



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

Centro de Ciências da Natureza

Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química

Dissertação de Mestrado

ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE INSETICIDA DE *Annona montana* SOBRE *Aedes aegypti*

Rafael Viana da Silva

Teresina-PI

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

Centro de Ciências da Natureza

Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química

Dissertação de Mestrado

ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE INSETICIDA DE *Annona montana* SOBRE *Aedes aegypti*

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Química (área de concentração: Química Orgânica).

Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa
Orientadora

Teresina-PI
2018

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

S586a Silva, Rafael Viana.

Análise fitoquímica e atividade inseticida de *Annona montana* sobre *Aedes aegypti* / Rafael Viana da Silva – Teresina, 2018.

86f.: il. color.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Natureza, Pós-Graduação em Química, 2018.

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

1. Química Orgânica. 2. Ação inseticida – *Annona montana*. 3. *Aedes aegypti*. I. Título.

CDD 547

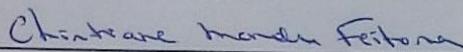
Bibliotecária: Caryne Maria da Silva Gomes / CRB 1461

ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE INSETICIDA DE *Annona montana* SOBRE *Aedes aegypti*

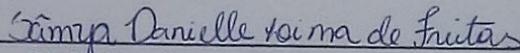
Rafael Viana da Silva

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Piauí como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Química – Área de Concentração: Química Orgânica.

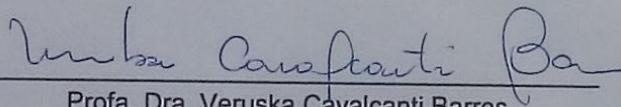
Aprovada por:



Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa
Universidade Federal do Piauí
(Orientadora/Presidente)



Profa. Dra. Samya Danielle Lima de Freitas
Universidade Federal do Piauí
(Membro I)



Profa. Dra. Veruska Cavalcanti Barros
Universidade Federal do Piauí
(Membro II)

Profa. Dra. Antonia Maria das Graças Lopes Citó
(Suplente)

Teresina, ___ de _____ de 2018.

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida presença em minha vida em todos os momentos e pela esperança que sempre me fez ir além.

Aos meus Pais, Helena e José Bento, por todo amor, carinho, amizade e confiança que depositaram em mim. São o alicerce da minha vida e de tudo que sou.

Aos meus irmãos, Samuel e Marylane, pelo companheirismo, amizade.

A minha namorada, Luciene, pela compreensão e incentivo constantes.

A minha orientadora, Chistiane Mendes Feitosa, a quem devo muito do meu crescimento científico. Obrigado por todo incentivo, apoio, amizade e, principalmente, pelo voto de confiança por ter acreditado em mim.

Aos amigos que me ajudaram nessa empreitada, Amanda, Assis, Felipe, Layanne, Sr. Ari, Sr. Francisco, Ariane que entenderam estiveram comigo.

Aos colegas pesquisadores do Instituto Federal do Piauí (Campus Central e Sul - Teresina-PI), professor Joaquim Júnior, Jurandir e Maria da Dores.

A todos do Laboratório de Pesquisas Entomológicas e Sanitárias (LAPES-UFPI), coordenado pela professora Veruska Cavalcanti, bem como seus colaboradores Lucas e sr. Antônio.

A toda gestão da Unidade Escolar Santa Teresinha que sempre se mostrou disposta a cooperar para que esse momento fosse possível.

“Olhe para cima, para as estrelas e não para baixo, para os seus pés. Tente achar sentido no que você vê e se pergunte sobre o que faz o Universo existir. Seja curioso, e, por mais difícil que a vida possa parecer, há sempre algo que você pode fazer e ser bem sucedido. O importante é não desistir.”

Stephen Hawking

RESUMO

Entre as várias doenças transmitidas por insetos, o *Aedes aegypti* configura como principal vetor de transmissão dos vírus da dengue, febre amarela, chikungunya e zika. Dados da Organização Mundial de Saúde classificam a dengue como um dos principais agravantes da saúde pública no mundo, onde, anualmente, estima-se que ocorrem 50 a 100 milhões de casos produzidos pelos quatro sorotipos diferentes, em mais de 100 países, de todos os continentes, com exceção da Europa. Estudos têm mostrado que a utilização de plantas e de seus derivados como repelente e inseticida é tão antiga quanto a civilização humana, com relatos em sistemas milenares no mundo todo, como China, Índia e Tibet. Neste contexto, esta pesquisa teve como principal objetivo realizar análise fitoquímica do extrato etanólico das folhas e sementes de *Annona montana*, bem como identificação e quantificação de classes de metabólitos secundários, além de avaliar a atividade inseticida sobre o vetor *Aedes aegypti*. O extrato foi obtido por meio de maceração em etanol, e as frações foram obtidas em solventes orgânicos por partição líquido-líquido (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol) em ordem crescente de polaridade. Pelo *screening* fitoquímico foi possível identificar a presença de alcaloides, taninos, cumarinas, saponinas, flavonoides, quinonas, triterpenos e esteróides. Na triagem fitoquímica o teor de polifenóis, flavonoides, taninos e alcaloides foi determinado com base em métodos espectrofotométricos, onde foi possível quantificar polifenóis (folhas= 249 µg/g, sementes= 102 µg/g) flavonoides (folhas= 101 µg/g, sementes= 89 µg/g) e alcaloides (folhas= 0,296 µg/g, sementes= 0,346 µg/g), não sendo possível quantificar taninos por conta dos limites de detecção e quantificação que foram menores do que o esperado. As frações metanólicas tanto das sementes como das folhas foram submetidas à análise de HPLC por meio de gradiente de eluição, no qual foi utilizado o método de gradiente acetonitrila/água (8:2), e metanol/água (8:2) cuja melhor resposta apresentou-se na fração da semente, com tempo de retenção entre 2,5 e 25 minutos, característico da presença de acetogeninas. Foram realizados ensaios para verificar a bioatividade do extrato e das frações, neste sentido a fração metanólica das sementes de *A. montana*, foi a que apresentou maior efeito inseticida para o controle das larvas de *A. egypti*, em comparação com os demais tratamentos. A fração metanólica teve melhor resultado de mortalidade por via de ingestão (100%), quando comparado ao contato por superfície contaminada (50%). A concentração letal 90% (CL₉₀ 24h= 20,978 µg/ml; CL₉₀ 48h= 10,356 µg/ml), apresentou maior mortalidade para o teste de ingestão e contato. Considerando-se os resultados obtidos, nas condições do presente estudo, pôde-se concluir que a fração em metanol das sementes de *A. montana*, do extrato em etanol obtido por partição líquido-líquido é promissor para elaboração de formulações capazes de promover efeito inseticida, propiciando níveis satisfatórios de controle. Entretanto é fundamental analisar a fitoquímica das frações, determinando qual o princípio ativo mais atuante na mortalidade dos insetos, bem como avaliar a toxicidade das frações a fim de tornar os resultados deste estudo em um produto comercialmente viável.

Palavras-chave: *Annona montana*, Graviola, *Aedes aegypti*, análise fitoquímica, atividade repelente

ABSTRACT

Among the various diseases transmitted by insects, *Aedes aegypti* is the main transmission vector of dengue virus, yellow fever, chikungunya and zika. Data from the World Health Organization classify dengue as one of the major aggravators of public health in the world, where an estimated 50 to 100 million cases are produced annually by the four different serotypes in more than 100 countries of all continents, with the exception of Europe. Studies have shown that the use of plants and their derivatives as a repellent and insecticide is as old as human civilization, with reports in millenarian systems around the world, such as China, India and Tibet. In this context, this research had as main objective to perform phytochemical analysis of the ethanolic extract of leaves and seeds of *Annona montana*, as well as identification and quantification of classes of secondary metabolites, besides evaluating the insecticidal activity on the *Aedes aegypti* vector. The extract was obtained by maceration in ethanol, and the fractions were obtained in organic solvents by liquid-liquid partition (hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol) in increasing order of polarity. Through phytochemical screening it was possible to identify the presence of alkaloids, tannins, coumarins, saponins, flavonoids, quinones, triterpenes and steroids. In the phytochemical evaluation, polyphenols, flavonoids, tannins and alkaloids were determined based on spectrophotometric methods, where it was possible to quantify flavonoids polyphenols (leaves = 249 $\mu\text{g} / \text{g}$, seeds = 102 $\mu\text{g} / \text{g}$) seeds = 89 $\mu\text{g} / \text{g}$) and alkaloids (leaves = 0.296 $\mu\text{g} / \text{g}$, seeds = 0.346 $\mu\text{g} / \text{g}$), it was not possible to quantify tannins because of the limits of detection and quantification that were lower than expected. The methanol fractions of both seeds and leaves were subjected to HPLC analysis by means of an elution gradient in which the acetonitrile / water (8: 2) gradient method and methanol / water (8: 2) gradient response occurred in the seed fraction, with retention time between 2.5 and 25 minutes, characteristic of the presence of acetogenins. In order to verify the bioactivity of the extract and the fractions, the methanolic fraction of the *A. montana* seeds was the one with the highest insecticidal effect for the control of the *A. egypti* larvae, in comparison to the other treatments. The methanolic fraction had a better mortality result through ingestion (100%), when compared to contaminated surface contact (50%). The 90% lethal concentration ($\text{CL}_{90} = 20.978 \text{ ug/ml}$) presented higher mortality for the ingestion and contact test. Considering the results obtained, in the conditions of the present study, it was possible to conclude that the methanol fraction of the *A. montana* seed from the ethanol extract obtained by liquid-liquid partition is promising for formulations capable of promoting insecticidal effect, providing satisfactory levels of control. However, it is fundamental to analyze the phytochemistry of the fractions, determining the most active active principle in insect mortality, as well as to evaluate the toxicity of the fractions in order to make the results of this study a commercially viable product.

Keywords: *Annona montana*, Graviola, *Aedes aegypti*, Phytochemical analysis, repellent activity

Lista de Figuras

Figura 1: Características para identificação do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	20
Figura 2: Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	22
Figura 3: Principais criadouros do <i>Aedes aegypti</i>	26
Figura 4: Ações de medida de controle do <i>Aedes aegypti</i>	27
Figura 5: Fórmula estrutural do DDT	28
Figura 6: Esquema simplificado de algumas rotas biossintéticas de metabólitos secundários	29
Figura 7: Modo de preparo das plantas para ação repelente	31
Figura 8: Fórmulas estruturais do α e β -pineno, (R) e (S)-limoneno, citronelol e β -cariofileno.....	32
Figura 9: Espécie vegetal de <i>Annona montana</i>	33
Figura 10: Fórmula estrutural geral da urvaricina.....	34
Figura 11: Proposta da provável rota biossintética de acetogeninas	36
Figura 12: Esquema de obtenção das alíquotas para leitura das absorvâncias em espectrofotômetro-UV para construção da curva de calibração de alcalóides	48
Figura 13: Curva de calibração do padrão de referência ácido gálico.....	59
Figura 14: Curva de calibração do padrão de referência quercetina	61
Figura 15: Curva de calibração do padrão de referência catequina	63
Figura 16: Resultado do teste qualitativo de alcalóides por reagente de Dragendorff	64
Figura 17: Curva de calibração do padrão de referência atropina.....	65
Figura 18: Estrutura da (A) reticulina, (B) cleistofolina, (C) geovanina e (D) anafolina.....	66
Figura 19: <i>Fingerprint</i> da fração metanólica do extrato bruto das sementes de <i>A. montana</i> pelo método 1	68
Figura 20: <i>Fingerprint</i> da fração metanólica do extrato bruto das sementes de <i>A. montana</i> pelo método 1	68
Figura 21: <i>Fingerprint</i> da amostra controle formada apenas por acetonitrila	69
Figura 22: <i>Fingerprint</i> da fração metanólica do extrato bruto das sementes de <i>A. montana</i> pelo método 2	70

Figura 23: Atividade larvicida da fração metanólica do extrato bruto das sementes de <i>Annona montana</i> em populações de <i>Aedes aegypti</i>	71
Figura 24: Efeito larvicida residual da fração metanólica do extrato da semente de <i>A. montana</i>	73

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Rendimento do extrato orgânico a partir de folhas e sementes de <i>A. montana</i>	55
Tabela 2 - Redimento das frações orgânicas obtidas pelo processo de partição com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol a partir dos extratos de <i>A. montana</i>	56
Tabela 3 - Resultados do <i>screening</i> fitoquímico	58
Tabela 4 - Resultado da quantificação de polifenóis nos extratos de <i>A. montana</i>	60
Tabela 5 - Resultado da quantificação de flavonoides nos extratos de <i>A. montana</i>	60
Tabela 6 - Resultado da quantificação de alcaloides nos extratos de <i>A. montana</i>	65
Tabela 7 - Concentrações letais da atividade larvicida da fração metanólica de sementes de <i>A. montana</i> em populações de <i>A. aegypti</i>	72
Tabela 8 - Atividade inibidora da fração metanólica do extrato bruto de <i>A. montana</i> contra criadouros de <i>A. aegypti</i>	74

Lista de Símbolos, Siglas e Abreviatura

AChe: Acetilcolinesterase

AlCl₃: Cloreto de Alumínio

Bi(NO₃)₃: Nitrato de Bismuto

°C: Grau Celsius

C₄H₆O₃: Anidrido Acético

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CCS: Centro de Ciências da Saúde

CHIKV: Vírus da Chikungunya

CLAE-DAD: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por Arranjo de Diodos

CL₅₀: Coeficiente de Letalidade 50%

CL₉₀: Coeficiente de Letalidade 90%

cm: Centímetro

°C: Grau Celsius

DENV: Vírus da dengue

DEN-1: Vírus da dengue tipo 1

DEN-2: Vírus da dengue tipo 2

DEN-3: Vírus da dengue tipo 3

DEN-4: Vírus da dengue tipo 4

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPa: Desvio padrão

FeCl₂: Cloreto Férrico

g: Grama

h: Hora

HCl: Ácido Clorídrico

HNO₃: Ácido Nítrico

H₂SO₄: Ácido Sulfúrico

IGR: Regulador de Crescimento de Inseto

KI: Iodeto de Potássio

L: Litro

L₁: Estádio larval 1

L₄: Estádio larval 4

LAPES: Laboratório de Parasitologia e Entomologia Sanitária

Lat: Latitude

LD: Limite de detecção

Long: Longitude

LQ: Limite de quantificação

M: Molaridade

mg: Miligrama

mL: Mililitro

mm: Milímetro

mmHg: Milímetro de Mercúrio

MS: Ministério da Saúde

m:v: Relação massa/volume

N: Normalidade

Na₂CO₃: Carbonato de Sódio

Na₂PO₄: Fosfato de Sódio

NaOH: Hidróxido de Sódio

nm: Nanômetro

NTF: Núcleo de Tecnologia Farmacêutica

OMS: Organização Mundial da Saúde

%: Porcentagem

pH: Potencial de Hidrogênio

PNCD: Plano Nacional de Controle de Doenças

p:v: Relação peso/volume

SE: Semana Epidemiológica

SESAPI: Secretaria de Estado de Saúde do Estado do Piauí

SNC: Sistema Nervoso Central

THF: Tetraidrofurânico

THP: Tetraidropirânico

UV: Radiação Ultravioleta

VBC: Verde de Bromocresol

v:v: Relação volume/volume

YFV: Vírus da Febre Amarela

ZIKV: Vírus da Zika

µg: Microgramas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1 Características do mosquito <i>A. aegypti</i> (Linnaeus, 1762)	20
2.2 Problema de saúde pública: Arboviroses	22
2.2.1 Dengue.....	23
2.2.2 Febre Amarela.....	24
2.2.3 Febre Chikungunya	25
2.2.4 Zika vírus (ZIKV)	25
2.3 Medidas de controle do <i>A. aegypti</i>	26
2.4 Produtos naturais: alternativa viável na busca de repelentes e inseticidas	28
2.5 Óleos essenciais e fixos no controle do <i>A. aegypti</i>	30
2.6 Família Annonaceae	32
2.6.1 Acetogeninas.....	34
2.7 Justificativa	37
3 OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral	39
3.2 Objetivos específicos	39
4 PARTE EXPERIMENTAL	41
4.1 Obtenção do material vegetal	41
4.2 Método de coleta	41
4.3 Obtenção do extratos orgânicos	41
4.3.1 Partição líquido-líquido dos extratos	42
4.4 Avaliação fitoquímica qualitativa (<i>Screening</i> Fitoquímico)	42
4.4.1 Alcaloides	43
4.4.2 Taninos.....	43
4.4.3 Flavonoides	44
4.4.4 Triterpenos/esteróis.....	44
4.4.5 Saponinas	44
4.4.6 Cumarinas	44
4.4.7 Quinonas	45

4.5 Quantificação de compostos secundários de extratos das folhas e sementes de <i>A. montana</i>	45
4.5.1 Determinação do teor de polifenóis.....	45
4.5.2 Determinação do teor de flavonoides.....	46
4.5.3 Determinação do teor de taninos.....	46
4.5.4 Determinação do teor de alcaloides.....	47
4.6 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do extato das folhas e sementes de <i>A. montana</i>	49
4.6.1 Métodos para análise das amostras em CLAE.....	49
4.6.1.1 Método 1.....	49
4.6.1.2 Método 2.....	50
4.7 Bioensaios	50
4.7.1 Teste Larvicida e efeito residual.....	50
4.7.2 Teste oviposicional.....	51
4.8 Análise de dados	52
4.8.1 Quantificação de metabólitos secundários.....	52
4.8.2 Bioensaios: teste larvicida, efeito residual e teste oviposicional.....	53
4.9 Considerações éticas	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Obtenção do extrato etanólico	55
5.2 Screening Fitoquímico de <i>A. montana</i>	57
5.3 Quantificação dos metabólitos secundários de <i>A. montana</i>	59
5.4 Análise de CLAE dos extratos de <i>A. montana</i>	67
5.5 Bioensaios	70
5.5.1 Atividade Larvicida e efeito residual.....	70
5.5.2 Atividade oviposicional.....	74
6 CONCLUSÃO	76
7 REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os insetos são artrópodes de grande importância para a saúde pública, uma vez que muitas espécies são vetores de doenças infecciosas e parasitárias em todo o mundo. Estima-se que doenças transmitidas por insetos vetores sejam responsáveis por causar doenças em mais de 2 milhões de pessoas anualmente (SANTOSH; RAGAVENDRAN; NATARAJAN, 2015).

