



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ALYANDRA DE SOUSA NASCIMENTO

**Perfil químico e potencial biológico do óleo essencial e extrato etanólico das
folhas da espécie *Annona squamosa* L. (ata)**

TERESINA
2019

ALYANDRA DE SOUSA NASCIMENTO

**Perfil químico e potencial biológico do óleo essencial e extrato etanólico das
folhas da espécie *Annona squamosa* L. (ata)**

Defesa de mestrado submetido à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pelo Programa de Pós-graduação em Química.

Área de Concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Chistiane Mendes
Feitosa

TERESINA

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do CCN

N244p Nascimento, Alyandra de Sousa.
Perfil químico e potencial biológico do óleo essencial e extrato etanólico das folhas da espécie *Annona Squamosa* L.(ata) / Alyandra de Sousa Nascimento – Teresina, 2019.
79f.: il. color.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Natureza, Pós-Graduação em Química, 2019.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Chistiane Mendes Feitosa.

1. Química Orgânica. 2. *Annona Squamosa*. 3. *Aedes aegypti*. 4. Toxicidade. I. Título.

CDD 547

Bibliotecária: Caryne Maria da Silva Gomes / CRB 1461

Alyandra de Sousa Nascimento

**PERFIL QUÍMICO E POTENCIAL BIOLÓGICO DO ÓLEO ESSENCIAL E
EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DA ESPÉCIE *Annona squamosa* L. (ATA)**

Dissertação de mestrado submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação Química da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em na área de concentração de Química Orgânica.

Data da aprovação: em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Chistiane Mendes Feitosa
Universidade Federal do Piauí
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dra. Samya Danielle Lima de Freitas
Universidade Federal do Piauí

Prof. Dra. Veruska Cavalcanti Barros
Universidade Federal do Piauí

TERESINA-PI

2019

AGRADECIMENTOS

Antes de qualquer coisa, agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de seguir com os meus objetos e que me mostrou o caminho certo a percorrer, que me deu saúde, alegria, força, determinação e, principalmente, dignidade e honestidade.

Agradeço aos professores do Curso de Química da Universidade Federal do Piauí – UFPI, e que e mantiveram dispostos a compartilhar os seus conhecimentos.

Tenho muito a agradecer também a minha família, em especial meus pais que tanto se esforçaram para dar uma educação a mim e aos meus queridos irmãos Alyssandra e Alysson, que sempre me incentivaram a buscar pelos os meus objetivos.

Ao meu namorado Wanderson que sempre foi atencioso comigo e que esteve ao meu lado nos momentos em que achava que não conseguiria alcançar os meus objetivos.

Agradeço aos meus amigos do laboratório que tanto me ajudaram, em especial a Layana que sempre esteve a disposição e que me inspirava ao ver sua autonomia no laboratório, e que foi capaz de compartilhar os conhecimentos. À Laíres, que apesar da sua correria esteve disposta a ajudar e me mostrou diferentes caminhos a percorrer. Não poderia deixar de agradecer também a Claucenira, que em tão pouco tempo pudemos nos apoiar uma na outra, dividindo aflições e trocando gentilezas, também não poderia deixar de citar os momentos de descontração, quando íamos ao café expresso ou andar por outros lugares, jogando conversa a fora, aah são bons momentos que ficaram guardados na memória.

Agradeço também aos meus outros colegas do grupo LPNNEX, o Felipe, Pedro, Ana Paula, Bruna, Denise, Ariane, Hilda, Juliana, que me auxiliaram nos experimentos e deixarem de fazer os seus a fazeres para desenvolvermos o trabalho. Também não poderia deixar de agradecer a professora Veruska por me disponibilizar o seu laboratório LAPES para a realização dos ensaios com o *Aedes aegypti* e ao seu aluno Lucas por se dispor a ajudar nos ensaios.

Agradeço aos funcionários do NTF o seu Francisco e o seu Ari por sempre serem atenciosos e tão solícitos quando precisamos. E também a Karla por sua disponibilidade em me ajudar com os ensaios da *Artemia salina*.

A minha orientadora, Prof^a. Dra. Chistiane Mendes Feitosa que me aceitou como sua aluna e se mostrou disposta a me orientar. As palavras em agradecimentos

são pequenas perto dos ensinamentos que ela me proporcionou no decorrer desse tempo.

E o meu sincero agradecimento aos membros da banca Prof^a Veruska e Prof^a Samya por serem tão atenciosas e por terem contribuído com este trabalho

Agradeço também a CAPES pela bolsa fornecida e que me deu todo subsídio financeiro para me dedicar ao programa de pós-graduação.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

O *Aedes aegypti* é um mosquito vetor que transmite várias doenças como a dengue, chikungunha, zika e febre amarela. Substâncias advindas de plantas têm sido alvo de estudos por apresentarem um baixo efeito sobre os organismos e, portanto, uma alternativa ao controle do *A. aegypti*. Dessa forma, foi avaliado o perfil químico do óleo essencial (OEAS) e extrato etanólico das folhas da espécie *Annona squamosa* L. (Annonaceae) (EEAS), e verificado a toxicidade frente as larvas do *Aedes aegypti* e microcrustáceos de *Artemia salina* L, e inibição da enzima acetilcolinesterase *in vitro*, como forma de determinar um dos mecanismos de ação das amostras. Para os ensaios de toxicidade utilizou-se o óleo e o extrato em diferentes concentrações em larvas de *A. aegypti* do 3º e 4º estádios e microcrustáceos de *A. salina* L. O OEAS foi extraído através do processo de hidrodestilação tipo *Clevenger* e os constituintes foram analisados por CG-EM. A análise por CG-EM, permitiu identificar os constituintes majoritários a saber: trans-cariofileno (25,53%), germacreno D (22,70%) e o γ -elemeno (14,86%). O screening fitoquímico do EEAS revelou a presença de alcaloides, taninos condensados, triterpenos, flavonoides e saponinas. A quantificação dos metabólitos secundários do EEAS foi realizada por métodos espectrofotométricos, obtida através de curvas de calibração de padrões (20-200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) que apresentaram boa linearidade. O EEAS apresentou $55,33 \pm 2,55 \text{ mg g}^{-1}$ de teor de fenóis, $58,73 \pm 6,41 \text{ mg g}^{-1}$ de taninos condensados e $0,068 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1}$ de alcaloides, e alto teores de flavonoides ($367,69 \pm 3,97 \text{ mg g}^{-1}$) e taninos hidrolisáveis ($243,90 \pm 1,43 \text{ mg g}^{-1}$). A CL_{50} do *A. aegypti* para OEAS foi igual a 76 ppm e para o EEAS não foi possível calcular a CL_{50} pois não houve a mortalidade em 50% das larvas após 48 horas de exposição. No efeito residual o OEAS continuou matando as larvas após 48 horas, no entanto em menor proporção, sugerindo-se que as larvas possam estar consumindo o óleo. Para o extrato não foi possível determinar o efeito residual, visto que não teve mortalidade efetiva. O OEAS e EEAS foram altamente tóxicos para as *A. salina* L. onde a CL_{50} de OEAS foi igual a 1,12 ppm e para o EEAS houve 100% de mortalidade em todas as concentrações e não foi possível calcular a CL_{50} . Portanto, o ensaio de toxicidade do EEAS para as larvas do *A. aegypti* não mostrou correlação com a toxicidade das *A. salina* L. No ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase, o OEAS e EEAS de *A. squamosa* L. não apresentaram inibição da enzima. A partir deste estudo é possível sugerir que a morte das larvas no OEAS não esteja correlacionada com o mecanismo de inibição da enzima AChE no sistema nervoso central. Esses resultados mostram um potencial larvicida do OEAS, porém o efeito larvicida pronunciado não está relacionado ao mecanismo de inibição da enzima AChE. Estes resultados nos motivam a continuação deste trabalho para avaliar qual composto apresenta a ação larvicida, e o seu efeito antiproliferativo do OEAS visando uma formulação farmacêutica.

Palavras-chave: *Annona squamosa* L. *Aedes aegypti*. Toxicidade. enzima acetilcolinesterase.

ABSTRACT

Aedes aegypti is a vector mosquito that transmits various diseases such as dengue, chikungunha, zika and yellow fever. Substances from plants have been studied because they have a low effect on organisms and, therefore, an alternative to the control of *A. aegypti*. Thus, the chemical profile of the essential oil (OEAS) and ethanolic extract of the leaves of *Annona squamosa* L. (Annonaceae) (EEAS) were evaluated, and the toxicity of *Aedes aegypti* larvae and *Artemia salina* L. microcrustacies and enzyme inhibition were verified. acetylcholinesterase in vitro as a way to determine one of the mechanisms of action of the samples. For toxicity tests, oil and extract were used at different concentrations in *A. aegypti* larvae of 3rd and 4th stages and *A. salina* L. microcrustacies. The OEAS was extracted through *Clevenger* hydrodistillation process and the constituents were analyzed by GC-MS. GC-MS analysis identified the major constituents: trans-caryophyllene (25.53%), germacrene D (22.70%) and γ -elemene (14.86%). The phytochemical screening of the EEAS revealed the presence of alkaloids, condensed tannins, triterpenes, flavonoids and saponins. The quantification of EEAS secondary metabolites was performed by spectrophotometric methods, obtained through standard calibration curves (20-200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) that presented good linearity. The EEAS presented $55.33 \pm 2.55 \text{ mg g}^{-1}$ of phenol content, $58.73 \pm 6.41 \text{ mg g}^{-1}$ of condensed tannins and $0.068 \pm 0.00 \text{ mg g}^{-1}$ of alkaloids, and high levels of flavonoids ($367.69 \pm 3.97 \text{ mg g}^{-1}$) and hydrolyzable tannins ($243.90 \pm 1.43 \text{ mg g}^{-1}$). The IC_{50} of *A. aegypti* for OEAS was 76 ppm and for the EEAS it was not possible to calculate the LC_{50} because there were not mortality in 50% of the larvae after 48 hours of exposure. In the residual effect, OEAS continued to kill the larvae after 48 hours, but to a lesser extent, suggesting that the larvae may be consuming the oil. For the extract it was not possible to determine the residual effect, since it had no effective mortality. OEAS and EEAS were highly toxic for *A. salina* L. where the OEAS LC_{50} was 1.12 ppm and for EEAS there was 100% mortality at all concentrations and it was not possible to calculate the LC_{50} . Therefore, the EEAS toxicity test for *A. aegypti* larvae showed no correlation with *A. salina* L. toxicity. In the acetylcholinesterase inhibition assay, *A. squamosa* L. OEAS and EEAS showed no inhibition of the enzyme. From this study it is possible to suggest that the death of larvae in OEAS is not correlated with the mechanism of AChE enzyme inhibition in the central nervous system. These results show a larvicidal potential of the OEAS, but the pronounced larvicidal effect is not related to the AChE enzyme inhibition mechanism. These results motivate us to continue this work to evaluate which compound has larvicidal action, and its antiproliferative effect of OEAS aiming at a pharmaceutical formulation.

Keywords: *Annona squamosa* L. *Aedes aegypti*. Toxicity acetylcholinesterase enzyme.

LISTA DE SIGLAS

AChE	Enzima acetilcolinesterase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CL ₅₀	Concentração Letal que mata 50% dos indivíduos
EEAS	Extrato etanólico da <i>Annona squamosa</i>
FA	Febre amarela
LAPES	Laboratório de Parasitologia e Entomologia Sanitária
OEAS	Óleo essencial da <i>Annona squamosa</i> L.
SE	Semana Epidemiológica
SESAPI	Secretaria de Saúde do Piauí

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CICLO BIOLÓGICO DO <i>Aedes aegypti</i>	18
FIGURA 2 - MAPA DE DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DE DOENÇAS COMO A ZIKA, DENGUE E CHIKUNGUNHA.	20
FIGURA 3 - ESQUEMA SIMPLIFICADO DA BIOSÍNTESE DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	27
FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ALCALOIDE ATROPINA.....	28
FIGURA 5 - COMPOSTOS FENÓLICOS.....	29
FIGURA 6 - ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONOIDES.....	30
FIGURA 7 - ESTRUTURA QUÍMICA DA QUERCETINA	30
FIGURA 8 - TANINOS CONDENSADOS E HIDROLISÁVEIS	31
FIGURA 9 - DISTRIBUIÇÃO DA FAMÍLIA ANNONACEAE NO MUNDO	32
FIGURA 10 - ESTRUTURA QUÍMICA DA UVARICINA	33
FIGURA 11 - FRUTOS da <i>Annona squamosa</i> L. (ata).....	35
FIGURA 12 - ACETOGENINAS ANNOTEMOYINA-1 (1), ANNOTEMOYINA-2 (2) E SQUAMOCINA (3).....	36
FIGURA 13 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DA <i>Annona squamosa</i> L.....	47
FIGURA 14: PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA <i>Annona squamosa</i> L.	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CONSTITUINTES QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DA <i>Annona squamosa</i> L.....	48
TABELA 2 - PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO de <i>A. squamosa</i> L.....	50
TABELA 3: MORTALIDADE DAS LARVAS EM 24 E 48 HORAS DO OEAS.....	55
TABELA 4: MORTALIDADE DAS LARVAS EM 24 E 48 HORAS DO EEAS	57
TABELA 5 - EFEITO RESIDUAL DE OEAS COM 24 E 48 HORAS	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
3.1	ESPÉCIE <i>Aedes aegypti</i>	17
3.1.1	<i>Ciclo biológico do Aedes aegypti (Linnaeus, 1762)</i>	17
3.2	AS ARBOVIROSES.....	19
3.2.1	<i>Dengue</i>	20
3.2.2	<i>Zika vírus</i>	21
3.2.3	<i>Febre chikungunya</i>	22
3.2.4	<i>Febre amarela</i>	22
3.3	MEDIDAS DE CONTROLE AO <i>Aedes aegypti</i>	23
3.4	PLANTAS MEDICINAIS.....	25
3.4.1	<i>Metabolismo vegetal</i>	26
3.4.2	<i>Biossíntese dos metabólitos secundários</i>	27
3.4.2.1	Alcaloides.....	27
3.4.2.2	Compostos fenólicos.....	28
3.4.2.3	Flavonoides.....	29
3.4.2.4	Taninos.....	30
3.5	FAMILIA ANNONACEAE.....	32
3.5.1	Gênero <i>Annona</i>	34
3.5.1.1	<i>Annona squamosa</i>	34
3.5.1.1	Atividades biológicas da <i>A. squamosa L</i>	36
4	PARTE EXPERIMENTAL	39
4.1	MATERIAL VEGETAL.....	39
4.2	OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	39
4.3	ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL.....	39
4.4	OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO.....	40
4.5	PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA.....	40

4.6	QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	42
4.6.1	<i>Determinação do teor de fenóis totais</i>	42
4.5.3	<i>Determinação do teor de taninos condensados</i>	43
4.6.3	<i>Determinação do teor de taninos hidrolisáveis</i>	43
4.6.4	<i>Determinação do teor de alcaloides</i>	43
4.7	BIOENSAIO LARVICIDA	44
4.8	TESTE DE TOXIDADE FRENTE <i>Artemia salina</i> L.....	45
4.9	ATIVIDADE DE INIBIÇÃO QUANTITATIVA DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL	47
5.2	RENDIMENTO E PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO EEAS.....	49
5.4	ATIVIDADE LARVICIDA FRENTE ao <i>Aedes aegypti</i>	55
5.5	EFEITO RESIDUAL	58
5.6	TESTE DE TOXICIDADE FRENTE a <i>Artemia salina</i> L.....	59
5.7	TESTE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE	61
6	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXO 1 - PREPARO DOS REAGENTES PARA O TESTE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA.....	79

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, tem-se utilizado plantas medicinais para o tratamento, cura e prevenção de doenças, por ser uma alternativa terapêutica, devido a práticas do uso comum de sua utilização por via oral. As plantas medicinais apresentam substâncias biologicamente ativas que constituem uma grande diversidade estrutural que possuem propriedades físicas-químicas e biológicas, com ampla variedade e complexidade de substâncias (VALERIO *et al.*, 2015; BRUNING; MOSEGUI, VIANNA, 2012; NEIVA *et al.*, 2011). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), planta medicinal é todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos, em que um fitoterápico consisti em uma formulação farmacêutica específica a partir de uma planta (WHO *et al.*, 2019).

As plantas medicinais biossintetizam metabólitos que são formados por processos enzimáticos, envolvendo reações químicas, que ao serem produzidos podem iniciar uma série de reações para formar novos produtos. Esses processos geralmente são compreendidos por vias do metabolismo normal, que engloba os processos bioquímicos de construção (anabolismo), degradação (catabolismo) e eliminação (excreção). Esses metabólitos são classificados em primários e secundários, os metabólitos primários são considerados como aqueles ditos como essenciais para todos os organismos vivos como carboidratos, proteínas, gorduras e ácidos nucleicos. Já os metabólitos secundários sintetizam materiais tóxicos contra predadores, ou atrativos voláteis para interações intra e interespecíficas, constituindo uma grande variedade de compostos farmacologicamente ativos (DEWICK, 2002; JAMES, 2017).

Esses metabólitos estão representados por três grupos: compostos fenólicos, terpenicos e alcaloides. Diferentes estudos comprovam o potencial biológico desses compostos, a saber: antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral, entre outras (BESSA *et al.*, 2013). Esses metabólitos advindos de plantas, isolados ou em uma mistura de compostos também podem apresentar atividades larvicida e inseticida, potencializando ou minimizando a ação (ZARA *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2010).

Há muito tempo tem-se utilizado plantas para o uso como repelente e inseticida. No entanto, o uso de substâncias de origem botânica era restrito devido a disponibilidade e o alto custo de obtenção. Por isso, por um longo período fez-se o uso de repelentes sintéticos, que apesar de serem visto como uma alternativa, o uso frequente tem selecionado insetos resistentes (MOREIRA; MANSUR; MANSUR-FIGUEIRA, 2012).

Um dos mecanismos de resistência a insetos descritos são compostos a base de organofosforados e carbamatos, que agem inibindo a enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável por hidrolisar a acetilcolina, um neurotransmissor importante que auxilia no processo de transmissão de impulsos nervosos. Ao inibir a enzima, ocorre um aumento de níveis de acetilcolina na fenda sináptica e o impulso nervoso não é cessado que leva conseqüentemente a morte do inseto. Além disso, a enzima ao ser inibida pode diminuir os níveis de colina, que age como substrato para a síntese de fosfolipídios da membrana (BRAGA; VALLE, 2007a; GARCEZ, 2013; SILVA *et al.*, 2015).

Dentre a diversidade de plantas medicinais, tem-se a *Annona squamosa* que é uma árvore da família Annonaceae nativa da Índia, que foi trazida ao Brasil no século XIX, onde se teve uma boa adaptação, por ser uma planta de clima quente, com pouca chuva e estação bem definida. A espécie é bem conhecida por suas frutas tropicais comestíveis conhecida popularmente como ata, fruto-do-conde ou pinha (ROOPAN *et al.*, 2012; BRITO *et al.*, 2008). É descrita por possuir várias atividades biológicas, tais como: antidiabética (SHIRWAIKAR, 2004), acaricida, inseticida e larvicida (ROOPAN *et al.*, 2012), leishmanicida (VILA-NOVA, 2011) e citotóxica (VIVEK *et al.*, 2012).

