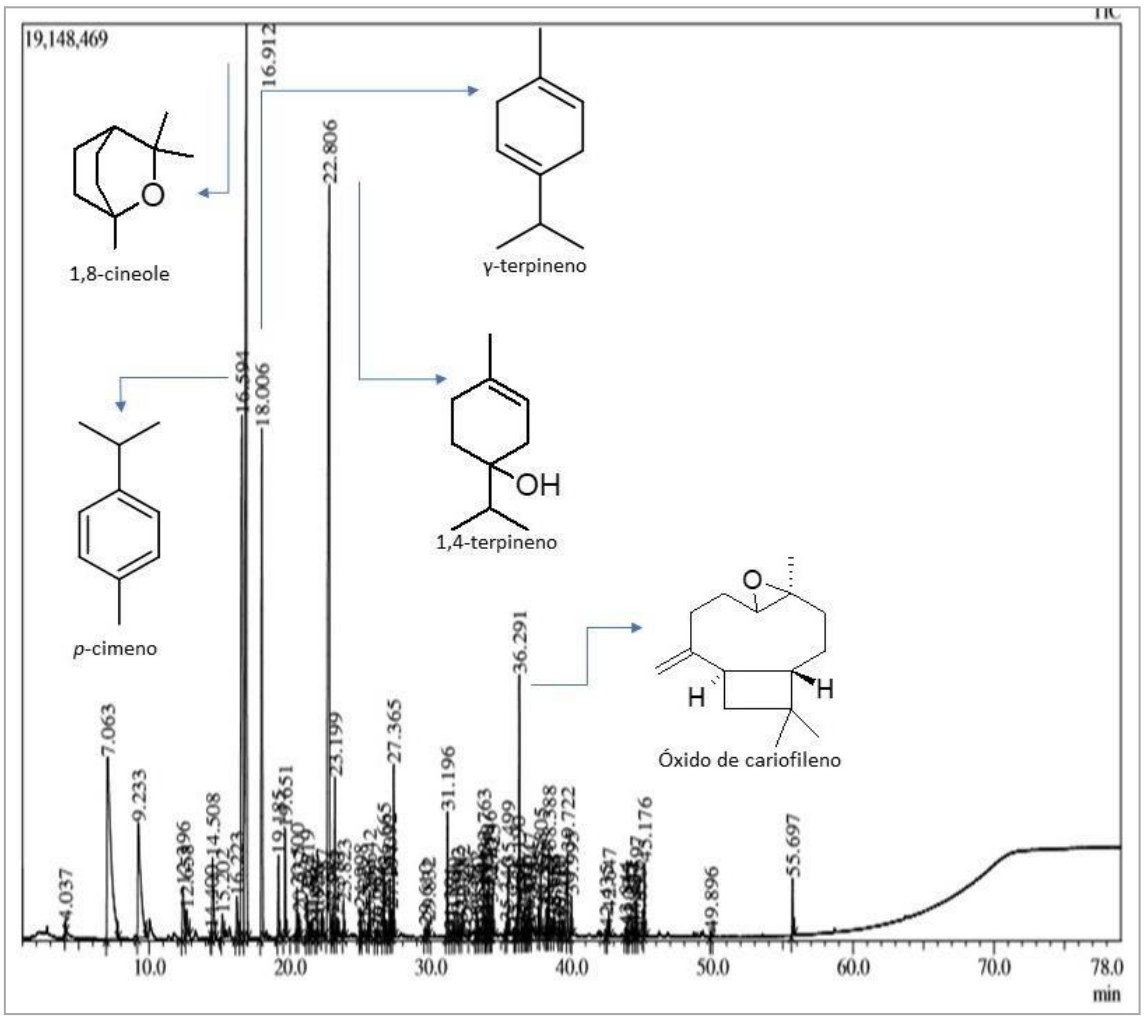
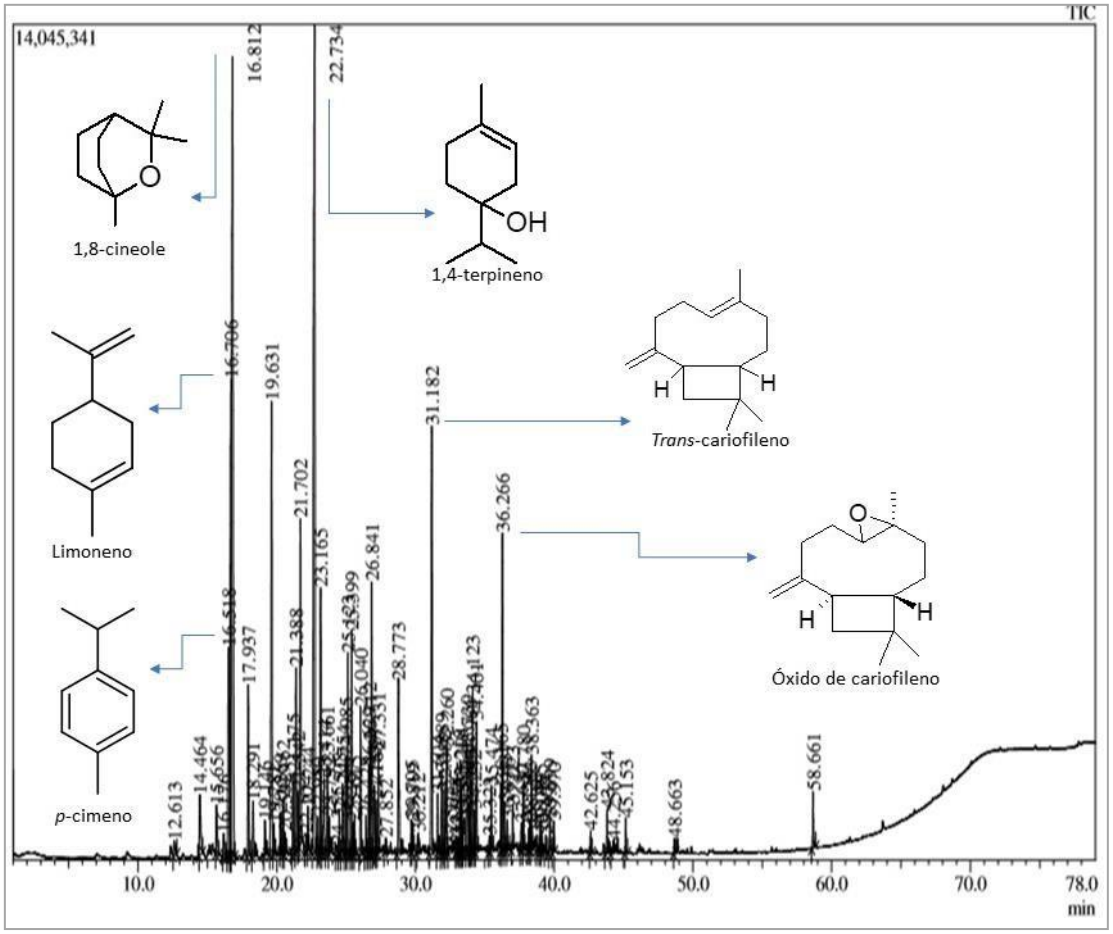


Figura 42. Cromatograma dos constituintes voláteis obtidos das folhas secas de *Alpinia zerumbet* coletadas no Rio de Janeiro por *Headspace* em microextração de fase sólida.



CAPÍTULO III

Bioensaios frente às larvas e adultos de *Aedes aegypti*

INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) indicou que doenças transmitidas por vetores, como a dengue, febre amarela, malária, esquistossomose, leishmaniose e doença de Chagas, representam mais de 17% das doenças infecciosas no mundo, causando mais de 700 mil mortes por ano (Ministério da Saúde, 2018). A dengue nas Américas atingiu o maior número de casos já registrado, com mais de 2,7 milhões de casos, incluindo 22.127 casos graves e 1.206 mortes notificadas até o final de outubro de 2019, conforme nova atualização epidemiológica da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS, 2019).

Os principais vetores das arboviroses pertencem ao gênero *Aedes*, onde podemos destacar as espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (López-Latorre & Neira, 2016; Dias et al., 2018; Giatropoulos et al., 2018). Nas regiões tropicais e subtropicais o principal vetor das arboviroses tem sido o *Aedes aegypti*, pois se encontra nos cinco continentes, tendo maior representação nos continentes africano, asiático e americano (López-Latorre & Neira, 2016; Kraemer, et al. 2019). No Brasil, o *A. aegypti* está presente nos 26 Estados e no Distrito Federal (OMS, 2018). As principais doenças transmitidas por esse mosquito são Febre Amarela, Dengue, Chikungunya e Zika (Londono-Renteria et al., 2016; López-Latorre & Neira, 2016; Kraemer, et al. 2019).

Para o controle desse vetor são utilizadas medidas para eliminar seus focos de criação, através de drenagem e instalação de telas em portas e janelas, controle químico, controle biológico, ou ainda, agentes patógenos como fungos e bactérias (Weeratunga et al., 2017). O controle químico é uma das metodologias mais adotadas para o controle de vetores em Saúde Pública. O primeiro inseticida de efeito prolongado, ou propriedade residual, foi o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT). Os outros compostos pertencem, principalmente, aos grupos dos organofosforados, carbamatos ou piretróides. Todos

esses grupos atuam sobre o sistema nervoso central dos insetos e têm sido usados nos programas de controle de doenças transmitidas por vetores (Weeratunga et al., 2017).

Um método alternativo para o controle desses vetores é o uso de plantas como inseticidas naturais, minimizando os efeitos colaterais provocados pelos inseticidas químicos, como a contaminação de solos e rios, danos aos trabalhadores, como intoxicação ou inflamações na pele, e podendo ser efetivos desde a fase larval do mosquito (Cheng et al 2009; Zu et al., 2010; Deb et al., 2011; Jayakumar et al 2012; Elshafie et al., 2017; Elshafie & Camele 2017; Weeratunga et al., 2017; Fikry et al., 2019; Sheng et al 2020). Dias & Moraes (2014) descrevem vários estudos envolvendo a atividade de extratos de plantas para o controle de *Ae. aegypti*, como espécies pertencentes as famílias Annonaceae, Apocynaceae, Asteraceae, Myrtaceae, Pinacea, Piperaceae, Poaceae, Rutaceae, and Zingiberaceae, entre outras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os óleos essenciais das seis espécies vegetais foram testados contra as larvas e adultos de *Ae. aegypti*, no Laboratório de Malária e Dengue, no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, sobre orientação do professor Dr. Wanderli Pedro Tadei e com o auxílio do doutorando Leandro Pereira França.