Entre as várias doenças transmitidas por insetos, o *Aedes aegypti* configura como principal vetor de transmissão dos vírus da dengue (DENV), febre amarela (YFV), chikungunya (CHIKV) e zika (ZIKV). Essa espécie de mosquito é originária da África, e foi introduzida nas Américas durante o período da colonização e escravidão. Atualmente está distribuído por quase todo o mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (ABREU; FARIA; AFFELDT, 2015).

Fatores políticos, econômicos e sociais corroboraram para a expansão do *A. aegypti*, tais como: crescimento populacional, ausência de saneamento básico, modernização e fragilidade das campanhas de controle vetorial. No momento, a principal estratégia para o manejo da disseminação do *A. aegypti* tem sido o controle dos criadouros de mosquito, com o intuito de impedir a oviposição e, conseqüentemente, chegarem à fase adulta (NASCIMENTO, 2014).

Contudo, o constante uso de inseticidas e repelentes químicos sintéticos, para esta função, tem selecionado populações de mosquito cada vez mais resistentes, onde o monitoramento deste problema é um dos fatores decisivos para o sucesso das ações que visam à redução populacional de espécies de mosquitos como o *A. aegypti* (LEITE, 2011; LIMA; PIMENTA; BOAVENTURA, 2010).

Recentemente, estudos têm apontado que a resistência a inseticidas em culicídeos é o fenômeno de adaptação evolutiva mais rápido já observado, cujos principais mecanismos se dão por: penetração reduzida do constituinte químico, comportamental, metabolismo do próprio inseticida e modificação do sítio alvo. No Brasil, por exemplo, a diversidade das populações de *A. aegypti* de diferentes regiões geográficas apresentam algum nível de resistência em seu controle (ROSA, 2016).

Assim, com o grande risco que o *A. aegypti* pode trazer, bem como a ineficácia e os danos causados pelos inseticidas e repelentes sintéticos, é

INTRODUÇÃO

imprescindível que se busque métodos alternativos, seguros e eficientes para o controle do vetor. Nesse sentido, o emprego de substâncias repelentes e inseticidas extraídas de plantas, torna-se uma maneira natural e eficaz no combate deste grave problema de saúde pública (SOUZA, 2012).

Pesquisas sugerem que a utilização de plantas e de seus derivados como repelente e inseticida é tão antiga quanto a civilização humana, com relatos em sistemas milenares no mundo todo, como China, Índia e Tibet. Aproximadamente há 70 anos atrás, cerca de 1.600 espécies de plantas já apresentavam estas propriedades, e hoje, mais de 2.500 espécies têm potencial inseticida e/ou repelente comprovados cientificamente (CORDEIRO; CHUNG; SACRAMENTO, 2005; RABELO, 2014; TEIXEIRA et al, 2014).

Nesse sentido, registros indicam que plantas produzem compostos secundários em seu metabolismo. Esses compostos podem ser considerados mecanismos de defesa da planta, uma vez que possuem substâncias bioativas que podem ser repelentes, causar intoxicações, deformidades físicas ou, até mesmo, morte em insetos que tiverem contato com elas (TEIXEIRA et al., 2014).

Por definição, repelentes são substâncias quimicamente voláteis, que têm ação local ou à distância, capazes de afastar um respondedor da fonte de estímulo, bloqueando a atração de uma fonte de odor de insetos. Já os inseticidas, são substâncias químicas utilizadas como meio prático e econômico de prevenir a transmissão de doenças ao homem, criando uma barreira de odor, capaz de matar insetos em alguma fase de desenvolvimento, não permitindo a conclusão do seu ciclo de vida, seja promovendo a destruição dos ovos, larvas (larvicidas) ou insetos adultos (NERIO; VERBEL; STASHENKO, 2010; SOUSA et al, 2017).

Vantagens em ter repelentes e inseticidas derivados de plantas são amplamente conhecidas, pois estas auxiliam no controle de pragas, podendo ter efeito larvicida, inibidores de oviposição, de crescimento e reprodução. Além disso, o uso dessas substâncias em baixas concentrações, são de amplo espectro, com melhor aproveitamento do composto ativo, que respeitam o meio ambiente, estando de acordo com os ideais ecológicos de sustentabilidade do sistema produtivo (MACIEL et al., 2010).

Entre as plantas com potenciais inseticidas e repelentes, a da família Annonaceae tem sido estudada amplamente nas últimas décadas devido ao seu

INTRODUÇÃO

potencial terapêutico. Quimicamente, esta família de planta se caracteriza por bioproduzir esteroides, flavonoides, peptídeos, diterpenos, alcaloides e acetogeninas. Esta última categoria é detentora de ampla atividade biológica com propriedade citotóxica, imunossupressora, antiparasitária, antimicrobiana, vermífida, atitumoral e pesticida (MATSUMOTO et al., 2010; SOARES et al., 2016).

Portanto, tendo em vista os problemas de saúde ocasionados pela proliferação do mosquito *A. aegypti*, assim como a impossibilidade de erradicar o vetor com alta capacidade de adaptação, e complicações com o uso de inseticidas sintéticos, além da crescente demanda por métodos de controle mais eficazes, este estudo teve por objetivo realizar a investigação fitoquímica e atividade inseticida de *Annona montana* sobre o vetor *A. aegypti*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

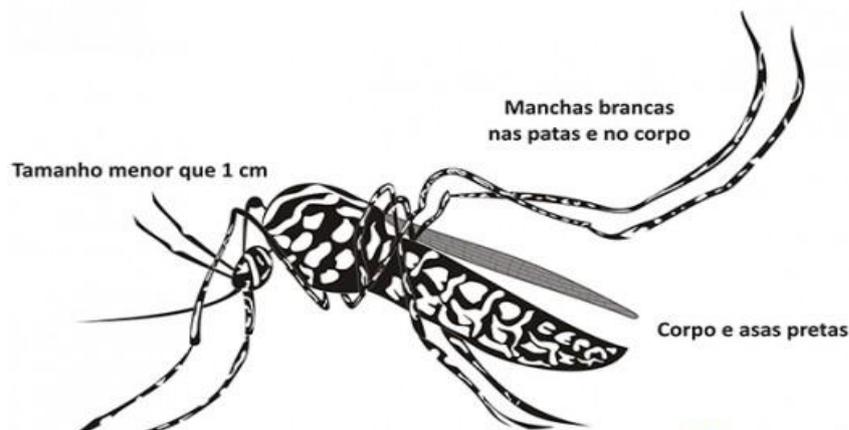
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Características do mosquito *A. aegypti* (Linnaeus, 1762)

O *Aedes aegypti* é um mosquito representante da ordem Diptera, pertencente à família Culicidae, geralmente confundido com o pernilongo devido ao tamanho (5 a 7 mm). Caracteriza-se pela presença de aparelho bucal tipo sugador-pungitivo, e tegumento predominantemente negro com escamas branco-prateadas, típico do gênero *Aedes* (ver figura 1) (MARTINS & VIEIRA, 2013).

Apresenta distribuição mundial, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, com ocorrência em países do sudeste asiático, Américas, África, Pacífico e Mediterrâneo (WHO, 2009). São capazes de suportar temperaturas entre 5°C e 42°C, podendo ter suas atividades reduzidas à espera de temperaturas favoráveis, isso os torna adaptados ao ambiente urbano, que associado ao alto grau de antropofilia e atividade hematofágica diurna, potencializa a importância epidemiológica na transmissão de doenças como dengue e febre amarela (UTSUNOMYIA et al., 2008).

Figura 1: Características para identificação do mosquito *Aedes aegypti*.



Fonte: <http://wwtudoemdia.blogspot.com.br/2015/05/mosquito-da-dengue.html>

A alimentação tanto dos mosquitos machos como das fêmeas é feita através das seivas de plantas ricas em fluídos açucarados, como néctar de flores. Contudo, os mosquitos fêmeas caracterizam-se, também, por serem hematófagas, pois precisam de sangue para produção de ovos. Assim, uma vez alimentadas, elas

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

procuram locais com água para depositar os ovos, onde a quantidade de sangue ingerido irá determinar o número de oviposturas, a qual poderá ser alcançada com 3,0 a 3,5 mg de sangue, ovipositando 120 ovos, aproximadamente, por repasto sanguíneo (FORATTINI, 2002; BRASIL, 2017).

A oviposição é realizada com preferência em criadouros artificiais, seja em recipientes abandonados a céu aberto capazes de acumular água, como pneus, caixas d'água, latas, piscinas, materiais metálicos, recipientes plásticos, etc., seja em reservatórios naturais como bambús, bromélias e em escavações de rochas. Isso faz com que o controle do *A. aegypti* seja bastante complexo (SOUZA, 2012).

Esses insetos caracterizam-se também por serem holometábolos, os quais apresentam ciclo de vida formado por ovo, quatro estádios larvais (L1-L4), pupa e adulto alado (ver figura 2). Na natureza, sua reprodução se dá pela cópula, onde os machos são atraídos pelos zumbidos emitidos pelas asas das fêmeas. Logo em seguida, os machos são devorados, deixando apenas seus órgãos reprodutores, com intuito de impedir que a fêmea copule com outros machos (NEVES, 2010).

A continuidade do ciclo biológico é seguida por meio da maturação dos ovos, que irá depender de condições ótimas de temperatura, umidade, além da alimentação sanguínea pelo mosquito fêmea, por meio de sucessivas picadas até que a oogênese se complete. Então, é justamente durante o repasto sanguíneo que pode ocorrer a infecção do mosquito pelos mais variados tipos de vírus, pois, caso o repasto seja feito em um hospedeiro infectado, durante a fase de viremia, o mosquito poderá adquirir o vírus que pode ser da dengue, febre amarela, chikungunya, zika, entre outros (BRASIL, 2009).

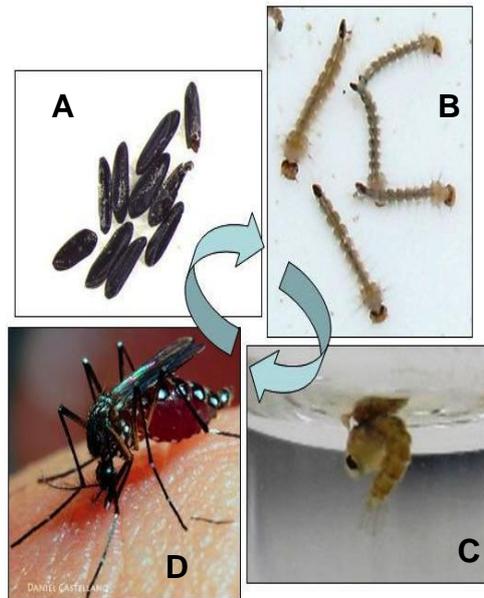
Passados aproximadamente 10 dias, os ovos eclodem a partir do contato direto com a água, que com estímulos necessários, tais como: presença de microrganismos e compostos químicos, dão origem à larva de 1º estágio. O desenvolvimento larval se completa entre 5 a 7 dias até chegar ao 4º estágio, onde passam a maior parte do tempo se alimentando de bactérias, detritos orgânicos, esporos de fungos ou qualquer material orgânico (FORATTINI, 2002).

Para finalizar o ciclo, as larvas transformam-se em pupa, fase cuja duração é de 2 a 3 dias, sendo uma transição entre o indivíduo do meio aquático para o meio terrestre, originando os insetos adultos. Assim, os mosquitos adultos recém formados saem à procura de ambiente livre de luz e vento, a fim de favorecer o

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

processo de oxidação para enrijecimento da quitina, em seguida, após 24 horas, estão aptos a iniciar novamente o ciclo em busca de alimentos e cópula (NEVES, 2010).

Figura 2: Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*.



Fonte: <https://www.cdc.gov/dengue/> A: Ovo; B: Larva; C: Pupa; D: Adulto

2.2 Problema de saúde pública: arboviroses

As doenças transmitidas por insetos vetores continuam como importantes marcadores de saúde pública no mundo, e o *A. aegypti* destaca-se por ser o agente transmissor das principais arboviroses que mais acometem os seres humanos (PRAHU et al., 2011). Por definição, arbovirose é toda e qualquer doença causada por um vírus, que pode ser transmitida por artrópodes hematófagos durante o repasto sanguíneo. Dentre os arbovírus mais importantes causadores de doenças em humanos estão as famílias Bunyaviridae, Togaviridae (que inclui o chikungunya), Flaviviridae (que inclui dengue, zika e febre amarela), Reoviridae e Rhabdoviridae (RIECK et al., 2014).

Pesquisas apontam que mais de 150 espécies de arbovírus estão relacionadas com doenças em seres humanos, sendo mantido o ciclo de transmissão entre insetos (vetores) e reservatórios vertebrados como principais hospedeiros. Essa atenção às arboviroses tem sido por conta das rápidas alterações

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

climáticas, desmatamentos, migração populacional, ocupação desordenada de áreas urbanas e precariedade das condições sanitárias, que favoreceram a amplificação da transmissão viral (MARTINS & VIEIRA, 2013).

Dentre as arboviroses, as principais doenças transmitidas pelo *A. aegypti* estão a dengue, febre amarela, chikungunya e zika.

2.2.1 Dengue

As primeiras infecções pelo vírus da dengue datam da década de 1920 na África do Sul, que rapidamente se alastrou pelo mundo, e em meados de 1990 a infecção afetou fortemente o sudoeste da Ásia e países da América Central e do Sul (RATTAN, 2010). No Brasil, a dengue é a doença de maior importância epidemiológica, sendo comprovada clínica e laboratorialmente pela primeira vez, no início da década de 1980 no estado de Roraima, com identificação de quatro sorotipos virais (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4). Todavia, apenas em 1986, em uma epidemia causada pelo sorotipo 1, na cidade do Rio de Janeiro, a doença se tornou o principal problema de saúde pública do país (NASCIMENTO, 2014).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), a dengue é um dos principais agravantes da saúde pública no mundo, onde, anualmente, estima-se que ocorrem 50 a 100 milhões de casos produzidos pelos 4 sorotipos diferentes, em mais de 100 países, de todos os continentes, com exceção da Europa (WHO, 2009). No Brasil, até setembro de 2017 foram registrados, aproximadamente, 1,5 milhões de casos clinicamente compatíveis, fato que aumentou a preocupação com a doença (BRASIL, 2017).

No Piauí, a Secretaria de Estado da Saúde (SESAPI) divulgou que até a 18ª Semana Epidemiológica (SE) de 2018 houve uma redução de 45,6% de casos novos de dengue em relação ao mesmo período de 2017. Contudo, vale destacar que a causa das epidemias de dengue está relacionada à capacidade de adaptação do vetor, que permite a reemergência da doença (NERIO, VERBEL, STASHENKO, 2010).

Assim, a preocupação com a dengue é devida suas manifestações clínicas, que, por ser de amplo espectro, pode se desenvolver em formas oligossintomáticas (Dengue Clássica) até quadros graves com hemorragia e choque (Febre

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Hemorrágica da Dengue/ Síndrome do Choque da Dengue), podendo evoluir para óbito, cujos principais sintomas são: febre associada à cefaléia, artralgias, dor retro-orbitária com presença ou não de prurido (BRITO, 2014).

2.2.2 Febre Amarela

A febre amarela é uma doença infecciosa aguda, febril, não contagiosa, de curta duração (média 12 dias), de gravidade variável, que se mantém endêmica em algumas regiões tropicais do mundo, causando periodicamente surtos isolados ou epidemia de maior impacto em saúde pública. Caracteriza-se, epidemiologicamente em duas formas, rural e urbana que diferem entre si quanto à natureza dos transmissores e dos hospedeiros vertebrados. No primeiro, é uma zoonose transmitida pelo mosquito *Haemagogus* e *Sabethes*, e na zona urbana é transmitida pelo *A. aegypti* e *A. albopictus* (CAVALCANTE; TAUIL, 2016).

Segundo dados do Ministério da Saúde (MS), em 2017 foram notificados 1.561 casos de febre amarela em oito estados brasileiros, nas quatro regiões, desses, 448 (28,7%) foram casos confirmados, os quais 144 foram a óbito. Esses números são alarmantes, uma vez que traz à tona a discussão a respeito da reemergência da febre amarela no país (BRASIL, 2017). No Piauí, de 2008 a 2016, foram diagnosticados 10 casos de febre amarela, porém nenhum foi confirmado. Em 2017 foram notificados 02 casos, e até o momento 02 casos suspeitos foram registrados (SESAPI, 2018).