O ensaio biológico utilizando *Artemia salina* é utilizado afim de se obter uma característica sobre a toxicidade de compostos de plantas, visto que esses compostos possam ser tóxicos em certas doses. É um ensaio preliminar, que pode averiguar quanto a toxicidade de futuras substâncias isoladas (MEYER *et al.*, 1982). A toxicidade frente aos náuplios demonstra uma boa relação entre a atividade citotóxica contra organismos de ambientes marinhos (VANHAECKE *et al.*, 1981), agentes antitumorais, pesticidas, antifúngicas (PISUTTHANAN *et al.*, 2013; MEYER *et al.*, 1982), atividade anti *Trypanosoma cruzi* (ZANI *et al.*, 1995), entre outros.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o perfil químico e o potencial biológico do óleo essencial e extrato etanólico da espécie *A. squamosa* L.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o óleo essencial das folhas da *A. squamosa* L. (OEAS).
- Quantificar e quantificar os metabólitos secundários presentes no extrato da etanólico das folhas de *A. squamosa* L. (EEAS).
- Averiguar a susceptibilidade das larvas de *Aedes aegypti* no OEAS e EEAS.
- Analisar o efeito residual do OEAS e EEAS de *A. squamosa* L. frente as larvas de *A. aegypti*.
- Avaliar a toxicidade de OEAS e EEAS frente aos nauplios de *Artemia salina* L.
- Verificar a inibição da enzima acetilcolinesterase frente ao OEAS e EEAS.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ESPÉCIE *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti* é um mosquito que pertence a ordem Díptera e a família Culicidae e são subdividida em três subfamílias: Anophelinae, Culicinae e Toxorhynchitina (ALMEIDA, 2011). É considerado o principal vetor de doenças como a dengue, chikungunha, zika e febre amarela e sua importância epidemiológica está relacionada a fatores como a morbidade, mortalidade e medidas de controle (FERREIRA *et al.*, 2009). No Egito, o mosquito *Aedes aegypti* teve a sua primeira ocorrência registrada por Linnaeus em 1762 (ZARA *et al.*, 2016). No Brasil, a introdução do mosquito ocorreu provavelmente pela vinda dos navios negreiros, e seus primeiros relatos foram registrados na cidade de São Paulo, Rio de Janeiro e Salvador em 1946 (SILVA, 2008). Devido ao crescimento global, as condições socioambientais, saneamento básico e urbanização, a propagação do vetor e o número de registros dessas doenças transmitidas pelo mosquito tem se intensificado (FERREIRA *et al.*, 2009).

Segundo o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde com os dados de 2017 até a Semana Epidemiológica (SE) de 2018, registrou-se 247.393 casos prováveis de dengue no Brasil, onde a maior incidência de casos concentrou-se na região centro-oeste com 93.344, em seguida a região Nordeste com 66.041 casos. Já os números de registros de casos prováveis de chikungunha e zika apresentou incidência de 85.221 e 8.024, respectivamente, sendo a região Sudeste com um maior número de casos (BRASIL, 2019). Os dados apresentados são alarmantes e o combate a essas doenças tem se intensificado desde o século XX, quando houve um aumento no número de mortos por febre amarela, cujo o combate consistia em eliminar os focos do *Aedes aegypti* (BRAGA; VALLE, 2007a).

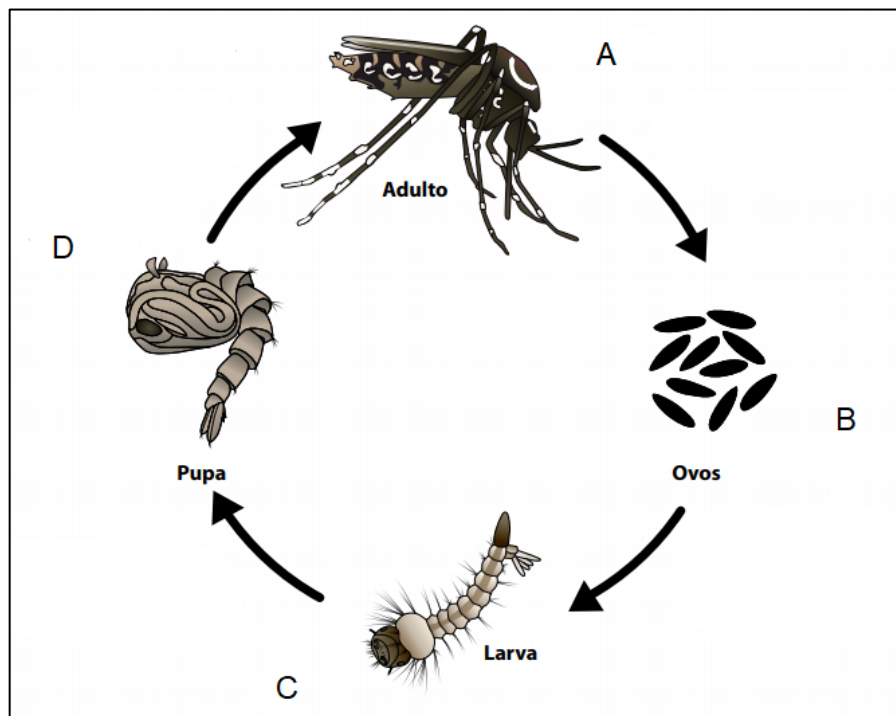
3.1.1 Ciclo biológico do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

O mosquito de *Aedes aegypti* desenvolve o seu ciclo preferencialmente no meio aquático, em reservatórios de águas limpas, podendo se adaptar a outros tipos de criadouros. Com o processo de urbanização e o déficit de saneamento básico a

proliferação dos mosquitos tem se elevado, devido ao acúmulo de lixo nas residências, o que torna o ambiente propício para a oviposição (BESERRA *et al.*, 2009). Os mosquitos de *A. aegypti* se alimentam basicamente de substâncias açucaradas, como néctar e seiva de planta. As fêmeas que são hematófagas precisam essencialmente de sangue para se alimentar e completar o desenvolvimento dos seus ovos. As fêmeas chegam a depositar em torno de 100 a 300 ovos (PALENCIA, 2012).

O ciclo de vida do *A. aegypti* compreende quatro fases: ovo, larva (quatro estádios larvais), pupa e adultos (FIGURA 1). As fêmeas depositam os ovos três dias após a ingestão de sangue e depositam em criadouros com água limpa e inerte, e então fixa-os nas paredes desses criadouros por cima da superfície da água (RAGONHA, 2018). Logo após a postura, os ovos são brancos, com o tempo se tornam escuros e brilhantes. Medem aproximadamente 1 mm de comprimento, e apresentam contorno alongado e fusiforme. Para a maturação dos ovos é necessário que permaneçam em boas condições de umidade e temperatura, passando por cerca de 48 horas, tornando-se resistentes a dessecação e se tornando capazes de sobreviver por 450 dias sem o contato com a água (FUNASA, 2001; RAGONHA, 2018).

FIGURA 1 - CICLO BIOLÓGICO DO *Aedes aegypti*



Fonte: <https://www.cdc.gov/dengue/resources/factSheets/MosquitoLifecycleFINAL.pdf>

Legenda: Mosquito adulto (A), ovos (B), larva (C) e pupa (D)

Na fase larval, o *A. aegypti* possui cabeça, tórax e abdômen, onde é dividido por oito segmentos, e respiram através de um sifão respiratório (SILVA, 2012). O intestino das larvas apresenta três partes distintas, estomodeo, mesêntero e proctodeo. O mesêntero é dividido em três partes: anterior, mediana e posterior. A parte anterior é o local onde substâncias tóxicas podem agir. As células do mesêntero possuem uma intensa atividade excretora essencial para formação da matriz peritrófica, membrana extracelular que atua como uma barreira protetora, que é eliminada quando as larvas ingerem substâncias tóxicas, químicas e biológicas como forma de desintoxicação (VALOTTO *et al.*, 2010). É durante essa fase que as larvas se alimentam de materiais orgânicos presentes nas paredes e no fundo dos criadouros. Essa fase é de suma importância a disponibilidade de alimento e condição de temperatura favorável para o seu desenvolvimento, podendo durar cerca de cinco dias (FUNASA, 2001).

A pupa tem a aparência de uma vírgula, é dividida em cefalotórax, união da cabeça com o tórax, e o abdômen. A fase de pupa dura cerca de 2 a 3 dias, e durante esse período elas não precisam de alimentação, decorrendo esse tempo dar-se início ao surgimento das asas, probóscito e patas. Os mosquitos procuram um ambiente escuro e sem ventilação para fortalecer a quitina e após 24 horas começar um novo ciclo em busca de alimentos e cópula (INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2019).

O mosquito de *Aedes aegypti* tem como característica cor escura com listras brancas no corpo e nas pernas, medindo menos de 1 cm. O macho se diferencia das fêmeas por possuir antenas plumosas e palpos mais longos. Geralmente os mosquitos procuram repousar em lugares escuros e quietos, podendo ser encontrado em quartos, banheiros e cozinha. Quando infectado por vírus os mosquitos fêmeas podem transmitir o vírus por transovariana e as fêmeas filhas podem nascer já infectadas. Os adultos podem viver bastante tempo em condições de laboratório, mas na natureza vivem em média 30 a 35 dias (FUNASA, 2001).

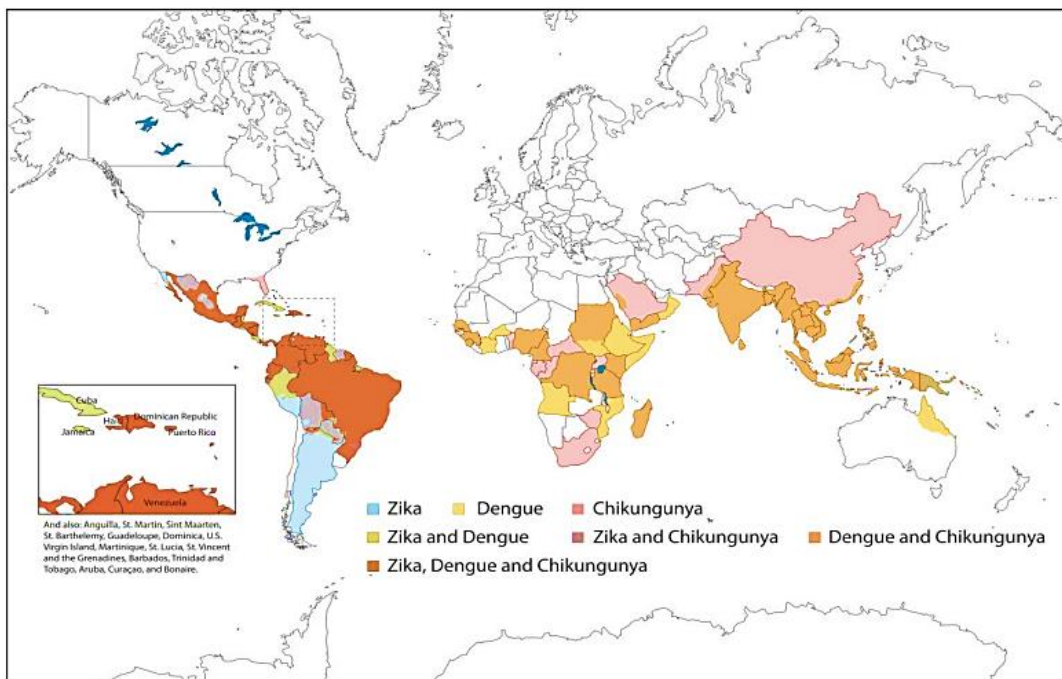
3.2 AS ARBOVIROSES

O termo “arbovírus” se origina da expressão inglesa arthropod-borne vírus, que são um de grupo de vírus transmitidos por artrópodes, seguindo os requisitos de:

infectar vertebrados e invertebrados; iniciar viremia em hospedeiro vertebrado por tempo e quantidade suficientes para permitir infecção do vetor invertebrado e iniciar uma infecção produtiva; habitar a glândula salivar do invertebrado a fim de fornecer vírus para infecção de outros hospedeiros vertebrados; o meio de transmissão de hospedeiro artrópode a hospedeiro artrópode através da via transovariana ou venérea (CASSEB *et al.*, 2011). Cinco famílias virais causam doenças em animais e seres humanos, a Bunyaviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Reoviridae e Rhabdoviridae.

A antártica é o único continente onde as arboviroses não são endêmicas, expandindo-se para regiões tropicais, oferecendo um local mais adequado para a proliferação do vetor e, conseqüentemente, as arboviroses (CASSEB *et al.*, 2011; LOPES *et al.*, 2014).

FIGURA 2 - MAPA DE DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DE DOENÇAS COMO A ZIKA, DENGUE E CHIKUNGUNHA.



FONTE: Patterson, Sammon e Garg. (2016)

3.2.1 Dengue

A dengue é uma doença viral transmitida por mosquitos que atinge mais de 100 países tropicais e subtropicais sendo considerado um problema mundial de saúde pública causando mais de 390 milhões de infecções por ano (AÑEZ, 2017; WHO,

2009). Os vírus da dengue são inerentes ao gênero *Flavivírus* (família Flaviviridae) e possuem quatro tipos de sorotipos virais: DEN-1, 2, 3 e 4. Em 1902 e 1907 os agentes etiológicos da febre amarela e dengue foram os primeiros microorganismos considerados vírus. Os estudos só se deram início nos laboratórios 36 anos depois e a primeira hipótese do *Aedes aegypti* como agente infeccioso se deu no ano de 1906, publicada por Bancroft (NOGUEIRA, 2001; TEIXEIRA; BARRETO; GUERRA, 1999).

Na 52ª Semana Epidemiológica (SE) de 2018 foram divulgados pelo Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde, o aumento do número de casos de dengue, em comparação ao ano de 2017. Em 2017, foram registrados 239.389 casos prováveis de dengue. Em 2018, foram registrados 247.393 casos. Na região Centro-Oeste apresentou o maior número de casos prováveis (93.344 casos; 37,7 %) em relação ao total do país. Em seguida, aparecem as regiões Nordeste (66.401 casos; 26,8 %), Sudeste (68.460 casos; 27,7%), Norte (16.288 casos; 6,6%) e Sul (2.900 casos; 1,2%) (BRASIL, 2019).

No Piauí, houve uma redução de 65% de novos casos de dengue em relação ao mesmo período do ano de 2017, segundo os dados divulgados na Secretaria de Estado da Saúde (SESAPI) na 52ª SE de 2018.

3.2.2 Zika vírus

Também pertencente ao vírus *Flavivírus*, recebeu o nome de zika em homenagem a floresta ugandense onde foi descoberto. O primeiro vírus foi isolado em 1947 em um macaco, que em seguida ficou conhecido por causar infecção assintomática ou doença febril leve em humanos. Em 2016, a OMS decretou a doença como estado emergência em saúde pública de interesse nacional e em virtude da descoberta da associação do zika vírus com a microcefalia (PATTERSON, 2016).

Em 2017, foram registrados 17.593 casos prováveis de doença aguda pelo vírus Zika, em 2018 registrou-se 8.680, 3.984 (45,9 %) de casos comprovados. A região Nordeste foi registrada com 2.425 casos (27,9%), na região Centro-Oeste 1.733 casos (20,0 %), região Norte 1.326 casos (15,3 %) e Sul 47 casos (0,5%). A região Sudeste foi a que apresentou o maior número de casos prováveis (3.149 casos; 36,3 %) em relação ao todo o país (BRASIL, 2019).

No Piauí, segundo dados da SESAPI, os casos de Zika também diminuíram de 86 para 23 em comparação com 2017 e 2018. (SESAPI, 2019).

3.2.3 Febre chikungunya

O vírus da chikungunya pertence ao gênero *alfavírus* da família *Togaviridae*, que tem como causa a febre caracterizada por dores na articulação grave. O agente etiológico foi isolado pela primeira vez na Tanzânia em 1953 em um paciente febril. Durante muito tempo pouco se era relatada sobre a doença, no entanto, a partir de 2004 ocorreram surtos de larga escala em toda a África e Ásia. O primeiro caso foi registrado no hemisfério ocidental em 2013, tendo se disseminado para 44 países no ano de 2015 (PATTERSON, 2016). No Brasil, a doença surgiu em 2014, quando foram registrados 2.772 casos em seis estados do país (TEIXEIRA *et al.*, 2015).

Em 2017, foram registrados 185.593 de casos prováveis de febre de chikungunya e em 2018, 87.687 casos, sendo 68.962 confirmados. A região Sudeste foi a que registrou o maior índice de casos prováveis de febre de chikungunya (52.966 casos; 60,4%) em relação ao todo o Brasil. Seguida das regiões Centro-Oeste (13.862 casos; 15,8 %), Nordeste (11.287 casos; 12,9 %), Norte (9.315 casos; 10,6 %) e Sul (257 casos; 0,3 %) (BRASIL, 2019).

3.2.4 Febre amarela

A febre amarela (FA) é uma doença infecciosa, porém não contagiosa, que se mantém endêmica ou enzoótica nas florestas tropicais da América e África (VASCONCELOS, 2003). O primeiro vírus da febre amarela foi isolado em 1927 por dois grupos distintos, a Fundação Rockefeller na Nigéria e o Instituto Pasteur no Segenal. Nesses estudos verificaram a suscetibilidade do *macaco rhesus* ao agente da febre amarela. Somente em 1937 foi inventada a primeira vacina contra a FA, sendo chamada como 17D. No Brasil a primeira epidemia da FA ocorreu em 1685, em Recife-PE e irrompeu em Salvador onde cerca de 25.000 pessoas ficaram doentes e 900 vieram a óbito (COSTA, 2011).

Segundo o Ministério da Saúde sobre a Febre Amarela o número de áreas registrada de casos da doença excedeu o limite na região considerada endêmica

(região amazônica). Os registros mostraram que casos de surtos em humanos e epizootias em primatas não humanos (PNH) se deu uma ampla faixa do território nacional. Teve início na região norte no período de 2014/2015, depois expandiu ao leste e sul do país, e depois afetou prioritariamente a região Centro Oeste entre os anos de 2015/2016. Nos anos 2017/2018 registrou-se o surto mais expressivo no Brasil, que afetou principalmente os estados da região Sudeste, com 1.376 de casos em humanos e 483 óbitos, além de 864 epizootias. Nos períodos da semana epidemiológica (SE) 27 e 45 (entre julho/2018 a junho/2019) foram notificados ao ministério da saúde 1.079 epizootias em PNH, no entanto apenas 13 foram confirmados por FA. Em humanos foram confirmados um caso, e que veio a óbito (BRASIL, 2018).

3.3 MEDIDAS DE CONTROLE ao *Aedes aegypti*

O controle do *Aedes* tem sido um grande desafio principalmente nos países desenvolvidos, apesar de terem situações em que os recursos sejam destinados as medidas de controle, muitas vezes não se tem alcançado sucesso. Fatores como a falta de infraestrutura das cidades tem dificultado as medidas tradicionais de controle (DONALÍSIO, 2002).

Existem três formas de medidas de controle dos mosquitos, o controle mecânico, que consiste em eliminar os focos de desenvolvimento do mosquito, impedindo o contato com o homem. Controle biológico, com a utilização de predadores aquáticos, que possam comer as larvas e pupas ou ainda patógenos que contém toxinas, como bactérias, fungos e parasitas. E controle químico que se baseia no uso de produtos químicos como inseticidas, larvicidas e repelentes, que possam ser tóxicos para matar as larvas e insetos adultos (ZARA *et al.*, 2016; BRAGA; VALLE, 2007a).

Uma das formas de controle que predominava no final do século XIX era por meio de medidas físicas e utilização de óleo ou verde de Paris (um dos primeiros inseticidas sintético inorgânico) nos criadouros (BRAGA; VALLE, 2007a). Como uma medida de controle de proteção pessoal, destaca-se o composto sintético DEET® (*N,N*-dietil-3-metilbenzamida), que possui um longo tempo de ação contra diversos tipos de insetos, porém o seu uso tem sido restrito devido ao seu odor desagradável e

efeitos tóxicos sobre a pele de crianças, mulheres gestantes ou lactantes (ZARA *et al.*, 2016; BRAGA *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2014). Além disso, existem inseticidas da classe dos organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides que são utilizados como medida de controle.

Os organoclorados, como o diclorodifeniltricloroetano (DDT) atuam no canal sódio-potássio nas membranas dos axônios (D'AMATO; TORRES; MALM, 2002). Os organofosforados como o teméfós é o único desse grupo com uso generalizado no controle de larvas de mosquitos que age inibindo a enzima acetilcolinesterase (AChE). Já os piretróides sintéticos como a cipermetrina, utilizada como adulticida, são produzidos em laboratório a partir de uma substância natural o piretro, extraída do crisântemo. Essa substância age mantendo aberto os canais de sódio das membranas dos neurônios (BRAGA; VALLE, 2007a).

No entanto, o uso contínuo de inseticidas sintéticos tem causado resistência, poluição ao meio ambiente, além de serem tóxicos aos seres vivos (BRAGA; VALLE, 2007a). Estudos sugerem que os principais mecanismos de resistência dos insetos estejam relacionados a diminuição na taxa de penetração, associada a alteração da cutícula do inseto, o aumento da detoxificação metabólica por ação das enzimas esterases, monooxigenases ou glutathione-transferases e por modificação do sítio alvo do inseticida (que atuam no sistema nervoso central como a enzima acetilcolinesterase "AChE", canais de sódio, receptores do gama-aminobutírico "GABA" (BRAGA; VALLE, 2007a; GUIRADO e BICUDO, 2009; MOREIRA, MANSUR, FIGUEIRA-MANSUR, 2012).