Teste Larvicida

Os valores obtidos para CL_{50} e CL_{90} dos óleos essenciais após 24 e 48 horas de aplicação estão na Tabela 15. Todos os óleos essenciais testados foram considerados altamente ativos, de acordo com parâmentros da literatura, pois apresentaram concentrações de CL_{50} abaixo de 50 µg/mL para 24 e 48 horas (Cheng, et. al. 2003;

Dias & Moraes, 2013). Não houve mortalidade para os controles negativos (DMSO e H_2O).

Tabela 15. Valores das CL_{50} e CL_{90} dos óleos essenciais contra larvas de *Aedes aegypti*.

Espécies Vegetais	**24 h**				**48 h**			
	CL_{50} (µg/mL) (95% LC)†	**CL_{90} (µg/mL) (95% LC)†**	**Slope**	***X²***	**CL_{50} (µg/mL) (95% LC)†**	**CL_{90} (µg/mL) (95% LC)†**	**Slope**	***X²***
Blepharocalyx sp.	38,9 (36,6 – 41,4)	53,2 (48,6 – 62,5)	9,397	81,521	36,1 (32,5 – 39,4)	46,5 (42,0 – 58,2)	11,639	217,68
Bocageopsis sp.	40,8 (35,1 – 51,3)	71,5 (55,4 – 127,0)	5,260	150,81	39,4 (34,3 – 47,8)	68,7 (54,4 – 111,6)	5,307	133,20
Endlicheria sp.	43,0 (41,1 – 45,4)	52,8 (49,3 – 59,7)	14,4	86,9	42,9 (40,6 – 46,0)	54,7 (50,0 – 64,7)	12,145	105,5
Origanum vulgare	37.5 (34.7 – 40.3)	47.4 (43.5 – 56.1)	12.685	241.84	37.1 (35.3 – 38.9)	47.6 (44.6 – 52.6)	11.901	105.49
Virola sp.	36,6 (34,0 – 39,4)	52,8 (47,6 – 62,1)	8,040	83,719	36,3 (33,1 – 39,2)	52,3 (47,1 – 61,7)	8,052	87,317
Thymus vulgaris	38.9 (38.4 – 39.5)	46.5 (45.5 – 47.7)	16.692	16.266	37.7 (33.6 – 41.7)	46.5 (41.9 – 62.2)	14.178	455.18

† Limites de confiança de 95%.

A Concentração Letal Mediana (CL_{50}) obtida qualifica os óleos essenciais como agentes larvicidas em potencial, pois, segundo Cheng (2003), consideram-se bons agentes larvicidas as substâncias com valor de CL_{50} menor que 100 μg/ mL, e substâncias de alta atividade aquelas com CL_{50} menor que 50 μg/mL (Cheng, et. al. 2003; Dias & Moraes, 2013; Gomes et al. 2016). Todos os óleos essenciais testados apresentam valores de concentração letal <50 μg/mL, mostrando-se promissores para a ação larvicida.

O óleo essencial da espécie *Virola* sp. destaca-se por apresentar os menores valores de CL_{50} 36,6 μg/mL e 36,3 μg/mL, para 24 e 48 horas, respectivamente. Atividade essa que pode estar associada a composição química do óleo essencial dessa espécie. Substâncias como β- selineno e *trans*-cariofileno, presentes em alta concentrações nos óleos de *Virola* sp. (40,7% e 17,84%, respectivamente) já possuem atividades relatadas contra as larvas de *Ae. aegypti* e outros insetos do gênero (Huang et al., 2020; Mesquita et al., 2020; Nunomura et al., 2020). O sesquiterpeno β-selineno possui relato de CL_{50} 136,03 μg/mL e 151,74 μg/mL contra as larvas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, respectivamente (Huang et al., 2020). Mesquita et al., (2020) relatam valores de CL_{50} para algumas espécies do gênero *Virola*; *V. calophylla* (CL_{50} 179,6 μg/mL), *V. multinervia* (CL_{50} 200,5 μg/mL) e *V. pavonis* (CL_{50} 185,1 μg/mL) e para fração rica em β- selineno valores acima de 350 μg/mL, baixa ação larvicida quando comparado com relatos da literatura para o sesquiterpeno isolado. Essa baixa atividade pode indicar uma ação sinérgica provocada pelos outros constituintes do óleo essencial.

As espécies vegetais *O. vulgare* e *T. vulgaris* mostraram atividade com valores de CL_{50} 37,5 μg/ mL e 38,9 μg/ mL, respectivamente, para o intervalo de 24 horas. Alguns estudos das espécies do gênero *Origanum* apresentam alta atividade contra as larvas de *Ae. albopictus* (Giatropoulos et al., 2018) e seus principais componentes, carvacrol e 4-terpineol apresentam atividade contra as larvas dos vetores da malária, *Anopheles stephensi* e *Anopheles subpictus*, o carvacrol com CL_{50} 21,15 e 24,06 μg/mL e o 4-terpineol com CL_{50} 43,27 e 47,73 μg/mL,

respectivamente (Govindarajan et al., 2016; Giatropoulos et al., 2018). O óleo essencial de *T. vulgaris* apresenta alta atividade contra as larvas de *Ae. aegypti* com uma concentração letal média de 38,90 µg/mL. Quando testado contras larvas de *Ae. albopictus* o óleo essencial de *T. vulgaris* apresenta CL_{50} de 31,60 µg/mL, sendo thymol o seu principal constituinte químico (Sheng et al 2020). Estudos mostram efeito tóxico significativo do timol contra as larvas de *Ae. albopictus*, com CL_{50} de 24,83 µg/mL (Govindarajan et al., 2016; Sheng et al 2020). O *p*- cimeno presente no óleo de *T. vulgaris* também apresenta alta atividade contra as larvas de *Ae. albopictus*, com uma CL_{50} 46,70 µg/mL (Cheng et al., 2009; Sheng et al., 2020).

O óleo essencial de *Bocageopsis* sp. apresentou baixos valores para as concentrações letais para 24 e 48 horas, com CL_{50} de 40,8 µg/ mL e 39,4 µg/ mL, respectivamente. Essa atividade pode ser associada a composição química de seus óleos. Os constituintes em maior concentração foram β-selineno (8,6%), α-selineno (9,8%) e β-elemeno (28,0%), onde o último possui atividade relatada contra as larvas de *Ae. albopictus* (Govindarajan et al. 2016).

A concentração letal mediana encontrada para os óleos da espécie *Endlicheria* sp. foram CL_{90} de 43,0 µg/ mL e 45,9 µg/ mL, no período de 24 e 48 horas, respectivamente. Como observado na composição química do óleo essencial dessa espécie, o felandreno foi identificado como componente principal, sendo 27,37% da composição do óleo, seguidos do *trans*-cariofileno (9,76%) e β-chamigreno (9,76%). Essas substâncias podem estar associadas aação larvicida do óleo essencial dessa espécie, uma vez que, algumas delas já possuem atividade contra as larvas de *Ae. aegypti* relatadas na literatura (Dias & Moraes, 2013).

As concentrações letais dos óleos essenciais das espécies *Blepharocalyx* sp. (38,5 µg/mL), *Bocageopsis* sp. (34,3 µg/mL), *Endlicheria* sp. (39,3 µg/mL) e *Virola* sp. (36,6 µg/mL) são relatadas de maneira inédita para o controle de larvas de *Ae. aegypti*. Podemos sugerir que as substâncias que compõem os óleos testados desempenham um papel fundamental na toxicidade observada frente as larvas de *Ae. aegypti*.

Os ensaios larvicidas realizados para os extratos de *A. zerumbet* não indicaram a ação larvicida contra as larvas do mosquito *Ae. aegypti*. Todos os extratos testados apresentaram valores de CL_{50} > 500 ug/mL, sendo considerados inativos.

Teste Adulticida

Os óleos essenciais extraídos das seis espécies vegetais foram utilizados para a avaliação da atividade adulticida frente as fêmeas adultas de *Ae. aegypti* de acordo com as diretrizes do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (2012) (CDC, Centers for Disease Control and Prevention). Após 90 minutos de exposição, foi possível o cálculo da concentraçãoletal mediana apresentada na Tabela 16.

Tabela 16. Valores das CL_{50} e CL_{90} dos óleos essenciais para a atividade adulticida de *Aedes aegypti*.

Espécies vegetais	**90 min**			
	LC_{50} (µg/mL) (95% CL)†	**LC_{90} (µg/mL) (95% CL)†**	**Slope**	***X²***
Blepharocalyx sp.	15,2 (13,5 – 16,9)	29,8 (25,6 – 37,1)	4,372	16,357
Bocageopsis sp.	12,5 (11,6 – 13,3)	17,1 (15,7 – 19,3)	9,258	5,911
Endlicheria sp.	14,2 (13,2 – 15,3)	20,8 (19,0 – 23,7)	7,730	13,533
Origanum vulgare	13,3 (11,9 – 14,9)	27,4 (23,6 – 33,9)	4,125	21,321
Virola sp.	12,7 (11,3 – 14,0)	22,3 (19,4 – 27,3)	5,243	17,915
Thymus vulgaris	12,8 (11,7 – 13,9)	25,0 (22,2 – 29,3)	4,384	7,070

† Limite de confinça de 95%.

Todos os óleos essenciais testados demonstram-se fortemente ativos contra os adultos de *Ae. aegypti*, visto que apresentam concentrações de letalidade abaixo de 50 µg/mL (Cheng, et. al. 2003; Dias & Moraes, 2013; Gomes et al. 2016).

Destacam-se as espécies *Bocageopsis* sp., *Virola* sp. e *T. vulgaris,* pois apresentam CL_{50} de 12,5 µg/mL, 12,7 µg/mL e 12,8 µg/mL, respectivamente, sendo considerados óleos com alta atividade adulticida, com $CL_{50} < 50$ µg/mL (Cheng, et. al. 2003; Dias & Moraes, 2013; Gomes et al. 2016).

A ação adulticida dos óleos essenciais dessas espécies pode ser atribuída às substâncias majoritárias desses óleos, como o *trans*-cariofileno, β-elemeno, timol, δ-cadineno e felandreno. O terpeno *trans*-cariofileno possui capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase, enzima responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina. Quando essa enzima éinibida, impede a interrupção da propagação de impulsos nervosos, causando um processo de paralisia que pode ocasionar a morte do inseto (Cabrini, 2013). O sesquiterpeno *trans*-cariofileno está presente na composição química de todos os óleos essenciais analisados. Para o óleo de *T. vulgaris* testado essa alta atividade pode estar associada ao composto principal do seu óleo, o timol (40,0%). Estudos apontam efeito tóxico significativo do timol contra as larvas de *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* com CL_{50} 24,83 µg/mL e 58,00 µg/mL, respectivamente (Govindarajan et al., 2016; Sheng et al 2020).