A doença possui caráter sazonal, apresentando-se mais intensa entre janeiro e abril, quando condições ambientais proporcionam o aumento da densidade vetorial. Atualmente, as áreas mais atingidas pelo vírus da febre amarela no Brasil são as regiões Sul e Sudeste, devido à proximidade de grandes centros urbanos, densamente ocupados por uma população não vacinada, conseqüentemente, sem proteção contra a doença, além da alta infestação por *A. aegypti* (BRAGA, VALE, 2007).

As manifestações clínicas da febre amarela são semelhantes as da dengue, com calafrios, cansaço, cefaléia, febre, dor muscular, náuseas e vômitos. Contudo, a principal diferença entre as duas doenças está na sintomatologia mais grave da febre amarela, a qual transcorre por meio de cansaço intenso, icterícia (olhos e

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

pele), insuficiência renal e hepática e manifestações hemorrágicas. Na maioria das vezes os infectados e vacinados tornam-se imunizados (CAVALCANTE; TAUIL, 2016).

2.2.3 Febre Chikungunya

O vírus Chikungunya (CHIKV) é uma arbovirose zoonótica que foi identificada pela primeira vez em 1950, no sul da Tanzânia. Assume importância de alerta mundial, porque se trata de uma patologia emergente, haja vista que ainda não há um tratamento ou vacina eficaz para o vírus. No Brasil, a doença surgiu em 2014, quando foram confirmados 2.772 casos em seis estados do país (TEIXEIRA et al., 2015).

Embora possua sintomas semelhantes aos da dengue e zika, o CHIKV destaca-se pela poliartralgia simétrica em cotovelos, punhos e tornozelos, o que limita a mobilidade dos indivíduos infectados. Além disso, a doença se desenvolve em três fases (aguda, subaguda e crônica), causando morbidade, principalmente em idosos, por conta do pouco depósito cartilaginoso e sensibilidade imunitária, que tornam a recuperação demorada. Em alguns casos, a doença se torna crônica, acompanhada de manifestações atípicas, como alterações cardíacas, renais oculares e neurológicas, sendo relatados casos de encefalite em recém nascidos de mães com infecção recente por CHIKV (BRITO, 2014).

2.2.4 Zika vírus (ZIKV)

A primeira aparição do ZIKV no mundo aconteceu no ano de 1947, em macacos da Floresta de Zika, em Uganda. Entretanto, os primeiros seres humanos foram contaminados em 1954, na Nigéria. No Brasil, a autoctonia do Zika foi confirmada só em 2015, e em 2016, a OMS decretou a doença como emergência em saúde pública, em virtude das alterações neurológicas e surto de microcefalia, reportados no Brasil e na Polinésia Francesa (BRASIL, 2017).

Esse vírus está relacionado ao da febre amarela, dengue e chikungunya, também transmitido por *A. aegypti* e que causa febre hemorrágica. No entanto, o ZIKV tem um neurotropismo positivo e pode infectar e anular células do Sistema

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Nervoso Central (SNC). Diante disso, os casos de microcefalia em recém nascidos de mães que tiveram contato com esses vírus, deve-se, supostamente, por um desenvolvimento defeituoso do córtex cerebral e deterioração de neurônios e células gliais (KANTOR, 2018).

2.3 Medidas de controle do *A. aegypti*

O controle do vetor é um desafio mundial principalmente em países em desenvolvimento por conta das diferenças socioeconômicas existentes na população, exigindo do governo, programas de vigilância epidemiológica e educação ambiental capazes de integrar a sociedade em ações voltadas para a redução de potenciais locais criadouros de mosquito (ver figura 3) (DOLAN, et al., 2007).

Figura 3: Principais criadouros do *Aedes aegypti*



Fonte: cupira.pe.gov.br/2016/02/governo-municipal-desenvolve-projeto-de-combate-ao-aedes-aegypti/

Nesse sentido, para o controle integrado de insetos transmissores de doenças, é necessário um planejamento com verificação das condições ambientais e conhecimento da dinâmica populacional dos vetores, a fim de escolher um conjunto de ações que devam ser tomadas para manter essas populações em índices que não causem riscos a saúde humana (ver figura 4) (SOARES et al., 2016).

Figura 4: Ações de medida de controle do *Aedes aegypti*.



Fonte: cupira.pe.gov.br/2016/02/governo-municipal-desenvolve-projeto-de-combate-ao-aedes-aegypti/

De acordo com o Plano Nacional de Controle da Dengue (PNCD), as estratégias de controle do vetor são: químico, biológico e físico (BRASIL, 2009). Dentre os três, o controle químico tem sido o mais utilizado por conta dos inseticidas e pesticidas, que podem atuar tanto na fase larval quanto na fase adulta do vetor. Além destes, há também o uso de repelentes sintéticos como o DEET, que promove um longo tempo de proteção contra diversos tipos de artrópodes (GUARIDO, 2009).

Quanto aos inseticidas utilizados para o manejo do *A. aegypti*, os inseticidas sintéticos organoclorados (DDT), organofosforados (que apresentam fósforo), carbamatos e piretróides são os de maior destaque. Sendo que, o principal larvicida químico empregado pelo Ministério da Saúde para combater às larvas do *A. aegypti* é o Temefós, um organoclorado, que atua no sistema nervoso central da larva, inibindo a acetilcolinesterase (AChE), comumente utilizado no tratamento da água potável, com baixa toxicidade, ação duradoura e baixo custo (NASCIMENTO, 2014).

No entanto, estudos têm mostrado que o constante uso do Temefós fez com que os mosquitos desenvolvessem resistência, e o larvicida aos poucos foi perdendo sua eficácia. Vale destacar, que a resistência a um inseticida é caracterizada pela queda da mortalidade em uma população que foi submetida a tratamento químico constante, com prevalência de indivíduos capazes de tolerar doses letais sobre indivíduos sensíveis (CARNEIRO, 2010).

Frente a essa situação, o uso descuidado de componentes químicos sintéticos, além de causar resistência, gera uma amplificação no uso destas

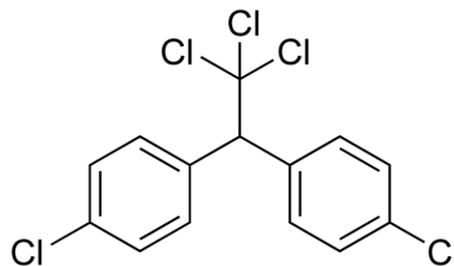
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

substâncias, uma vez que o volume se torna cada vez maior e frequente as aplicações, para que o produto atinja sua eficácia. Isso pode levar a toxicidade do ambiente, bem como para o ser humano (ABREU; FARIA; AFFELDT, 2015).

2.4 Produtos naturais: alternativa viável na busca de repelentes e inseticidas

O uso de produtos naturais para o controle de pragas e vetores de doenças não é um técnica recente, já que seu uso é uma prática comum, entretanto, a pesquisa com substâncias repelentes e inseticidas de plantas só teve início no final do século XIX, quando houve perda da eficácia nas formulações utilizadas pelos militares durante a Segunda Guerra Mundial, bem como os efeitos maléficos de inseticidas sintéticos organoclorados como diclodifeniltricloetano (DDT) (figura 5), além da resistência dos parasitas aos produtos que eram utilizados para controlar vetores de doenças como malária, febre amarela e dengue (CARNEIRO, 2010).

Figura 5: Fórmula estrutural do DDT.

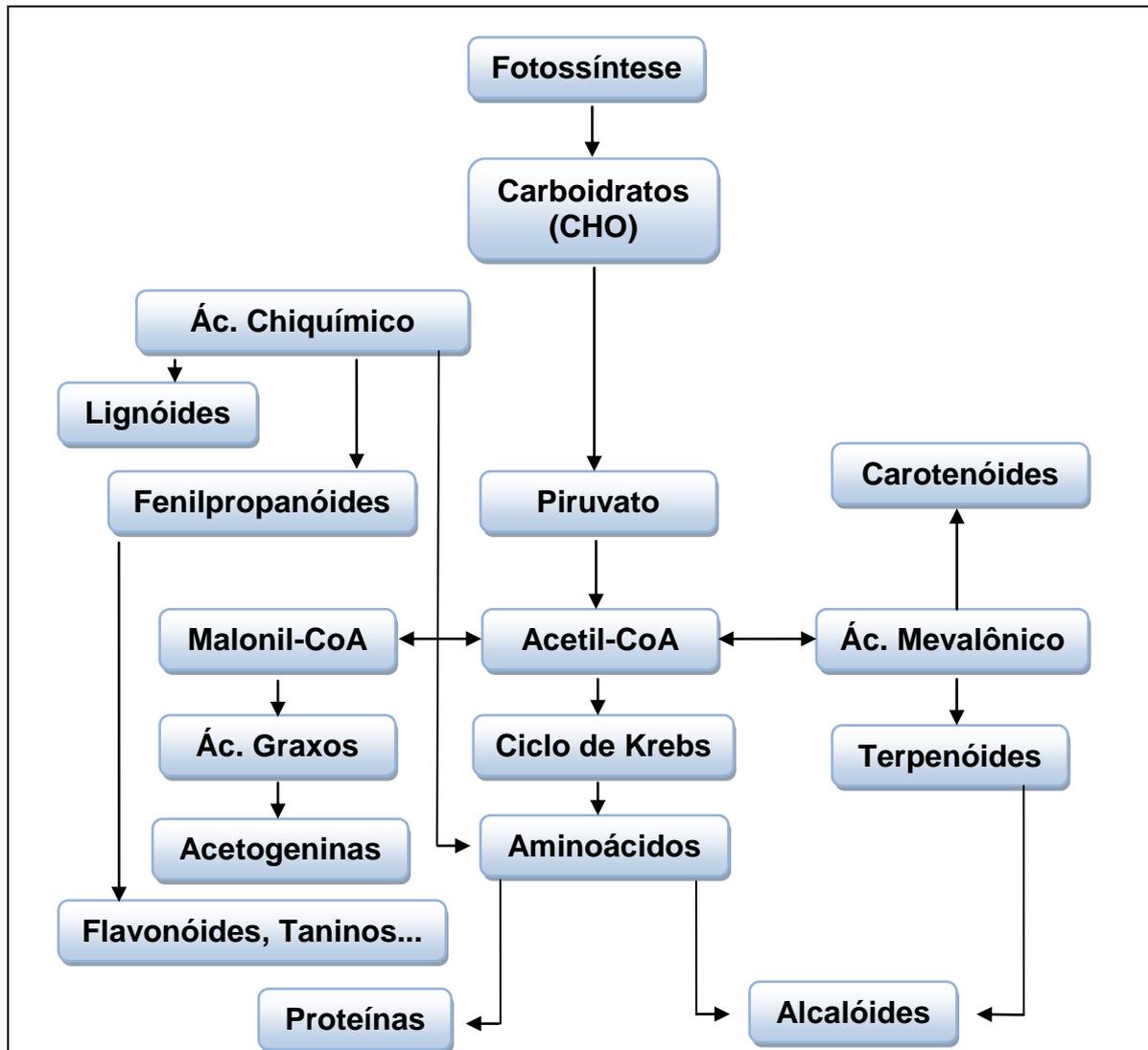


Fonte: Dewick, 2009.

Por esse motivo, nos últimos anos a química dos produtos naturais tem crescido substancialmente, e as pesquisas com repelentes e inseticidas à base de plantas apresentaram uma diversidade de compostos ativos, que se sobressaíram aos aspectos negativos dos correlacionados sintéticos, com ação sinérgica capaz de promover o controle e monitoramento de populações de insetos, devido sua constituição química ser rica em metabólitos primários e secundários. Todavia, aqueles são responsáveis pela nutrição, proteção e desenvolvimento da planta, ao passo, que estes são produtos naturais protagonistas que podem ser utilizados no controle de insetos (KRINSKI; MASSAROLI; MACHADO 2014).

As principais rotas biossintéticas de metabólitos secundários podem ser visualizadas na figura 6.

Figura 6: Esquema simplificado de algumas rotas biossintéticas de metabólitos secundários



Fonte: Pesquisa direta.

Assim, inúmeras plantas tem sido objeto de estudo exibindo fortes potenciais de repelentes e inseticidas. Pesquisa na base de dados SCOPUS, para artigos publicados a partir de 1978 a fevereiro de 2018, com palavras chave associadas à repelência e óleos fixos e essenciais, demonstrou um interesse crescente em encontrar alternativas aos repelentes sintéticos, assim como entre os artigos de bioensaios, objetivaram desenvolver formulações repelentes para espécies de insetos dípteros, em particular aqueles pertencentes ao gênero *Aedes*, *Anopheles* e

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Culex, os quais estão relacionados à doenças de interesse para a saúde pública (EDWIN et al., 2016).

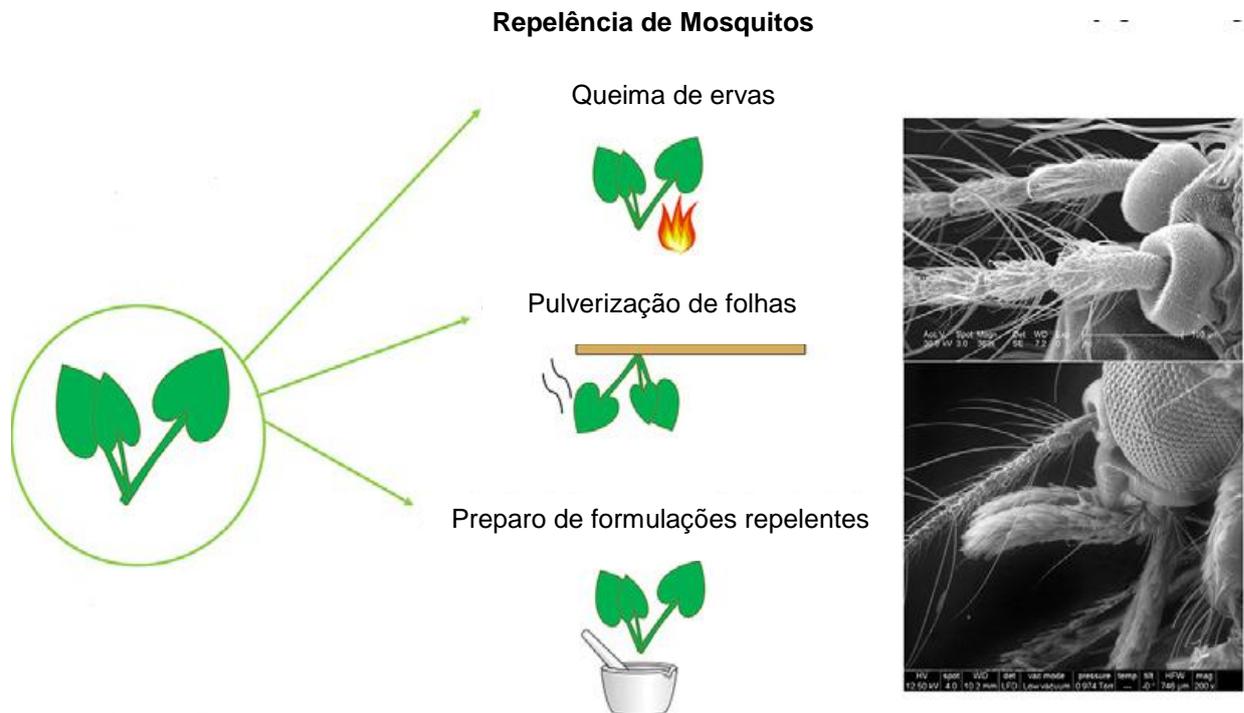
Dentre as plantas mais conhecidas com compostos biocidas ativos usadas na proteção contra mosquitos, as famílias Meliaceae, Annonaceae, Asteraceae, Cannellaceae, Lauraceae e Rutaceae são promissoras para o desenvolvimento de novos compostos tóxicos no controle de vetores e pragas (DOLAN et al., 2007). Exemplos de constituintes químicos extraídos dessas plantas estão o linalol, limoneno, citronelol, geraniol, entre outros.

2.5 Óleos essenciais e fixos no controle do *A. aegypti*

O emprego de vegetais e de produtos preparados a partir de metabólitos secundários, tais como extratos e óleos essenciais e fixos, contra insetos têm aumentado nos países industrializados, incluindo o Brasil. Estas plantas liberam compostos capazes de manter os insetos longe da pele humana, por meio de ação repelente e dissuasiva, onde os produtos químicos liberados ligam-se às proteínas de percepção de odores dos insetos e os afastam, seja por queima de ervas, pulverização de folhas ou formulações repelentes (ver figura 7) (TÉLLEZ et al., 2016).

Em um esforço para encontrar novos repelentes e dissuasores, pesquisadores têm concentrado seus estudos em óleos essenciais e fixos para explorar os compostos eficazes. Sendo assim, denomina-se como óleos essenciais, misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas presentes nas plantas, com caráter farmacologicamente ativo, tais como analgésicos, antiinflamatórios, antitumorais, antibióticos e repelente de mosquitos (GILLIJ; GLEISER; ZYGADLO, 2008).

Figura 7: Modo de preparo das plantas para ação repelente.



Fonte: Adaptado Pavela; Benelli, 2016.