Com isso, busca-se por alternativas com menos efeitos adversos e mais eficazes, do qual uma dessas alternativas é a utilização de compostos a base de produtos naturais que contenham diferentes mecanismos de ação, como a utilização de inseticidas e novos agentes de controle químico e biológico (GARCEZ *et al.*, 2013; ZARA *et al.*, 2016).

As plantas são ricas em metabolitos secundários que podem ajudar no controle de pragas (MACIEL *et al.*, 2010). O uso de extratos e óleos provenientes de plantas são amplamente conhecidos pela sua diversidade química e pela sua variada aplicação na indústria, pois fornecem substâncias com atividade inseticida. Os metabolitos secundários produzidos pelas plantas podem ser utilizados como uma alternativa aos inseticidas sintéticos, pois normalmente agem em doses baixas e com

ações específicas, além de causarem menos impacto aos seres vivos (REGNAULT-ROGER, 1997).

Provenientes de recursos renováveis, a utilização de inseticidas a base de plantas possui vantagens aos inseticidas sintéticos, por apresentarem uma mistura de compostos ativos que agem sinergismo ou isoladamente, podendo potencializar ou reduzir a atividade larvicida, diminuindo a seleção de organismos resistentes (ZARA *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2010).

3.4 PLANTAS MEDICINAIS

Desde as primeiras civilizações o homem já fazia uso de plantas medicinais para o tratamento e cura de doenças, onde partiam de um conhecimento prévio obtido acerca da observação do homem. Além disso, as plantas eram utilizadas em rituais religiosos como forma de colocar os homens em contato direto com os deuses. Os usos de plantas com fins terapêuticos foram descritos em escrituras cuneiforme, e relatam a utilização de plantas para o tratamento de gripe, resfriado e infecções bacterianas (CRUZ; BRANDELLI, 2017). Ao longo dos anos, esses estudos têm se intensificado e a biodiversidade dos produtos naturais tem sido cada vez mais explorada. A utilização de plantas medicinais também está atrelada a fatores socioeconômicos, devido à falta de acesso de medicamento industrializados por parte de pessoas de zonas rurais (CRUZ MONTEIRO; BRANDELLI, 2017; SIMÕES; SCHENKEL, 2002).

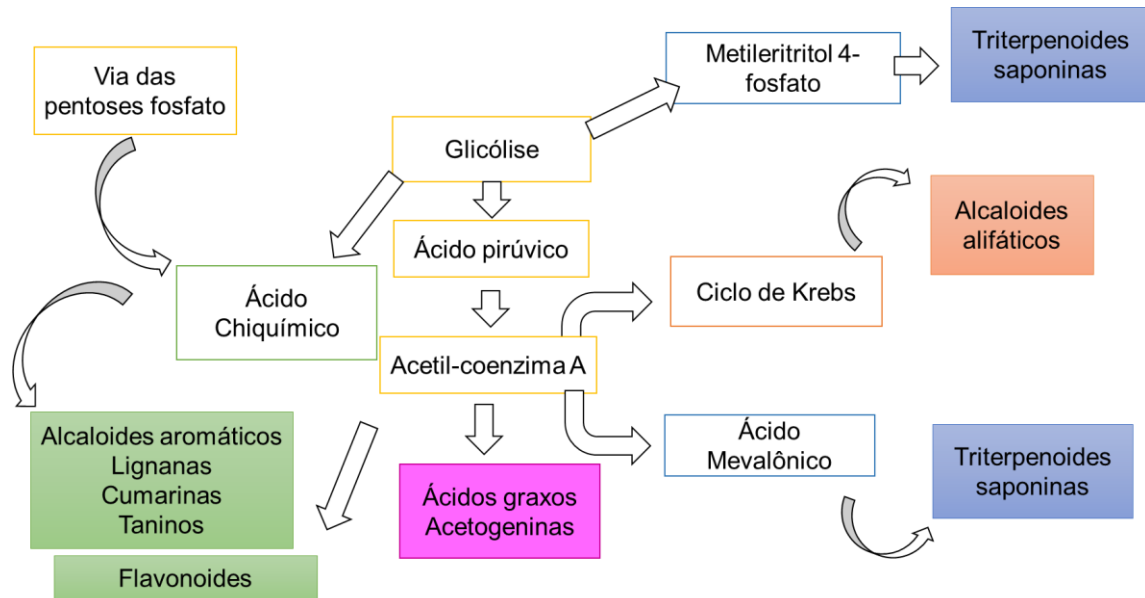
Jeffrey B. Theophrastus foi o primeiro a relatar sobre a possibilidade de encontrar flavonoides em plantas medicinais. No entanto, apenas no século XIX Cavetou e Pelletier isolaram o alcaloide quinina da casca de *Cinchona*, depois disso inúmeros substâncias foram isoladas. Apesar disso, a descoberta de novas substâncias diminuiu e as indústrias farmacêuticas começaram a elaborar substâncias químicas sintéticas (PHILLIPSON, 2001). A farmacopeia brasileira (Código Oficial Farmacêutico do país) estabeleceu uns critérios para o uso de medicamentos tanto manipulados quanto industrializados como forma de padronizar formulações de fitoterápicos (ANVISA, 2017; CRUZ MONTEIRO; BRANDELLI, 2017; SIMÕES; SCHENKEL, 2002).

3.4.1 *Metabolismo vegetal*

As plantas produzem metabolitos que são essenciais para a sua sobrevivência e preservação. E estão divididos em dois grupos, metabolitos primários e secundários. Os metabolitos secundários são definidos como micromoléculas complexas, de baixo peso molecular e que são encontrados em pequenas quantidades. Atuam na defesa ou atração do vegetal liberando substâncias tóxicas ou atraindo insetos, pássaros e morcegos. São formados através de reações químicas em que envolvem enzimas específicas para a formação de cada substância designando diferentes rotas metabólicas. O fornecimento de energia por meio de ATP e poder redutor NADPH são fundamentais para a manutenção da célula (SIMÕES, 2007).

A rota biossintética dos metabolitos secundários (FIGURA 3) se inicia com o intermediário acetil coenzima A a partir da descarboxilação oxidativa do ácido pirúvico proveniente da via glicolítica que leva a formação de três vias: ácido mevalônico que biossintetizam os terpenoides e esteroides, ácido cítrico que leva a formação de alcaloides alifáticos e condensação do acetato para formar ácidos graxos e acetogeninas. Além disso, dois intermediários da via glicolítica levam a formação de uma rota alternativa do terpenoides e esteroides, a via do fosfato de metileritritol. A classe dos compostos fenólicos se inicia com a condensação do fosfoenolpiruvato e a eritrose 4- fosfato da via das pentoses fosfato que gera o ácido chiquímico precursor de ácidos cinâmicos, alcaloides aromáticos, taninos e lignanas. Os flavonoides advêm da rota mista do ácido chiquímico mais unidades de malonil-CoA (formados a partir de acetil-CoA) (DEWICK, 2002; SIMÕES, 2007).

FIGURA 3 - ESQUEMA SIMPLIFICADO DA BIOSÍNTESE DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS



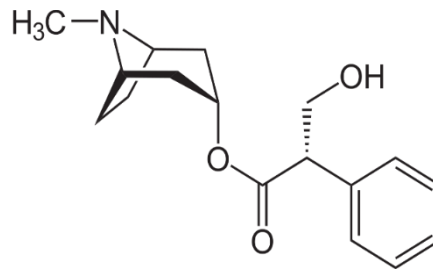
Fonte: O próprio autor

3.4.2 Biossíntese dos metabólitos secundários

3.4.2.1 Alcaloides

Por definição, os alcaloides são compostos orgânicos que apresentam um nitrogênio no seu anel heterocíclico como indólicos, piridina e benzilisoquinolínico, e protoalcaloides para classificar aqueles que possuem um nitrogênio na sua estrutura alifática que vem da rota dos aminoácidos (ROBINSON, 1974). Formam sais com ácidos, por exemplo o ácido quínico ou mecônico. Podem ser encontrados em combinação com açúcares, como a solanina, ou como ésteres ou amidas. Os alcaloides estão presentes em muitas plantas, mas também podem ser encontrados no reino animal. Estão presentes nas famílias Apocynaceae, Asteraceae, Berberidaceae, Fabaceae (Leguminosae), Lauraceae, entre outras (PELLETIER, 1983).

FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ALCALOIDE ATROPINA



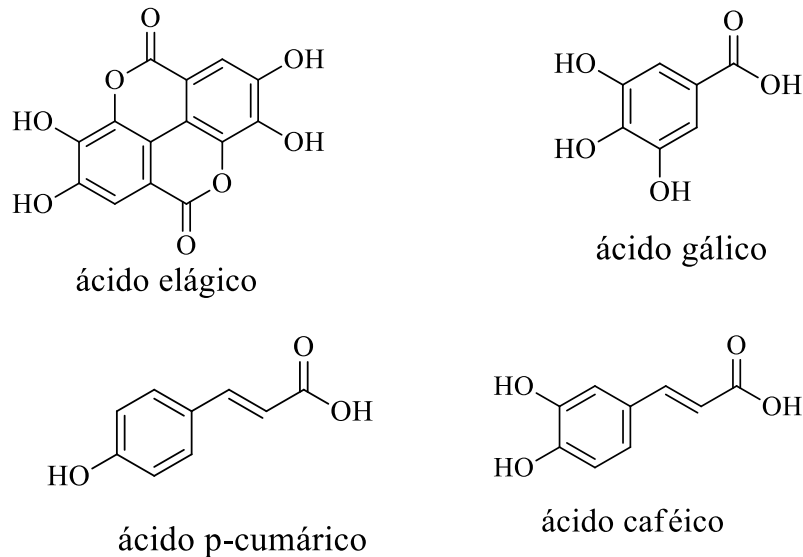
FONTE: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Atropine>

3.4.2.2 Compostos fenólicos

Abrangem muitos metabólitos secundários vindos de diferentes rotas metabólicas destacando-se aqueles vindo da rota do acetato, que além de formarem fenóis, produzem prostaglandinas e antibióticos macrolídeos juntamente com vários ácidos graxos. Da mesma forma a via do ácido chiquímico leva a formação de uma variedade de fenóis (DEWICK, 2002).

Esses metabólitos secundários estão presentes em fontes vegetais e podem ser classificados em dois grupos: os flavonoides e os não-flavonoides. Os flavonoides incluem aqueles que são descritos como C₆-C₃-C₆, por exemplo: a catequina, epicatequina, caempferol, quercetina, miricetina e antocianinas. O outro grupo pertence aos ácidos fenólicos hidroxibenzóicos como o gálico e o elágico e os hidroxicinâmicos como cafeico e p-cumárico, ou seja, que apresentam estruturas C₆-C₁ e C₆-C₃ respectivamente. Além disso, também está incluso o polifenol resveratrol que faz parte da classe dos estilbenos (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; ABE *et al.*, 2007).

FIGURA 5 - COMPOSTOS FENÓLICOS



FONTE: Dewick (2002)

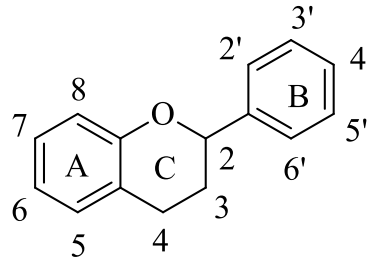
3.4.2.3 Flavonoides

São uma classe de compostos com baixo peso molecular e que possuem em sua estrutura polifenóis e um oxigênio em um anel heterocíclico. Representam uma grande classe dos metabolitos secundários com mais de 10.000 estruturas. Vários estudos enfatizam esses compostos com propriedades antioxidantes, pois suas hidroxilas são altamente reativas doando elétrons para os radicais livres que são produzidos por um estresse oxidativo nas células. Os radicais livres têm uma devida importância pois estão associados a diversas doenças como osteoartrite, câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas entre outras (BANJARNAHOR; ARTANTI, 2015; AGATI *et al.*, 2012).

Matos e Fernandes (2005) descrevem que a capacidade antioxidante dos flavonoides está atrelada ao grupo catecol no anel B favorecendo uma alta estabilidade aos radicais aroxilo, além da deslocalização dos elétrons no anel B com a ligação C₂-C₃ da estrutura 4-oxo (FIGURA 6). A presença de hidroxilas no anel B e no carbono 3 nos flavonoides dão característica mais pronunciada como antioxidante. Além disso, essa classe de compostos são bons agentes quelantes metálicos e com

boa capacidade para a prevenção da peroxidação lipídica (MATOS e FERNANDES, 2005).

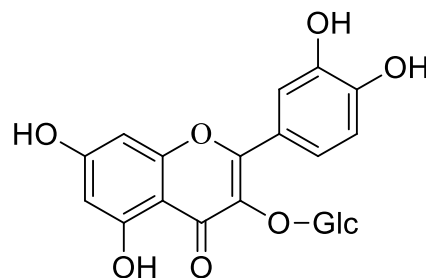
FIGURA 6 - ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONOIDES



FONTE: Banjarnahor; Artanti. (2015)

Um dos flavonoides de grande potencial químico e farmacológico é a quercetina (FIGURA 7), que age como um excelente antioxidante devido a suas hidroxilas no anel B capaz de quelar com os íons de Cu e Fe reduzindo as espécies reativas de oxigênio (AGATI *et al.*, 2012). Estudos com a quercetina mostram que a conformação planar do anel B com as hidroxilas é essencial para a doação de elétrons através da deslocalização dos elétrons no sistema π conjugado sobre toda a estrutura (MOALIN *et al.*, 2011).

FIGURA 7 - ESTRUTURA QUIMICA DA QUERCETINA



FONTE: Agati *et al.* (2012).

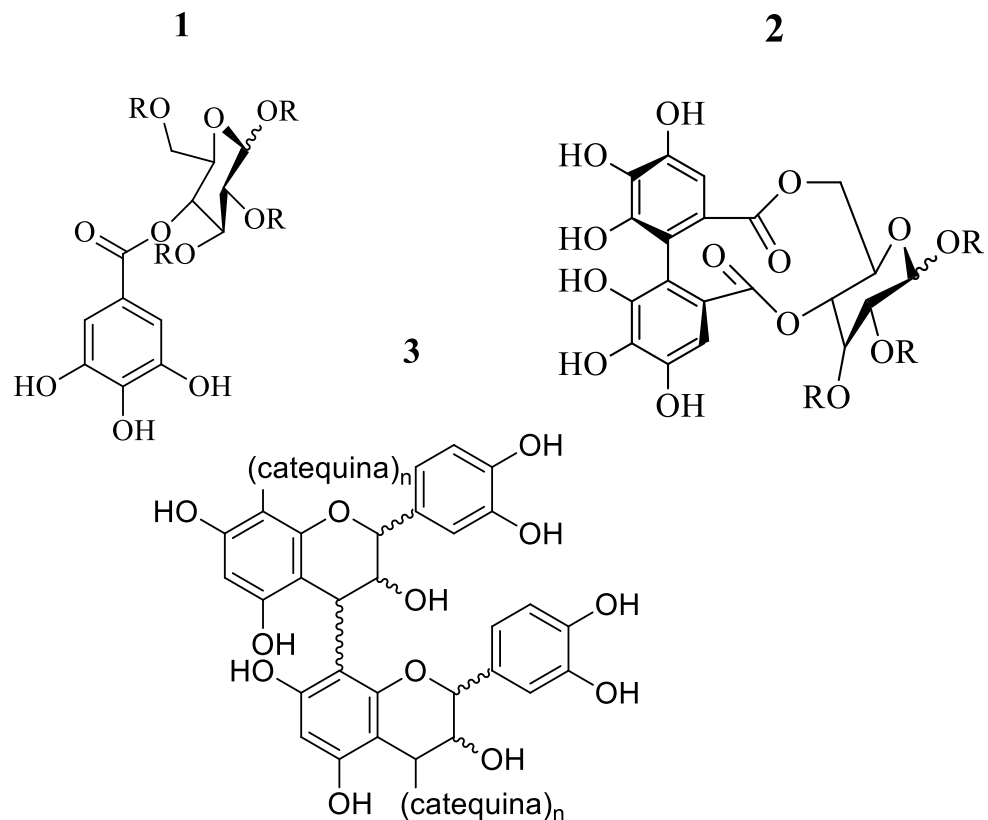
3.4.2.4 Taninos

Taninos são compostos polifenólicos que estão divididos em taninos condensados (derivados a partir de flavonoides) e taninos hidrolisáveis. Taninos hidrolisáveis são aqueles que podem ser quebrados hidroliticamente ao ser tratado

com água quente ou por tanases (enzimas que catalisam reações químicas) e representados pelos galotaninos (1) e elagitaninos (2), polímeros derivados dos ácidos gálico ou elágicos. Os taninos condensados são proantocianidinas oligoméricas não hidrolisáveis representados pela catequina (3), esses compostos são responsáveis por dar características adstringentes aos alimentos e bebidas, podendo favorecer a defesa das plantas contra herbívoros tornando-os indesejáveis ao paladar (BERNARDES et al., 2013; KHANBABAEE E VAN REE, 2001, DEWICK, 2002).

São compreendidos por apresentarem boa solubilidade em água e podem formar complexos insolúveis com proteínas, gelatinas e alcaloides. Na medicina tradicional podem ser utilizados no tratamento de diarreia, queimaduras e inflamações (ARAÚJO *et al.*, 2006; MONTEIRO *et al.*, 2005). Estudos sugerem que taninos isolados da casca do cajueiro possuem atividade antibacteriana sobre as linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes (PEREIRA *et al.*, 2015).

FIGURA 8 - TANINOS CONDENSADOS E HIDROLISÁVEIS

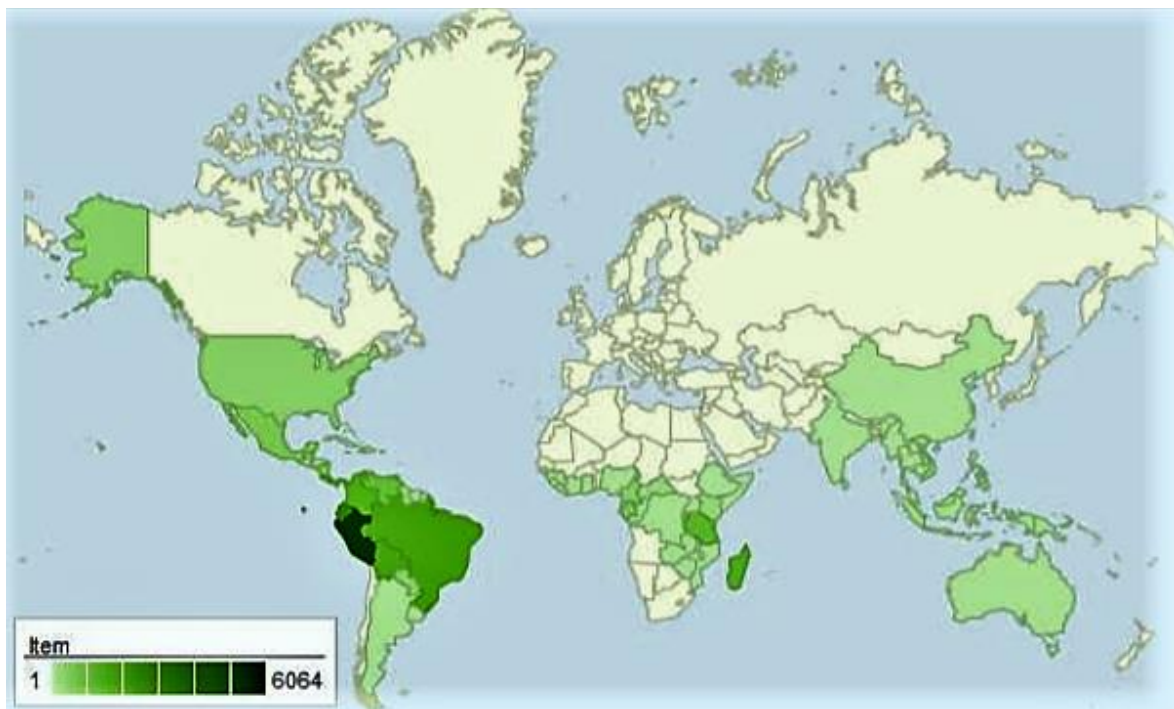


FONTE: Khanbabaee e Ree (2001)

3.5 FAMILIA ANNONACEAE

Foi catalogada por Jussieu em 1789 (HUTCHINSON, 2004), pertence a ordem Magnoliales e é considerada a maior família (APG III, 2009), compreende cerca de 135 gêneros e mais de 2.500 espécies distribuídas na América do Sul, América Central, África e Ásia (CHATROU *et al.*, 2004). No Brasil, há 29 gêneros e 386 espécies diversificadas na Amazônia, Mata Atlântica e Cerrado (LOPES; MELLO-SILVA, 2014).