Para as espécies *Blepharocalyx* sp. e *Bocageopsis* sp. não são encontrados na literatura dados que relatem testes adulticidas contra *Ae. aegypti,* o que reforça a importância do estudo da atividade e composição química desses óleos essenciais para o controle vetores.

Os resultados do presente trabalho demonstram o potencial dos óleos essenciais dessas espécies no controle de *Ae. aegypti*, tanto nos estágios de larvas como adultos. A análise da atividade inseticida de óleos essenciais é de extrema importância na descoberta de novas moléculas, e para a produção de produtos alternativos que não causam danos ao ambiente (Bakkali et al., 2008; Dias & Moraes, 2013; Gomes et al. 2016).

Ação Repelente

Os óleos essenciais de *O. vulgare* e *T. vulgaris* apresentam uma taxa de repelência significativa, com valores que variaram de 8,89% a 37,78% para os óleos de *O. vulgare* e 4,44% a 68,89% para os óleos de *T. vulgaris.* Foram testadas as concentrações 0,01%, 0,1%, 0,5%, 1,0%, 2,5% e 5,0% para cada óleo em um intervalo de 30 minutos. Os valores de escapes são baseados no número de fugas dos mosquitos ao longo dos 30 minutos do teste, sendo observada essa ação a cada 1 minuto (Tabela 17) (Govindarajan et al., 2016; Nararak et al., 2019).

Tabela 17. Atividade repelente dos óleos essências de *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris* contra *Aedes aegypti*.

Espécie vegetal	**Concentração (%)**	**N[a]**	**% Escape[†]**
Origanum vulgare	0.01	45	17.8
	0.1	45	35.6
	0.5	45	37.8
	1.0	45	37.8
	2.5	45	26.7
	5.0	45	8.9
Thymus vulgaris	0.01	45	28.9
	0.1	45	66.7
	0.5	45	68.9
	1.0	45	20.0
	2.5	45	6.7
	5.0	45	4.4

DEET	6.7	45	73.3

[a] Número total de insetos; [†] Taxa de escape ajustada com a formula de Abbott.

Os óleos de *O. vulgare* demonstram uma ação repelente moderada com valores entre 8,89% e 37,78% de escape, sendo observada o maior percentual de escape (37,78%) para duas concentrações distintas (0,5% e 1,0%), podendo indicar uma ação de paralisia do mosquito (efeito *Knockdown*) impossibilitando seu escape. As porcentagens de escape para os óleos de *T.vulgaris* são mais elevadas, variando entre 4,44% e 68,89%. As concentrações 0,1% e 0,5% sãoas mais ativas, com porcentagem de escape de 66,67% e 68,89%, respectivamente.

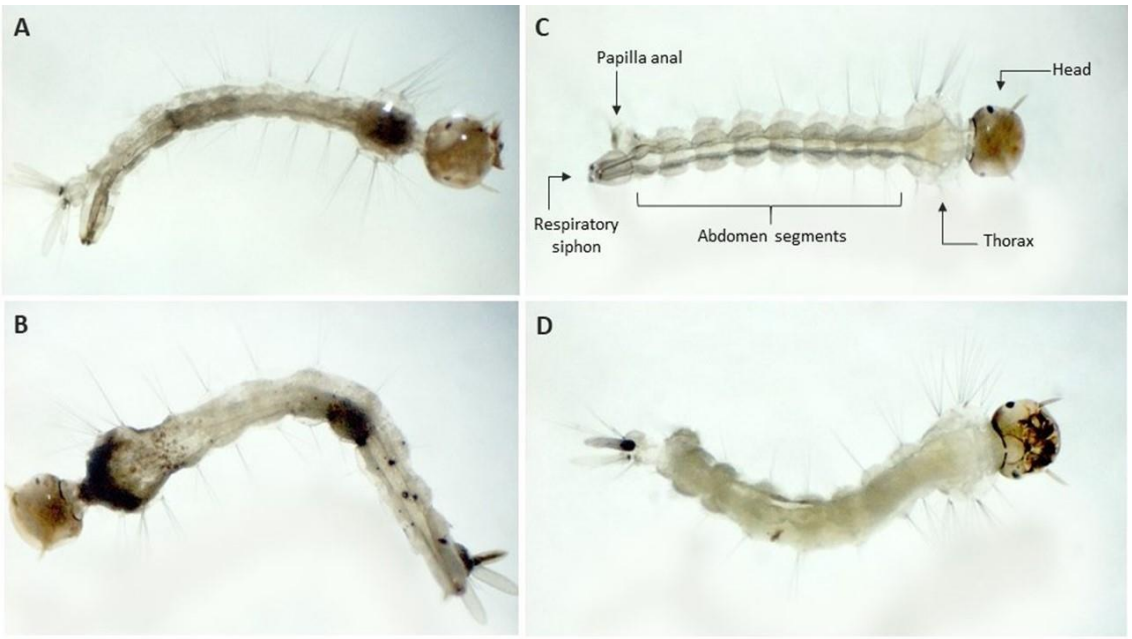
Estudos apontam a ação repelente de terpenos comuns em óleos essenciais, como o óxido de β-cariofileno que apresenta ação repelente com variada porcentagem de escape entre 22% a 59% (Nararak et al., 2019) ou ainda o linalool com uma ação que varia entre 48,13% e 77,5 % de escape para os adultos de *Ae. aegypti* (Estrada et al., 2019). Estudos realizados com timol e carvacrol demonstram alta atividade repelente contra os adultos de *Ae. albopictus,* sendo o carvacrol com excelentes resultados de repelência em baixas concentrações 0,04 mg/cm^2 (Giatropoulos et al., 2018). A ação repelente significativa dos óleos essenciais de *O. vulgare* e *T. vulgaris* pode estar associada a presença do carvacrol e timol na composição de seus óleos em altas concentrações, visto que, compostos oxigenados desempenham papel significativo na ação repelente dos terpenos contra mosquitos (Costa et al., 2017).

Estudo morfológico

A morfologia das larvas de *Ae. aegypti* foi observada após 24 horas de exposição aos óleos essenciais de *O. vulgare* e *T. vulgaris* para CL_{90} (46,6 e 46,5 µg/mL, respectivamente). Este procedimento, foi executado seguindo metodologia aplicada nos ensaios larvicidas, conforme OMS (2005). O estudo estereomicroscópio das larvas demonstrou alterações fisiológicas após o tratamento com ambos os óleos e com temefos, controle positivo e controle negativo (Figura

43). As larvas tratadas com os óleos de *O. vulgare* (Figura 43A) e *T. vulgaris* (Figura 43B), evidenciaram alterações morfológicas, com o escurecimento da região do tórax e de alguns segmentos abdominais (Figura 43A e 43B). Nessa região, ambas as larvas testadas com os óleos apresentam uma curva no abdômen, contudo, a tratada com *T. vulgaris* apresentou um encurtamento mais pronunciada do abdômen em relação àquela tratada com *O. vulgare*. Contrário ao observado para as larvas tratadas com os óleos essenciais, as larvas- controle testadas com a solução de DMSO 1,0%, apresentam um aspecto alongado e uniforme, com sifão respiratório curto e tubular e com grande número de cerdas bem definidas nasuperfície do corpo, mostrando a fisiologia bem delimitada e sem alterações visíveis (Figura 43C) (Borges et al., 2004). As larvas tratadas com o controle temephos (Figura 43D) demonstraram uma desregulação no abdômen, coloração esbranquiçada no tubo digestivo, comportamento compatível com o descrito na literatura para o organofosoforado (Arruda et al., 2003; Borges et al., 2004; Vasantha-Srinivasan et al., 2017; Chantawee et al., 2018). Esse escurecimento pode ser resultado de danos às células epiteliais ou alterações da matriz peritrófica das larvas, e a ausência de epitélio subjacente nas larvas sujeitas ao tratamento como óleo essencial, o que pode indicar que a atividade larvicida dos óleos provavelmente foi devida a danos na célula do intestino de *Ae. Aegypti* (Arruda et al., 2003; Borges et al., 2004; Vasantha-Srinivasan et al., 2017; Chantawee et al., 2018).

Figura 43. Fotomicrografia das larvas de *Aedes aegypti* tratada com o óleo de *Origanum vulgare* (A), *Thymus vulgaris* (B), DMSO 1,0% (C) e Temefós (D). As imagens foram obtidas em aumento de 50x em microscópio estereoscópio, modelo binocular, Stemi 508 (fabricante Carl Zeiss).



Fonte: Oliveira, A. A, 2020.

Os óleos essenciais são compostos por várias substâncias que podem ter ações diferenciadas contra as larvas, como inundação física do sistema traqueal, toxicidade química, interferência nas forças da superfície ou ações combinadas, podendo pormover diferentes modos de ação para o controle do vetor *Ae. aegypti*. O estudo estereomicroscópio mostra que as concentrações testadas dos óleos de *O. vulgare* e *T. vulgaris* provocaram danos na fisiologia das larvas e o controle temefós exibiu danos diferenciados no segmento intestinal, conforme relatado por Vasantha-Srinivasan et al., (2017).

Os resultados do presente trabalho demonstram o potencial dos óleos essenciais dessas espécies no controle de *A. aegypti*, tanto nos estágios de larvas como adultos. A análise da atividade inseticida de óleos essenciais é de extrema importância na descoberta de novas moléculas, e para a produção de produtos alternativos para o controle de pragas e insetos, e que não causam danos ao ambiente (Bakkali et al., 2008; Dias & Moraes, 2013).

CONCLUSÃO

4. CONCLUSÃO

As espécies desse projeto obtidas no estado do Amazonas, *Ampelozizyphus amazonicus*, *Alpinia zerumbet*, *Blepharocalyx* sp., *Endlicheria* sp., *Virola* sp., *Bocageopsis* sp., *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris*, podem ser encontradas na Amazônia e em outras regiões do Brasil. Possuem ampla utilização na medicina popular e apresentam diversas classes de metabólitos secundários na constituição química de suas partes vegetativas.