Já os óleos fixos, ao contrário dos óleos essenciais, não evaporam ou volatilizam completamente, e quando são mantidos em contato com ar permanecem fluídos. Quimicamente, os óleos fixos são compostos por triacilgliceróis, com ácidos graxos esterificados, podendo ser saturados ou insaturados (PEREIRA et al., 2008). Estudos apontam que a presença dos ácidos graxos são responsáveis pela repelência e atividade contra os mosquitos, porém a absorvência na pele pode ser um fator importante dos ácidos graxos em sua eficácia (YOU et al., 2015).

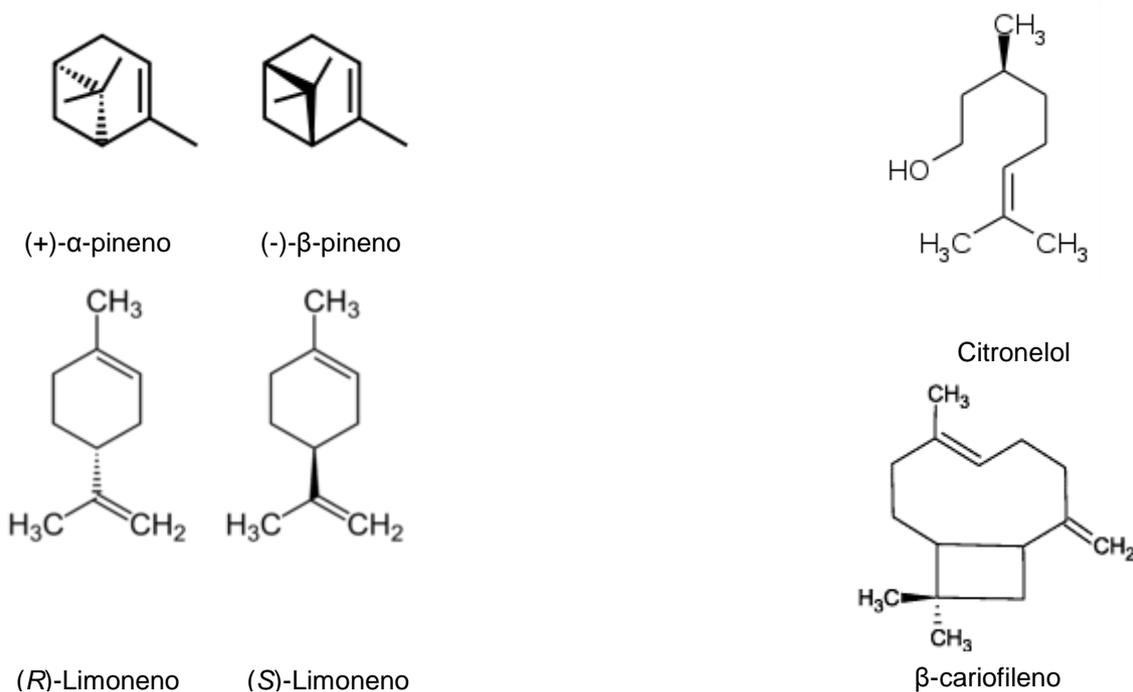
Estudos de bioensaios com determinados óleos essenciais e fixos revelaram que eles são constituídos, em sua maioria, por hidrocarbonetos (terpenos) e compostos oxigenados (alcoóis, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas, fenóis e éteres de fenóis), substâncias responsáveis pelo o odor distintivo das plantas. Em relação a propriedade repelente, estima-se que diversos óleos fixos contém isoprenóides inferiores (GILLIJ; GLEISER; ZYGADLO, 2008; NERIO; VERBEL; STASHENKO, 2010).

Assim, os monoterpenos a saber: α -pineno, limoneno, citronelol, cânfora e timol são constituintes comuns de uma série de óleos essenciais com atividade

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

repelente de mosquitos. Ao passo que, entre os sesquiterpenos, o β -cariofileno é um forte repelente contra mosquitos do gênero *Anopheles*. Nesse sentido, uma maior resposta repelente pode ser potencializada por meio de fenômenos sinérgicos entre os diversos componentes dos óleos essenciais e fixos (ver figura 8) (TÉLLEZ et al, 2016).

Figura 8: Fórmulas estruturais do α e β -pineno, (*R*) e (*S*)-limoneno, citronelol e β -cariofileno.



Fonte: Dewick, 2009.

A sinergia dos compostos bioativos possui uma complexidade composicional de terpenóides naturais, que potencializam os efeitos repelentes e inseticidas. Isso ocorre devido ao fato de que as plantas costumam desenvolver seus mecanismos de defesa com um conjunto de compostos, onde os constituintes de menor expressão agem como sinergistas, aumentando a eficácia dos principais constituintes (NERIO; VERBEL; STASHENKO, 2010).

2.6 Família Annonaceae

As anonáceas são plantas dicotiledôneas pertencentes à família Annonaceae, da ordem Magnoliales, considerada uma das mais antigas

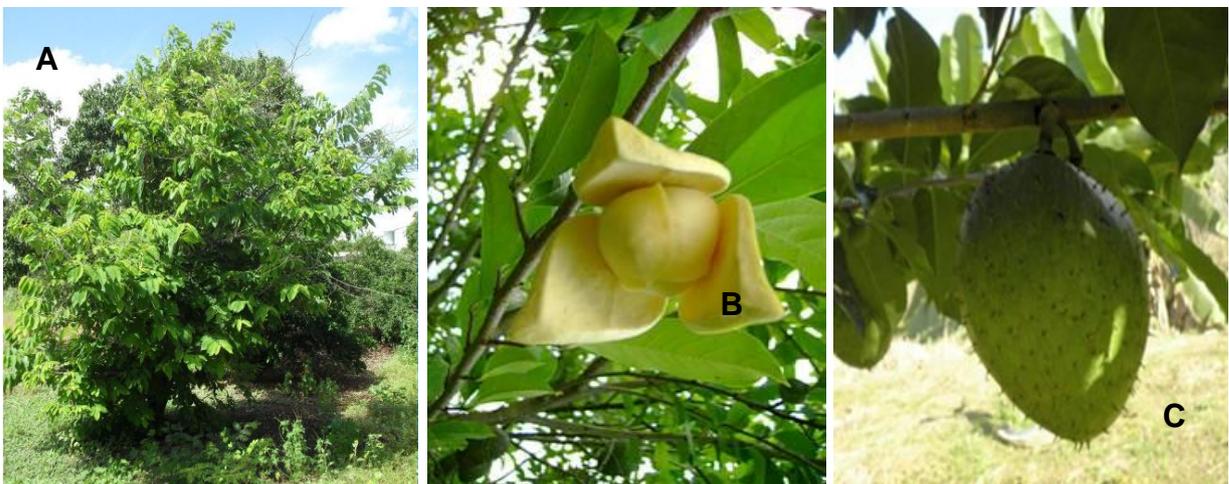
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

angiospermas ricas em espécies primitivas e de aspecto arcaico, sendo conhecidas como “fóssil vivo”, que até o momento, têm encontrado condições favoráveis para a sua adaptação (LUNA, 2006).

Estudos apontam que há mais de 2400 espécies de anonáceas descritas e agrupadas em 129 gêneros, aproximadamente. Estas plantas caracterizam-se por serem lenhosas, de casca fibrosa, e porte arbustivo. Incluem diversas árvores frutíferas de elevado interesse econômico, pois são fontes de frutos comestíveis, e bastante utilizadas na medicina popular para tratar diversas enfermidades. Os principais representantes dessa família são: graviola, biribá, ata, fruta do conde, araticum, entre outras. Apresentam distribuição pantropical, sendo mais comum nas Américas Central e do Sul, além de África e Ásia (CARNEIRO, 2010; CHATROU et al., 2012).

No Brasil, estima-se 250 espécies pertencentes a 33 gêneros, sendo mais comum o gênero *Annona*, com caráter endêmico no Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pantanal e floresta Amazônica. Entre as anonáceas, a *Annona montana* configura como uma árvore frutífera nativa da floresta Amazônica, comumente encontrada nas nascentes dos rios. É uma árvore rudimentar, que ocorre em terras brejosas capaz de suportar períodos de 3 a 4 meses sem chuva. Possui tamanho variado, dependendo da localização, e o fruto possui polpa aromática, espessa e doce podendo ser consumida *in natura* após retirada da casca (ver figura 9) (MAAS; LOBÃO; RAINER, 2016).

Figura 9: Espécie vegetal de *Annona montana*.



Fonte: Pesquisa direta. A: Árvore; B: Flor; C: Fruto verde.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

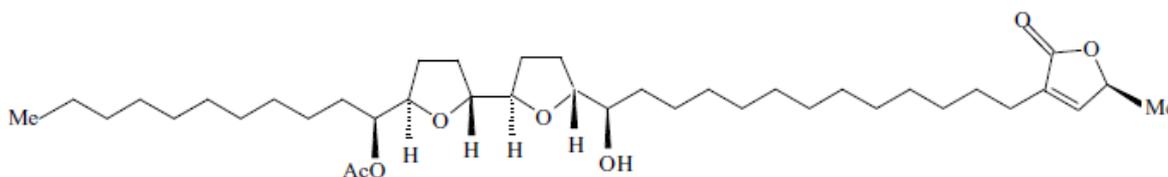
Do ponto de vista fitoquímico, os membros da família Annonaceae têm sido cada vez mais pesquisados devido à presença de uma nova classe de substâncias naturais bioativas, as acetogeninas (LIU et al., 2014; MIAO et al., 2016). Além delas, em investigações dos constituintes químicos de extratos de diferentes partes de espécies dessa família, levaram ao isolamento de alcaloides do tipo benziltetraidroisoquinolínicos, protoberberínicos, proaporfínicos e azaantraquinonas (MIREKU; MENSAH; MENSAH, 2016), como também de flavonoides (GALLE et al., 2013), terpenoides (SOUSA et al., 2014), saponinas (CHEN; GANG; WU 1997), taninos entre outros (YANG et al., 2009) foram obtidos.

Assim como as demais espécies do gênero *Annona*, a *A. montana* exibe diferentes propriedades e usos na medicina popular. Os chás das folhas, por exemplo, têm propriedades diuréticas, e vem sendo usadas com emagrecedor (LUNA, 2006). As sementes são usadas como inseticidas e parasiticidas; as raízes são usadas como antídoto nos envenenamentos por entorpecentes, e por conter acetogeninas, têm poder efeito antitumoral e anticancerígeno (BERMEJO et al., 2005)

2.6.1 Acetogeninas

Nos últimos 20 anos, os estudos fitoquímicos de anonáceas têm se concentrado nas acetogeninas, uma classe de produtos naturais relativamente nova, mas que tem crescido rapidamente, presente em praticamente todas as espécies da família Annonaceae, sendo isolada pela primeira vez em 1982, a partir do extrato etanólico das folhas de *Urvaria acuminata* (urvaricina) figura 10 (PAES; CORTES; KANASHIRO, 2016).

Figura 10: Fórmula estrutural geral da urvaricina.



Fonte: Paes; Cortes; Kanashiro, 2016.

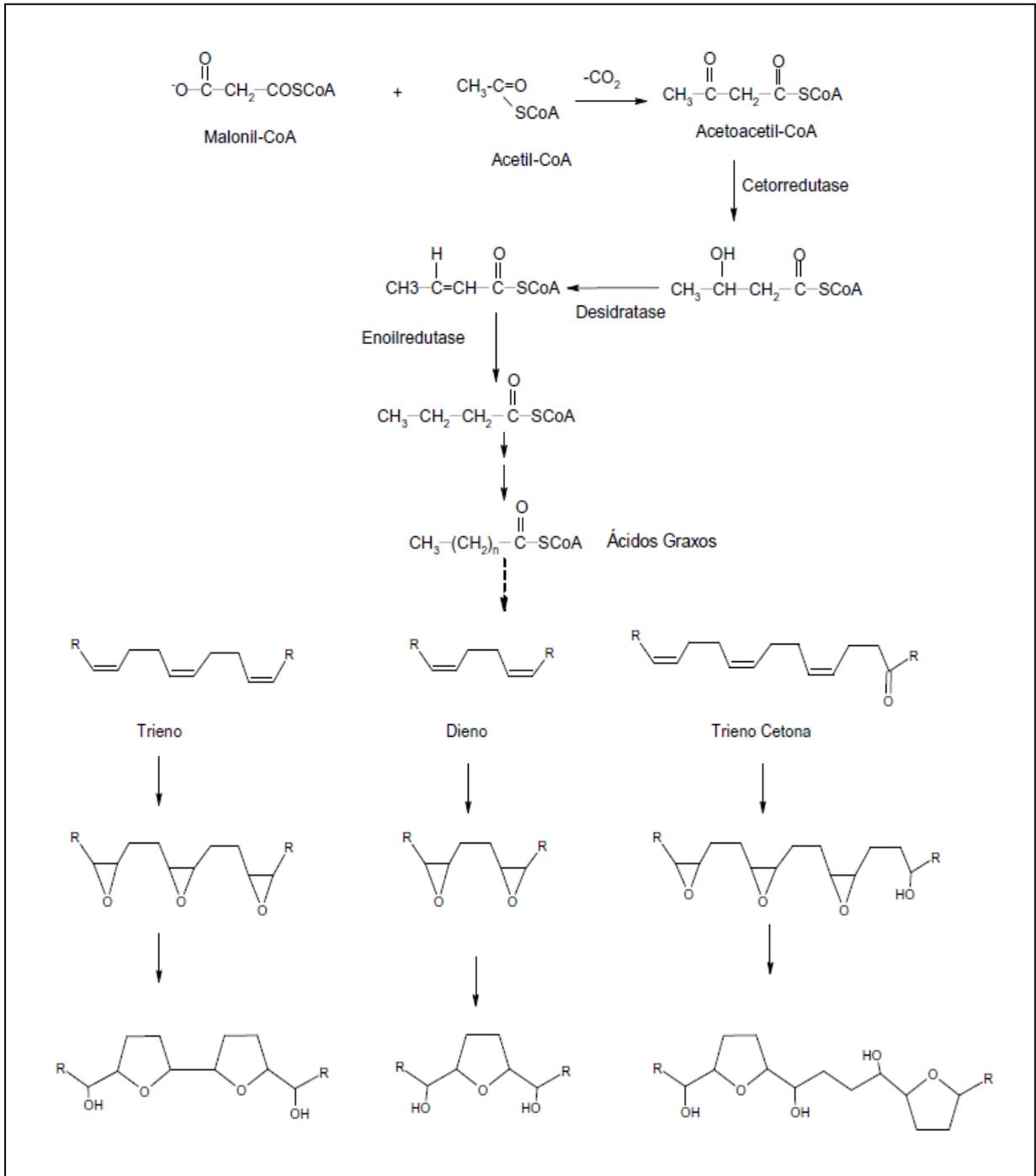
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Quimicamente, as acetogeninas são derivados de ácidos graxos de cadeia longa, apoiando um anel γ -lactônico-2,4-dissubstituído terminal em C-35 ou C-39, com um número variável de anéis tetraidrofurânicos (THF) ou tetraidropirânicos (THP), onde as cadeias hidrocarbônicas apresentam, geralmente, constituintes oxigenados na forma de grupos hidroxilas, acetoxilas e cetonas. Contudo, acetogeninas sem anéis THF ou THP, com anéis simples de ligações duplas contendo ou não grupos epóxidos também já foram descritos (CHANG & WU, 2001; BERMEJO et al., 2005; SIMÕES et al., 2010).

Em uma análise retrobiossintética de acetogeninas conhecidas demonstrou que os precursores destes metabólitos podem ter se condensado de forma linear com duas ou três unidades de carbono via acetil-CoA, malonil-CoA e propionil-CoA, por meio de mecanismos análogos à biossíntese do acilpolimalonato. Assim, acetogeninas com anéis THF podem ser divididas em três grupos e serem obtidas por epoxidação de trienos, dienos e trienocetona com abertura e fechamento do anel. Entretanto, a estereoquímica dos anéis THF e grupos hidroxilas dependem da regioquímica das duplas ligações, da face de epoxidação e modo de abrir e fechar os anéis epóxidos (ver figura 11) (RUPRECHT et al., 1990).

As acetogeninas são potencialmente bioativas com intensa atividade antitumoral, citotóxica, imunossupressora, pesticida, antiparasitária e antimicrobiana (LIMA et al., 2010; SIMÕES et al., 2010). Em uma análise primária, é um composto anticancerígeno promissor, exibindo toxicidade mínima em células não cancerígenas. E num segundo destaque, apresenta-se como um forte candidato à atividade larvicida, inseticida e repelente de mosquitos vetores de doenças de importância em saúde pública (COSTA et al., 2012).

Figura 11: Proposta da provável rota biossintética de acetogeninas.



Fonte: Adaptado Ruprecht et al., 1990.