FIGURA 9 - DISTRIBUIÇÃO DA FAMILIA ANNONACEAE NO MUNDO



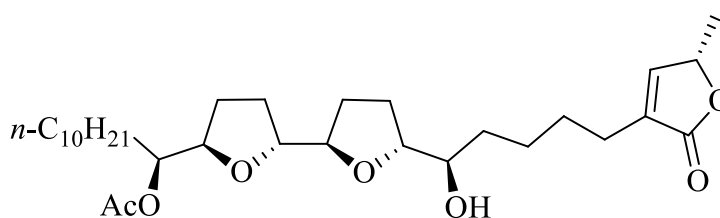
FONTE: Missouri Botanical Garden 2015 – *apud* Rodrigues (2016).

A família Annonaceae é classificada em quatro subfamílias: Anaxagoreoideae, Ambavioideae, Annonoideae e Malmeoideae. Os gêneros mais representativos da flora brasileira pertencem a subfamília Annonoideae que inclui a *Annona*, *Duguetia*, *Guatteria* e *Xylopia* (MAAS, 2009; LOPES; MELLO-SILVA, 2014). No aspecto econômico as espécies mais relevantes para o comércio são: Atemoia (híbrido de *Annona cherimola* x *Annona squamosa*), *Annona cherimola* (Cherimola), *Annona muricata* (Graviola) e *Annona squamosa* (Pinha), devido aos seus frutos comestíveis de sabor agradável, açucarados e ligeiramente ácidos (PROHORT, 2013).

Esta família é rica na biodiversidade de substâncias em extratos vegetais tais como alcaloides, flavonoides e terpenoides e principalmente diterpenos (SILVA *et al.*, 2009) e os seus óleos essenciais apresentam monoterpenos e sesquiterpenos (LEBOEUF *et al.*, 1980). Além disso, são reportados a presença de carboidratos, lipídios, ácido graxos, saponinas entre outros (ANDRADE *et al.*, 2001; BRITO *et al.*, 2008; LUNA, 2006). Estudos com plantas dessa família tem se intensificado devido a presença de acetogeninas, uma classe de compostos que apresentam atividade anti-tumoral, citotóxica e pesticida (CHEN *et al.*, 2012).

As acetogeninas constituem uma classe única de compostos de metabólitos secundários advindos da série da via dos policetídeos com 35 ou 37 carbonos, com um anel γ -lactona e com várias funções oxigenadas como grupos hidróxi, cetona, epóxido, tetra-hidrofurano (THF) e tetra-hidropirano (THP), além disso possuem ligações duplas e triplas. A primeira acetogenina isolada foi a Uvaricina (FIGURA 10) em 1982 por Jolad a partir das raízes da *Uvaria acuminata* Oliv. e apresentou excelente bioatividade para a leucemia linfocítica P-388 em camundongos. A partir daí muitas acetogeninas foram isoladas e identificados em diferentes partes de plantas anonáceas e principalmente de sementes (LIAW *et al.*, 2016).

FIGURA 10 - ESTRUTURA QUÍMICA DA UVARICINA



FONTE: Liaw *et al.* (2016)

Diversas espécies da família Annonaceae tem sido relatada por apresentar potencial inseticida, estando distribuídas em 42 espécies e 14 gêneros. Destaca-se as espécies *Annona muricata* (graviola) e *Annona squamosa* (pinha), que tem sido alvo de estudos com atividade inseticida (KRINSKI; MASSAROLI; MACHADO, 2014).

3.5.1 Gênero Annona

Cerca de 200 espécies estão distribuídas nos trópicos das Américas e África, do qual o gênero faz parte da tribo Annoneae. Com 44 espécies reconhecidas do gênero *Rollinia* agora fazem parte filogeneticamente do gênero *Annona* (RAINER, 2007). No Brasil, a sua biodiversidade pode ser encontrada na Caatinga, Cerrado, Mata Amazônica e Pantanal com a ocorrência de 82 espécies. No Pantanal 11 espécies estão representadas pelas *Annonas*. No cerrado, encontra-se as *Annonas crassiflora* e *coriacea*, com suas árvores tortuosas, com grandes frutos e comestíveis (LOPES; MELLO-SILVA, 2014).

As *Annonas* configuram um gênero com grande importância na descoberta de novos fármacos e cosméticos (ALMEIDA; SANTOS, 2018) devido à presença de metabólitos secundários com propriedades terapêuticas. Estudos relatam atividades biológicas, como atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana (ALMEIDA *et al.*, 2014), antitumoral (LIMA; PIMENTA; BOAVENTURA, 2010), antinociceptiva, anti-inflamatória (SIEBRA *et al.*, 2009) e antinociceptiva (CHAVAN; WAKTE; SHINDE, 2010).

3.5.1.1 *Annona squamosa* L.

É uma árvore de pequeno porte, que possui frutos comestíveis tipicamente globulares ou em um formato de coração com um diâmetro de aproximadamente 12 cm e peso de 150 g aproximadamente. Os frutos são formados através da união de muitos ovários amadurecidos e o receptáculo, que se dividem em segmentos maduros apresentando uma polpa branca ou cremosa com suas sementes pretas (FIGURA 11) (ANDRADE *et al.*, 2001).

FIGURA 11 - FRUTOS da *Annona squamosa* (ata)

Fonte: <http://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Annona+squamosa>

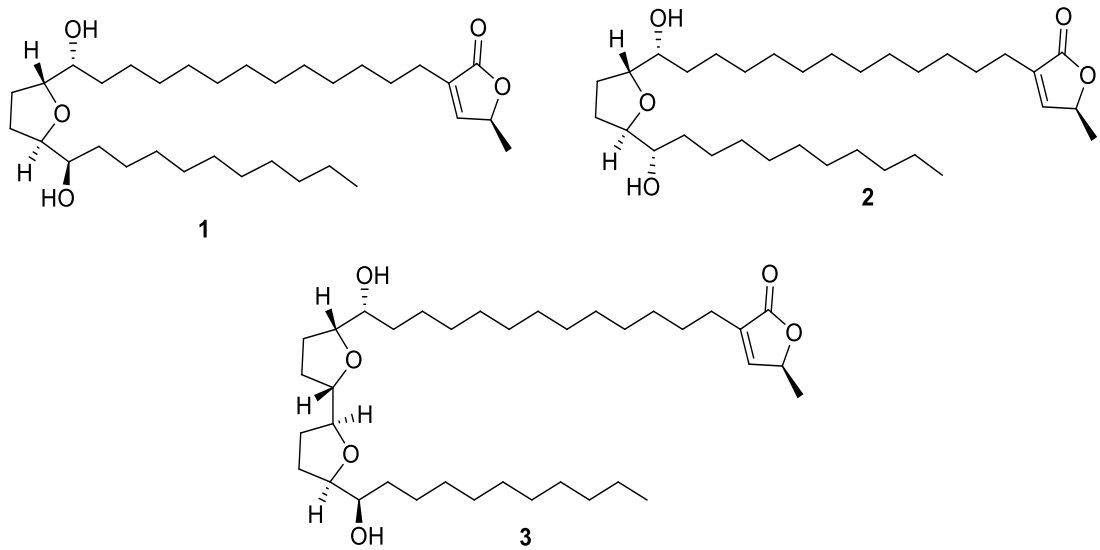
Legenda: A) formato globular B) aberta com polpa branca e sementes

A espécie *Annona squamosa* dispõe de uma vasta gama de metabólitos secundários já identificados, que contribuem com as suas propriedades farmacológicas, dentre eles: alcaloides, flavonoides, acetogeninas, e no óleo essencial sesquiterpenos, sesquiterpenos oxigenados e diterpenos (SAXENA *et al.*, 1993; KOTKAR *et al.*, 2002; CHAVAN, 2006).

Vila-nova *et al.* (2011) em seus estudos isolaram os constituintes químicos das folhas da *Annona squamosa* que levou a identificação do alcaloide benzilisoquinolinico O-metilarmepavina, e em seu extrato metanólico uma acetogenina bistetrahydrofurano C₃₇ trihidroxi adjacente, um composto já isolado das sementes da espécie.

Vários estudos foram realizados com a extração de compostos orgânicos das sementes dessa espécie. Nesses estudos foram identificados as acetogeninas Annotemoyina-1, Annotemoyina-2 e squamocina (FIGURA 12), no qual apresentam uma atividade antimicrobiana e citotóxica (RAHMAN *et al.*, 2005). Em outros estudos também se revelou a presença desses compostos, a 12-15-cis-squamostatina e bulatacina, sugerindo que estes são os principais compostos bioativos do extrato. Intensas pesquisas tem sido realizada quanto as atividades farmacológicas frente as linhagens tumorais (CHEN *et al.*, 2012).

FIGURA 12 - ACETOGENINAS ANNOTEMOYINA-1 (1), ANNOTEMOYINA-2 (2) E SQUAMOCINA (3)



FONTE: Rahman *et al.* (2005)

Doze acetogeninas diferentes quanto a estereoquímica e configuração foram testadas sobre a inibição do crescimento de linhas celulares SMMC-7541, SGC-7901, MCF-7 e A-5408, usando o ensaio MTT. Os resultados relevaram que algumas acetogeninas foram mais ativas do que outras devido a sua configuração e estereoquímica (YANG *et al.*, 2009).

Já nos experimentos de Chandrashekar e Kulkarni (2011) identificaram-se diferentes compostos em diferentes frações. Na fração de éter de petróleo identificou-se esteroides, glicosídeos e compostos fenólicos, além disso a fração clorofórmica apresentou triterpenos, e na fração metanólica e aquosa identificou-se alcaloides, flavonoides, saponinas e compostos fenólicos.

Chavan, Shinde e Nirmal (2006) extraíram os constituintes do óleo essencial da casca da *A. squamosa* obtido por destilação a vapor e verificou que houve uma mistura de compostos de sesquiterpenos (19,38%), sesquiterpenos oxigenados (33,02%) e diterpenos (19,13%), onde o óxido de cariofileno foi o constituinte majoritário do óleo (29,38%).

3.5.1.1. Atividades biológicas da *A. squamosa* L.

Vários autores relatam a espécie *A. squamosa* L. com propriedades farmacológicas bastante promissoras. Saxena *et al.* (1993) em suas pesquisas

verificaram que os alcaloides isolados do extrato da espécie foram tóxicos para as larvas de *Anopheles stephensi* nas concentrações de 20 a 200 ppm. Verificou-se que houve a mortalidade das larvas, das pulpas e diminuição da taxa de fecundidade dos mosquitos fêmeas. Em estudos anteriores já haviam comprovado a eficiência de alcaloides quanto a sua atividade inseticida, por eles apresentarem uma certa toxicidade aos insetos.

Outra classe de compostos encontrados na espécie são os flavonoides e estes já foram identificados como agentes antimicrobianos e pesticidas. Com base nesse conhecimento, Kotkar *et al.* (2002) comprovaram essa atividade através dos flavonoides dispostos no extrato aquoso das folhas contra o inseto *Callosobruchus chinensis*. A atividade inseticida apresentou mortalidade de 0,07 mg mL⁻¹ com 80% e 0,09 mg mL⁻¹ com 100%.

Shad e Andrew (2017) relataram a atividade larvicida do extrato etanólico da *A. squamosa* frente ao mosquito vetor da filariose, *Culex quinquefasciatus*. Diante disso, observaram que houve a mortalidade das larvas nas concentrações do extrato de 2, 4, 6, 8, e 10 mg mL⁻¹ após a exposição de 24 horas registrando a mortalidade em 20, 30, 50, 68 e 100% respectivamente.

O extrato de éter de petróleo e o constituinte químico óxido de cariofileno isolado da casca de *A. squamosa* L. foram investigados quanto as suas atividades analgésicas e anti-inflamatórias. A ação anti-inflamatória do óxido de cariofileno foi observado nas doses de 12,5 e 25 mg kg⁻¹ por massa corporal e o extrato de 50 mg kg⁻¹ nas primeiras horas de administração. Avaliação dos resultados mostraram se promissores como analgésico e anti-inflamatório (CHAVAN; WAKTE; SHINDE, 2010).

A leishmaniose visceral é uma doença endêmica causada pelo protozoário *Leishmania chagasi*. Vila-Nova *et al.* (2011) testaram a atividade leishmanicida de duas espécies Anonáceas, *Annona muricata* e *Annona squamosa* L., frente duas formas de protozoários, promastigotas e amastigotas. O extrato das folhas de *Annona squamosa* e sementes de *Annona muricata* foram obtidos e os seus alcaloides (*Annona squamosa* L.) e acetogeninas (*Annona muricata*) isolados. O alcaloide apresentou concentração inibitória de 23,3 µg mL⁻¹ e as acetogeninas 25,9 a 37,6 µg mL⁻¹ contra as promastigotas e amastigotas 13,5 a 28,7 µg mL⁻¹. Podendo-se concluir que as espécies possuem um potencial como agentes leishmanicidas.

Vivek *et al.* (2012) sugeriram estudos com nanopartículas e avaliaram o efeito citotóxico *in vitro* em células de câncer de mama (MCF-7), células epiteliais de mama

normal (HBL-100). As nanopartículas exibiram uma citotoxicidade de dose-independente de concentração inibitória (CI_{50}) de 50, 30 $g mL^{-1}$ e 80 e 60 $g mL^{-1}$ em 24 e 48 horas, respectivamente.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAL VEGETAL

As folhas de *A. squamosa* foram coletadas no *Campus* Petrônio Portella da Universidade Federal do Piauí -UFPI, sob as coordenadas: 5°03'17,7"S; 42°47'25,0"W, no período de março a julho de 2018. Um Voucher HAF com o número 04612 foi obtida do herbário Afrânio Gomes Fernandes na Universidade Estadual do Piauí (UESPI) e identificada pelo Prof^o Dr. Francisco Soares Santos Filho. O acesso ao patrimônio genético está registrado sob o número A166F6D.

4.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

As folhas de *A. squamosa* foram secas em estufa a 40 °C, durante 48 h de acordo com a metodologia proposta por Campos et al. (2014). Após a secagem, as folhas foram trituradas, pesadas e a cerca de 650 g das folhas foram submetidas a um sistema de hidrodestilação do tipo *Clevenger*, por cerca de 3 horas para a extração do óleo essencial. O OEAS obtido foi separado da fase aquosa com diclorometano, coletado e armazenado em frasco âmbar e mantido sob refrigeração.

4.3 ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL

A análise do óleo foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) no equipamento da SHIMADZU, modelo GCMS-QP2010 SE. A programação de aquecimento do forno cromatográfico estabelecida foi de 40 °C (1 min) → 3 °C/min até 80 °C (0 min) → 20 °C/min até 100 °C (0 min) → 1,5°C/min até 140 °C (1 min). Os parâmetros instrumentais utilizados foram: temperatura do injetor de 250 °C; modo de injeção *split* de 1:10; vazão volumétrica da fase móvel (Hélio) de 0,59 mL/minuto; temperatura da interface de 300 °C; análises realizadas no modo SCAN em uma faixa de 18 a 400 m/z (em intervalos de 0,5 s e com energia de ionização de 70 eV); temperatura do detector de 250 °C.

4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO

As folhas da *Annona squamosa* foram secas em estufa, a 40 °C, durante 48 h. Após a secagem, as folhas foram trituradas em moinho de facas, pesadas e submetidas à extração por maceração em álcool etílico (cerca de 700 g em 2,0 L) por três vezes. Cada extração teve duração de 72 horas. Após a filtração, a solução extrativa foi concentrada em um rotaevaporador rotativo e a água residual foi removida por liofilização.

4.5 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

A análise preliminar dos metabólitos secundários presente no extrato etanólico da *A. squamosa* foi investigado e os testes qualitativos empregados seguiu a metodologia preconizadas por Soares *et al.* (2016) e Yusuf *et al.* (2004). Para isso realizou-se ensaios que envolviam reações químicas com mudança de coloração e formação de precipitado e Cromatografia em Camada Delgada. Nessa prospecção foram investigados: alcaloides, taninos, flavonoides, triterpenos, saponinas e cumarinas.

4.5.1 Alcaloides

Para a identificação de alcaloides foi utilizado o método do reagente de Dragendorff. Uma alíquota do extrato etanólico foi aplicada na placa de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), onde a placa foi eluída com etanol. Em seguida borrifou-se o reagente de Dragendorff na placa e aguardou-se a aparição de uma coloração alaranjada indicativa de alcaloides.

4.5.2 Taninos

Utilizou-se 10 mg do extrato etanólico e diluiu-se com 2,0 mL de metanol. Logo em seguida, adicionou-se 5,0 mL de água destilada e a solução resultante foi filtrada e acrescentado 5,0 gotas de solução de cloreto férrico a 10% (FeCl₂). Esperou-se

ocorrer a reação com a formação de precipitado com coloração azul (taninos hidrolisáveis) e/ou esverdeado (taninos condensados).

4.5.3 Flavonoides

Para a identificação de flavonoides, 10 mg de EEAS foram adicionados em um tubo de ensaio e acrescido com 2,0 mL de metanol. Em seguida, adicionou-se raspas de fita de magnésio e 5,0 gotas de ácido clorídrico (HCl) concentrado. O indicativo de flavonoides é identificado através da reação química com mudança de coloração para rósea.

4.5.4 Triterpenos

Uma alíquota de 2,0 mL do EEAS foi transferida para um béquer de 100 mL, e após evaporação do solvente em banho-maria, adicionou-se 3,0 mL de clorofórmio com leve agitação. Em seguida, a solução clorofórmica foi transferida para um tubo de ensaio. Após filtração, adicionou-se 1,0 mL de anidrido acético ($C_4H_6O_3$) e agitou-se levemente. Posteriormente, adicionou-se 4,0 gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado pelas paredes do tubo. A coloração marrom na parte inferior indica a presença de triterpenoides.

4.5.5 Saponinas

As saponinas foram identificadas a partir de 10 mg do extrato etanólico, colocados em tubo de ensaio e diluído com 2,0 mL de etanol. Em seguida, foram adicionados 5,0 mL de água fervente. Após resfriamento, agitou-se vigorosamente e deixou-se em repouso por 20 minutos. A formação de espuma é indicativa da presença de saponinas.

4.5.6 Cumarinas

Pesou-se 10 mg de EEAS e adicionou-se em um tubo de ensaio e colocou-se 4,0 mL de metanol. Em seguida, o tubo foi tampado com papel-filtro molhado com uma solução de hidróxido de sódio 10% (NaOH), e foi levado a banho-maria com temperatura de 100 °C por 5 minutos. Logo depois, retirou-se o papel filtro colocou-se

sob luz ultravioleta (UV). A presença de cumarinas é verificada através da cor fluorescente esverdeada.