O estudo cromatográfico do chá da espécie *A. amazonicus* possibilitou a identificação das saponinas jujubosideo H, jujubosideo J, 3-O-R-L-rhamnopiranosil-(1f2)-[(4-sulfo)-α-D-glucopiranosil-(1β)]-α-D-galactopiranosil-(20R,22R)-16α,22:16R,30diepoxidammar-24-ene-3α,20-diol e jujubosideo B, classe de metabólitos muito comum em espécies do gênero.

Os valores obtidos para a atividade antioxidante dos extratos de *A. amazonicus* foram relativamente baixos, indicando pouca atividade, sugerindo baixa capacidade de sequestro do radical pelas substâncias presentes no extrato. Os extratos com os melhores valores de atividade antioxidantes foram EMGF e o EMGG, com CS_{50} 119,06 ± 0,62 μg/mL e 125,03 ± 0,68 μg/mL, respectivamente. Para o teste com *Artemia salina*, os extratos CGGM1 e CGGM2 com as concentrações de 125,8 e 198,0 μg/mL, respectivamente, foram considerados moderadamente ativos. A simulação digestiva *in vitro* realizada com os Chás de *A. amazonicus* permitiram um melhor entendimento das possíveis reações enzimáticas ocorridas no tratogastrointestinal após ingestão do chá. Esse estudo permitiu a observação de alterações na composição química do chá de *A. amazonicus*, podendo a essas ser associada a ação farmacológica dessa espécie, o que indica a necessidade da continuidade de estudos relacionados a espécie.

As análises dos voláteis da espécie *A. zerumbet* obtidos através da técnica de *Headspace* indicaram os terpenos 1,8-cineol e 1,4-terpineol como substâncias majoritárias para todas as

amostras analisadas (IFFRJ, IFSRJ, IFFDF e IFSDF), como valores acima de 10% da composição dos voláteis.

Para as espécies *Blepharocalyx* sp., *Endlicheria* sp., *Virola* sp., *Bocageopsis* sp., *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris,* foi observado que todos os óleos essenciais das folhas mostraram toxicidade para as larvas de *Ae*. *aegypti*. No entanto, o óleo essencial da espécie *Virola* sp. demonstrou maior eficácia para o controle de larvas desse mosquito, pois apresenta omenor valor de concentração letal mediana para 24 horas, CL_{50} 36,6 μg/mL.

Nos testes com os mosquitos adultos de *Ae*. *aegypti* os óleos das espécies *Bocageopsis* sp. e *Virola* sp. apresentam satisfatória ação adulticida, com CL_{50} de 12,5 μg/mL e 12,7 μg/mL, rescpetivamente. Todos os óleos testados foram considerados ativos, pois apresentaram CL_{50} < 50 μg/mL.

Compostos orgânicos possuem diferentes componentes bioativos que podem ser utilizados para o controle de larvas e mosquitos. Neste trabalho, tanto os dados experimentais quanto a modelagem teórica, permitem concluir que os óleos essenciais de *O. vulgare* e *T. vulgaris*, com 4-terpineol, carvacrol e timol como principais componentes, possuem potencial larvicida e adulticida para o controle de *Ae. aegypti*.

Novos estudos sobre preparação de produtos repelentes são necessários para recomendar o desenvolvimento de químicos destes óleos essenciais para controle de larvas e mosquitos de insetos hematófagos. Além disso, informações sobre os efeitos desses óleos essenciais no crescimento e reprodução dos insetos são necessários. Os resultados relatados evidenciam o potencial dos óleos essenciais dessas espécies para o controle de larvas e adultos de *Ae*. *aegypti*, o que reforça a importância do estudo da atividade e composição química desses óleos essenciais para o controle de vetores. O trabalho possibilitará o desenvolvimento de bioinseticidas baseados na prospecção fitoquímica, que representa uma alternativa promissora na substituição de inseticidas químicos, para serem utilizados no controle destesvetores no

ambiente amazônico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUBAKAR IB, MALAMI I, YAHAVA Y, SULE SM. A review on the ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology of Alpinia officinarum Hance. Journal of ethnopharmacology. 5;224:45-62, 2018.

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry, 4th Edition, 2007.

AHSAN, F.; RIVAS, I.P.; KHAN, M.A.; TORRES SUAREZ, A.I. Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers - liposomes and microspheres - on the phagocytosis by macrophages. Journal of Controlled Release, Amsterdam, v.79, p.29-40, 2002.

AJAEGBU EE, DANGA SP, CHIJOKE IU, OKOYE FB. Mosquito adulticidal activity of the leaf extracts of *Spondias mombin* L. against *Aedes aegypti* L. and isolation of active principles. Journal of vector borne diseases. 1;53(1):17, 2016.

ALBARRACIN, L.T. Estudio fitoquímico bioguiado de los extractos de corteza de las especies Endlicheria oreocola y Endlicheria arenosa (Lauraceae), en busca de fuentes para el control del hongo fitopatógeno Colletotrichum tamarilloi. Química. 2017.

ALBARRACIN, L.T., DELGADO, W., CUCA, L.E., ÁVILA, M.C. New butyrolactone and other metabolites from the bark of Endlicheria arenosa against of the phytopathogen Colletotrichum tamarilloi. Natural product research. 4;33(5):687-94, 2019.

ALMEIDA, L.S., COTA, A.L., RODRIGUES D.F. Sanitation, Arboviruses, and Environmental Determinants of Disease: impacts on urban health. Ciência & Saúde Coletiva. 28;25:3857-68, 2020.

ALVING, C.R. Design and selection of vaccine adjuvant: animal models and human trials. Vaccine, Amsterdam, v.20, p.S56-S64, 2002.

AMARANTES, C. B.; MULLER, A. H.; POVOA, M. M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). Acta Amazonica, v.41, n.3, p.431-434, 2011.

AMARAL, A.C.F.; FERREIRA, J.L.P.; MOURA, D.F.; CARVALHO, J.R.; OHANA, D.T.; ECHEVARRIA, A.; ROSÁRIO, V.E.; LOPES, D.; SILVA, J.R.A..Updated studies on Ampelozizyphus amazonicus, a medicinal plant used in the Amazonian Region. *Pharmacognosy Reviews*, (2): 308-316, 2008.

ANDRADE, C.A.; CORREIA, S.M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; NASCIMENTO, S.C.; SANTOSMAGALHÃES, N.S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. International Journal Pharmaceutics.,Amsterdam, v.278, p.435-445, 2004.

ANDRADE-NETO VF, BRANDÃO MG, NOGUEIRA F, ROSÁRIO VE, KRETTLI AU. Ampelozyziphus amazonicus Ducke (Rhamnaceae), a medicinal plant used to prevent malaria in the Amazon Region, hampers the development of *Plasmodium berghei* sporozoites. International Journal for Parasitology. 1;38(13):1505-11, 2008.

ASLAM, M. S.; AHMAD, M. S. Worldwide Importance of Medicinal Plants: Current and Historical Perspectives. Recent Advances in Biology and Medicine, v.2, p.88-93, 2016.

ASMARE, Y., HILL, S.R., HOPKINS, R.J. et al. The role of grass volatiles on oviposition site selection by *Anopheles arabiensis* and *Anopheles coluzzii* . Malar J 16, 65, 2017.

AXSON, J. L.; STARK, D. I.; BONDY, A. L.; CAPRACOTTA, S. S.; MAYNARD, A. D.; PHILBERT, M. A.; BERGIN, I. L.; AULT, A. P. Rapid Kinetics of Size and pH-Dependent Dissolution and Aggregation of Silver Nanoparticles in Simulated Gastric Fluid. J Phys Chem C Nanomater Interfaces, v. 119, n.35, p.20632-20641, 2015.

BAEZ C., VILLENA, J., MONTENEGRO, I., RUSSO A, SAID B, MADRID A. Cytotoxic activity of crude extracts and fractions from *Blepharocalyx cruckshanksii* against selected human cancer cell lines. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 1;19(4), 2020.

BAY M, SOUZA DE OLIVEIRA JV, SALES JUNIOR PA, FONSECA MURTA SM, ROGERIO DOS SANTOS A, DOS SANTOS BASTOS I, PUCCINELLI ORLANDI P, TEIXEIRA DE SOUSA JUNIOR P. In vitro trypanocidal and antibacterial activities of essential oils from four species of the family annonaceae. Chemistry & biodiversity. 16(11):e1900359, 2019.

BENELLI G. On a Magical Mystery Tour of Green Insecticide Research: Current Issues and Challenges, 2020.

BENELLI, G., PETRELLI, R., CANALE, A. Arthropod-Borne Disease Control at a Glance: What's New on Drug Development? 2020.

BERENDSEN, HJ, POSTMA JV, VAN GUNSTEREN WF, DiNola AR, HAAK JR. Molecular dynamics with coupling to an external bath. The Journal of chemical physics. 15;81(8):3684-90, 1984.

BHAT V, SHARMA SM, SHETTY V, SHASTRY CS, RAO CV, SHENOY S, SAHA S, BALAJI S. Characterization of herbal antifungal agent, Origanum vulgare against Oral Candida spp. isolated from patients with Candida-associated denture stomatitis: an

in vitro study. Contemporary clinical dentistry. Jun;9(Suppl 1), 2017.

BIANCHINI, N. H. ÓLEO ESSENCIAL DE *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg.: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA. Salão Internacional de Ensino e Extensão, 2018.

BOYOM, F. F.; NGOUANA, V.; KEMGNE, E. A. M.; ZOLLO, P. H. A.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J. Antiplasmodial volatile extracts from *Cleistopholis patens* Engler & Diels and *Uvariastrum pierreanum* Engl. (Engl. & Diels) (Annonaceae) growing in Cameroon. Parasitol Research, v.108, n. 5, p.1211–1217, 2011.

BÔA IS, PORTO ML, PEREIRA AC, RAMOS JP, SCHERER R, OLIVEIRA JP, NOGUEIRA BV, MEYRELLES SS, VASQUEZ EC, ENDRINGER DC, PEREIRA TM. Resin from *Virola oleifera* protects against radiocontrast-induced nephropathy in mice. PloS one. 16;10(12):e0144329, 2015.

Boletim Epidemiológico 48, Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde, vol.51, Dez 2020.

BORGES, A. M.; PEREIRA, J.; CARDOSO, M. G.; ALVES, J. A.; LUCENA, E. M. P. Determinação de óleos essenciais de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.). Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.14, n.4, p.656-665, 2012.