2.7 Justificativa

Diante da ausência de uma vacina eficaz contra os quatro sorotipos da dengue e a crescente infecção da população por febre amarela, o controle do mosquito vetor aponta como alternativa na redução destes agravos à saúde humana. Contudo, o manejo ao *A. aegypti* por meio do uso contínuo de inseticidas químicos sintéticos, tem levado a seleção de populações de mosquito resistentes. Assim, a procura de produtos alternativos que possam ser integrados ao controle químico e que reduzam a velocidade de seleção dessas populações resistentes, direcionou a investigação da atividade biológica e fitoquímica de extratos de *A. montana*.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS**3.1 Objetivo geral**

Realizar análise fitoquímica do extrato etanólico das folhas e sementes de *Annona montana* visando à identificação e quantificação de classes de metabólitos secundários, bem como avaliar a atividade inseticida sobre o vetor *Aedes aegypti*.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Identificar as classes de metabólitos secundários presentes nos extratos das folhas e sementes de *Annona montana*, por meio de reações químicas preliminares de prospecção fitoquímica.
- ✓ Quantificar o teor de polifenóis, flavonoides, taninos e alcaloides presentes nos extratos da planta, a partir de métodos espectrofotométricos.
- ✓ Verificar a susceptibilidade de larvas de *Aedes aegypti*, aos extratos de *A. montana*.
- ✓ Avaliar o efeito residual do extrato de *A. montana* sobre larvas de *A. aegypti*.
- ✓ Analisar a atividade anti oviposicional dos mosquitos fêmeas adultos frente aos extratos de *Annona montana*.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Obtenção do material vegetal

Os extratos utilizados nesse estudo foram elaborados a partir das folhas e sementes de *Annona montana*. A coleta do material vegetal foi realizada na cidade de Madeiro-PI (Lat: 03°28'58" S, Long: 42°30'16" O), em outubro de 2016. O clima da região possui pouca variação térmica, geralmente entre 25 °C e 36 °C ao longo do ano, e pluviosidade média em torno de 1200 mm/ano, concentrando-se nos meses de janeiro a junho (IBGE, 2010). Uma exsicata da planta foi depositada e identificada no Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí – Campus Teresina - PI, sob o número 31.151.

4.2 Método de coleta

O material vegetal foi coletado com a utilização de tesoura de poda. Após a aquisição, as folhas foram secas em uma estufa de ar circulante à temperatura de 40 °C e reduzidas a pó, obtendo-se no final do processo 623,45 g de material seco. Para a obtenção das sementes, os frutos maduros foram limpos em água corrente e separadas as sementes de suas respectivas polpas. Em seguida, as sementes foram secas em estufa de ar circulante a 40 °C e trituradas em um moinho de quatro facas, até a obtenção de um pó fino das sementes que foi de 237,13 g de material seco.

4.3 Obtenção dos extratos orgânicos

Os extratos orgânicos tanto das folhas como das sementes foram obtidos por meio da extração por maceração a frio em solvente etanol, segundo o método de Yang et al. (2009).

Para o preparo do extrato das folhas, 623,45 g do material seco e moído foi depositado em um garrafão de vidro graduado (20,0 L de capacidade) e imerso em 4,0 L de etanol 99,5% (quantidade suficiente para cobrir todo material vegetal). Em seguida, a solução foi agitada por cinco minutos e mantida em repouso por 24 h.

PARTE EXPERIMENTAL

Esse mesmo procedimento foi repetido durante sete dias. Posteriormente, o macerado foi submetido à filtração simples, e em seguida, o solvente da amostra filtrada foi eliminado em rotaevaporador em temperatura de 50 °C e pressão de 600 mmHg.

Para o tratamento das sementes, a extração foi semelhante ao descrito acima. Após seco e moído, 237,13 g do pó obtido das sementes foi colocado em um balão de fundo chato (2,0 L de capacidade) e imersos em 1,0 L de etanol 99,5% até cobrir todo material vegetal. Logo após, a solução foi agitada por cinco minutos e mantida repouso por 48 h. Esse mesmo procedimento foi repetido durante sete dias. Em seguida, o macerado foi submetido à filtração simples, e o solvente da amostra filtrada foi eliminado em rotaevaporador em temperatura de 50 °C e pressão de 600 mmHg. O solvente recuperado foi reutilizado em ambos os processos.

Após a eliminação do solvente, os extratos foram colocados na capela, para completa evaporação do solvente. Em seguida, os extratos foram pesados para o cálculo do rendimento.

4.3.1 Partição Líquido-líquido dos extratos

A partição líquido-líquido, também conhecida como extração por solvente ou partição, é um método para separar compostos baseados em suas diferentes solubilidades em dois líquidos imiscíveis, normalmente água e um solvente orgânico (RIBEIRO et al., 2013). Desta forma, o extrato seco das folhas e sementes obtido na etapa anterior, foi solubilizado em metanol:água, na proporção (8:2). Em seguida submetido à partição líquido-líquido, utilizando-se um funil de separação e solventes orgânicos de polaridades crescentes, a saber: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, seguindo a metodologia adaptada de Yang et al. (2009).

As partições (frações) obtidas foram colocadas na capela para completa evaporação do solvente. A determinação dos rendimentos foi realizada baseada nas massas dos respectivos extratos brutos.

4.4 Avaliação fitoquímica qualitativa (Screening Fitoquímico)

PARTE EXPERIMENTAL

A identificação de metabólitos secundários das folhas e sementes de *Annona montana* seguiu a metodologia descrita por Lemos (2015) e Soares et al. (2016). Para análise, foi utilizado o extrato etanólico bruto onde foram realizados testes para identificação de alcaloides, taninos, flavonoides, triterpenos e/ou esteróis, saponinas, cumarinas e quinonas.

4.4.1 Alcaloides

Para a identificação de alcaloides foi utilizado o método do reagente de Dragendorff. O preparo deste reagente envolveu a dissolução de 8 g de nitrato de bismuto $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ em 20 mL de ácido nítrico HNO_3 (30%). Em seguida, dissolveu-se, separadamente, 22,8 g de iodeto de potássio KI num volume mínimo de água. Feito isso, misturou-se a primeira solução aos poucos com a segunda. Após repouso de 1 h, a solução foi filtrada, e o filtrado foi diluído com água destilada até 100 mL.

Os alcaloides foram identificados a partir da aplicação do extrato etanólico sobre uma placa de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando etanol como eluente. Em seguida, borrifou-se a placa com o reagente de Dragendorff, onde se esperou o aparecimento de coloração laranja indicativo da presença de alcalóides.

4.4.2 Taninos

Os taninos foram identificados a partir de 10 mg do extrato etanólico, colocados em um tubo de ensaio e diluído com metanol até 2,0 mL. Após isso, adicionou-se 5,0 mL de água destilada a esta mistura, em seguida a solução foi filtrada e adicionada 5,0 gotas de solução de cloreto férrico a 10% (FeCl_2) previamente preparada. Após um intervalo de tempo, observou-se a solução para ver se houve a formação de precipitado com coloração azul (taninos hidrossolúveis) e/ou esverdeado (taninos condensados).

PARTE EXPERIMENTAL

4.4.3 Flavonoides

Para a identificação de flavonóides 10 mg do extrato vegetal foram colocados em um tubo de ensaio, e diluído com 2,0 mL de metanol. Em seguida, foram adicionadas raspas de fita de magnésio na solução metanólica e, posteriormente, foram colocadas 5,0 gotas de ácido clorídrico (HCl) concentrado. A ocorrência de reação química de oxirredução (reação de Shinoda) mudando a coloração da substância para rósea indica positividade para flavonoides.

4.4.4 Triterpenos/esteróis

Nesta análise, 2,0 mL do extrato foi transferido para um béquer de 100 mL, e após evaporação do solvente em banho-maria, adicionou-se 3,0 mL de clorofórmio com agitação leve. Em seguida, a solução clorofórmica foi transferida para um tubo de ensaio. Após filtração, adicionou-se 1,0 mL de anidrido acético (C₄H₆O₃) com agitação leve. Posteriormente, foram adicionadas 4,0 gotas de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado pelas paredes do tubo. A presença de esteróides será verificada pela mudança de coloração para vermelho-escuro, ao passo que na parte inferior, a coloração marrom caracterizará presença de triterpenoides.

4.4.5 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.

4.4.6 Cumarinas

Para esta identificação, 10 mg do extrato vegetal foram colocadas em um tubo de ensaio e diluído com 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

PARTE EXPERIMENTAL

levado a banho-maria com temperatura de 100 °C por 5 minutos. Logo depois, retirou-se o papel filtro e examinou-o sob luz ultravioleta (UV).

4.4.7 Quinonas

Pesou-se 10 mg de extrato etanólico em um tubo de ensaio e foi adicionado 2,0 mL de metanol para dissolução. Após isso, foram adicionados 5,0 mL de clorofórmio com agitação. Posteriormente, 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.

4.5 Quantificação de metabólitos secundários de extratos das folhas e sementes de *A. montana*

O teor de polifenóis, flavonoides, taninos e alcaloides foi determinado com base em métodos espectrofotométricos. Cada teste seguiu uma metodologia específica, porém todos partiram de um mesmo princípio. Uma solução padrão foi preparada e utilizada para o preparo de outras soluções diluídas a fim de se obter uma equação de reta pela medida das absorvâncias dessas soluções.

4.5.1 Determinação do teor de polifenóis

A determinação do teor de fenólicos totais seguiu a metodologia descrita por Swain e Hills (1959). Para a obtenção da curva de calibração, foi preparada uma solução padrão de 100 µg/mL de ácido gálico marca Sigma[®], dissolvendo-se 10 mg de ácido gálico em 100 mL de água destilada. A partir dessa, foram obtidas concentrações de 3,1; 6,2; 12,5; 25; 50; 100 µg/mL utilizadas para gerar a curva de calibração e equação de reta.

Para a preparação das amostras, 2,5 mg do extrato foi pesado e solubilizado em água destilada com auxílio de 5% de DMSO em concentrações de 250 µg/mL. Das soluções preparadas foram retirados uma alíquota de 0,5mL e transferidos para tubos de ensaio, adicionado 8,0 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente *Folin*

PARTE EXPERIMENTAL

Ciocalteau 20% (v:v). Em seguida, a solução foi homogeneizada em agitador tipo vortex, após 3 minutos, acrescido 1,0 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 20% (m:v), e após 1 h em banho-maria a 37 °C foram realizadas as leituras das densidades óticas em espectrofotômetro à 720 nm. Foi feito também a leitura de um branco composto por água destilada, reagente de *Folin Ciocalteau* 20% (v:v) e solução de Na_2CO_3 a 20% (m:v).

A partir da equação da reta obtida na curva de calibração, realizou-se o cálculo do teor de fenólicos totais. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.5.2 Determinação do teor de flavonoides

Para determinar o teor de flavonoides a metodologia utilizada foi descrita por Meda et al. (2005), onde a curva de calibração foi obtida a partir de uma solução padrão de quercetina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, preparada com 10 mg de quercetina dissolvida em 100 mL de metanol, e dessa solução foi obtido soluções de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, e 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ utilizadas para gerar a curva de calibração e equação de reta.

O material vegetal foi preparado a partir de 50 mg do extrato dissolvido em metanol e transferido para um balão volumétrico de 100 mL, obtendo-se uma concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dessa solução metanólica foi retirada uma alíquota de 5,0 mL, que foi misturada em um tubo de ensaio com 5,0 mL de cloreto de alumínio (AlCl_3) a 2% (p:v). O sistema ficou em repouso por 10 minutos antes da leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 415 nm, contra um branco formado por solução de AlCl_3 a 2% (p:v).

A partir da equação da reta obtida na curva de calibração, realizou-se o cálculo do teor de flavonoides. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.5.3 Determinação do teor de taninos

O teor de taninos presente no extrato de *A. montana* foi realizado pelo método descrito por Makkar e Becker (1993). A curva de calibração foi obtida a partir de uma solução padrão de catequina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Essa solução foi utilizada para obtenção de outras soluções de catequina nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50,

PARTE EXPERIMENTAL

60, 70, 80, 90 e 100 µg/mL. A medida das absorbâncias destas soluções permitiu a obtenção da equação de reta necessária para a determinação do teor de taninos.

A amostra foi preparada a partir de uma solução do extrato de 200 µg/mL. Para tanto, foi pesado 2,0 mg do extrato e dissolvido em solução de etanol 50% (v/v) e, posteriormente, transferido para um balão volumétrico de 10 mL. Dessa solução foi retirada uma alíquota de 0,5 mL e adicionado a 3,0 mL de uma solução de vanilina 4% (p/v em metanol) em tubo de ensaio; em seguida, foi adicionado 1,5 mL de HCl concentrado (37%). A leitura da absorbância foi feita em um comprimento de onda de 500 nm contra um branco composto pela solução de vanillina, HCl e solução de etanol 50% (v/v) em água.

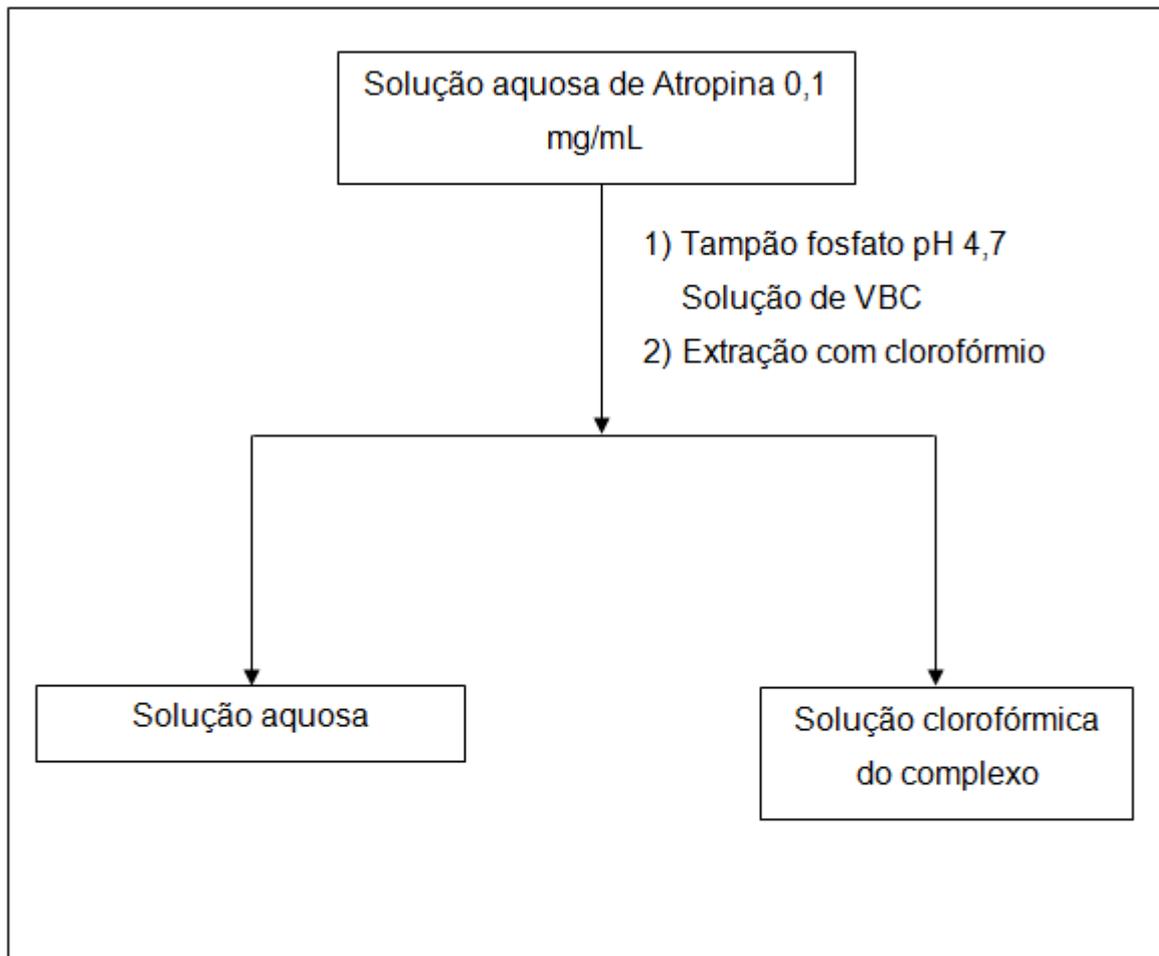
A partir da equação da reta obtida na curva de calibração, realizou-se o cálculo do teor de taninos. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.5.4 Determinação do teor de alcaloides

A determinação do teor de alcaloides seguiu o método descrito por Ajanal, Gundkalle e Nayak (2012). A curva de calibração foi obtida a partir de uma solução padrão de atropina 0,1 mg/mL. Dessa solução foram retiradas alíquotas de 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 e 1,2 mL, as quais foram transferidas para diferentes funis de separação. Em seguida, cada alíquota foi tratada com 5,0 mL de solução tampão de fosfato de pH 4,7, e 5,0 mL de solução de verde de bromocresol (VBC), e a mistura foi agitada e extraída com 1, 2, 3 e 4 mL de clorofórmio. Cada alíquota foi recolhida em tubo de ensaio e ajustada o volume da solução com clorofórmio para 10 mL (Figura 12). As medidas de absorbâncias destas soluções permitiu a obtenção da equação de reta necessária para a determinação do teor de alcaloides.

PARTE EXPERIMENTAL

Figura 12: Esquema de obtenção das alíquotas para leitura das absorvâncias em espectrofotômetro-UV para construção da curva de calibração de alcalóides.



Fonte: Dados da pesquisa

Para análise das amostras foi preparada uma solução do extrato com concentração de 5 mg/mL. Para isso foi pesado 10 mg do extrato que foi dissolvido em 2,0 mL de HCl 2,0 N e depois filtrado. Desta solução foi retirada uma alíquota de 1,0 mL e transferida para um funil de separação, onde foi lavada com 10 mL de clorofórmio por três vezes. Em seguida, o pH da solução remanescente foi ajustado para neutro com NaOH 0,1 N. Posteriormente, foi adicionado a esta solução 5,0 mL de solução tampão de fosfato de pH 4,7 e 5,0 mL da solução de VBC. A mistura foi agitada vigorosamente, e o complexo foi extraído com 1, 2, 3 e 4 mL de clorofórmio. O extrato foi então recolhido em tubo de ensaio e o volume ajustado com clorofórmio até 10 mL.