4.5.7 Quinonas

Colocou-se 10 mg do extrato em um tubo de ensaio juntamente com 2,0 mL de metanol. Logo em seguida, adicionou-se 5,0 mL de clorofórmio com agitação e deixou-se em repouso por 15 minutos. Em seguida, foi recolhido num tubo de ensaio a fase clorofórmica e adicionou-se 1,0 mL de solução de NaOH a 5%. O Aparecimento de coloração roxa é indicativo de quinonas.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

4.6.1 Determinação do teor de fenóis totais

O teor de fenóis do extrato da *Annona squamosa* foi determinado por meio do ensaio de Follin-Ciocalteu descrita por Tambe e Bhambar (2014). Inicialmente, adicionou-se nos tubos de ensaios, 100 µL da amostra (2 mg/mL), 900 µL de água destilada e 100 µL do reagente de Follin-Ciocalteu, agitou-se a mistura. Após 5 minutos, 1 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 7%, ao final adicionou-se 5 mL de água destilada. Incubou-se por 40 min a temperatura ambiente e as absorbâncias foram lidas a 500 nm em um espectrofotômetro Ultravioleta (UV) /Visível. Uma solução padrão de ácido gálico foi utilizado como referência (40, 80, 120, 160, 200 µg/mL) nas mesmas condições descritas anteriormente. O teor de fenóis totais foi expresso em mg de GAE g⁻¹ de extrato. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.6.2 Determinação do teor de flavonoides

O teor de flavonoides foi analisado através do ensaio colorimétrico de Cloreto de alumínio (AlCl_3) descrita por Tambe e Bhambar (2014). O ensaio consistiu em adicionar em tubos de ensaios 500 µL de extrato (5 mg/mL), 2 mL de água destilada, 150 µL de nitrito de sódio a 5% (NaNO_2), após 5 min adicionou-se 150 µL de AlCl_3 a 10%, após 5 min 1 mL µL de Hidróxido de sódio 1M (NaOH) e completou-se o volume final com água destilada para 5 mL. Logo em seguida, realizou-se as leituras a 510

nm no espectrofotômetro Ultravioleta (UV) /Visível. Uma solução padrão de quercetina foi utilizado como referência (40, 80, 120, 160, 200 µg/mL) nas mesmas condições descritas anteriormente. O teor de flavonoides foi expresso em mg de QE g⁻¹ de extrato. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.5.3 Determinação do teor de taninos condensados

O teor de taninos condensados foi determinado usando a metodologia descrita por Broadhurst e Jones, 1978, utilizando vanilina. A mistura reacional consistiu em adicionar nos tubos de ensaio 500 µL de amostra (0,7 mg/mL), 1,5 mL de vanilina metanólica a 2% juntamente 750 µL com ácido sulfúrico (70%) recém preparado. As amostras foram lidas a 510 nm no espectrofotômetro Ultravioleta (UV) /Visível. Uma solução padrão de catequina foi utilizada como referência (40, 80, 120, 160, 200 µg/mL) nas mesmas condições descritas anteriormente. O teor de taninos condensados expresso em mg de CTQ g⁻¹ de extrato. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.6.3 Determinação do teor de taninos hidrolisáveis

O teor de taninos hidrolisáveis foi avaliado por meio do método de Follin-Ciocalteu. 100 µL de amostra (0,5 mg/mL) foi adicionado a tubos de ensaio, contendo 5 mL de água destilada e 500 µL do reagente de Follin-Ciocalteu, 1 mL de solução de Na₂CO₃ a 20%. Agitou-se bem e incubou-se por 30 min. As amostras foram lidas a 725 nm no espectrofotômetro Ultravioleta (UV) /Visível. Uma solução padrão de Ácido Tânico foi utilizada como referência (40, 80, 120, 160, 200 µg/mL) nas mesmas condições descritas anteriormente. O teor de taninos hidrolisáveis expresso em mg de ATG g⁻¹ de extrato. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.6.4 Determinação do teor de alcaloides

A determinação do teor de alcaloides seguiu o método descrito por Ajanal, Gundkalle e Nayak (2012). Inicialmente pesou-se 10 mg do extrato e dissolveu-se em 1 mL de etanol. Essa solução foi tratada com 1 mL de 2N HCl e filtrou-se. Essa solução

foi transferida para um funil de separação e adicionou-se 5 mL de solução de verde de bromocresol (3 mL de 2N NaOH e 69,8 mg de verde de bromocresol dissolvidos em um balão de 1L) e 5 mL de tampão fosfato de sódio 2 M pH 4,7 (preparou-se 1 L de ácido cítrico a 0,2 M para ajustar o pH). A mistura foi agitada com 1, 2, 3 e 4 mL de clorofórmio consecutivamente e coletadas em tubos de ensaio. As amostras foram lidas a 470 nm no espectrofotômetro Ultravioleta (UV) /Visível. Uma solução padrão de Atropina foi utilizada como referência, onde uma solução foi preparada na concentração de 200 µg/mL e retiradas alíquotas de 0,2, 0,6, 1,0, 1,4 mL e transferido para diferentes funis de separação. Em seguida, adicionou-se 5 mL de solução tampão de fosfato pH 4,7 e 5 mL de solução de verde de bromocresol e a mistura agitada com com 1, 2, 3 e 4 mL de clorofórmio consecutivamente e coletadas em tubos de ensaio. Um branco foi feito nas mesmas condições. O teor de alcaloides foi expresso em mg de AE g⁻¹ de extrato. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.7 BIOENSAIO LARVICIDA

As larvas de *A. aegypti* foram obtidas a partir de mosquitos adultos, provenientes de Teresina-PI, mantidos em colônia semifechada no Laboratório de Parasitologia e Entomologia Sanitária (LAPES-UFPI), a 28±1°C e 70±10% UR. Os adultos são alimentados com solução açucarada concentrada e as fêmeas realizam o repasto sanguíneo em camundongos. As larvas são alimentadas com ração de peixe triturada durante toda fase evolutiva. A manutenção da colônia de mosquitos seguiu os parâmetros de biossegurança para insetários da Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ (SILVA H.; SILVA I.; LIRA, 1998).

Para o teste com o OEAS, sessenta larvas 3^a e 4^a estádios foram selecionadas e distribuídas igualmente em cada pote, contendo 0, 20, 40, 60, 80 e 100 ppm do óleo essencial, a partir de diluições seriadas, no volume final de 20 mL em Tween 20 0,02% (v/v) em água desclorada. O óleo essencial foi preparado com Tween 20 a 0,02% (v/v), afim de melhorar a solubilidade do óleo. Foram avaliados a ação larvicida da *A. squamosa* após 48 h de contato direto com as larvas. Da mesma forma procedeu-se com o EEAS nas concentrações 0, 50, 100, 200 e 500 ppm, onde o extrato foi solubilizado em etanol 1%. Os bioensaios foram realizados em triplicata. Após a

exposição, contou-se o número de larvas mortas e a concentrações letal que mata 50% das larvas (CL_{50}) foi avaliada utilizando regressão por análise em log dose-probit, com o intervalo de confiança de 95%, realizados através do programa SPSS 16.0.

Após as 48 horas, novas larvas foram adicionadas nas diferentes concentrações por mais 48 horas, afim de se verificar o efeito residual do óleo essencial.

4.8 TESTE DE TOXICIDADE FRENTE *Artemia salina* L.

Artemia salina L. é um microcrustáceo de água salgada e que são utilizados para alimentar os peixes. Os seus ovos são comercializados em lojas que vendem comida para peixes e que podem permanecer no seco por muito tempo. Após o contato com água salgada, os seus ovos eclodem com 48 horas dando origem a várias larvas ou náuplios.

O ensaio com *Artemia salina* L. foi realizada seguindo a metodologia descrita por Meyer (1982), os ovos de *A. salina* foram colocados em água salina artificial por 48 horas até a eclosão e atingirem o estágio de náuplios, em seguida foram transferidas para tubos de ensaio, ficando 10 náuplios em cada tubo. O ensaio com o OEAS e o EEAS foi realizado em triplicata, contendo a solução salina nas seguintes concentrações: 0, 1, 25, 50, 100, 250 500, 1000 ppm. Após 24 horas de exposição, contou-se o número de mortos. A análise estatística foi expressa em CL_{50} (concentração letal que mata 50% dos náuplios), com intervalo de confiança de 95%, por regressão em análise em log dose-probit, realizados através do programa *Graph Pad Prism 6.0*.

4.9 INIBIÇÃO QUANTITATIVA DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

O princípio consiste em medir a taxa de produção da tiocolina. A acetiltiocolina (análogo da acetilcolina) é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase formando a tiocolina e acetato. A tiocolina produzida reage com o DTNB produzindo o ânion amarelo ácido 5-tio-2-nitrobenzóico que pode ser medido em espectrotômetro a 412 nm (CHOUDHARY *et al.*, 2003).

A atividade inibitória foi medida utilizando o ensaio em microplaca de 96 poços descrito por (DOHI; TERASAKI; MAKINO, 2009) juntamente com (MACHADO *et al.*, 2015) com algumas modificações. Primeiramente, adicionou-se 25 µL da amostra do óleo e extrato, em seguida 50 µL do tampão B e 25 µL de 0,22 U/mL da enzima AChE e encubou-se a 37 °C por 15 min. Depois do período de incubação, adicionou-se 125 µL de DTNB 3 mM e 25 µL de ATCI 15 mM. Logo após, realizou-se a primeira leitura no leitor de microplaca, a primeira leitura foi considerada como o tempo de 0 min, e após 5 min realizou-se uma nova leitura. A absorbância foi medida a 405 nm usando um leitor de microplacas (marca Celer, modelo Polaris). O controle foi realizado utilizando 25 µL de metanol ao invés do óleo e seguindo os outros procedimentos. As concentrações utilizadas foram 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10 mg/mL. O óleo foi diluído em 10% de metanol em tampão A. A Rivastigmina foi utilizada como controle positivo nas concentrações 0, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10 µg/mL.

A concentração que inibi 50% da enzima foi calculada (CI_{50}), com intervalo de confiança de 95%, por regressão em análise em log dose-probit, realizados através do programa Graphpad prism 6. Calculou-se a porcentagem de inibição através da equação: %inibição = $100 - (A_{amostra} - A_{controle}) \times 100$.

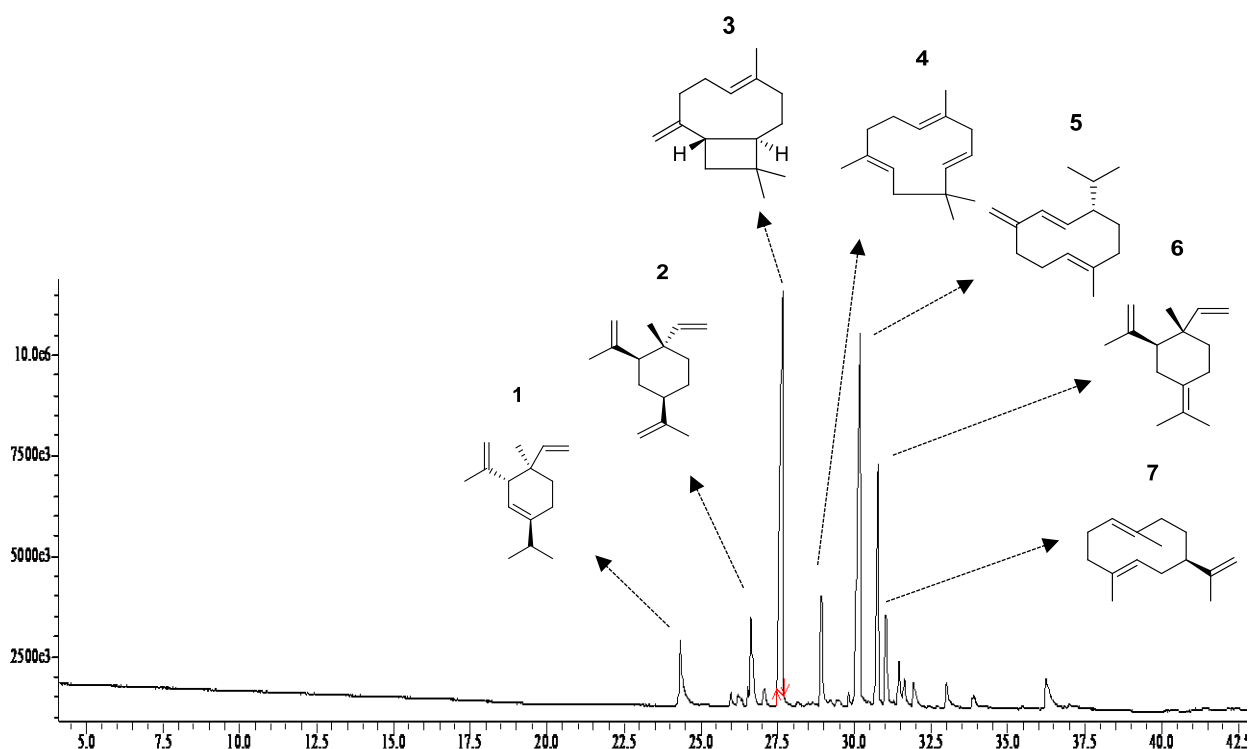
Onde, $A_{amostra}$ é a variação das médias das absorbâncias medidas da amostra no tempo 0 e 5 min e $A_{controle}$ é a variação das médias absorbâncias medidas do controle no tempo 0 e 5 min.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial extraído das folhas de *Annona squamosa* apresentou coloração amarelo escuro, e um rendimento de 0,11%. O perfil cromatográfico revelou sete compostos (FIGURA 13), representando 84,78% do rendimento total do óleo, sendo todos os compostos sesquiterpenos. Os compostos majoritários do OEAS foram o trans-cariofileno (25,53%), germacreno D (22,70%) e o γ -elemeno (14,86%) como mostra a TABELA 1.

FIGURA 13 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DA *Annona squamosa*.



O trans-cariofileno (3) é um sesquiterpeno bicíclico e que contém um anel ciclobutano característica incomum aos compostos de produtos naturais (NCBI, 2019) e que apresenta várias atividades já relatadas, dentre elas atividade antiparasitária, citotóxica (LEITE et al., 2013), anti-inflamatória, antitumoral e antibactericida (JUNIOR e PINTO, 2002). O trans-cariofileno pode ser encontrado em muitos óleos essenciais.

No geral, é encontrado na forma de mistura de isômeros como o isocariofileno e o α -humuleno (antigamente α -cariofileno).

TABELA 1 - CONSTITUINTES QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DA *Annona squamosa*.

Sinal	Tempo de Retenção (minutos)	Constituinte Químico	Abundância Relativa (%)
1	24,339	δ - Elemeno	4,00
2	26,638	β - Elemeno	5,47
3	27,656	Trans - Cariofileno	25,53
4	28,923	α – Humuleno	6,73
5	30,187	Germacreno D	22,70
6	30,779	γ – Elemeno	14,86
7	31,026	Germacreno A	5,49
Total			84,78

FONTE: O próprio autor

Vários trabalhos já relataram estudos sobre a composição química do OEAS e estes sugerem que há uma invariabilidade na abundância dos compostos, que são influenciados de acordo com a localização. Campos *et al.* (2014) identificaram dez compostos sendo os majoritários a saber: o trans-cariofileno (28,71%), α -cariofileno (14,46%) e o canfeno (18,10%) de uma espécie coletada no Brasil, divergindo com o resultado do nosso estudo, que não foi identificado o canfeno. O germacreno D descrito em nossos estudos não foi identificado no trabalho desenvolvido por Campos *et al.* (2014). Em contrapartida, os óleos essenciais extraídos da planta coletada em outros países identificaram uma variedade de constituintes, com abundância de monoterpenos, sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados (JOY e RAO, 1997; MEIRA *et al.*, 2015)

Garg e Gupta (2005) analisaram a composição do óleo essencial da *A. squamosa* coletada na Índia. Nesse estudo o OEAS apresentou 18 constituintes exibindo 85,8% do total do óleo, onde os compostos majoritários foram o trans-cariofileno (22,9%) e o germacreno D (21,3%). No entanto, em comparação com mesma espécie coletada na Índia, os autores identificaram 43 constituintes, que

representou 88,6% do total do óleo. Representados por monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados, no qual foi possível relatar o trans-cariofileno (15,9%), γ -cadineno (11,2%) e epi- α -cadinol (9,4%) como constituintes majoritários (VERMA *et al.*, 2016).

Por outro lado, o óleo essencial obtido da espécie *A. squamosa* coletada no Vietnã, descrito no trabalho de Thang *et al.* (2013), identificaram o germacreno D em menor abundância, com 2,5% e o trans-cariofileno e o β -cubebeno como constituintes majoritários com porcentagens de 21,5 e 13,0% respectivamente. O β -elemeno também foi identificado com 5,2%, porcentagem similar ao descrito neste trabalho com 5,4%.

As caracterizações químicas do OE da *A. squamosa* descritas, demonstram a variabilidade do óleo, pois em diferentes regiões apresentaram uma variedade de constituintes. Porém, também foi possível observar que na maioria dos estudos composto majoritário trans-cariofileno foi identificado. É válido ressaltar, que a variação do óleo essencial depende de fatores climáticos, variabilidade genética, composição do solo e estações do ano, além do emprego de metodologias diferentes (HARRAZ *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2012).

5.2 RENDIMENTO E PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO EEAS

O pó das folhas (700g) da *A. squamosa* rendeu 55 g que foi expresso em 7,85% de extrato bruto. Fatores como a metodologia de extração, a natureza da matriz do vegetal, o tamanho das partículas, o tipo de solvente e a concentração utilizada, o tempo e a temperatura podem influenciar na extração e no rendimento do extrato (FRANZEN *et al.*, 2018). Portanto, é de suma importância determinar o que se quer extrair da matriz vegetal para empregar um dos diversos métodos de extração.

Através da identificação preliminar, seguindo a metodologia descrita por Soares *et al.* (2016) e Yusuf *et al.* (2004) foi possível identificar as classes de metabolitos secundários no extrato, as quais se encontram destacados na TABELA 2.

TABELA 2 - PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO de *A. squamosa* L.

Metabólitos secundários	EEAS
<i>Taninos condensados</i>	+
<i>Flavonoides</i>	+
<i>Triterpenos</i>	+
<i>Saponinas</i>	+
<i>Cumarinas</i>	-
<i>Quinonas</i>	-
<i>Alcaloides</i>	+

Os critérios de avaliação foram determinados com base na mudança de coloração das reações, formação de precipitado ou visível no UV, em que (+) significa a presença, (-) ausência da classe química.

Vários autores realizaram uma análise fitoquímica do extrato etanólico das folhas da *A. squamosa* L. e identificaram a presença de alcaloides, flavonoides, flavononas, triterpenoides, esteroides, flavonas, flavonóis, xantonas, saponinas, taninos e resinas (BRITO *et al.*, 2008). No estudo realizado por Varadharajan, Janarthanan e Krishnamurthy (2012), foi reportado a identificação de alcaloides, carboidratos, flavonoides, quinonas, terpenoides, triterpenoides e taninos presente no extrato das folhas da *A. squamosa*.

Já nos experimentos de Chandrashekar e Kulkarni (2011) identificaram-se diferentes compostos em diferentes frações. Na fração de éter de petróleo identificou-se esteroides, glicosídeos e compostos fenólicos, além disso a fração clorofórmica apresentou triterpenos, e na fração metanólica e aquosa identificou-se alcaloides, flavonoides, saponinas e compostos fenólicos.

A prospecção fitoquímica apesar de ser uma análise qualitativa, ela nos fornece um perfil químico das possíveis classes de compostos presente nos extratos e nos dá um direcionamento para o isolar futuras substâncias.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE METABOLITOS SECUNDÁRIOS

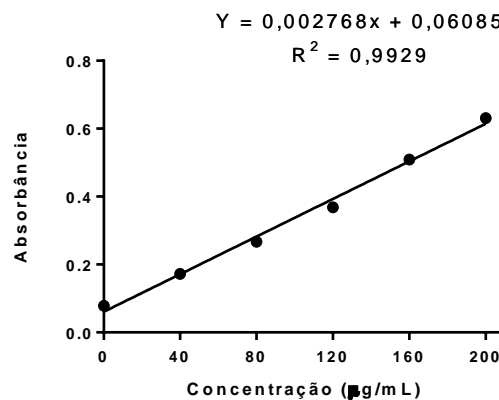
A quantificação dos metabólitos secundários fenóis, flavonoides e taninos condensados, hidrolisáveis e alcaloides determinados através da curva de calibração dos padrões ácido gálico, quercetina, catequina, ácido tânico e alcaloides respectivamente. Com a equação da reta foi possível interpolar os valores de

absorbâncias das amostras, onde o y da equação expressa a absorbância (nm) e o x a concentração ($\mu\text{g/mL}$).

5.3.1 Teor de fenóis totais

O conteúdo de fenóis foi mensurado pelo reagente de Folin-Ciocalteu em termos de equivalente de ácido gálico (GAE). Esse método consiste em reduzir o ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico através das hidroxilas fenólicas que em meio alcalino esses compostos dissociam um próton formando o ânion fenolato. A curva de calibração do padrão (Gráfico 1) permitiu determinar o teor de fenóis no EEAS em termos de ácido gálico. O resultado mostrou que o EEAS continha $55,33 \pm 2,55 \text{ mg g}^{-1}$ de extrato. Esses resultados são aproximados ao encontrado por Varadharajan, Janarthanan e Krishnamurthy (2012) que conteve $75,80 \pm 1,31 \text{ mg g}^{-1}$ no extrato das folhas da *Annona squamosa* L.