BRANDÃO, M.G.L. Estudo Químico das raízes do *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke planta utilizada popularmente na Amazônia como preventivo da malária. Tese de Doutorado, Belo Horizonte, Minas Gerais - Brasil UFMG-ICEx/DQ.00223 T.00047, 1991.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol. Serv. Saúde*, v.16, n.4, p.279-293, 2007.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. Advencede drud delivery reviews. Arlington, v.54, p.631-651, 2002.

BUSSI G, DONADIO D, PARRINELLO M. Canonical sampling through velocity rescaling. The Journal of chemical physics. 7;126(1):014101, 2007.

CARCABOSO, A.M.; HERNANDEZ, R.M.; IGARTUA, M.; GASCON, A.R.; ROSAS, J.E.; PATARROYO, M.E.; PEDRAZ, J.L. Immune response after oral administration of the encapsulated malaria synthetic peptide SPf66. International Journal Pharmaceutics, Amsterdam, v.260, p.273- 282, 2003.

DO CARMO DF, AMARAL AC, MACHADO M, LOPES D, ECHEVARRIA A, ROSÁRIO VE, SILVA JR. Evaluation of Antiplasmodial activity of extracts and constituents from *Ampelozizyphus amazonicus*. Pharmacognosy magazine.11(Suppl 2):S244, 2015.

CARY, D. C.; PATERLIN, B. M. Natural Products and HIV/AIDS, AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, v. 34, n.1, 2018.

DE LA CRUZ CHACON I, MORENO MC, CAZARES LM, ESQUINCA AR. La família Annonaceae Juss. Lacandonia. 6;10(2):73-85, 2016.

CHOUIN-CARNEIRO, T.; VEJA-RUA, A.; VAZEILLE, M.; YEBAKIMA, A.;GIROD, R.; GOINDIN, D.; DUPON-ROUZEYROL, M.; OLIVEIRA, R. L.; FAILLOUX, A. B. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. PLOS Neglected Tropical Diseases, 2016.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013. http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/ (accessed 20 august 2013).

CHATELAIN E., LOSET JR. Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDi model. Drug Design Development and Therapy, 16(5) 175-181, 2011.

CHEN M., WANG S., TAN M., WANG Y. Applications of nanoparticles in herbal medicine: zedoary turmeric oil and its active compound β-elemene. The American Journal of Chinese Medicine, 39(6) 1093-1102, 2011.

CHENG, S.; CHANG, H.; CHANG, S.; TSAI, K.; CHEN, W. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. Bioresource Technology, v.89, p.99-102, 2003.

CHENG SS, HUANG CG, CHEN YJ, YU JJ, CHEN WJ, CHANG ST. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. Bioresource technology. Jan 1;100(1):452-6, 2009.

COLOMBA C., SAPORITO L., VITALE F., REALE S., VITALE G., CASUCCIO A., TOLOMEO M., MARANTO D., RUBINO R., DI CARLO P., TITONE L.. Cryptic *Leishmania infantum* infection in Italian HIV infected patients. BMC Infectious Diseases 9(199), 2009. Disponível em http://www.biomedcentral.com/1471-2334/9/199.

COX, F. E. G. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. Parasites & Vectors. Londres: v. 3, n.15, 2010. DOI: 10.1186/1756-3305-3-5.

COUTINHO PN, PEREIRA BP, PEREIRA AC, PORTO ML, de ASSIS AL, Destefani AC, Meyrelles SS, Vasquez EC, Nogueira BV, de Andrade TU, Endringer DC. Chronic

administration of antioxidant resin from Virola oleifera attenuates atherogenesis in LDLr-/-mice. Journal of ethnopharmacology. 12;206:65-72, 2017.

CROFT SI., YARDLEY V. Chemotherapy of leishmaniasis. Current Pharmaceutical Design, 8(4), 319-342, 2002.

CRUZ I.; NIETO J.; MORENO J.; CANAVATE C.; DESJEUX P.; ALVAR J. Leishmania/ HIV co-in-infections in the second decade. Indian Journal Med. Res. 123(3) 357–388, 2006.

DA CRUZ JD, MPALANTINOS MA, RAMOS AD, FERREIRA JL, de OLIVEIRA AA, JUNIOR NL, SILVA JR, AMARAL AC. Chemical standardization, antioxidant activity and phenolic contents of cultivated Alpinia zerumbet preparations. Industrial Crops and Products. Sep 1;151:11249, 2020.

D, ASHA, M, LIZZY. Chemical profiling of *Thymus vulgaris* L. using HPTLC. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 6(4):1017-23, 2017.

DATE, A. A.; JOSHI, M. D.; PATRAVALE, V. B. Parasitic diseases: liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. Advanced Drug Delivery Reviews, vol. 59, pp. 505–521, 2007.

DAUQAN EM, ABDULLAH A. Medicinal and functional values of thyme (Thymus vulgaris L.) herb. Journal of Applied Biology & Biotechnology. Mar;5(2):17-22, 2017.

DEWICK PM. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley & Sons; Jan 3, 2002.

DIAS, C. N.; MORAES, D. F. C. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. Parasitol Res, 2013.

DING, Y.; YAN, Y.; PENG, Y.; CHEN, D.; MI, J.; LU, L.; LUO, Q.; LI, X.; ZENG, X.; CAO, Y. In vitro digestion under simulated saliva, gastric and small intestinal conditions and fermentation by human gut microbiota of polysaccharides from the fruits of Lycium barbarum. International Journal of Biological Macromolecules, v.125, p.751-760, 2019.

DHINAKARAN SR, MATHEW N, MUNUSAMY S. Synergistic terpene combinations as larvicides against the dengue vector *Aedes aegypti* Linn. Drug development research. Sep;80(6):791-9, 2019.

DONALISIO MR, FREITAS AR, ZUBEN AP. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. Revista de saúde pública. Apr 10;51:30, 2017.

DURÁN, N.; AZEVEDO, M. M. M.. O Que é Nanobiotecnologia? Atualidades e Perspectivas. Monografia LQES - Laboratório de Química do Estado Sólido – Instituto de Química – UNICAMP, 2002.

EFFERTH, T. From ancient herb to modern drug: *Artemisia annua* and artemisinin for cancer therapy. Seminars in Cancer Biology, v.46, p.65-83, 2017.

EGAN, T.J.; ROSS, D.C.; ADAMS, P.A. Quinoline anti-malarial drugs inhibit spontaneous formation of beta-haematin (malaria pigment). FEBS. 19;352(1):54–57, 1994.

EHRENBERG JP., AULT, SK. Neglected diseases of neglected populations: thinking to re- shape the determinants of health in Latin America and the Caribbean. BMC Public Health, 5, 119. 2005. Disponível em http://www.biomedcentral.com/1471-2458/5/119.

El AZIZ MM, ASHOUR AS, MELAD AS. A review on saponins from medicinal plants: chemistry, isolation, and determination. J. Nanomed. Res. 8:6-12, 2019.

ELSHAFIE HS, CAMELE I. An overview of the biological effects of somemediterranean essential oils on human health. BioMed research international. Nov 5;2017.

ESSMANN U, PERERA L, BERKOWITZ ML, DARDEN T, LEE H, PEDERSEN LG. A smooth particle mesh Ewald method. The Journal of chemical physics. 1995 Nov 15;103(19):8577-93, 1995.

FABBRI, C. Marcadores de estresse oxidativo em plasma e eritrócitos de pacientes com malária vivax grave. Dissertação, 2012.

FERNANDES, K. R. P.; BITTERCOURT, P. S.; SOUZA, A. D. L.; SOUZA, A. Q. L.; SILVA, F. M. A.; LIMA, E. S.; ACHO, L. D. R.; NUNOMURA, R. C. S.; TEIXEIRA, A. F.; KOOLEN, H. H.F. Phenolic compounds from *Virola venosa* (Myristicaceae) and evaluation of their antioxidant and enzyme inhibition potential. Acta Amazonica, v.49, n.1, p.48-53, 2019.

FRANÇA, T. C. C; SANTOS, M. G; FIGUEROA-VILLAR, J.D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. Quim. Nova, 31 (5): 1271-1278, 2008.

FRANÇA LP, AMARAL AC, RAMOS AD, FERREIRA JL, MARIA AC, OLIVEIRA KM, ARAUJO ES, BRANCHES AD, SILVA JN, SILVA NG, BARROS GD. *Piper capitarianum* essential oil: a promising insecticidal agent for the management of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. Environmental Science and Pollution Research. Nov 6:1-7, 2020.

FIERASCU RC, FIERASCU I, AVRAMESCU SM, SIENIAWSKA E. Recovery of natural antioxidants from agro-industrial side streams through advanced extraction techniques. Molecules. Jan;24(23):4212, 2019.

FIKRY S, KHALIL N, SALAMA O. Chemical profiling, biostatic and biocidal dynamics of *Origanum vulgare* L. essential oil. AMB Express. Dec;9(1):1-0, 2019.

FURTADO FB, BORGES BC, TEIXEIRA TL, GARCES HG, ALMEIDA Junior LD, ALVES FC, SILVA CV, FERNANDES Junior A. Chemical composition and bioactivity of essential oil from *Blepharocalyx salicifolius*. International journal of molecular sciences. Jan;19(1):33, 2018.

GABRIËLS, M.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Physical and chemical evalutation of liposomes, containing artesunate. Journal of Pharmaceutical and Biomed Analysis., Arlington, v.31, p.655-667, 2003.

GIARETTA A, TULER AC, SOUZA MD, VALDEMARIN KS, MAZINE FF, PEIXOTO AL. Diversidade de Myrtaceae na Reserva Natural Vale. Floresta Atlântica de Tabuleiro: diversidade e endemismo na Reserva Natural Vale. Rona, Belo Horizonte. 2016:247-57, 2016

GIATROPOULOS, A.; KIMBARIS, A.; MICHAELAKIS, A.; PAPACHRISTOS, D. P.; POLISSIOU, M. G.; EMANOUEL, N. Chemical composition and assessment of larvicidal and repelente capacity of 14 Lamiaceae essential oils against *Aedes albopictus*. Parasitology Research, 2018.

GOMES, P. R. B.; SILVA, A. L. S.; PINHEIRO, H. A.; CARVALHO, L. L.; LIMA, H. S.; SILVA, E. F.; SILVA, R. P.; LOUZEIRO, C. H.; OLIVEIRA, M. B.; FILHO, V. E. M. Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial do *Zingiber officinale Roscoe* (gengibre) frente ao mosquito *Aedes aegypti*. Rev. Bras. Pl. Med, v.18, n.2, p.597-604, 2016.