A leitura da absorvância do complexo em clorofórmio foi feita em comprimento de onda de 470 nm contra um branco composto pela solução tampão

PARTE EXPERIMENTAL

de fosfato pH 4,7 e solução de VBC. A partir da equação da reta obtida na curva de calibração, realizou-se o cálculo do teor de alcalóides. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Vale destacar que a solução tampão de fosfato (pH 4,7) foi preparada a partir de uma solução de fosfato de sódio 2,0 M (71,6 g de Na₂PO₄ em 1,0 L de água destilada), e pH ajustado para 4,7 com ácido cítrico 0,2 M (ácido cítrico 42,02 g em 1,0 L de água destilada). Já a solução de VBC foi preparada a partir de 69,8 mg de verde de bromocresol com 3,0 mL de NaOH 2,0 N e 5,0 mL de água destilada até dissolver completamente, por fim a solução foi diluída para 1000 mL com água destilada.

4.6 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do extrato das folhas e sementes de *A. montana*

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é um processo físico de separação, no qual os componentes de uma mistura a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma fase estacionária e outra que se move. Para tanto, nesta análise foi utilizada a técnica de eluição por gradiente, a qual é feita aumentando-se a força de interação da fase móvel durante a separação cromatográfica (LIMA, 2007).

As análises foram realizadas em cromatógrafo analítico marca Shimadzu modelo LC-20 A. Controlador CBM-20A, detector UV-Vis com arranjo de diodos (DAD), modelo SPD- M20 A, coluna Nuleodur® 100-5 Macherey-Nagel, C-18, 5 µm (250 x 4,6 mm).

4.6.1 Métodos para análises das amostras em CLAE

4.6.1.1 Método 1

As frações foram analisadas em coluna de fase reversa C-18, no modo gradiente com acetonitrila e água [MeCN/H₂O 5:95 → MeCN 100% em 40 min] com vazão de 1,0 mL/min e varredura de 190 a 800 nm.

PARTE EXPERIMENTAL

4.6.2.2 Método 2

As frações foram analisadas em coluna de fase reversa C-18, no modo gradiente com metanol e água [MeOH:H₂O, 5-100% MeOH em 50 min]. Solução de aproximadamente 1 mg/mL, fluxo 1 mL/min, C-18, $\lambda = 254$ nm.

4.7 Bioensaios

Para a realização deste estudo foram utilizados insetos adultos de *Aedes aegypti* provenientes de Teresina-PI, e mantidos em colônia semi fechada no Laboratório de Parasitologia e Entomologia Sanitária (LAPES), do Departamento de Parasitologia e Microbiologia, CCS, UFPI.

No insetário, os ovos, as larvas e as pupas foram criados em potes plásticos, contendo água desclorada (água da torneira deixada em repouso por 12 horas em temperatura ambiente), e cobertos por uma tela de náilon.

Os adultos foram mantidos em gaiolas de náilon, alimentados com solução de sacarose saturada *ad libitum*. Os mosquitos fêmeas, também foram alimentadas com galinhas, em condições controladas de temperatura e umidade (28±1°C; 70±10%).

Após a alimentação, foi introduzido nas gaiolas um pote plástico transparente com água desclorada e coberto com papel filtro, para a postura das fêmeas. Os ovos obtidos foram colocados para secar a temperatura ambiente, em seguida foram contados e armazenados.

Vale destacar que para a efetividade dos testes de bioensaio foram realizados testes preliminares para a escolha do extrato mais adequado, o qual evidenciou os extratos da fração metanólica das sementes como o de melhor resposta para os objetivos da pesquisa.

4.7.1 Teste Larvicida e efeito residual

A realização deste teste seguiu a metodologia proposta por Guarido (2009) com modificações, onde, primeiramente, as larvas utilizadas foram provenientes da colônia supracitada, e os ovos obtidos foram submersos em água desclorada dentro

PARTE EXPERIMENTAL

de potes plásticos com capacidade para 700 mL, e adicionada ração de peixe triturada para induzir a eclosão larval. Após a eclosão, as larvas continuaram sendo alimentadas com ração de peixe triturada até atingirem o terceiro estágio final ou quarto inicial.

As larvas foram contadas e transferidas com auxílio de uma pipeta de Pasteur, para copos plásticos de 50 mL. Cada copo continha 10 larvas e 20 mL da mesma água desclorada que se encontravam as larvas anteriormente. Essas larvas ficaram armazenadas em câmara climatizada enquanto os copos com as soluções eram preparados.

As larvas de terceiro estágio final ou quarto inicial foram expostas a quatro diferentes concentrações de extrato da fração metanólica das sementes de *Annona montana*, e para a calibração do DMSO 1,0%.

Os experimentos foram realizados em triplicata, totalizando 30 larvas por concentração. Cada replica continha a concentração desejada do extrato em 20 mL de água destilada com DMSO 1%. Como controle, foi utilizado a 20 mL de DMSO 1% com água destilada. Após homogeneização da solução, as larvas anteriormente separadas foram acondicionadas em recipientes contento a solução preparada.

As soluções escolhidas para a realização dos testes foram de 10 a 40 µg/mL (10, 20, 30 e 40 µg/mL), enquanto que a mortalidade foi verificada após 24 e 48 horas de exposição aos extratos. As larvas incapazes de atingir a superfície da solução ou que não apresentaram nenhum tipo de movimento foram consideradas mortas. As larvas sobreviventes no final do experimento foram descartadas, e novas larvas foram colocadas nos potes de ensaio para verificar o efeito residual do extrato.

4.7.2 Teste oviposicional

Para cada 10 casais de mosquitos foram ofertados quatro criadouros testes, a saber: um com CL₅₀, outro com CL₉₀, outro com controle comercial, por fim, um segundo controle com DMSO 1% em água desclorada. As concentrações de CL₅₀ e CL₉₀ foram obtidas de acordo com o teste anterior. Após a alimentação sanguínea dos mosquitos fêmeas, foram inseridos potes contendo as soluções e cobertos lateralmente com papel filtro, nas mesmas condições de criação no laboratório. Feito

PARTE EXPERIMENTAL

isso, as avaliações foram realizadas diariamente por três dias, efetuando a contagem dos ovos.

A solução preparada foi aplicada nos filtros e após a secagem, estes foram acomodados nos potes contendo água desclorada.

4.8 Análise de dados

4.8.1 Quantificação de metabólitos secundários

Para a quantificação dos metabólitos secundários foi utilizado um espectrofotômetro VIS 320 a 1100 nm da marca Bunker, onde os experimentos foram feitos em triplicata (n=3) e os resultados apresentados à média de três verificações. As técnicas de quantificação seguiram alguns parâmetros de validação como especificidade, função da resposta (gráfico analítico), linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), a fim de gerar dados credíveis e adequados aos objetivos propostos.

A especificidade foi realizada por meio da adição dos padrões analíticos, na qual objetivou-se detectar o analito de interesse na presença de outros constituintes. A função resposta foi obtida por meio das equações de regressão linear, característico para cada metabólito quantificado. Para avaliar a linearidade foi usada a média de três intervalos com repetições autênticas, que contemplavam as concentrações das soluções padrão analisadas. Por fim, o LD e o LQ foram expressos considerando o desvio padrão em razão ao coeficiente angular, sob condições experimentais estabelecidas (equações 1 e 2) (BRITO et al., 2003; SOBRINHO et al., 2008).

$$LD = DP_a \times 3/IC \quad (1)$$

$$LQ = DP_a \times 10/IC \quad (2); \text{ onde:}$$

DPa: Desvio padrão; IC: Inclinação da curva

A validação dos procedimentos analíticos tem por objetivo demonstrar que os métodos de ensaio utilizados apresentam resultados que permitem avaliar

PARTE EXPERIMENTAL

objetivamente a qualidade dos extratos, conforme os parâmetros especificados (SOBRINHO et al., 2008).

Todos os dados foram tabelados e analisados estatisticamente pelo software Origin[®] 8.0.

4.8.2 Bioensaios: teste larvicida, efeito residual e teste oviposicional

Para o teste larvicida, efeito residual e teste oviposicional o cálculo do CL₅₀ e CL₉₀ dos extratos analisados foram feitos no software Probit[®], a partir da relação de concentração (µg/mL) - mortalidade (%) obtida no ensaio.

4.9 Considerações éticas

A manutenção da colônia de mosquitos seguiu os parâmetros de biossegurança para insetários da Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ (ANJOLLETE; MACORIS, 2016).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção do extrato etanólico

A partir de toda a massa do pó das folhas (623,45 g) de *A. montana* obteve-se 13,26 g de extrato etanólico, que expressa um rendimento de aproximadamente 2,13%. Já para as sementes, dos 237,18 g de pó, foi extraído 8,593 g cujo rendimento foi de 3,62% conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1 - Rendimento do extrato orgânico a partir de folhas e sementes de *A. montana*.

Espécie	Estrutura	Material Vegetal (g)	Solvente	Rendimento	
				(g)	(%)
<i>Annona montana</i>	Folhas	623,45	Etanol	13,26	2,13
	Sementes	237,18		8,593	3,62

Fonte: Pesquisa direta.

Esses rendimentos podem ser explicados pela presença de óleos, que apresentam como constituinte majoritário triacilgliceróis, e que podem ser extraídos com etanol (BRANCO et al., 2009). O etanol permite que grande parte dos constituintes de plantas sejam extraídos, uma vez que a maioria dos metabólitos apresentam solubilidade em misturas etanólicas, além de ser o solvente que mais se adéqua aos preceitos da química verde (BRITO, 2014).

Além disso, alguns fatores podem estar relacionados ao rendimento da extração, tais como: método de extração, solvente empregado, variações sazonais fisiológicas, peculiaridades do ambiente de cultivo da planta e variação genética (FIGUEIREDO et al., 2007; BIMAKR et al., 2011).

Nesse sentido, outro fator que pode interferir no rendimento é o tamanho das partículas do material vegetal processado, quanto menor o tamanho maior a superfície de contato com o solvente e maior a extração. Desta forma, inúmeros fatores podem interferir nos rendimentos dos extratos, onde a otimização das condições de extração pode proporcionar maior

RESULTADOS E DISCUSSÃO

rendimento de extração. Assim, o comportamento dessa variável assume difícil comparação entre estudos disponíveis na literatura (MENDES, 2012).

Para a avaliação do rendimento das frações, foi retirado 5 g de cada extrato de *A. montana* obtido pelo método de maceração, solubilizado em metanol/água (8:2) e submetido a partição com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. Na tabela 2 a seguir estão detalhadas as partições obtidas.

Tabela 2 - Rendimento das frações orgânicas obtidas pelo processo de partição com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol a partir dos extratos de *A. montana*.

Espécie	Estrutura	Material Vegetal (g)	Solvente	Rendimento	
				(g)	(%)
<i>Annona montana</i>	Folhas	5	Hexano	0,81	16,2
			Clorofórmio	1,12	22,4
			Acet. etila	1,31	26,2
			Metanol	1,76	35,2
	Sementes	5	Hexano	2,62	52,4
			Clorofórmio	1,03	20,6
			Acet. etila	0,74	14,8
			Metanol	0,61	12,2

Fonte: Pesquisa direta.

O alto rendimento das frações em hexano obtido nesse estudo, a partir das folhas e sementes de *A. montana*, é decorrente do alto teor de óleo nessas estruturas vegetais, destacadamente nas sementes, o qual é majoritariamente extraído pelos solventes mais apolares no sistema de extração empregado. Estudos de Ribeiro et al. (2013) e Lima (2007) afirmam que as espécies do

RESULTADOS E DISCUSSÃO

gênero *Annona* acumulam significativas quantidades de óleo nas sementes, as quais vêm sendo pesquisadas para utilização na produção de produtos inseticidas e repelentes.

Estes dados são semelhantes aos resultados obtidos por Masruri et al. (2012) e Abdualrahman et al. (2016), os quais verificaram que as sementes de *Annona muricata* e *Annona squamosa*, respectivamente, possuem maior teores de lipídios em detrimento das proteínas e dos carboidratos. As sementes têm sido estudadas quanto à composição química de suas reservas, e tal interesse não se dá apenas por seu teor nutritivo, mas por serem úteis na confecção de produtos industrializados (BUCKERIDGE, 2010).

5.2 Screening Fitoquímico de *A. montana*

A análise fitoquímica preliminar tem por objetivo caracterizar os componentes químicos presentes nas plantas e produtos do metabolismo secundário vegetal. A presença ou ausência de concentrações consideráveis de metabólitos secundários numa determinada espécie é influenciado por vários fatores, tais como: época da coleta, idade da planta e fatores ambientais. Os testes qualitativos aqui empregados detectam apenas metabólitos especiais que estejam presentes em concentrações mínimas necessárias para análise nos extratos analisados (SOARES et al., 2016).

O resultado da análise qualitativa dos compostos do metabolismo secundário presente nos extratos das folhas e sementes de *A. montana* estão listados na tabela 3.

Tabela 3 - Resultados do *screening* fitoquímico.

Metabólitos secundário / Testes realizados	Folhas	Sementes
Alcaloides (Dragendorf)	+/-	+
Taninos (Cloreto férrico)	+/-	-
Flavonoides (Reação de Shinoda)	+	-
Triterpenos e Esteroides (Reação de Liebermann-Burchard)	+	+
Saponinas (Teste da espuma)	-	+
Cumarinas	+	+
Quinonas	+	-

Fonte: Pesquisa direta. (+) Presença; (-) Ausência; (+/-) Pouco expressivo.

Pelos resultados da tabela 3 pode-se dizer que no *screening* fitoquímico dos extratos de *A. montana* foram detectados praticamente todos os metabólitos secundários analisados. A aplicação de testes como esses são de extrema relevância, uma vez que detectam a presença de compostos, funcionando como marcadores químicos da espécie, além de delinear melhores métodos de extração e bioensaios aos quais poderá ser submetida, ainda mais numa espécie de anonácea com perfil fitoquímico pouco elucidado (SOARES et al., 2016).

Os métodos empregados para esta análise qualitativa foram baseados em reações químicas de coloração e precipitação em tubos de ensaio e placas de CCD, por serem métodos rápidos e de baixo custo, capazes de traçar o perfil químico do vegetal, sendo que em algumas identificações como taninos, flavonoides, triterpenos e esteroides foi preciso a combinação de ferramentas quantitativas e específicas (BESSA et al., 2013; CARVALHO et al., 2014).

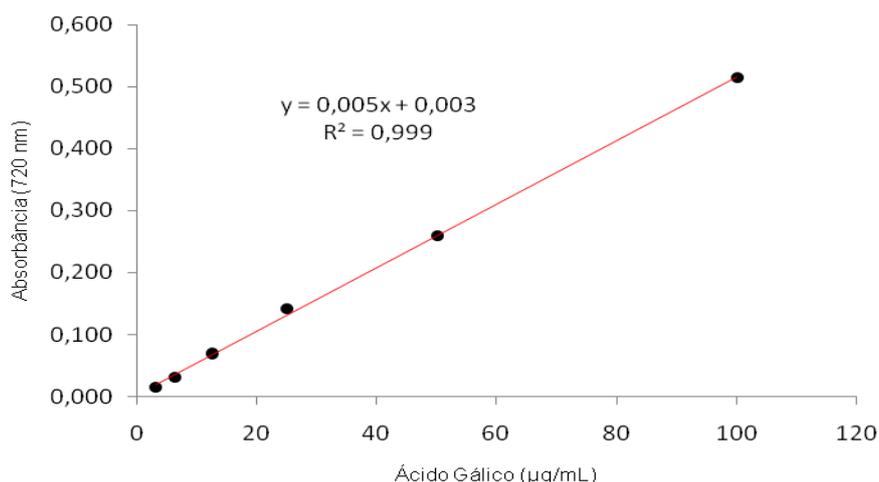
Alguns dos constituintes químicos presentes nos extratos são responsáveis, majoritariamente, pela atividade biológica do gênero *Annona*, como alcaloides, flavonoides, taninos e fenóis totais (CARVALHO et al., 2014). Contudo, vale destacar que testes qualitativos não possuem alta sensibilidade, portanto é importante realizar análises de quantificação para comprovar ou não a existência de determinado metabólito (GUARIDO, 2009).

5.3 Quantificação dos metabólitos secundários de *A. montana*

Os metabólitos foram quantificados por meio de espectrofotometria, e realizadas de modo específico para cada tipo de metabólito. Entretanto, não foi possível realizar para todos os compostos identificados no teste qualitativo, devido a dificuldade de se encontrar reagentes para os testes.

Sendo assim, a determinação do teor de polifenóis foi realizada de acordo com as técnicas descritas por Swain e Hills (1959), onde foi construída uma curva de calibração (figura 13) para obtenção de uma equação de reta que determinou a quantidade de polifenóis existente nos extratos.

Figura 13: Curva de calibração do padrão de referência ácido gálico.



Fonte: Pesquisa direta.