Gráfico 1 - Curva de calibração dos fenóis



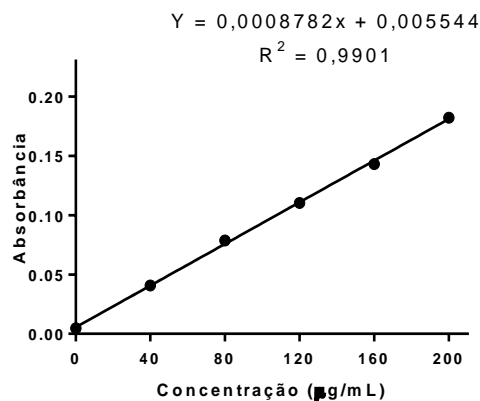
Esses resultados também se assemelham aos descritos por Benites *et al.* (2011) do teor de fenóis de extratos da polpa da *Annona coriacea* e sementes de *Annona sylvatica* $57,67 \pm 1,16$, $58,10 \pm 1,45 \text{ mg g}^{-1}$. Esses estudos com compostos fenólicos são relevantes para atividades antioxidantes pois esses compostos são sequestradores de radicais livres que agem contra o estresse oxidativo, inibem a peroxidação lipídica prevenindo doenças cardiovasculares, cancerígenas, neurodegenerativas e inflamatórias (BASKAR; RAJESWARI; KUMAR, 2007). Vários estudos já descrevem a *A. squamosa* com propriedades antioxidantes. Kalidindi *et al.*

(2015) elaboraram uma pesquisa com os extratos metanólico, clorofórmico e aquoso e verificaram sua potencialidade como antioxidantes, onde o extrato metanólico demonstrou ser mais eficaz.

5.3.2 Teor de flavonoides

A análise do teor de flavonoides foi determinada por meio do método colorimétrico de cloreto de alumínio utilizando a curva de calibração da quercetina (Gráfico 2) como parâmetro. O conteúdo de flavonoides encontrado para o extrato da *A. squamosa* foi $367,69 \pm 3,97 \text{ mg g}^{-1}$, conteúdo superior ao encontrado por Benites *et al.* (2015) para os extratos da polpa e sementes da *A. coriacea* e *A. sylvatica*.

Gráfico 2 - Curva de calibração dos flavonoides



Esses metabólicos secundários são importantes para diversos estudos como atividade antioxidante, antimicrobiana, antifúngica e antibactericida (BOAKYE *et al.*, 2015; RABELO *et al.*, 2014). Estudos revelam que larvas que consomem compostos fenólicos causam mortalidade e deformam as pupas, devido a oxidação dos tecidos no intestino médio (PETACCI *et al.*, 2012). Em uma revisão de literatura foi descrito vários flavonoides que apontaram atividade larvicida e a família Annonaceae se destacou por dispor desses compostos ativos (GARCEZ *et al.*, 2003).

5.3.3 Teor de taninos condensados e hidrolisáveis

Os teores de taninos condensados e hidrolisáveis foram expressos em equivalentes de catequina (Gráfico 3) e ácido tânico (Gráfico 4). Para o EEAS foi determinado $58,73 \pm 6,41 \text{ mg g}^{-1}$ de taninos condensados e $243,90 \pm 1,43 \text{ mg g}^{-1}$ de taninos hidrolisáveis. Esses resultados se assemelham aos descritos por Varadharajan, Janarthanan e Krishnamurthy (2012), para o teor de taninos condensados com $45,93 \pm 0,30 \text{ mg g}^{-1}$ no extrato da *A. squamosa* L. Benites *et al.* (2011) também determinou valor aproximado de taninos condensados para as sementes de *A. sylvatica* com $53,31 \pm 1,01 \text{ mg g}^{-1}$.

Gráfico 3 - Curva de calibração da catequina

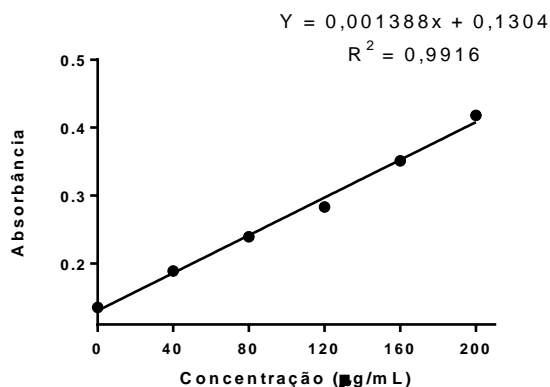
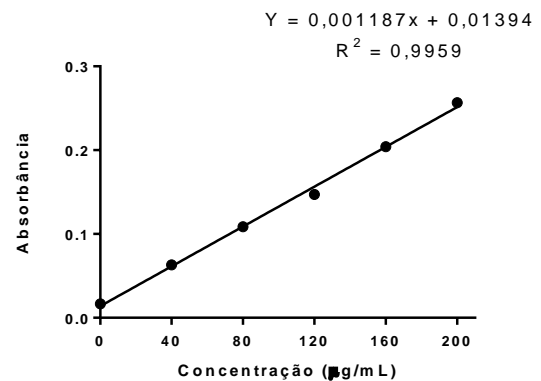


Gráfico 4 - Curva de calibração do ácido tânico



Uma substância denominada tanino catequico obtido do extrato do caule de *Magonia pubescens* apresentou um bom potencial larvicida contra as larvas do *Aedes aegypti*, mostrando-se com uma alta toxicidade (VALOTTO *et al.*, 2010).

As sementes da *A. squamosa* L. já foram investigadas quanto a atividade antioxidante e o conteúdo de fenóis e flavonoides presentes em diferentes extratos hexânico, acetona, clorofórmio-metanol, etanol e água. Apesar de terem apresentado fenóis e flavonoides, a atividade antioxidante não mostrou uma correlação linear significativa. Os extratos clorofórmio-metanol, etanol e água foram os que obtiveram melhores teores de fenóis com $242,82 \pm 5,08$, $171,58 \pm 7,31$, $208,70 \pm 2,09 \text{ mg g}^{-1}$ de extrato respectivamente. Para os flavonoides os extratos cetônico e etanólico $32,66 \pm 8,13$ e $42,44 \pm 1,13 \text{ mg g}^{-1}$ e para a atividade antioxidante o extrato aquoso exibiu o

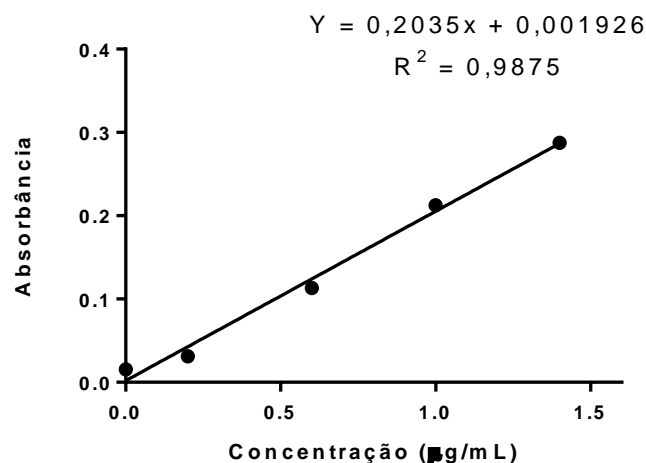
melhor resultado com $777,64 \pm 15,05$ g de ácido gálico por grama de extrato (KOTHARI; SESHADRI, 2010).

Rabelo *et al.* (2014) também quantificou os teores de fenóis e flavonoides totais e avaliou a atividade antioxidante dos talos e folhas da Atemoia, um híbrido das espécies *A. cherimola* Mill x *A. squamosa* L. O extrato etanólico dos talos foi mais significativo pelo método do sequestro de radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) ($CI_{50} = 10,44 \pm 1,25$ µg/mL) e por meio do sequestro de radicais ABTS ($24,81 \pm 0,49\%$). Em contrapartida o extrato hexânico das folhas foi mais efetivo pelo ensaio beta-caroteno/ácido linoleico ($41,12 \pm 4,35\%$).

5.3.4 Teor de alcaloides

Em relação ao teor de alcaloides uma equação da reta do padrão atropina foi utilizada para interpolar os valores de absorbâncias das amostras e mensurar a quantidade de alcaloides presente nas folhas da *A. squamosa* L. O teor de alcaloides que continha nas folhas foi pouco expressivo com a concentração de $0,068 \pm 0,00$ mg g⁻¹.

Gráfico 5 - Curva de calibração da atropina



Muitos alcaloides já foram isolados de espécies da família Annonaceae. Fehine *et al.* (2002) isolaram seis alcaloides das folhas de *Duguetia trunciflora* Maas, um benzilisoquinolínico, quatro tetrahidroprotoberberínicos e uma berberina. E os compostos isolados de Annonaceas também tem apresentado atividade citotóxica, antitumoral, anti-ansiolítica e antibacteriana (SILVA *et al.*, 2007; SURESH;

SHIVAKUMAR B.; SHIVAKUMAR S., 2012; LUNA CAZÁRES; GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2008).

Na literatura tem-se relatado a ação larvívica de alcalóides frente ao *Aedes aegypti*. Garcez *et al.* (2009) testou a atividade larvívica do alcalóide isolado da *Ocotea velloziana*, (+) – dicentrina e obteve resultados promissores como agente larvívica contra o *Aedes aegypti*. Além disso, os alcalóides aporfínicos e oxoaporfínico também apresentaram essa atividade (GARCEZ *et al.*, 2013; FEITOSA, 2009). Touré *et al.* (2017) testou dois novos alcalóides sesquiterpênicos isolados da espécie *Maytenus oblongata*, onde tiveram boa atividade larvívica.

5.4 ATIVIDADE LARVÍVICA FRENTE AO *Aedes aegypti*

Diversos autores têm disposto critérios de avaliação como bons larvívicos advindos de espécies vegetais. Segundo Cheng *et al.* (2003), óleos essenciais e extratos que exibem valores de $CL_{50} < 100$ ppm são consideradas como ativas e valores maiores que 100 ppm inativas.

O óleo essencial da *A. squamosa* apresentou a CL_{50} (concentração letal em 50%) igual a 76 ppm em 48 horas de exposição. Portanto, o óleo essencial foi ativo como um larvívico. O número total de larvas mortas em 24 e 48 horas estão contabilizados na tabela a seguir:

TABELA 3: MORTALIDADE DAS LARVAS EM 24 E 48 HORAS DO OEAS

Concentrações (ppm)	24 horas	48 horas
	Total de mortes	
Controle	0	0
20	2	8
40	4	11
60	5	13
80	7	16
100	8	17

FONTE: O próprio autor

. Vários trabalhos reportam a atividade larvicida de óleos essenciais e seus compostos isolados. Sousa *et al.* (2012) em seus experimentos com o óleo essencial da *Capraria biflora*, identificou o trans-cariofileno (31,1%) e o α -humuleno (43,0%) como compostos majoritários da composição total, além disso, realizou a atividade larvicida contra o *Aedes aegypti*, no qual, obteve CL₅₀ de 73,39 ppm, apresentando uma boa atividade.

Por outro lado, em outros estudos com as espécies *Croton hiliotropiifolius* e *Hyptis pectinata* que teve o trans-cariofileno como constituinte majoritário, com porcentagens de 38,21 e 40,90% respectivamente, obtiveram atividades larvicidas diferentes. A espécie *H. pectinata* adquiriu uma maior atividade larvicida 366,35 ppm em relação ao óleo de *C. hiliotropiifolius* com 550,68 ppm. Com isso, sugeriu-se que a atividade larvicida possa não estar relacionada com o trans-cariofileno, embora ambos tenham percentual de composição similares (SILVA, 2006).

Tendo em vista que diversas plantas que apresentaram o trans-cariofileno como constituinte principal, alguns autores sucederam com ensaios larvicidas contra o *Aedes aegypti* com o composto isolado. Silva *et al.* (2008) e Dória *et al.* (2010) em seus trabalhos avaliaram a atividade larvicida do *A. aegypti* com o trans-cariofileno e a toxicidade foi muito baixa com CL₅₀ de 1038 e 1202 ppm, respectivamente.

O óleo essencial da *A. squamosa* L. possui o germacreno D, também como composto majoritário, e a sua toxicidade já foi testada. O óleo essencial das folhas de *Chloroxylon swietenia* DC que possui o germacreno D como um dos constituintes principais mostraram ser um potente larvicida com CL₅₀ igual a 16,5 ppm e o germacreno D isolado apresentou CL₅₀ 63,6 ppm (KIRAN *et al.*, 2006). Diante disso, é válido ressaltar que o potencial larvicida de um óleo essencial pode ser atribuído tanto ao seu composto majoritário, como por suas substâncias agindo em sinergismo, aumentando o efeito tóxico sobre as larvas. Estudos revelam que o óleo essencial pode apresentar uma maior atividade em relação aos seus compostos isolados (DIAS e MORAES, 2014).

O extrato etanólico da *A. squamosa* L. não apresentou mortalidade em 50% das larvas com 48 horas de exposição (TABELA 4). Após 48 horas, apenas a concentração de 500 ppm houve um aumento na mortalidade, as outras concentrações não alteraram.

TABELA 4: MORTALIDADE DAS LARVAS EM 24 E 48 HORAS DO EEAS

Concentrações (ppm)	24 horas	48 horas
	Total de mortes	
Controle	0	0
50	3	3
100	3	3
200	2	2
500	4	13

FONTE: O próprio autor

Kumar *et al.* (2011) avaliou atividade larvicida contra o *Aedes aegypti* do extrato clorofórmio das folhas da *A. squamosa* L. e foi observado CL₅₀ de 219,41 ppm, pouco eficiente para a mortalidade das larvas. Várias espécies da família Annonaceae tem sido objeto de estudo quanto a atividade larvicida contra as larvas do *A. aegypti*.

Em um estudo conduzido por Hoe *et al.* (2010) o extrato clorofórmio da *Annona muricata* exibiu uma potente atividade larvicida com CL₅₀ de 0,9 ppm. O extrato clorofórmio e metanólico da espécie *Annona reticulata* exibiram boa atividade larvicida contra as larvas de *A. aegypti* com CL₅₀ igual a 58,73 ppm (MOHANKUMAR; VIJAYAN, 2017) e 95,24 ppm (MOHANKUMAR; SHIVANNA; ACHUTTAN ,2016) respectivamente. Extratos etanólicos da *Annona crassiflora* foram altamente tóxicos, com CL₅₀ de 0,71 e 8,94 ppm para a casca da raiz e madeira da raiz, e o extrato das sementes de *Annona glaba* 0,06 ppm (OMENA *et al.*, 2007).

Espécies da família Annonaceae causaram a mortalidade das larvas em 100% na concentração de 100 ppm dos extratos metanólico e hexânico da *A. coriacea* e metanólico da *Annona mucosa*. Enquanto a *Annona crassiflora* provocou a mortalidade em 90% na concentração de 1000 ppm para os extratos metanólico, hexânico, diclorometano e fração hexânica (COSTA *et al.*, 2013), portanto inativos segundo a classificação de Cheng *et al.* (2003) e Komalamisra *et al.* (2005). Várias espécies do bioma do cerrado brasileiro foram avaliadas contra as larvas do *Aedes aegypti*, no qual duas espécies da família Annonaceae apresentaram boa atividade larvicida, a *Duguetia furfuracea* e *Annona crassiflora* com 56,6 e 23,06 ppm, respectivamente (RODRIGUES, 2006).

5.5 EFEITO RESIDUAL

O efeito residual é realizado a fim de se obter características quando a ação larvívica, tais como a eficiência a longo prazo e os possíveis mecanismos de ação envolvidos como a ingestão ou contato (DILL; PEREIRA, COSTA, 2012). Assim, novas larvas do terceiro e quarto estágio foram colocadas em contato direto com o OEAS nas diferentes concentrações e após 48 horas observado o seu efeito. Como o EEAS não teve mortalidade, o efeito residual não foi realizado. O OEAS após as 48 horas continuou matando as larvas, no entanto houve uma diminuição em relação ao primeiro contato das larvas com o óleo essencial. Com isso, pode-se sugerir que as larvas possam estar consumindo o óleo e o seu efeito pode estar relacionado com a ingestão, no entanto é necessário que se realize outros ensaios mais específicos. A mortalidade das larvas do efeito residual encontra-se sumarizado na TABELA 5.

TABELA 5 - EFEITO RESIDUAL DE OEAS COM 24 E 48 HORAS

Concentrações (ppm)	24 horas	48 horas
	Total de mortes	
Controle	0	0
20	0	0
40	1	4
60	1	6
80	3	5
100	2	7

FONTE: O próprio autor

Pontes *et al.* (2005) definiu o efeito residual como a capacidade que um larvívica tem de permanecer matando os organismos alvo por um determinado tempo. Nesse estudo foi realizada uma análise comparativa do efeito residual dos larvívica teméfos (controle químico) e o *Bacillus thuringiensis* (controle biológico) afim de verificar a eficiência desses produtos a longo prazo. Com isso, observaram que o teméfos obteve melhores resultados com longos dias de exposição ao produto, apesar de que houve renovação de água nos recipientes todos os dias.

Estudos com o óleo essencial da *Tagetes minuta* L não apresentou efeito residual sobre as larvas do terceiro estágio de diferentes locações mesmo empregando o dobro e o triplo da CL₉₉ após uma semana de contato (LIMA *et al.*, 2009).

5.6 TESTE DE TOXICIDADE FRENTE *Artemia salina* L.

O teste biológico com a *Artemia salina* L. é utilizado afim de se obter uma característica sobre a toxicidade de compostos de plantas, visto que esses compostos possam ser tóxico em certas doses. O teste é um ensaio preliminar, para que depois do isolamento de substâncias outros ensaios mais apropriados possam ser empregados. Esse ensaio ainda é muito empregado por ser de baixo custo e versátil (MEYER *et al.*, 1982). A toxicidade frente aos náuplios demonstra uma boa relação entre a atividade citotóxica contra organismos de ambientes marinhos (VANHAECKE *et al.*, 1981), agentes antitumorais, pesticidas, antifúngicas (PISUTTHANAN *et al.*, 2013; MEYER *et al.*, 1982), atividade anti *Trypanosoma cruzi* (ZANI *et al.*, 1995), entre outros.

O bioensaio da *Artemia salina* L. com o óleo essencial da *Annona squamosa* L. mostrou ser altamente tóxico com valor de CL₅₀ igual a 1,12 ppm (concentração letal de 50% dos náuplios). Óleos essenciais com toxicidade frente os náuplios de *A. salina* L. que possuem CL₅₀ < 500 ppm, podem ser considerados bons candidatos a testes com atividade larvicida para o *Aedes aegypti* (CHENG *et al.*, 2003). Meyer e seus colaboradores (1982), definiram uma relação entre o grau de toxicidade da amostra e a CL₅₀, onde a CL₅₀ > 1000 ppm são consideradas atóxicas e a CL₅₀ < 1000 ppm tóxica frente as larvas do microcrustácio.

O óleo essencial da espécie *Syzygium aromaticum* (cravo-da-Índia), que possui o trans-cariofileno (37,2%) como um dos compostos majoritários, obteve CL₅₀ igual a 1 ppm, portanto, altamente tóxico. No entanto, o principal constituinte do óleo, o eugenol isolado, também apresentou alta toxicidade com CL₅₀ de 18,3 ppm, porém não se descarta a possibilidade dos seus outros componentes estarem agindo com o efeito tóxico (GOMES *et al.*, 2018). Zheng, Kenney e Lam (1992) identificaram os compostos trans-cariofileno, óxido de cariofileno e α -humuleno da mesma espécie

(*Syzygium aromaticum*), e esses sesquiterpenos demonstraram ser potentes agentes carcinogênicos. Nos estudos de Rosa *et al.* (2016), sugeriram que o óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* possui CL₅₀ de 79,44 ppm e a composição do seu óleo também apresentou o trans-cariofileno como constituinte majoritário. Os óleos essenciais obtidos das espécies *Lantana câmara* L e *Lantana* sp (Verbenaceae) que tinham como predominâncias os compostos trans-cariofileno, germacreno D e o biciclogermacreno mostraram ser altamente tóxicos com CL₅₀ igual a 14 e 24 ppm, respectivamente (COSTA *et al.*, 2009).

Estudos registrados na literatura para espécie *Eremanthus erythropappus* mostrou valores de CL₅₀ de 9,59 e 9,25 ppm para o óleo essencial das folhas jovens e adultas, respectivamente. A análise no CG-EM revelou que na espécie continha os compostos majoritários β -pineno, trans-cariofileno, β -mirceno e germacreno D (SOUSA *et al.*, 2008). Mclaughlin, Rogers e Anderson (1998) em seus estudos mostraram que existe uma boa relação entre o efeito tóxico da *Artemia salina* L. com diferentes células tumorais. Diante a esses resultados, pode-se concluir que o trans-cariofileno, germacreno D e o α -humuleno presente no óleo da *A. squamosa* L. podem estar contribuindo isoladamente ou por sinergismo com o efeito tóxico nos náuplios de *Artemia salina* L.