GOVINDARAJAN, M.; BENELLI, G. α-Humulene and β-elemene from *Syzygium zeylanicum* (Myrtaceae) essential oil: highly effective and eco-friendly larvicides against *Anopheles subpictus*, *Aedes albopictus*, and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). Prasitol Res, 2016.

GOTELLI, M; GALATI, B; MEDAN, D. Pollen, Tapetum, and Orbicule development in Colletia paradoxa and Discaria americana (Rhamnaceae). The Scientific World Journal, 2012.

GROMACS. 2019. Groningen University. At http://www.gromacs.org.

HABERMANN E, PONTES FC, PEREIRA VC, IMATOMI M, GUALTIERI SC. Phytotoxic potential of young leaves from *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg (Myrtaceae). Brazilian Journal of Biology. Jun;76(2):531-8, 2016.

HAMIDI MR, JOVANOVA B, PANOVSKA TK. Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. Maced pharm bull. 2014;60(1):9-18, 2014.

HAMINI-KADAR N, HAMDANE F, BOUTOUTAOU R, KIHAL M, HENNI JE. Antifungal activity of clove (*Syzygium aromaticum* L.) essential oil against phytopathogenic fungi of tomato (*Solanum lycopersicum* L) in Algeria. Journal of experimental biology and agricultural sciences. 2014;2(5):447-54, 2014.

HAN X, PARKER TL. Anti-inflammatory, tissue remodeling, immunomodulatory, and anticancer activities of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil in a human skin disease model. Biochimie Open. 2017 Jun 1;4:73-7, 2017.

HASTINGS, I. M.; DONNELLY, M. J. The impact of antimalarial drug resistance mutations on parasite fitness, and its implications for the evolution of resistance. Drug Resistance Updates, v. 8, p. 43-50, 2005.

HERNANDEZ JJ, RAGONE MI, BONAZZOLA P, BANDONI AL, CONSOLINI AE. Antitussive, antispasmodic, bronchodilating and cardiac inotropic effects of the essential oil from *Blepharocalyx salicifolius* leaves. Journal of ethnopharmacology. 2018 Jan 10;210:107-17, 2018.

HESS, B., BEKKER, H., BERENDSEN, H. J., FRAAIJE, J. G. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. J. Comput. Chem., 18: 1463-1472, 1997.

HONORIO, N. A.; SILVA, W. C.; LEITE, P. J.; MONTEIRO, J. L. M.; LOUNIBOS, L. P.; LOURENÇO DE OLIVEIRA, R. Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an Urban Endemic Dengue Area in the State of Rio de Janeiro, Brazil, Memorial Intituto Oswaldo Cruz, v.98, n.2, p. 191-198, 2003.

HUANG J, MACKERELL Jr AD. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. Journal of computational chemistry. 2013 Sep 30;34(25):2135-45, 2013.

HUANG Y, LIN M, JIA M, HU J, ZHU L. Chemical composition and larvicidal activity against *Aedes* mosquitoes of essential oils from *Arisaema fargesii*. Pest management science. 2020 Feb;76(2):534-42, 2020.

Instituto Oswaldo Cruz. Acesso: 9 de janeiro de 2019.

JESUS de GS, MICHELETTI AC, PADILHA RG, de SOUZA de Paula J, ALVES FM, LEAL CR, Garcez FR, Garcez WS, Yoshida NC. Antimicrobial Potential of Essential Oils from Cerrado Plants against Multidrug− Resistant Foodborne Microorganisms. Molecules. 2020 Jan;25(14):3296, 2020.

JOHANSEN, I. C. URBANIZAÇÃO E SAÚDE DA POPULAÇÃO: O CASO DA DENGUE EM CARAGUATATUBA (SP). 2014. Tese (Doutorado em Filosofia) – Instituto de Filosofia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

JOHNSON, I. S.; ARMSTRONG, J. G.; GORMAN, M.; BURNETT, J. P. B. JR. The Vinca Alkaloids : A New Class of Oncolytic Agents. Cancer Research. v.23, p.1390- 1427, 1963.

JOLY, C. A.; HADDAD, C. F. B.; VERDADE, L. M.; OLIVEIRA, M. C.; BOLZANI, V. S.; BERLINCK, R. G. S. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. Revista USP, n.89, 2011.

KAMAL M, KENAWY MA, RADY MH, KHALED AS, SAMY AM. Mapping the global potential distributions of two arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* under changing climate. PloS one. 2018 Dec 31;13(12):e0210122, 2018.

KINGSTON, D. G. I. Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. Journal of Natural Products, v. 74, n, 3, 2010.

KHAN M, KHAN ST, KHAN M, MOUSA AA, MAHMOOD A, ALKHATHLAN HZ. Chemical diversity in leaf and stem essential oils of *Origanum vulgare* L. and their effects on microbicidal activities. AMB Express;9(1):1-5, 2019.

KRAEMER, M. U. G.; SINKA, M. E.; DUDA, K. A.; MYLNE, A.; SHEARER, F. M.; BARKER, C. M.; MOORE, C. G.; CARVALHO, R. G.; COELHO, G. E.; VAN BORTEL, W.; HENDRICKX, G.; SCHAFFNER, F.;; ELYAZAR, I. R. F.; TENG, H. J.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. O.; PIGOT, D. M.; SCOTT, T. W.; SMITH, D. L.; WINT, G. R. W.; GOLDING, N.; HAY, S. The 1 global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. Epidemiology and global health, v.4, 2015.

KRETTLI AU, ANADRADE-NETO VF, BRANDÃO MD, FERRARI W. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants ramdomly selected: a review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Nov;96(8):1033-42, 2001.

KAWAI H, KURAYA E, TOUYAMA A, HIGA O, HOKAMOTO K, TOKESHI K, YASUDA A, NARAGAKI T, ITOH S. Improved yield and antioxidant activity of essential oil from *Alpinia zerumbet* (Zingiberaceae) leaves by underwater shockwave pretreatment. Food and Bioproducts Processing. Jan 1;125:134-40, 2021.

KIRCHMAIR J, MARKT P, DISTINTO S, WOLBER G, LANGER T. Evaluation of the performance of 3D virtual screening protocols: RMSD comparisons, enrichment assessments, and decoy selection—what can we learn from earlier mistakes?. Journal of computer-aided molecular design. Mar;22(3):213-28, 2008.

KLIMOVICH PV, MOBLEY DL. A Python tool to set up relative free energy calculations in GROMACS. Journal of computer-aided molecular design. Nov;29(11):1007-14, 2015.

KUMAR B, SMITA K, CUMBAL L. Biosynthesis of silver nanoparticles using Lantana camara flower extract and its application. Journal of Sol-Gel Science and Technology. 2016 May 1;78(2):285-92, 2016.

KUETE V. *Thymus vulgaris*. Medicinal spices and vegetables from Africa. Jan 1:599- 609, 2017.

LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J-P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: a review. *S.T.P*. Journal of Pharmaceutical Sciences, Paris v.9, p.411-418, 1999.

LEITÃO, G. G.; SIMAS, N. K.; SOARES, S. S.V.; BRITO, A. P. P.; CLAROS, B. M. G.; BRITO, T. B. M.; MONACHE, F. D. Chemistry and pharmacology of Monimiaceae: a special focus on *Siparuna* and *Mollinedia*. Journal of Ethnopharmacology, n. 65, p. 87–102, 1999. DOI: 10.1016/S0378-8741(98)00233-5.

LEYVA-LOPEZ N, GUTIERREZ-GRIJALVA EP, VAZQUEZ-OLIVO G, HEREDIA JB. Essential oils of oregano: Biological activity beyond their antimicrobial properties. Molecules. Jun;22(6):989, 2017.

LIMA, R. B. Flora da reserva ducke, amazonas, brasil: rhamnaceae. Rodriguésia 57, (2): 247-249, 2006.

LOPES, N.; LINHARES, R. E. C.; NOZAWA, C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. Revista Pan-Amazon Saúde, n.5 v.3, p. 55-64, 2014.

MAJDI M, MALEKZADEH-MASHHADY A, MAROUFI A, CROCOLL C. Tissue-specific gene-expression patterns of genes associated with timol/carvacrol biosynthesis in thyme (*Thymus vulgaris* L.) and their differential changes upon treatment with abiotic elicitors. Plant physiology and biochemistry. Jun 1;115:152-62, 2017.

MACIUK, A.; LAVAUD, C.; THEPENIER, P.; JACQUIER, M. J.; GHEDIRA, K.; ZECHES-HANROT, M. Four New Dammarane Saponins from *Zizyphus lotus*. *Journal of Natural Products*, v.67, n. 10, 2004.

MAGALHÃES, P. M.; FIGUEIRA, G. M.; SOUZA, J. M.; VENTURA, A. M. R.; OHNISHI, M. D. O.; SILVA, D. R.; LOBO, L. A. G.; ELERES, F. B.; LIBONATI, R.; WILLCOX, M.; PIMENTEL, E. C. *Artemisia annua*: A New Version of a Traditional Tea under Randomized, Controlled Clinical Trial for the Treatment of Malaria. Scientific Research Publishing, v. 7, p.545-563, 2016.

MALIK S, editor. Essential Oil Research: Trends in Biosynthesis, Analytics, Industrial Applications and Biotechnological Production. Springer; 2019.

MALESKI LT, de SOUZA MT, de SOUZA MT, AGUIAR LK, DURAU BC, ZAWADNEAK MA. Toxicidade do óleo essencial de *Raulinoreitzia crenulata* (Asteraceae) e seu constituinte majoritário contra *Aphis forbesi* (Hemiptera: Aphididae). InAnais do Congresso Brasileiro de Fitossanidade Vol. 5, No. 1, 2019.

MATTOS, F.J.A. Introdução à Fitoquímica Experimental. 2ª ed. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1997.

MEYER BN, FERRIGNI NR, PUTNAM JE, JACOBSEN LB, NICHOLS DE, MCLAUGHLIN JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta med. 1982 May 1;45(5):31-4, 1982.

MELO, C. P; PIMENTA, M. A. Nanociências e nanotecnologia. Parcerias Estratégicas, Brasília, n. 18, p. 9-21, 2004. Disponível em: <http://www.cgee.org.br/arquivos/pe_18.pdf

MENDONÇA SC, SIMAS RC, REIS SIMAS DL, LEITÃO SG, LEITÃO GG. Mass spectrometry as a tool for the dereplication of saponins from *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke bark and wood. Phytochemical Analysis. 2020.