Pela análise da figura 16 foi possível perceber que no comprimento de onda de 720 nm, as leituras de absorbância foram características para a construção da curva de calibração para polifenóis, na qual apresentou equação de regressão linear média igual a $y = 0,003 + 0,005x$, onde y representa absorbância (nm) e x a concentração ($\mu\text{g/mL}$). O coeficiente de determinação obtido foi $R^2 = 0,999$, indicando adequação do método ao intervalo avaliado. Os valores de LD e LQ estimados pelas equações 1 e 2, foram 0,1297 e 0,3891 de absorbância, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como a absorvância para os extratos das folhas foi 0,3143 e das sementes foi de 0,1306, portanto dentro dos limites foi possível determinar o teor de polifenóis. Nas soluções com concentração de 250 µg/mL preparadas a partir dos extratos das folhas e sementes de *Annona montana*, calculou-se os valores das concentrações de polifenóis em µg/mL conforme a tabela 4.

Tabela 4 - Resultado da quantificação de polifenóis nos extratos de *Annona montana*.

Conc. da solução (250 µg/mL)	Absorbância	Conc. Polifenóis (µg/mL)	Conc. Polifenóis (%)	Conc. Polifenóis (µg/g)
Folha	0,3143	62,25	24,9	249,0
Semente	0,1306	25,52	10,2	102,0

Fonte: Pesquisa direta.

Até o presente momento ainda não foi observado na literatura estudos que trouxessem a quantificação de polifenóis em *A. montana*. Contudo, em estudos realizados com outras espécies da família Annonaceae relatam valores fenólicos totais de 120 mg / 100 g para polpa de *A. muricata* (graviola), enquanto outros citam teor de 84,3 mg / 100 g nas folhas de *A. squamosa* (ata) (NUNES et al., 2013). Esses valores mostram que o teor de determinado metabólito é variável de espécie para espécie, dependendo de fatores que vão desde a parte da planta utilizada até o método de quantificação.

Assim, tomando como parâmetro medidas de estudos anteriores a *A. montana* possui 24,9 mg / 100 g de polifenóis nas folhas e 10,2 mg / 100 g nas sementes, fato que revela que mesmo em pouca quantidade, a planta exibe um importante potencial bioativo, uma vez que em certas espécies de planta pode ter uma forte relação entre atividade antioxidante e o conteúdo fenólico. Dessa maneira, é possível observar uma relação entre concentração de polifenóis e a capacidade de sequestrar radicais livres (FERNANDÉZ et al., 2017).

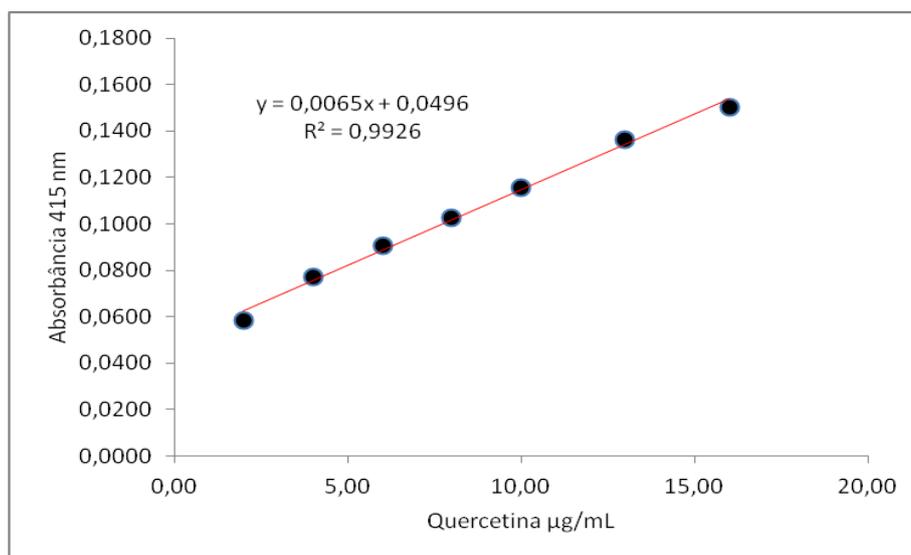
Segundo Correa et al. (2012), a atividade antioxidante de polifenóis está associada a sua estrutura química, haja vista que a facilidade desse efeito torna-se possível pelo átomo de hidrogênio, a partir de uma hidroxila do anel

RESULTADOS E DISCUSSÃO

aromático, poder ser doado a um radical livre, bem como a polaridade e posição dos grupos constituintes.

Para a determinação do teor de flavonóides foi realizada a técnica de Meda (2005) a partir dos extratos de *Annona montana*, onde, primeiramente, foi obtida uma curva de calibração (figura 14) para posterior obtenção de uma equação de reta.

Figura 14: Curva de calibração do padrão de referência quercetina.



Fonte: Pesquisa direta.

A análise da figura 14 aponta que no comprimento de onda de 415 nm, as leituras de absorvância foram características para a construção da curva de calibração para flavonoides, a qual apresentou equação de regressão linear média igual a $y = 0,0496 + 0,0065x$, onde y representa absorvância (nm) e x a concentração (µg/mL). O coeficiente de determinação obtido foi $R^2 = 0,9926$, indicando adequação do método ao intervalo avaliado. Os valores de LD e LQ estimados pelas equações 1 e 2, foram 0,2940 e 0,8820 de absorvância, respectivamente.

A absorvância dos testes para os extratos com as folhas foi de 0,3766, e para as sementes foi 0,3390, portanto dentro dos limites sendo possível determinar o teor de flavonoides (tabela 5).

RESULTADOS E DISCUSSÃO**Tabela 5** - Resultado da quantificação de flavonoides nos extratos de *Annona montana*.

Conc. da solução (500 µg/mL)	Absorbância	Conc. Flav. (µg/mL)	Conc. Flav. (%)	Conc. Flav. (µg/g)
Folha	0,3766	50,31	10,1	101,0
Semente	0,3390	44,52	8,9	89,0

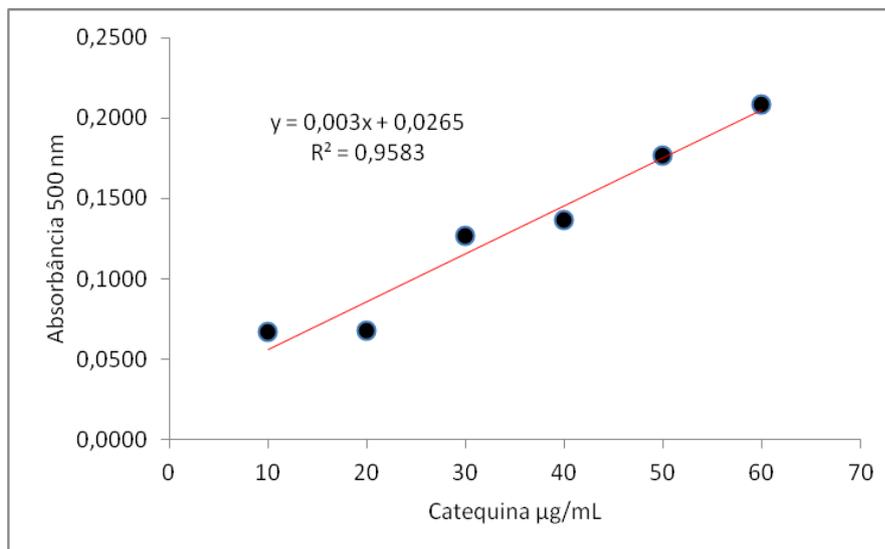
Fonte: Pesquisa direta.

Assim como nos polifenóis, a presença de flavonoides em plantas do gênero *Annona* os dados ainda são recentes, no entanto pesquisas têm mostrado cada vez mais a presença desses metabólitos, sobretudo na forma glicosilada como a quercetrina (NUNES et al., 2013). Os flavonóides possuem função bioativa semelhante a dos polifenóis exibindo forte atividade antioxidante, antimicrobiana e antiparasitária (SIMÕES et al., 2010).

A quercetrina, na reação com o íon alumínio (Al^{+3}) durante o processo de quantificação, forma um complexo com as moléculas de flavonóides da amostra, estabelecendo um complexo estável flavonoide- Al^{+3} . Este complexo promove em espectroscopia intensificação das absorções, sendo quantificado sem sofrer influência de outros compostos fenólicos, como polifenóis e taninos (SOBRINHO, 2014).

Num estudo realizado por Nunes et al. (2013) com *Annona dioica*, revelou que a planta possui quatro flavonóides responsáveis por atividades hipoglicemiantes, antiedemogênico, anticancerígena e antioxidante.

Quanto à determinação do teor de taninos nos extratos de *Annona montana* foi seguida a técnica descrita por Makkar e Becker (1993), para construção da curva de calibração e obtenção da equação de reta (figura 15).

Figura 15: Curva de calibração do padrão de referência catequina.

Fonte: Pesquisa direta.

Pela figura 15, o comprimento de onda de 500 nm permitiu as leituras de absorbância características para a construção da curva de calibração para taninos, a qual apresentou equação de regressão linear média igual a $y = 0,0265 + 0,003x$, onde y representa absorbância (nm) e x a concentração ($\mu\text{g/mL}$). O coeficiente de determinação obtido foi $R^2 = 0,9583$, indicando adequação do método ao intervalo avaliado. Os valores de LD e LQ estimados pelas equações 1 e 2, foram 0,154 e 0,462 de absorbância, respectivamente.

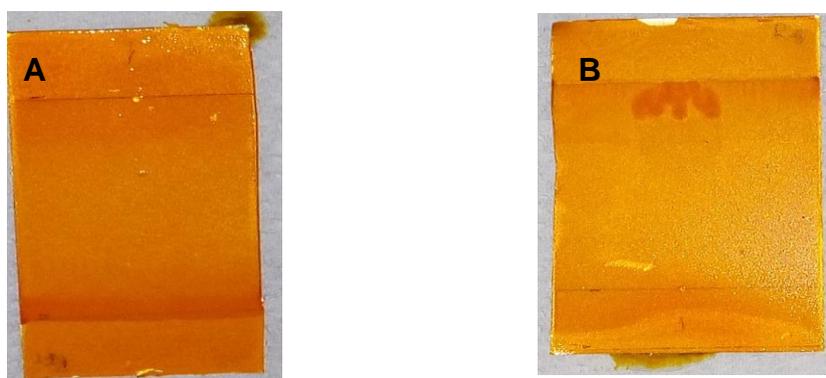
Como as absorbâncias média obtidas da solução do extrato das folhas foi 0,041, e nas sementes foi de 0,038, portanto menores que o intervalo de detecção, não foi possível determinar o teor de taninos, haja vista que as absorbâncias do teste não se mostraram dentro dos limites de detecção e quantificação. Portanto, para a solução de concentração 200 $\mu\text{g/mL}$ obtida a partir dos extratos, não houve detecção de taninos.

Esse resultado vai de encontro ao mostrado no *screening* fitoquímico, onde taninos foram identificados no extrato das folhas de forma pouco expressiva e nas sementes se mostraram ausentes. Contudo, os taninos são metabólitos presentes na maioria das plantas, onde sua concentração nos tecidos vegetais varia conforme a idade, tamanho da planta, parte coletada e local onde a mesma foi coletada (NUNES et al., 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por último, para a determinação do teor de alcalóides nos extratos de *A. montana* foi utilizado o método de Ajanal, Gundkalle e Nayak (2012), para a obtenção da curva de calibração (figura 17) e equação de reta. Esta análise foi realizada tanto para as folhas como para as sementes, apesar de que no teste qualitativo foi pouco expressivo a presença deste metabólito nas folhas, conforme a figura 16.

Figura 16: Resultado do teste qualitativo de alcalóides por reagente de Dragendorff.



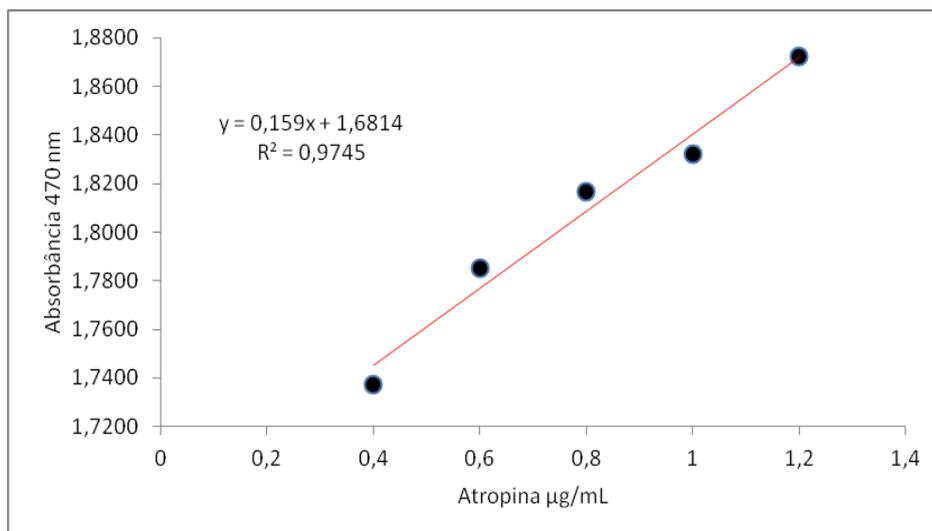
Fonte: Pesquisa direta. A: Placa de CCD com extrato da folha; B: Placa CCD com extrato semente

Pela análise da figura 17 foi possível perceber que no comprimento de onda de 470 nm, as leituras de absorvância foram características para a construção da curva de calibração para alcalóides, a qual apresentou equação de regressão linear média igual a $y = 1,6814 + 0,159x$, onde y representa absorvância (nm) e x a concentração ($\mu\text{g/mL}$). O coeficiente de determinação obtido foi $R^2 = 0,9745$, indicando adequação do método ao intervalo avaliado. Os valores de LD e LQ estimados pelas equações 1 e 2, foram 1,7996 e 5,3988 de absorvância, respectivamente.

As absorvâncias dos testes para os extratos com as folhas foi de 1,9167, e para as sementes foi 1,9564, portanto dentro do limite de detecção (LD), sendo possível determinar o teor de alcalóides.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 17: Curva de calibração do padrão de referência atropina.



Fonte: Pesquisa direta.

Na determinação do teor de alcalóides, a solução de concentração 5,0 mg/mL preparada a partir dos extratos etanólicos das folhas e sementes de *A. montana* foi possível quantificar os valores das concentrações de alcalóides em mg/mL conforme a tabela 6.

Tabela 6 - Resultado da quantificação de alcaloides nos extratos de *Annona montana*.

Conc. da solução (5000 µg/mL)	Absorbância	Conc. Alcalóides (µg/mL)	Conc. Alcalóides (%)	Conc. Alcal. (µg/mL)
Folha	1,9167	1,48	0,0296	0,296
Semente	1,9564	1,73	0,0346	0,346

Fonte: Pesquisa direta.

Os alcaloides são compostos orgânicos farmacologicamente ativos que contêm nitrogênio na sua constituição, presentes naturalmente no reino vegetal. Pelos resultados obtidos foi possível perceber que a *A. montana* possui alcalóides, tanto nas folhas como nas sementes. No entanto, em quantidades mínimas se comparadas com polifenóis e flavonóides. Isso,

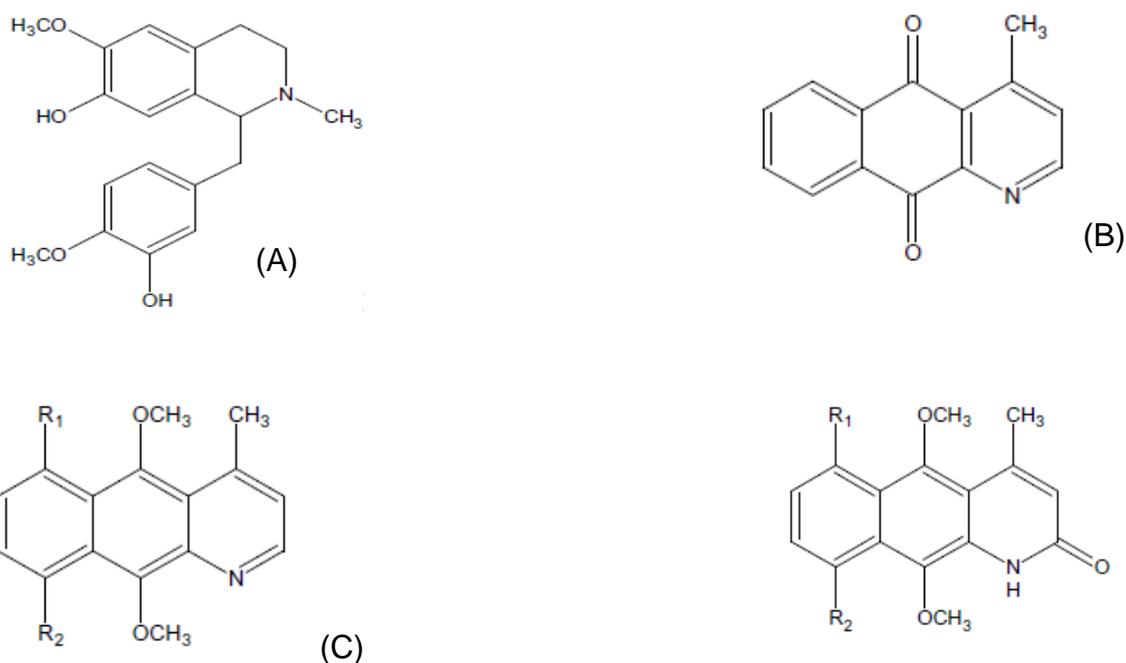
RESULTADOS E DISCUSSÃO

provavelmente, deve ser por conta do método desenvolvido que não define uma concentração exata do extrato.