Para o EEAS não foi possível calcular a CL₅₀ pois houve 100% de mortalidade em todas as concentrações testadas. Pisutthanan *et al.* (2004) já haviam relatado em suas pesquisas a toxicidade dos nauplios de *A. salina* L. do extrato metanólico das folhas e a casca do caule da *Annona squamosa* L. e demonstraram ser altamente tóxicos com CL₅₀ igual a 1,49 e 6,53 ppm respectivamente. Vários estudos reportam a toxicidade sobre a *A. salina* com espécies do gênero de *Annona*, além disso, estudos comprovam o seu potencial como agente antitumoral. As folhas e a casca do caule de *Annona muricata* apresentaram resultados CL₅₀ das *Artemia salina* superiores a 80 ppm e ambos obtiveram citotoxicidade sobre as linhagens tumorais SF295, OVCAR-8, HCT-116 e HL-60, dando destaque ao extrato da casca do caule que conteve maior efeito citotóxico.

O teste da *Artemia salina* L. para os extratos metanólico, clorofórmico, éter de petróleo e hexânico da *Annona reticulata* revelaram alta toxicidade com as concentrações de 1,08, 1,09, 1,99 e 3,126 ppm respectivamente. Além disso, entre os extratos quando investigados sobre a atividade antitumoral, o extrato metanólico foi o

que apresentou melhor atividade, inibindo o crescimento do tumor quando testado *in vivo* (BISWAS *et al.*, 2012). A espécie *Annona cherimola* quando avaliado as frações do extrato clorofórmio as frações que mais obtiveram toxicidade foram aquelas que continham acetogeninas, com CL_{50} menor que 1 ppm (COLOM, 2007).

Embora o ensaio da *Artemia salina* L. tenha apresentado uma alta toxicidade, o extrato da *A. squamosa* L. não mostrou correlação com atividade larvicida do *Aedes aegypti* já que mesmo na maior concentração (500 ppm) não houve 100% de mortalidade, contrapondo o que foi sugerido por Cheng *et al.* (2003).

5.7 ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

Compostos organofosforados e carbamatos são sítios-alvo da enzima acetilcolinesterase (AChE). AChE é uma enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina, um neurotransmissor importante que auxilia no processo de transmissão de impulsos nervosos. Ao inibir a enzima, ocorre um aumento de níveis de acetilcolina na fenda sináptica e o impulso nervoso não é cessado que leva conseqüentemente a morte do inseto. Como esses compostos têm ocasionado uma série de problemas como a resistência dos insetos, poluição ambiental e toxicidade tanto para os seres humanos como os organismos não alvo, buscam-se por novas alternativas como o uso de produtos naturais com ação larvicida (BRAGA e VALLE, 2007a; GARCEZ, 2013).

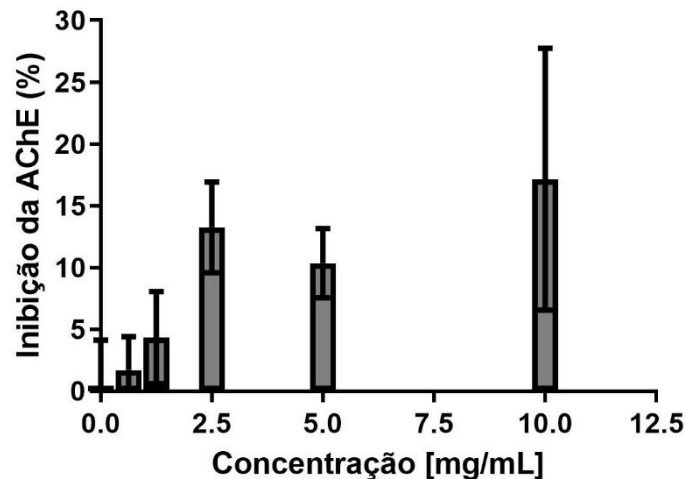
Como forma de verificar um dos mecanismos de ação do óleo essencial nas larvas, como a inibição da enzima no sistema nervoso central, realizou-se o teste de inibição da enzima AChE.

De acordo Vinutha *et al.* (2007), substâncias testadas nas concentrações de 100 µg/mL que assumem valores de porcentagens de inibição maior que 50% são potentes inibidores, de 30-50% são moderados e valores menores que 30% são inativos ou apresentam baixa atividade.

Portanto, o OEAS não apresentou inibição da enzima, pois não obteve porcentagem de inibição em 50% mesmo na maior concentração de 10 mg/mL, não sendo possível assim, determinar a CI_{50} (concentração que inibi a enzima em 50%). O controle positivo Rivastigmina teve CI_{50} igual a 0,363 µg/mL (0,272-0,4841), R^2 0,9880. A FIGURA 14 apresenta as porcentagens de inibição do óleo essencial, onde,

na maior concentração (10 mg/mL) a porcentagem de inibição foi aproximadamente 17%, que de acordo Vinutha *et al.* (2017), não apresenta atividade.

FIGURA 14: PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Annona squamosa* L.



A solubilidade do óleo deve ter sido um dos fatores que tenham contribuído para o resultado do ensaio enzimático, visto que o óleo essencial apresentava baixa solubilidade em metanol, solvente utilizado no teste. Além disso, a morte das larvas do *Aedes aegypti* pode estar associada a outros mecanismos de ação (SANTOS, 2014). Os óleos essenciais de plantas, seus compostos isolados e extratos têm sido investigados quanto a inibição da enzima acetilcolinesterase. Em estudos realizados por Silva *et al.* (2014) com óleos essenciais da família de espécies *Piper*, *P. anonifolium* e *P. aleyreanum* que apresentaram o trans-cariofileno, α -humuleno e o elemeno, compostos presentes também o OE da *A. squamosa* L. demonstraram ser 100 vezes mais potentes que a fisostigmina, um medicamento utilizado no tratamento da doença de Alzheimer

Jyotshna *et al.* (2015) atribuíram a atividade acetilcolinesterase apresentada no óleo essencial da espécie *Artemisia maderaspatana* aos compostos trans-cariofileno, α -humuleno, α -copaeno e calareno. Concluiu-se que, o trans-cariofileno e o α -humuleno podem estar contribuindo com a atividade inibitória associada ao efeito sinérgico dos dois compostos ou ainda, com outros compostos de baixa abundância. Esses estudos com óleos essenciais que contêm as mesmas substâncias que a *A. squamosa* e apresentaram uma boa inibição da enzima acetilcolinesterase,

corroboram com a ideia de que a solubilidade do óleo pode ter influenciado no teste, visto que ambos foram realizados nas mesmas condições.

Para o extrato da *Annona squamosa* L. também não houve inibição da enzima, no entanto, espécies pertencentes a família Annonacea têm sido relatados quanto a inibição da enzima acetilcolinesterase. Formagio *et al.* (2015) em seus estudos avaliaram o extrato metanólico das sementes, folhas e capítulo floral das espécies *Annona crassiflora*, *Annona coriacea*, *Annona sylvatica*, *Annona cacans* e *Dugurtia furfuracea* observou que as sementes de *Annona coriacea* foram mais ativas com 52% de inibição na concentração de 1,5 mg/mL. Em outro trabalho o óleo das sementes da espécie *Annona hypoglauca* exibiu uma boa inibição com 79,55% (SANTOS *et al.*, 2015).

Um alcaloide aporfínico isolado da espécie *Meliusa thorelii* obteve uma boa inibição da enzima em relação a outros alcaloides com 50,17% e atribuíram essa melhor atividade em relação aos grupos metoxi e hidroxí na estrutura desses compostos (DAMTHONGDEE; CHAOWASKU, 2018).

Devido a utilização do temefos como larvicida e os seus efeitos adversos causados ao meio ambiente e aos seres vivos, Griza *et al.* (2008) realizaram uma pesquisa em relação a contaminação de águas superficiais devido ao uso de agrotóxicos a base de organofosforados. Nesse estudo avaliaram a inibição da enzima acetilcolinesterase por esses organofosforados presente nos rios e verificaram que dos 15 pontos de coleta, 5 apresentaram contaminação, onde a inibição da enzima foi maior que 40 µg/mL.

6 CONCLUSÃO

As análises através de CG-EM nos permitiu caracterizar o óleo essencial da *A. squamosa*, que apresentou como compostos majoritários os sesquiterpenos: trans-cariofileno, germacreno D e γ -elemeno. Na prospecção fitoquímica, o EEAS revelou a presença de alcaloides, triterpenos, taninos condensados, flavonoides e saponinas. Na quantificação determinada por métodos espectrofotométricos apresentou $55,33 \pm 2,55 \text{ mg g}^{-1}$ de teor de fenóis, $58,73 \pm 6,41 \text{ mg g}^{-1}$ de taninos condensados e $0,068 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1}$ de alcaloides, e altos teores de flavonoides ($367,69 \pm 3,97 \text{ mg g}^{-1}$) e taninos hidrolisáveis ($243,90 \pm 1,43 \text{ mg g}^{-1}$).

Na avaliação do ensaio larvicida o óleo essencial apresentou CL_{50} igual a 76 ppm e o extrato não apresentou mortalidade em 50% após 48 horas, portanto apenas o óleo foi efetivo como um larvicida. No efeito residual, o OEAS continuou matando as larvas após 48 horas, no entanto em menor proporção, sugerindo-se que as larvas possam estar consumindo o óleo. Para o extrato não foi possível determinar o efeito residual, visto que não teve mortalidade efetiva.

No ensaio quantitativo da enzima AChE tanto o OEAS como o EEAS não houve inibição pois não obtiveram porcentagem de inibição mínima de 50%. Fatores como a solubilidade do óleo podem ter interferido no resultado. Além disso, pode-se sugerir outras vias de mecanismos para a mortalidade das larvas do *A. aegypti*. O ensaio frente a *Artemia salina* do OEAS a CL_{50} foi 1,12 ppm e do EEAS causou 100% de mortalidade em todos os microcrustáceos, ou seja, altamente tóxicos, não demonstrando correlação EEAS com a mortalidade do *A. aegypti*. Esses resultados que nos motivam a realizar novos bioensaios em relação ao óleo essencial da *A. squamosa* com ação antiproliferativa.

Portanto, esses estudos nos motivam a averiguar quais as vias que causaram a mortalidade das larvas para o OEAS, e por qual composto é responsável pela ação larvicida, se é por meio de seus compostos majoritários agindo isoladamente ou por sinergismo com outros compostos de baixa abundância, fazendo-se necessário avaliar as atividades de seus compostos isolados.

REFERÊNCIAS

- ABE, L. T. et al. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 394-400, 2007.
- AGATI, G. et al. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. **Plant science**, v. 196, p. 67-76, 2012.
- ALITONOU, G. A. et al. Chemical composition and biological activities of essential oils of *Chenopodium ambrosioides* L. collected in two areas of Benin. **International Journal of Biosciences (IJB)**, v. 2, n. 8, p. 58-66, 2012.
- ALMEIDA, A. P. G. OS MOSQUITOS (DIPTERA, CULICIDAE) E A SUA IMPORTÂNCIA MÉDICA EM PORTUGAL. **Acta médica portuguesa**, v. 24, n. 6, 2011.
- ALMEIDA, A. S; SANTOS, A. F. Flavonoids of the genus *Annona*. **Diversitas Journal**, v. 3, n. 2, p. 475-485, 2018.
- ALMEIDA, J. R. G. da S. et al. Antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity of *Annona vepretorum* Mart.(Annonaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. SPE1, p. 258-264, 2014.
- ANDRADE, E. H. A. et al. Chemical characterization of the fruit of *Annona squamosa* L. occurring in the Amazon. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, n. 2, p. 227-232, 2001.
- AÑEZ, G. et al. Collaborative study to establish World Health Organization international reference reagents for dengue virus Types 1 to 4 RNA for use in nucleic acid testing. **Transfusion**, v. 57, n. 8, p. 1977-1987, 2017.
- ANVISA. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. 2017.
- APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, n. 2, p. 105-121, 2009.
- ARAÚJO, A. V. et al. Atividade cicatrizante e estudo toxicológico pré-clínico do fitoterápico Sanativo®. **acta farmacéutica bonaerense**, v. 25, n. 4, p. 544-9, 2006.
- ASSIS, L. M. de et al. characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.
- AWAN, J. A.; KAR, A.; UDOUDOH, P. J. Preliminary studies on the seeds of *Annona muricata* Linn. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 30, n. 2, p. 163-168, 1980.
- BANJARNHOR, S. DS; ARTANTI, N. Antioxidant properties of flavonoids. **Medical Journal of Indonesia**, v. 23, n. 4, p. 239-44, 2015.
- BASKAR, R.; RAJESWARI, V.; KUMAR, T. S. In vitro antioxidant studies in leaves of *Annona* species. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 45, p. 480-485, 2007.

BENITES, R. S. R. et al. Contents of constituents and antioxidant activity of seed and pulp extracts of *Annona coriacea* and *Annona sylvatica*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 3, p. 685-691, 2015.

BERENBAUM, M. Adaptive significance of midgut pH in larval Lepidoptera. **Am. Natural.**, v. 115, n. 1, p. 138-146, 1980.

BERNARDES, N. R. et al. Atividade antioxidante e o teor de taninos e fenóis totais dos frutos de *Annona muricata* L. **Revista Vértices**, v.15, nº 3, p. 93-110, 2013.

BESERRA, E. B. et al. Ciclo de vida de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. **Iheringia, Sér. Zool., Porto Alegre**, v. 99, n. 3, p. 281-5, 2009.

BESSA, N. G. F. D. et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15 n. 4, p. 692-707, 2013.

BISWAS, S. et al. Investigation of Antioxidant, *In-vitro* Cytotoxic, and *In-vivo* Antitumor Effects of Leaf Extracts of *Annona Reticulata*. **Bangladesh Journal of Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 70-74, 2012.

BOAKYE, A. A. et al. Antioxidant activity, total phenols and phytochemical constituents of four underutilised tropical fruits. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 1, p. 262-268, 2015.

BRAGA, I. A. et al. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 199-203, 2004.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e serviços de saúde**, v. 16, n. 2, p. 113-118, 2007b.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 2, p. 113 -118, 2007a.

BRASIL, M. S. Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela. **Brasil—2017/2018: Informe**, n. 25.

BRASIL, M. S. Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela. **Brasil—2018/2019: Informe**, n. 25.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico. Volume 50. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/2019-002.pdf>> Acesso em: 25 jan. 2019.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico. Volume 49 | Dez. 2018. <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/02/2018-067.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2019.

- BRITO, H. O. et al. Análise da composição fitoquímica do extrato etanólico das folhas da *Annona squamosa* (ATA). **Rev. Bras. Farm**, v. 89, n. 3, p. 180-184, 2008.
- BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. de M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & saúde coletiva**, v. 17, p. 2675-2685, 2012.
- CAMPOS, F. G. et al. Characterization of the chemical composition of the essential oils from *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer'terra-fria'and *Annona squamosa* L. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. SPE1, p. 202-208, 2014.
- CASSEB, A. do R. et al. Arbovírus: importante zoonose na Amazônia brasileira. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 3, p. 391-403, 2013.
- CHANDRASHEKAR, C.; KULKARNI, V. R. Isolation characterization and antimicrobial activity of *Annona squamosa* leaf. **J. Pharm Res**, v. 4, n. 6, p. 1831-1832, 2011.
- CHATROU, L. W. et al. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, n. 1, p. 5-40, 2012.
- CHATROU, L.W.; RAINER, H.; MAAS, P.J.M. Annonaceae. In: SMITH, N.; MORI, S.A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D.W.; HEALD, S.V (Ed.). **Flowering plants of the neotropics**. New York: Princeton University Press, p.18- 20, 2004.
- CHAVAN, M. J.; SHINDE, D. B.; NIRMAL, S. A. Major volatile constituents of *Annona squamosa* L. bark. **Natural product research**, v. 20, n. 8, p. 754-757, 2006.
- CHAVAN, M. J.; WAKTE, P. S.; SHINDE, D. B. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine*, v. 17, n. 2, p. 149-151, 2010.
- CHEKEM, M. S. G. et al. Antifungal properties of *Chenopodium ambrosioides* essential oil against *Candida* species. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 9, p. 2900-2909, 2010.
- CHEN, Y. et al. Anti-tumor activity of *Annona squamosa* seeds extract containing annonaceous acetogenin compounds. **Journal of ethnopharmacology**, v. 142, n. 2, p. 462-466, 2012.
- CHENG, S-S et al. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 99-102, 2003.
- CHIH-CHUANG, L. et al. Acetogenins from Annonaceae. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, Vol. 101, p. 114-18, 2016.
- CHOUDHARY, M. I et al. **Bioassay techniques for drug development**. CRC Press, 2003.

- COLOM, O. Á. et al. Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Pest Science**, v. 80, n. 1, p. 63-67, 2007.
- COSTA, J. G. M. et al. Composição química e avaliação das atividades antibacteriana e de toxicidade dos óleos essenciais de *Lantana camara* L. e *Lantana* sp. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 710-714, 2009.
- COSTA, J. G. M. et al. Composição química e toxicidade de óleos essenciais de espécies de Piper frente a larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Lat Am J Pharm**, v. 29, n. 3, p. 463-7, 2010.
- COSTA, M. S. et al. Anonáceas provocam mortalidade em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 2, 2013.
- COSTA, Z. G. A. et al. Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 1, p. 11-26, 2011.
- CRUZ MONTEIRO, S. da ; BRANDELLI, C. L. C. **Farmacobotânica: Aspectos Teóricos e Aplicação**. Artmed Editora, 2017.
- D'AMATO, C.; TORRES, J. PM; MALM, O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental-uma revisão. **Química Nova**, v. 25, n. 6/A, p. 995-1002, 2002.
- DAMTHONGDEE, A.; CHAOWASKU, T. *Miliusa chantaburiana* (Annonaceae), a new species from SE Thailand. **Willdenowia**, v. 48, n. 2, p. 293-302, 2018.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica**, v. 5, n. 1, 2004.
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. John Wiley & Sons, 2002.
- DIAS, C. N.; MORAES, D. F. C. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides. **Parasitology research**, v. 113, n. 2, p. 565-592, 2014.
- DILL, E. M.; PEREIRA, M. J. B.; COSTA, M. S. Efeito residual do extrato de *Annona coriacea* sobre *Aedes aegypti*. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v. 79, n. 4, p. 595-601, 2012.
- DOHI, S.; TERASAKI, M.; MAKINO, M. Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 10, p. 4313-4318, 2009.
- DONALÍSIO, M. R.; GLASSER, C. M. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, p. 259-279, 2002.

DÓRIA, G. A. A. et al. A study of the larvicidal activity of two *Croton* species from northeastern Brazil against *Aedes aegypti*. **Pharmaceutical biology**, v. 48, n. 6, p. 615-620, 2010.

ELLMAN, G. L. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

FECHINE, I. M. et al. Alcalóides de *Duguetia trunciflora* Maas (Annonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 17-19, 2002.

FEITOSA, E. A. M. et al. Chemical composition and larvicidal activity of *Rollinia leptopetala* (Annonaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 2, p. 375-378, 2009.

FERREIRA, B. J. et al. Evolução histórica dos programas de prevenção e controle da dengue no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 14, p. 961-972, 2009.

FORMAGIO, A. S. et al. In vitro biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to Annonaceae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 4, p. 308-315, 2015.

FRANZEN, F. et al. Teor e rendimento de extratos de flores obtidos por diferentes métodos e períodos de extração. **Acta Iguazu**, v. 7, n. 1, p. 9-21, 2018.

FUNASA – FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas. 3ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, p. 84f, 2001.

GARCEZ, W. S. et al. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of some plants native to the West-Central region of Brazil. **Bioresource technology**, v. 100, n. 24, p. 6647-6650, 2009.

GARCEZ, W. S. et al. Substâncias de origem vegetal com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 363-393, 2013.

GARG, S. N.; GUPTA, D. Composition of the leaf oil of *Annona squamosa* L. from the North Indian plains. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, n. 3, p. 257-258, 2005.

GOMES, P. R. B. et al. Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). **Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacéuticas**, v. 47, n. 1, p. 37-52, 2018.