MESQUITA, R.D.S., de OLIVEIRA, A.C., SÁ, I.S., SALES, M.L., BASTOS, L.M., KOOLEN, H.H., TADEI, W.P., da SILVA, F.M. and NUNOMURA, R.C. Essential Oils from Leaves of *Virola calophylla*, *Virola multinervia*, and *Virola pavonis* (Myristicaceae): Chemical Composition and Larvicidal Activity against *Aedes aegypti*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *23*(3), pp.453-463, 2020.

MORSHEDLOO MR, SALAMI SA, NAZERI V, MAGGI F, CRAKER L. Essential oil profile of oregano (*Origanum vulgare* L.) populations grown under similar soil and climate conditions. Industrial Crops and Products. 1;119:183-90, 2018.

MULLER, R. H.; KECK, C. M. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs a review of drugs nanocrystal technology and lipid nanoparticles. Journal of Biotecnology, v. 113, p. 151-170.

NARARAK, J. SATHANTRIPHOP, S. KONGMEE, M. MAHIOU-LEDDET, V. OLLIVIER, E. MANGUIN, S. CHAREONVIRIYAPHAP, T. Excito-repellent activity of β-caryophyllene oxide against *Aedes aegypti* and *Anopheles minimus. Acta Tropica* 197, 2019.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. Journal of Natural Products, v. 75, n. 03, 2012.

NEWMAN DJ, CRAGG GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. Journal of natural products. 12;83(3):770-803, 2020.

OLADEJI, O. The Characteristics and Roles of Medicinal Plants: Some Important Medicinal Plants in Nigeria. Natural Products: An Indian Journal, v.12, n.3, 2016.

OLIVEIRA, E. S. C.; AMARAL, A. C. F.; RAMOS, A. S..; FERREIRA, J. L. P.; SILVA, J. R. A. Chemical Composition of Essential Oils from the Leaves of *Endlicheria bracteolata.* Journal of Essential Oil Bearing Plants, v. 18, n. 1, p.93-98, 2015.

OLIVEIRA, E. S. C.; AMARAL, A. C. F.; LIMA, E. S.; SILVA, J. R. A. Chemical composition and biological activities of *Bocageopsis multiflora* essential oil. The Journal of Essential Oil Research, v. 26, n. 3, 2013.

OLIVEIRA, S. R.; CALEFFE, R. R. T.; CONTE, H. Chemical control of *Aedes aegypti*: a review on effects on the environment and human health. Revista Eletronica em gestão e Educação e Tecnologia Ambiental. V. 21, n.3, p.240-247, 2017.

Organização Pan-Americana da Saúde, 2019.

YAMAGUCHI KK, VEIGA-JUNIOR VF, PEDROSA TD, VASCONCELLOS MC, LIMA ES. Biological activities of essential oils of *Endlicheria citriodora*, a methyl geranate-rich Lauraceae. Química Nova. 36(6):826-30, 2013.

YOUNOUSSA L, ESIMONE CO, YINYANG SP, DANGA TK, NUKENINE EN. Adulticidal efficacy of *Annona senegalensis* and *Boswellia dalzielii* Leaf fraction extracts and essential oils against *Anopheles gambiae* Gilles, *Aedes aegypti* Linn and *Culex quinquefasciatus* say using CDC bottles, 2019.

Pan American Health Organization. Ministers of Health of the Americas agree to strengthen actions to prevent vector-borne diseases [Online] (2019). Available: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14681:ministers-of-health-of-the-americas-agree-to-strengthen-actions-to-prevent-vector-borne-diseases&Itemid=1926&lang=en [7 March 2019].

Pan American Health Organization/World Health Organization. Epidemiological Update:

Arbovirus. 10 June 2020, Washington, D.C. PAHO/WHO. 2020.

PAVELA R, MAGGI F, LUPIDI G, CIANFAGLIONE K, DAUVERGNE X, BRUNO M, BENELLI G. Efficacy of sea fennel (*Crithmum maritimum* L., Apiaceae) essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say and Spodoptera littoralis (Boisd.). Industrial crops and products. 15;109:603-10, 2017.

PAWLOWSKA, A. M.; CAMANGI, F.; BADER, A.; BRACA, A. Flavonoids of *Zizyphus jujuba* L. and *Zizyphus spina-christi* (L) willd (Rhamnaceae) fruits. Food Chemistry, v.112, p.858-862, 2009.

PEÇANHA, L. M. T; FERNANDES, P. D; SIMEN, T. J-T; OLIVEIRA, D. R; FITONELLI, P. V; PEREIRA, M. V. A; BARBOZA, F. F; ALMEIDA, T. S; CARVALHAL, S; PIERUCCI, A. P. T. R; LEITÃO, G. G; RASTRELLI, L; PICCINELLI, A. L; LEITÃO, S. G. Immunobiologic and Antiinflammatory Properties of a Bark Extract from *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke. BioMed Research International, 1-9, 2013.

PEREIRA AC, LENZ D, NOGUEIRA BV, SCHERER R, ANDRADE TU, COSTA HB, ROMÃO W, PEREIRA TM, ENDRINGER DC. Gastroprotective activity of the resin from *Virola oleifera*. Pharmaceutical biology. 1;55(1):472-80, 2017.

PHILIPSON, W. R. MONIMIACEAE. In: K. KUBITZKI. The Families and Genera of Vascular Plants. . Springer, v. 2, p. 426-437, 1993.

PIMENTEL, L.F. *et al*. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, v.43, n.4, 2007.

PINACHO, R.; CAVERO, R. Y.; ASTIASARAN, I.; ANSORENA, D.; CALVO, M. I. Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of *in vitro* digestion on their antioxidant capacity. Journal of Functional Foods, v.19, p.49-62, 2015.

PONTES, A.C.O.; CAETANO, M.N.P.; SANTOS; MAGALHÃES, N.S. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of benzathine penicillin G liposomes. *S.T.P. Pharmaceutics Sciences.* Paris, v.9, p.419-427, 1999.

PU, Y.; DING, N.; ZHANG, N.; JIANG, P.; LIU, D. Identification of bitter compounds from dried fruit of *Ziziphus jujuba* cv. Junzao. International Journal of Food Properties, 2017.

RENNER, S.S. LAURALES. Complement, Post-C3 (Lytic) Pathway-Encyclopedia of Life Sciences. St. Louis US: Macmillan Reference Ltd, 1997.Encyclopedia of Life Sciences. 1997.

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA,

M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra-firme na Amazônia Central. DFID (Departamento Internacional de Desenvolvimento), Manaus: Ed. INPA, p. 816, 1999-AM. INPA, p. 816, 1999.

RIBEIRO-COSTA, R. M.; PEREIRA, E.C.G.; ALVES, J.A.; SANTOS, N.P.; NASCIMENTO, S. C.; HONDA, N.K.; SILVA, N.H.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. In vitro and in vivo properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. Journal of Microencapsulation., London, v.21, p.371-384, 2004.

RODRIGUES, I. A.; DA SILVA, B. A.; DOS SANTOS, A. L.; VERMELHO, A. B.; ALVIANO, C. S.; DUTRA, P. M.; ROSA, M. S. S. A new experimental culturemedium for cultivation of *Leishmania amazonensis*: its efficacy for the continuous in vitro growth and differentiation of infective promastigote forms, Parasitology Research, vol.106, no. 5, 1249-1252, 2010.

RODRIGUES, R. M. M.S.; MERTINE, M. H.; CHIARINI, P. F. T.; PRADO, S. P. T. Matérias estranhas e identificação histológica em manjerona (*Origanum majorana* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e salsa (*Petroselinum sativum* Hoffim.), em flocos, comercializados no estado de São Paulo. Revista Instituto Adolfo Lutz, v.64, n.1, p.25-30, 2005.

ROLÓN, M.; SECO, E.; VEGA, C.; NOGAL, J. J.; ESCARIO, J. A. ; GÓMEZ-BARRIO, A. ; MALPARTIDA, F. Selective activity of polyene macrolides produced by genetically modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*, International Journal of Antimicrobial Agents, vol. 28, pp. 104-109, 2006.

ROSSI - BERGMANN, B.. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. Ciências e Cultura, São Paulo, v.60, n.2, 2008.

ROSAS, L.V; CORDEIRO, M.S.C; NASCIMENTO S.K.R; JANUÁRIO, A.H; FRANÇA, S.C; NOMIZO, A; TOLDO, M.P.A; ALBUQUERQUE, S; PEREIRA, P.S. In vitro evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). Brazilian Journal Medical and Biological Research, (40): 663-670, 2007.

ROSE, R. I. Pesticides and Public Health: Integrated Methods of Mosquito Management. Emerging Infectious Diseases, v. 7, n.1, p. 17-23, 2001.

ROTA, M. C.; HERRERA, A.; MARTINEZ, R. M.; SOTOMAYOR, J. A.; JORDAN, M. J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. Food Control, v.19, p.681-687, 2008.

SCHLICHER, E.J.A.M.; POSTMA, N.S.; ZUIDEMA, J.; TALSMA, H.; HENNINK, W.E. Preparation and characterisation of Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres

containing desferrioxamine. International Journal Pharmaceutical., Amsterdam, v.153, p.235-245, 1997.

SCHULTES, R.E. Evolution of the identification of the myristicaceous hallucinogens of

South America. J. Ethnopharmacol. 1: 211-239, 1979.

SEGATA, J. A Doença socialista e o mosquito dos pobres. Ilimunuras, v. 17, n. 42, p. 372-389, 2016.

Silva MV, Silva SA, Teixera TL, De Oliveira A, Morais SA, Da Silva CV, Espindola LS, Sousa RM. Essential oil from leaves of *Eugenia calycina* Cambes: Natural larvicidal against *Aedes aegypti*. Journal of the Science of Food and Agriculture. Feb;101(3):1202-8, 2021.

SIMEN, T. J. M.; FINOTELLI, P. V.; BARBOZA, F. F.; PEREIRA, M. V. A.; PIERUCCI, A. P. T. R.; MOURA, M. R. L.; OLIVEIRA, D. R.; ABRAÇADO, L. G.; CELANO, R.; FIGUEIREDO, F. S.; PICCINELLI, A. L.; RASTRELLI, L.; LEITÃO, G. G.; PEÇANHA, L. M. T.; LEITÃO, S. G. Spray-dried extract from the Amazonian adaptogenic plant *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (Saracura-mirá): Chemical composition and immunomodulatory propertes. Food Research International, v.90 p.100-110, 2016.

SINICO, C.; LOGU, A.; LAI, F.; VALENTI, D.; MANCONI, M.; LOY, G.; BONSIGNORE, L.; FADDA, A. M.. Liposomal incorporation of *Artemisia arborescens* L. essential oil and in vitro antiviral activity, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, vol. 59, pp. 161–168, 2005.

SILVA, J. A. C.; SILVA, M. F. Estudos florísticos no município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil – II: famílias Myristicaceae, Siparunaceae e Monimiaceae. Acta Amazônica, v. 38, n. 02, pg. 207-212, 2008. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672008000200003

SINGH, K. Nanomedicine in Malaria. Patenting Nanomedicines, p. 401-434, 2012

SINGH, K.; VINGKAR, S. Formulation, antimalarial activity and biodistribution of oral lipid nanoemulsion of primaquine. International Journal of Pharmaceutics. v. 347, n. 1-2, p. 136-143, 2008.

SOARES, E. R.; SILVA, F. M. A.; ALMEIDA, R. A.; LIMA, B. R.; KOOLEN, H. H. F.; LOURENÇO, C. C.; SALVADOR, M. J.; FLACH, A.; COSTA, L. A. M. A.; SOUZA, A. Q. L.; PINHEIRO, M. L. B; SOUZA, A. D. L. Chemical composition and antimicrobial evaluation of the essential oils of *Bocageopsis pleiosperma* Maas. Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters, 2015.

SOLOWEY, E.; LICHTENSTEIN, M.; SALLON, S.; PAAVILAINEN, H.; SOLOWEY, E.; LORBERBOUM-GALSKI. Evaluating Medicinal Plants for Anticancer Activity. Scientific World Journal, v. 2014, 2014.

TEICH, V.; ARINELLI, R.; FAHHEM, L. *Aedes aegypti* e sociedade: o impacto econômico das arboviroses no Brasil. Journal Bras Econ Saúde , v.9, n.3, p.267-276, 2017.

TANGJANG, S.; NAMSA, N.; MANDAL, M. Ethnobotany of the Monpa ethnic group at Arunachal Pradesh, India. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine. v.7, n.1, p.31, 2011.

TSABANG, N.; FOKOU, P. V. T.; TCHOUKOUAHA, L. R. Y.; NOGUEM, B.; BAKARNGA-VIA, I.; NGUEPI, M. S. D.; NKONGMENECK, N. A.; BOYOM, F. F. Ethnopharmacological survey of Annonaceae medicinal plants used to treat malaria in four áreas of Cameroon. Jounal of Ethnopharmacology, v. 139, p. 171-180, 2012.

VALDUGA, E.; VALEIRO, A.; TREICHEL, H.; NASCIMENTO FILHO, I.; FURIGO JUNIOR, A.; LUCCIO, M. D. Head Space Solid Phase Micro-Extraction (HS - SPME)of volatile organic compounds produced by *Sporidiobolus salmonicolori*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 30, n.4, p.987-992, 2010.

VASCONCELOS, P. F. C. Febre amarela. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.36, n.2, 2003.

VEIGA, A., ALBUQUUERQUE, K. CORREA, M. E. BRIGIDO, H. SILVA, J. S., Marliane Campos, Fernando Silveira, Lourivaldo Santos, Maria Dolabela. *Leishmania amazonensis* and *Leishmania chagasi*: In vitro leishmanicide activity of *Virola surinamensis* (rol.) warb,. Experimental Parasitology, Vol. 175, P. 68-73, 2017.

VINCIGUERRA, V.; ROJAS, F.; TEDESCO, V.; GIUSIANO, G.; ANGIOLELLA, L.; Chemical characterization and antifungal activity of *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* essential oils and carvacrol against *Malassezia furfur*. Natural product research. Nov 17;33(22):3273-7, 2019.

WANG, S.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; GAO, W.; YAN, Y.; LI, X.; LIU, C. Identification of Chemical Constituents in the Extract and Rat Serum from *Ziziphus Jujuba* Mill. by HPLC-PDA-ESI-MS, Iranian Journal of Pharmaceutical Research, v.13, n.3, p.1055-1063, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. First WHO report on neglected tropical diseases. 2010. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World malaria report: 2012. WHO Library Cataloguing, 2013.

YAMAGUCHI, K. K. I.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Atividades biológicas dos Óleos essenciais de *Endlicheria citriodora*, uma Lauraceae rica em geranato de metila. Química Nova, v. 36, n.6, p.826-830, 2013.

ZHOU, K.; YU, L. Total phenolic contents and antioxidant properties of commonly consumed vegetables grown in Colorado. Food Science and Technology, v. 39, n. 10, p.1155-1162, 2006.

ZHU S, LIU XC, LIU ZL, XU X. Chemical composition of Salvia plebeian R. Br. essential oil and its larvicidal activity against *Aedes aegypti* L. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. Oct 2;14(5):831-6, 2015.

PUBLICAÇÕES

Industrial Crops & Products

Classificação Qualis: A1 ISSN: 0926-6690

Industrial Crops & Products 151 (2020) 112495

Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops & Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop

Chemical standardization, antioxidant activity and phenolic contents of cultivated *Alpinia zerumbet* preparations

Jefferson D. da Cruz[a], Maria A. Mpalantinos[a], Aline de S. Ramos[a], José Luiz P. Ferreira[a,b], Aimêe A. de Oliveira[c], Nilton L. Netto Júnior[d], Jefferson Rocha de A. Silva[c], Ana Claudia F. Amaral[a,*]

[a] Laboratório de Plantas Medicinais e Derivados, Farmanguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
[b] Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil
[c] Laboratório de Cromatografia, Departamento de Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil
[d] Farmácia Viva, Secretaria do Estado de Saúde do DF, Brasília, DF, Brasil

ARTICLE INFO

Keywords
Zingiberaceae
Alpinia speciosakavalactone
Flavonoids
HPLC-DAD

ABSTRACT

Alpinia zerumbet (Zingiberaceae) is an important medicinal plant found in several countries and used in folk medicine. The hypotensive and anxiolytic effects of the preparations made from this plant are mainly attributed to flavonoids and kavalactones, respectively. The aim of this study was to compare infusions, hydroalcohol extracts and tinctures obtained with fresh and dried leaves of *A. zerumbet* collected in two Brazilian cities: Rio de Janeiro/RJ and Brasília/DF. Colorimetric methods were used to evaluate the antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of the extracts. The flavonoids and dihydro-5,6-dehydrokavain (DDK) contents were analyzed by HPLC-DAD and the volatile compounds were evaluated by headspace solid phase extraction (SPE) followed by GC–MS analyses, which also evaluated the nonpolar fractions. The fresh and dried leaves from both Brazilian cities contain high amounts of flavonoids with antioxidant activity. The 80 % hydroalcohol extract prepared with fresh leaves collected in Brasília exhibited the highest antioxidant activity by the phosphomolybdenum and DPPH methods. HPLC analyses of the infusions prepared with fresh leaves collected in Rio de Janeiro showed the highest DDK content, 6.63 mg/g of the extract. The GC–MS analyses of the nonpolar fractions from the aqueous extracts, from both cities, showed the presence of two major substances, the kavalactones DDK and 5,6-dehydrokavain. The evaluation of the loss of volatile substances by headspace SPE showed that even after a storage time of 30 days, there were still volatile substances in the dried plant material from both cities. In addition, the loss of terpinen-4-ol and γ-terpinene from the fresh leaves was very low, showing the slow release of these substances under the studied conditions. In conclusion, this work shows that the chemical standardization of *A. zerumbet* preparations contains terpenoids, kavalactones and phenolic compounds related to the biological activities which are important to corroborate the different uses of this species.

South African Journal of Botany

Classificação Qualis: A3 ISSN: 0254-6299

South African Journal of Botany 140 (2021) 17–24

Contents lists available at ScienceDirect

South African Journal of Botany

journal homepage: www.elsevier.com/locate/sajb

Larvicidal, adulticidal and repellent activities against *Aedes aegypti* L. of two commonly used spices, *Origanum vulgare* L. and *Thymus vulgaris* L.

Aimêe A. de Oliveira[a], Leandro P. França[a], Aline de S. Ramos[b], José Luiz P. Ferreira[b], Ana Clara B. Maria[b], Kelson M.T Oliveira[c], Earle S.Araújo Jr[c], Jonathas N. da Silva[c], Adjane D.S. Branches[c], Gabriel de A. Barros[c], Noam G. da Silva[c], Wanderli P. Tadei[d], Ana Claudia F. Amaral[b], Jefferson R. de Andrade Silva[a,*]

[a] Laboratório de Cromatografia, Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brazil
[b] Laboratório de Plantas Medicinais e Derivados, Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
[c] Laboratório de Química Teórica e Computacional, Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brazil
[d] Laboratório de Malária e Dengue, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, Brazil

ARTICLE INFO

Article History:
Received 17 September 2020
Revised 1 February 2021
Accepted 4 March 2021
Available online xxx

Edited by R Maharaj

Keywords:
Botanical insecticides
Arboviruses
Aedes aegypti
Lamiaceae
Essential oil

ABSTRACT

The high incidence of dengue, chikungunya, and Zika indicates the importance of controlling the vector of these arboviruses in the tropical and subtropical regions of the world. However, vector control is hindered by pesticide resistance and the limited success of biocontrol programs against *Aedes* mosquitoes. Despite these difficulties, the study of common plant species, including those with commercial value, can offer effective and ecological tools in the fight against mosquitoes. In the present study, the essential oils obtained from the aerial parts of *Origanum vulgare* L. and *Thymus vulgaris* L. were analyzed by GC–MS and evaluated for their larvicidal, adulticidal and repellent activities against *Aedes aegypti* L. The main constituents of the *O. vulgare* essential oil were terpinen-4-ol (17.4%), carvacrol (16.0%) and thymol (10.4%), and the main constituents of the *T. vulgaris* essential oil were thymol (40.0%), *p*-cymene (19.3%) and γ-terpinene (17.3%). Both essential oils were toxic to *Ae. aegypti* larvae with LC_{50} values of 37.5 μg/mL for *O. vulgare* and 38.9 μg/mL for *T. vulgaris*. For adult mosquitoes, the LC_{50} values were 14.3 and 11.7 μg/mL, respectively. The essential oils of *O. vulgare* and *T. vulgaris* showed a significant repellency effect, with values ranging from 8.9% to 37.8% and 4.4% to 68.9%, respectively. In addition, morphological differences between larvae treated with the EOs and the control group were evidenced by optical microscopy. Thus, the results suggest that the essential oils of *O. vulgare* and *T. vulgaris* have potential use as an ecofriendly source to develop new insecticides for the control of *Ae. aegypti*.

© 2021 SAAB. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.