GRIZA, F. T. et al. Avaliação da contaminação por organofosforados em águas superficiais no município de Rondinha-Rio Grande do Sul. **Quim. Nova**, v. 31, n. 7, p. S1, 2008.

GRZYBOWSKI, A. et al. The combined action of phytolarvicides for the control of dengue fever vector, *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 3, p. 549-557, 2012.

GUIRADO, M. M.; BICUDO, H. E. M. de C. Alguns aspectos do controle populacional e da resistência a inseticidas em *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online)**, v. 6, n. 64, p. 5-14, 2009.

GUPTA, R. K. et al. Hypoglycemic and antidiabetic effect of ethanolic extract of leaves of *Annona squamosa* L. in experimental animals. **Journal of ethnopharmacology**, v. 99, n. 1, p. 75-81, 2005.

HARRAZ, F. M. et al. Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activities of the essential oils of *Conyza linifolia* and *Chenopodium ambrosioides*. **Natural product research**, v. 29, n. 9, p. 879-882, 2015.

HOE, P. K. et al. Biological activity of *Annona muricata* seed extracts. **Malaysian Journal of Science**, v. 29, n. 2, p. 153-159, 2010.

HUTCHINSON, J. The Genera of Flowering Plants. University Press: Oxford, 1964.

CHATROU, L.W.; RAINER, H.; MAAS, P.J.M. In Annonaceae (Soursop Family); Smith, N. et al. (Eds). Flowering Plants of Neotropics; New York **Botanical Garden**, 2004.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ. Dengue: vírus e vetor. Instituto Oswaldo Cruz (IOC), s. d. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/opportunista.html> Acesso em: 01 mai. 2019.

JAMES, K.-D. Animal Metabolites: From Amphibians, Reptiles, Aves/Birds, and Invertebrates. In: **Pharmacognosy**. Academic Press, p. 401-411, 2017.

JARDIM, C. M. et al. Composition and antifungal activity of the essential oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of chemical ecology**, v. 34, n. 9, p. 1213-1218, 2008.

JOY, B.; RAO, J. Madhusudana. Essential Oil of the Leaves of *Annona squamosa* L. **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, n. 3, p. 349-350, 1997.

JUNIOR, VF. V.; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* L. **Quim. Nova**, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

JYOTSHNA, et al. Chemical composition and acetylcholinesterase inhibitory activity of *Artemisia maderaspatana* essential oil. **Pharmaceutical biology**, v. 53, n. 11, p. 1677-1683, 2015.

KALIDINDI, N. et al. Antifungal and antioxidant activities of organic and aqueous extracts of *Annona squamosa* Linn. leaves. **Journal of food and drug analysis**, v. 23, n. 4, p. 795-802, 2015.

KHANBABAEE, K.; VAN REE, T. Tannins: classification and definition. **Natural product reports**, v. 18, n. 6, p. 641-649, 2001.

KIRAN, S. R. et al. Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. **Bioresource technology**, v. 97, n. 18, p. 2481-2484, 2006.

KOMALAMISRA, N. et al. Screening for larvicidal activity in some Thai plants against four mosquito vector species. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 36, n. 6, p. 1412, 2005.

KOTHARI, V.; SESHADRI, S. Antioxidant activity of seed extracts of *Annona squamosa* and *Carica papaya*. **Nutrition & Food Science**, v. 40, n. 4, p. 403-408, 2010.

KOTKAR, H. M. et al. Antimicrobial and pesticidal activity of partially purified flavonoids of *Annona squamosa*. **Pest Management Science**, v. 58, n. 1, p. 33-37, 2002.

KRINSKI, D.; MASSAROLI, A.; MACHADO, M. Insecticidal potential of the Annonaceae family plants. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. SPE1, p. 225-242, 2014.

KUMAR S. V. et al. Larvicidal, oviposition deterrent and repellent activity of *Annona squamosa* extracts against hazardous mosquito vectors. **International Journal of Pharmacy and Technology**. v. 3, n. 3 p. 3143-3155, 2011.

LEBOEUF, M. et al. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2783-2813, 1980.

LEITE, N. F. et al. Actividad antiparasitaria *in vitro* citotóxica de cariofileno y eugenol contra *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania brasiliensis*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, n. 4, p. 522-528, 2013.

LIMA, L. A. A. S.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 122, p. 1129 – 1138, 2010.

LIMA, W. P. et al. Estabelecimento de metodologia para alimentação de *Aedes aegypti* (Diptera-Culicidae) em camundongos swiss e avaliação da toxicidade e do efeito residual do óleo essencial de *Tagetes minuta* L (Asteraceae) em populações de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p. 638-641, 2009.

LOPES, J. C.; MELLO-SILVA, R. Diversidade. caracterização das Annonaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 125, 2014.

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

LUNA CAZÁRES, LM; GONZÁLEZ-ESQUINCA, AR A atividade antibacteriana de extratos de *Annona purpúrea* e *Annona diversifolia*. **Polibotânica**, México, v.25, p.121-125, 2008.

LUNA, J. de S. **Estudo de Plantas Bioativas**. 2006. 233 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

MAAS, P. J. M. Neotropical Annonaceae. In: MILLIKEN, W.; KLITGARD, B.; BACARAT, A. Neotropikey: interactive key and information resources for flowering plants of the neotropics. 2009. Disponível em: <<http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Annonaceae.htm>>. Acesso em: 19 jan. 2019.

MACHADO, L. P. et al. Evaluation of acetylcholinesterase inhibitory activity of Brazilian red macroalgae organic extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 6, p. 657-662, 2015.

MACIEL, M. V. et al. Extratos vegetais usados no controle de dípteros vetores de zoonoses Plant extracts used in the control of dipteran vectors of zoonosis. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 105-112, 2010.

MATOS, P. A. C.; FONTAINHAS-FERNANDES, A. Antioxidant defences in animals. **Revista portuguesa de zootecnia**, nº 1.p. 101-123, 2005.

MCLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L.; ANDERSON, J. E. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug information journal**, v. 32, n. 2, p. 513-524, 1998.

MEIRA, C. S. et al. Chemical composition of essential oils from *Annona vepretorum* Mart. and *Annona squamosa* L.(Annonaceae) leaves and their antimalarial and trypanocidal activities. **Journal of Essential Oil Research**, v. 27, n. 2, p. 160-168, 2015.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, n. 05, p. 31-34, 1982.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. 2015. In: RODRIGUES, C. M. S. de C. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de *Annona leptopetala* (R.E.F.Fr.)**. 2016. 209 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina- PE, 2016.

MOALIN, M. et al. A planar conformation and the hydroxyl groups in the B and C rings play a pivotal role in the antioxidant capacity of quercetin and quercetin derivatives. **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9636-9650, 2011.

MOHANKUMAR, T. K.; VIJAYAN, V. A. Evaluation of larvicidal efficacy of *Annona reticulata* (leaf) and *Psoralea corylifolia* (seed) extracts against larvae of *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles stephensi* at Mysore. **Asia Pacific Journal of Research ISSN (Print)**, v. 2320, p. 5504, 2017.

MOHANKUMAR, Thirumalapura Krishnaiah; SHIVANNA, Kumuda Sathigal; ACHUTTAN, Vijayan Valiakottukal. Screening of methanolic plant extracts against larvae of *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi* in Mysore. **Journal of arthropod-borne diseases**, v. 10, n. 3, p. 303, 2016.

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892, 2005.

MOREIRA, M. F.; MANSUR, J. F.; FIGUEIRA-MANSUR, J. Resistência e inseticidas: estratégias, desafios e perspectivas no controle de insetos. **Inst Nac Ciênc Tecnol Entomol Mol**, v. 15, p. 1-23, 2012.

NCBI (2019). Substance summary for beta-cariophyllene (SID 111978172). PubChem substance. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/111978172#section=Available-Date>. Acesso em Janeiro de 2019.

NEIVA, V. A. et al. Estudos pré-clínicos de atividade giardicida de *Chenopodium ambrosioides* L. e a padronização dos extratos na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos. **Rev. Ciênc. Saúde**, São Luís, v.13, n. 2, 155-165, 2011.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 925-926, 2001.

OMENA, M. C. de. et al. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource technology**, v. 98, n. 13, p. 2549-2556, 2007.

PALENCIA, D. da S. Fauna de larvas de mosquitos (Diptera, Culicidae) da área urbana do município de Armação dos Búzios, Rio de Janeiro. **Revista Eletrônica de Biologia (REB). ISSN 1983-7682**, v. 5, n. 2, p. 13-30, 2012.

PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, Zika and chikungunya: emerging arboviruses in the New World. **Western Journal of Emergency Medicine**, v. 17, n. 6, p. 671, 2016.

PELLETIER, S. William (Ed.). **Alkaloids: chemical and biological perspectives**. 1983.

PEREIRA, A. V. et al. Taninos da casca do Cajueiro: atividade antimicrobiana. **Agropecuária Técnica**, v. 36, n. 1, p. 121-127, 2015.

PETACCI, F. et al. Phytochemistry and quantification of polyphenols in extracts of the Asteraceae weeds from Diamantina, Minas Gerais State, Brazil. **Planta Daninha**, v. 30, n. 1, p. 9-15, 2012.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, n. 3, p. 237-243, 2001.

PIRES, J. et al. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, 2017.

PISUTTHANAN, S. et al. Brine shrimp lethality activity of Thai medicinal plants in the family Meliaceae. **Naresuan University Journal: Science and Technology (NUJST)**, v. 12, n. 2, p. 13-18, 2013.

PONTES, R. J. S. et al. Efeito residual de apresentações comerciais dos larvicidas temefos e *Bacillus thuringiensis israelensis* sobre larvas de *Aedes aegypti* em recipientes com renovação de água. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 4, p. 316-321, 2005.

PROHORT- Programa Brasileiro para a Modernização da Horticultura. v. 1, n. 1 (2003-). – São Paulo: PBMH, 2003- v. 11, n. 1, jan./jun. 2013.

RABÊLO, S. V. et al. Antioxidant and antimicrobial activity of extracts from atemoia (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. SPE1, p. 265-271, 2014.

RAGONHA, F. H. A evolução e potencialização do *Aedes Aegypti* em relação às doenças no Brasil e no estado do Paraná. **Arquivos do Museu Dinâmico Interdisciplinar**, v. 22, n. 1, p. 48-78, 2018.

RAHMAN, M. M. et al. Antimicrobial and cytotoxic constituents from the seeds of *Annona squamosa*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 5, p. 484-489, 2005.

RAINER, H. Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): Inclusion of the genus *Rollinia* A. ST.-HIL. **Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien. Serie B für Botanik und Zoologie**, v. 108, p. 191-205, 2007.

REGNAULT-ROGER, C. The potential of botanical essential oils for insect pest control. **Integrated Pest Management Reviews**, v. 2, n. 1, p. 25-34, 1997.

RHEE, I. K. et al. Screening for acetylcholinesterase inhibition from Amaryllidaceae using silica gel thin – layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of chromatography**. v. 915. p. 217-223, 2001.

ROBINSON, Trevor. Metabolism and function of alkaloids in plants. **Science**, v. 184, n. 4135, p. 430-435, 1974.

RODRIGUES, A. M. de S. et al. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, n. 2, p. 314-318, 2006.

ROOPAN, Selvaraj Mohana et al. Acaricidal, insecticidal, and larvicidal efficacy of aqueous extract of *Annona squamosa* L peel as biomaterial for the reduction of palladium salts into nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 92, p. 209-212, 2012.

ROSA, C. S. et al. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 19-26, 2016.

SANTOS, R. C. et al. Fatty acid profile and bioactivity from *Annona hypoglauca* seeds oil. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 30, p. 2377-2382, 2015.

SANTOS, S. R. L. **Síntese e atividade de compostos potencialmente larvicidas frente ao *Aedes aegypti***. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas), São Cristóvão, 2014.

SANTOS, S. RL et al. Toxic effects on and structure-toxicity relationships of phenylpropanoids, terpenes, and related compounds in *Aedes aegypti* larvae. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 10, p. 1049-1054, 2010

SAXENA, R. C. et al. Larvicidal and chemosterilant activity of *Annona squamosa* alkaloids against *Anopheles stephensi*. **Journal-American Mosquito Control Association**, v. 9, p. 84-84, 1993.

SHAD, A.; ANDREW, J. Larvicidal efficacy of ethanolic extracts of *Annona squamosa* (Annonaceae) over the filarial vector, *Culex quinquefasciatus* Say (Culicidae). 2017.

SHIRWAIKAR, A. et al. Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Annona squamosa* in streptozotocin–nicotinamide type 2 diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*, v. 91, n. 1, p. 171-175, 2004.

SIEBRA, C. A. et al. Potencial anti-inflamatório de *Annona glabra*, Annonaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 82 - 88, 2009.

SILVA, A. A. S. et al. Estudo fitoquímico e atividades leishmanicida, anticolinestarásica e antioxidante de extratos de *Annona glabra* L. (araticum panã). **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 36, n. 2, p. 189-194, 2015.

SOARES, N. P. et al. Técnicas de prospecção fitoquímica e sua importância para o estudo de biomoléculas derivadas de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, v. 13, n. 34, p. 991, 2016.

SILVA, C. J. da et al. Chemical composition and histochemistry of *Sphagneticola trilobata* essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 3, p. 482-489, 2012.

SILVA, D. B. da et al. Isolation and cytotoxicity evaluation of some oxoaporphine alkaloids from Annonaceae. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1809-1812, 2007.

SILVA, E. M. F. et al. Estudo in vitro do potencial citotóxico da *Annona muricata* L. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 2, 2015.

SILVA, F. B. da R. Avaliação dos componentes de óleos essenciais 1,8-cineol, β -cariofileno e α -humuleno como possíveis repelentes para *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) 2014.

SILVA, H. H. G. da; SILVA, I. G. da; LIRA, K. da S. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. 1998.

SILVA, J. K. R. et al. Essential oils of Amazon *Piper* species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 55-60, 2014.

SILVA, J. S. et al. A dengue no Brasil e as políticas de combate ao *Aedes aegypti*: da tentativa de erradicação às políticas de controle. **Hygeia**, v. 4, n. 6, 2008.

SILVA, M. S. da et al. Alkaloids and other constituents from *Xylopia langsdorffiana* (Annonaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1566-1570, 2009.

SILVA, W. J. Atividade larvicida do óleo essencial de plantas existentes no estado de Sergipe contra *Aedes aegypti* Linn. 2006. 81 f. Dissertação (Mestrado em desenvolvimento e meio ambiente) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2006.

SILVA, W. J. et al. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource technology**, v. 99, n. 8, p. 3251-3255, 2008.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SOUSA, L. G. S. S. et al. Constituintes químicos de *Capraria biflora* (Scrophulariaceae) e atividade larvicida de seu óleo essencial. **Quim Nova**, v. 35, p. 2258-2262, 2012.

SOUSA, O. V. et al. Estudo comparativo da composição química e da atividade biológica dos óleos essenciais das folhas de *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n. 2, p. 113-116, 2008.

STEFFENS, A. H. **Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial**. Dissertação (mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia) - Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2010.

SURESH, H. M.; SHIVAKUMAR, B.; SHIVAKUMAR, S.I. Phytochemical Potential of *Annona reticulata* roots for antiproliferative activity on human cancer cell lines. **Advances in Life Sciences**, Tokyom v. 2, n.2, p.1-4, 2012.

TAMBE, V. D.; BHAMBAR, R. S. Estimation of total phenol, tannin, alkaloid and flavonoid in *Hibiscus tiliaceus* Linn. wood extracts. **Journal of pharmacognosy and phytochemistry**, v. 2, n. 4, p. 41-47, 2014.

TEIXEIRA, J. M. et al. Vírus do Genotype Chikungunya do Leste / Centro / SulAfricano, Brasil, 2014. **Emerg Infect Dis**. v. 21, n. 5, p. 906-907, 2015.

TEIXEIRA, M. da G.; BARRETO, M. L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Informe epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 4, p. 5-33, 1999.

THANG, T. D. et al. Study on the volatile oil contents of *Annona glabra* L., *Annona squamosa* L., *Annona muricata* L. and *Annona reticulata* L., from Vietnam. **Natural product research**, v. 27, n. 13, p. 1232-1236, 2013.

TOURÉ, S. et al. *Aedes aegypti* larvicidal sesquiterpene alkaloids from *Maytenus oblongata*. **Journal of natural products**, v. 80, n. 2, p. 384-390, 2017.

VALERIO, E. S. et al. Physicochemical Characterization, Microbiological Quality Control And Toxicity Evaluation of the Hydroethanolic Extract From *Chenopodium Ambrosioides* Linn. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, n. 10, p. 4190-419, 2015.

VALOTTO, C. F. B. et al. Alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)(Diptera, Culicidae) causadas pelo tanino catéquico isolado da planta do cerrado *Magonia pubescens* (Sapindaceae). 2010.

- VANHAECKE, P. et al. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 5, n. 3, p. 382-387, 1981.
- VARADHARAJAN, V.; JANARTHANAN, U. K.; KRISHNAMURTHY, V. Physicochemical, phytochemical screening and profiling of secondary metabolites of *Annona squamosa* leaf extract. **World Journal of pharmaceutical research**, v. 1, n. 4, p. 1143-1164, 2012.
- VASCONCELOS, P. F. da C. Febre amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 275-293, 2003.
- VERMA, R. S. et al. Characterization of the Leaf Essential Oil Composition of *Annona squamosa* L. from Foothills of North India. **Med Aromat Plants (Los Angel)**, v. 5, n. 270, p. 2167-0412.1000270, 2016.
- VIÉGAS BUSATO, N. et al. Estratégias de modelagem da extração de óleos essenciais por hidrodestilação e destilação a vapor. **Ciência Rural**, v. 44, n. 9, 2014.
- VILA-NOVA, N. S. et al. Leishmanicidal activity and cytotoxicity of compounds from two Annonacea species cultivated in Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 567-571, 2011.
- VINUTHA, B. et al. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 109, n. 2, p. 359-363, 2007.
- VIVEK, R. et al. Green biosynthesis of silver nanoparticles from *Annona squamosa* leaf extract and its *in vitro* cytotoxic effect on MCF-7 cells. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 2405-2410, 2012.
- WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review. 2019.
- WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. World Health Organization, 2009.
- XU, P. et al. Mosquito odorant receptor for DEET and methyl jasmonate. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 111: 16592–16597, 2014.
- YANG, H. et al. Structure–activity relationships of diverse annonaceous acetogenins against human tumor cells. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 19, n. 8, p. 2199-2202, 2009.
- YUSUF, A. Z. et al. Phytochemical analysis of the methanol leaves extract of *Paullinia pinnata* linn. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v. 6, n. 2, p. 10-16, 2014.
- ZANI, C. L. et al. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **Phytomedicine**, v. 2, n. 1, p. 47-50, 1995.
- ZARA, A. L. de S. A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 391-404, 2016.

ZHENG, G-Q.; KENNEY, P. M.; LAM, L. KT. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **Journal of natural products**, v. 55, n. 7, p. 999-1003, 1992.

ANEXO 1 - PREPARO DOS REAGENTES PARA O TESTE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA

Preparo dos tampões A, B e C

O tampão A foi elaborado dissolvendo-se 3,0285 g de tris-HCl em 350 mL de água miliporo. E seguida, adicionou-se ácido clorídrico com agitação para ajustar o pH até 8 com aparelho medidor de pH e adicionou-se a água para completar 500 mL.

O procedimento para elaboração do tampão B consisti em adicionar 50 mM Tris-HCl pH 8, contendo 0,1% albumina bovina (BSA).

O tampão C foi elaborado utilizando-se 50 mM Tris-HCl pH 8, contendo 0,1 M NaCl e 0,02 M $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$.

O tampão D foi elaborado dissolvendo-se 3,0285 g de tris-HCl em 350 mL de água miliporo, foi adicionado então ácido clorídrico com agitação para ajustar o pH até 8 com aparelho medidor de pH e adicionou-se 450 mL de água para completar, 50 mL de metanol.

Todos os tampões são conservados na geladeira.

Obtenção da Enzima

A enzima acetilcolinesterase (tipo VI-s, liofilizada, 292 U/mg sólida, 394 U/mg proteína) foi adquirida da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO. USA). A enzima liofilizada foi dissolvida em tampão A para ter uma solução estoque 1000 U/ml, e então se dilui em A para obtenção de 5 U/mL da enzima para ensaio qualitativo em cromatografia em camada delgada (CCD).