Nas anonáceas, os alcalóides estão concentrados mais nas sementes e frutos, e são derivados da benzilisoquinolina, sendo a reticulina de maior ocorrência (figura 18). Entre os derivados de azaantraquinona a cleistofolina, geovanina e anafolina foram obtidas, fato que pode ser confirmado, uma vez que nos extratos das sementes de *A. montana* houve um maior teor de alcalóides (CHATROU et al., 2012). Em estudos realizados por Rupprecht (1991) apontaram que as folhas de *A. montana* possuem um alcalóide de fenantreno citotóxico semelhante a oxoaporfina.

Leboeuf et al., (1982) listou cerca de 170 alcalóides isolados de diversos gêneros de Annonaceae, sendo que a annomontina e metoxiannomontina foram isolados das cascas de tronco e raiz de *Annona montana*, constituindo os primeiros alcalóides isolados desta espécie de planta.

Figura 18: Estrutura da (A) reticulina, (B) cleistofolina, (C) geovanina e (D) anafolina.



Fonte: Adaptado Luna (2006).

(D)

5.4 Análise de CLAE dos extratos de *A. montana*

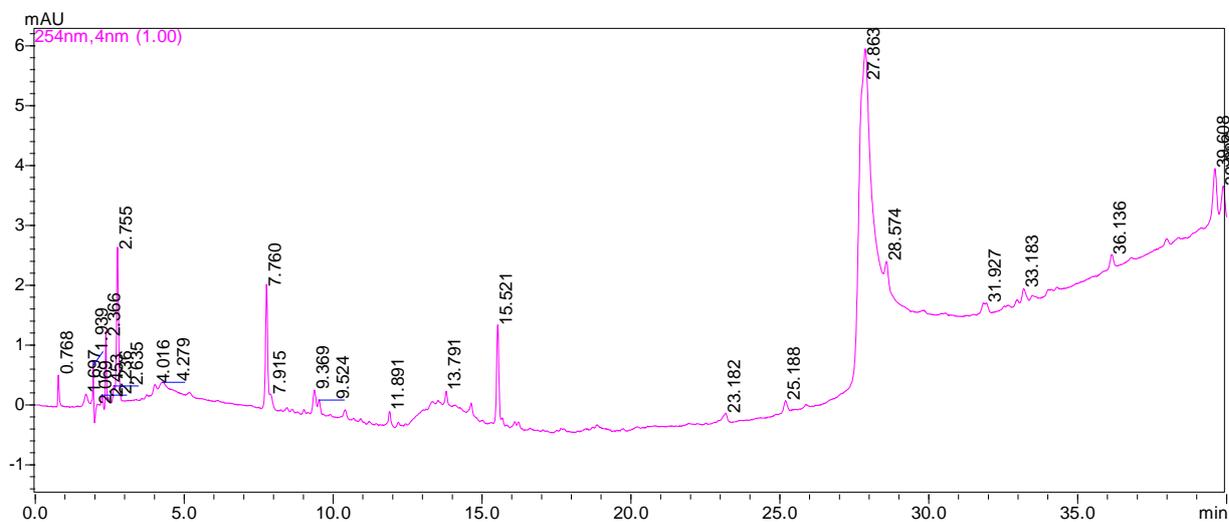
A análise do perfil químico por CLAE-DAD teve como objetivo verificar a adequação desta técnica cromatográfica no trabalho experimental e, também contribuir para uma avaliação prévia da natureza química das substâncias presentes. Assim, o uso da eluição gradiente em condições de ampla faixa de força da fase móvel é tido como exploratório e pode ser usado de modo a fornecer um cromatograma *fingerprint* da amostra em análise (CASS, DEGANI, 2001).

Para esta análise, foram usadas as frações metanólicas dos extratos brutos das folhas e sementes de *A. montana*, haja visto que nas demais frações não foi possível obter cromatogramas reprodutíveis, muito provavelmente por conta da clorofila, presente principalmente nas folhas, que quando submetidos à CLAE exibiram pequeno número de bandas cromatográficas, que pode ter acontecido devido a retenção de outros compostos além da clorofila (LIMA, 2007).

Nos cromatogramas (figura 19 e 20) obtidos em gradiente exploratório binário usando a mistura água (A) e acetonitrila (B) como solventes. Fez-se variar a concentração do solvente B de 5% a 100% durante 50 minutos, com vazão de 1,0 mL por minuto, onde foi observada uma variedade metabólica, com bandas cromatográficas com diferentes tempos de retenção, variando de média a alta polaridade nos extratos das sementes (fração metanólica). No entanto, o mesmo não foi observado para a mesma fração nos extratos das folhas.

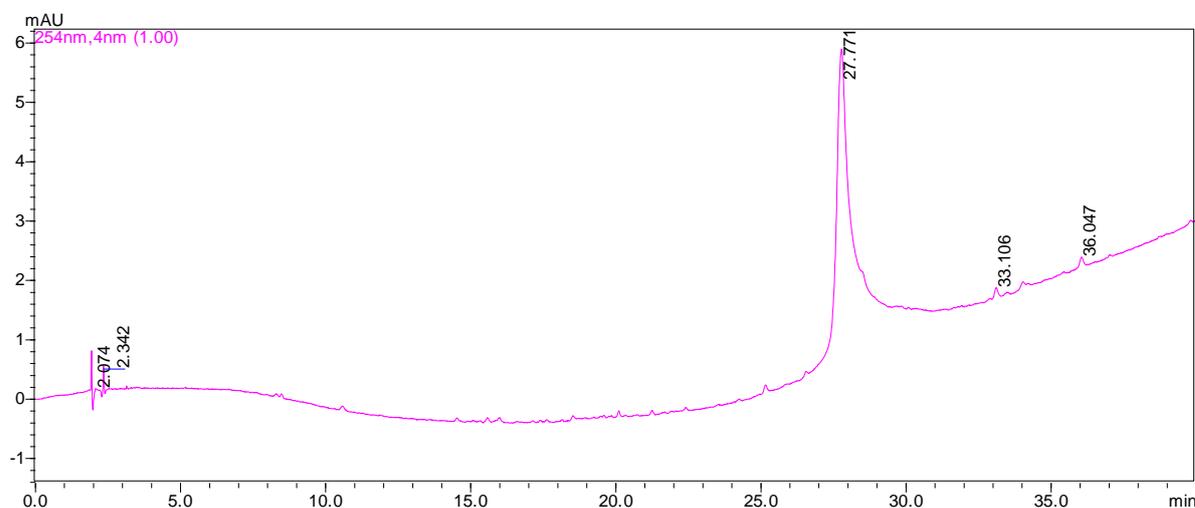
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 19: *Fingerprint* da fração metanólica do extrato bruto das sementes de *A. montana* pelo método 1.



Fonte: Pesquisa Direta

Figura 20: *Fingerprint* da fração metanólica do extrato bruto das folhas de *A. montana* pelo método 1



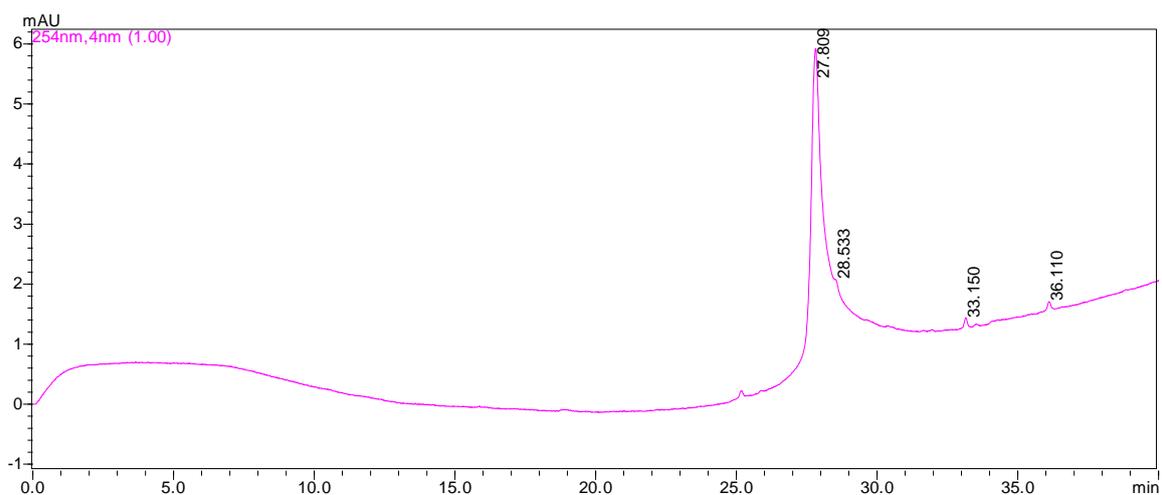
Fonte: Pesquisa Direta

A diferença marcante encontrada na análise dos dois cromatogramas *fingerprint* (figuras 19 e 20), é que a fração metanólica do extrato bruto das sementes de *A. montana* exibe a presença de bandas com tempo de retenção entre 2,5 e 20 minutos que não foram observadas nas folhas. Uma visão mais clara da similaridade e diferenças entre os dois extratos brutos pode ser

RESULTADOS E DISCUSSÃO

observada a presença de banda com o tempo de retenção próximo a 30 minutos. No entanto, essa característica pode ser associada a impurezas no aparelho, uma vez que antes da amostra ser submetida à CLAE foi realizada a leitura com o branco constituído apenas por acetonitrila (figura 21).

Figura 21: *Fingerprint* da amostra controle formada apenas por acetonitrila

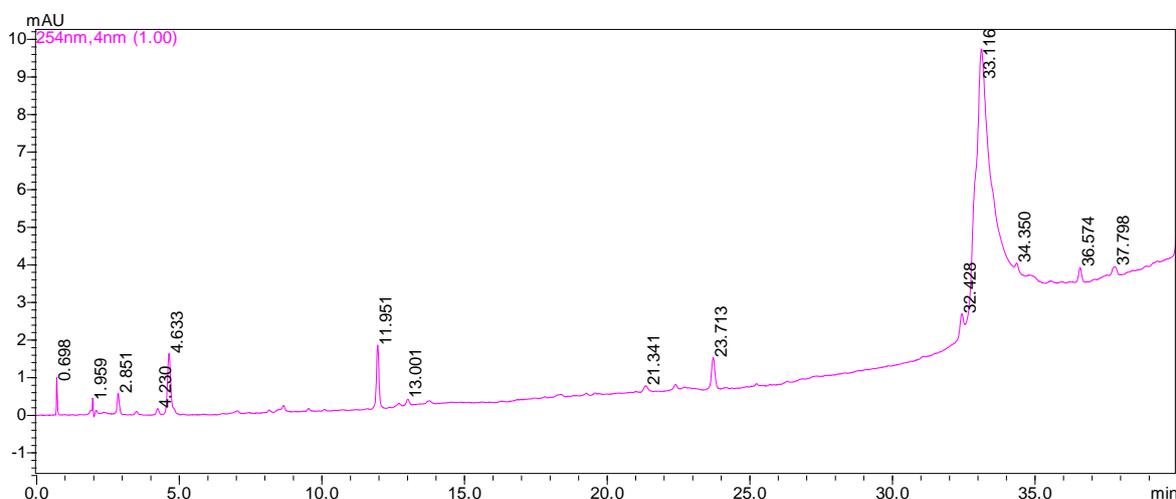


Fonte: Pesquisa direta

Pelo método 2, no qual os cromatogramas foram obtidos em gradiente exploratório binário usando a mistura água (A) e metanol (B) como solventes, foi observada uma grande variedade metabólica, com bandas cromatográficas com diferentes tempos de retenção, variando de média a alta polaridade somente nos extratos das sementes (fração metanólica).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 22: *Fingerprint* da fração metanólica do extrato bruto das sementes de *A. montana* pelo método 2



Fonte: Pesquisa direta

Nesse caso, como foi possível a obtenção apenas do cromatograma *fingerprint* (figuras 22) da fração metanólica do extrato bruto das sementes de *A. montana* houve a presença de bandas com tempo de retenção entre 5 e 25 minutos. Resultado muito semelhante ao encontrado no primeiro método.

Num estudo realizado por Lima (2007) sobre extratos brutos com misturas de acetogeninas de *A. muricata* e *A. squamosa* submetidas à análise por CLAE, revelou que o tempo de retenção para acetogeninas é observado com a presença de bandas entre 45 e 60 minutos. Isto sugere que é nesta região que deve ser encontrada as acetogeninas na *A. montana*.

5.5 Bioensaios

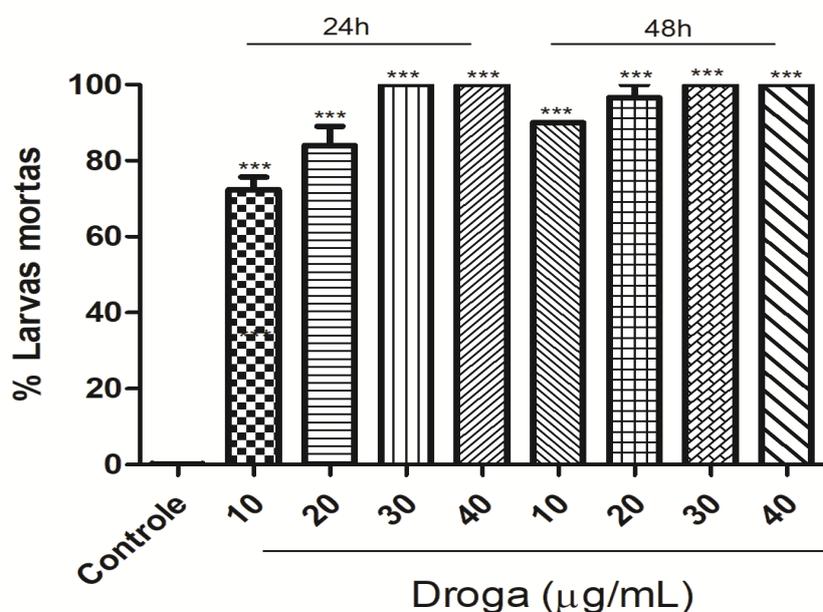
5.5.1 Atividade larvídica e efeito residual

Através da análise do Probit constatou-se que a concentração de 1% (Controle) de DMSO não causa mortalidade nas larvas de *A. aegypti*. Contudo, as demais concentrações testadas da fração metanólica do extrato bruto de *Annona montana* demonstraram potencial atividade larvídica, principalmente

RESULTADOS E DISCUSSÃO

nas concentrações maiores de 30 e 40 $\mu\text{g/mL}$, que exibiram mortalidade total das larvas logo nas primeiras 24h (figura 23).

Figura 23: Atividade larvicida da fração metanólica do extrato bruto das sementes de *Annona montana* em populações de *Aedes aegypti*.



Fonte: Pesquisa direta.

A utilização do DMSO a 1% em relação ao volume total utilizado nos bioensaios não auxilia na mortalidade das larvas. Na literatura, são encontrados trabalhos utilizando uma concentração mais alta desse produto em diferentes volumes, 2% por exemplo. Assim, o solvente utilizado juntamente com o produto de plantas indica que sua utilização não contribuiu com a mortalidade e o resultado encontrado é somente devido aos extratos ou óleos (FURTADO et al., 2005; PROPHIRO, 2008).

A eficácia como larvicida de *Annona montana* foi verificada para a fração metanólica do extrato das sementes, sob condições controladas (temperatura de 25°C, umidade relativa de 70±10% e fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro) em intervalo de concentração dose-resposta, sobre populações de *Aedes aegypti*. Os valores das concentrações letais CL_{50} e CL_{90} estimadas através da análise Probit estão apresentadas na tabela 7.

RESULTADOS E DISCUSSÃO**Tabela 7** - Concentrações letais da atividade larvicida da fração metanólica de *Annona montana* em populações de *Aedes aegypti*.

Extrato		CL₅₀	CL₉₀
Fração metanólica	24h	7,096	20,798
das sementes			
(µg/mL)	48h	3,752	10,356

Fonte: Pesquisa direta.

O extrato de *Annona montana* em concentrações letais apresentaram atividade larvicida. Esses resultados encontram-se dentro do que é esperado, uma vez que em estudos realizados por Silva et al. (2004) e Lima (2007) com extratos de *A. muricata* mostraram que a atividade larvicida de anonáceas está relacionada à acetogeninas tetraidrofurânicas com forte potencial citotóxico às larvas de *A. aegypti*.

Além disso, pesquisas demonstraram a eficiência larvicida de extratos obtidos em diferentes espécies da família Annonaceae contra espécies de mosquitos, não somente devido a presença de acetogeninas, mas também por alcaloides encontrados nos extratos (GUARIDO, 2009).

Neste estudo não foi possível investigar o mecanismo com o qual ocorre a mortalidade das larvas. Entretanto, alterações morfológicas externas das larvas como no exosqueleto, nas papilas anais, alongamento do colar, e internas como na membrana peritrófica, causadas pela exposição de derivados botânicos já foram reportados por diversos autores (PROPHIRO, 2008).

Assim, os derivados de plantas podem, além do efeito larvicida, influir no tempo de duração de larvas e pupas e reduzir a emergência de adultos. Dessa maneira, a aplicação de produtos naturais em doses sub letais poderia levar a novas estratégias de controle, relacionados a resistência aos inseticidas sintéticos (LIMA, 2017).

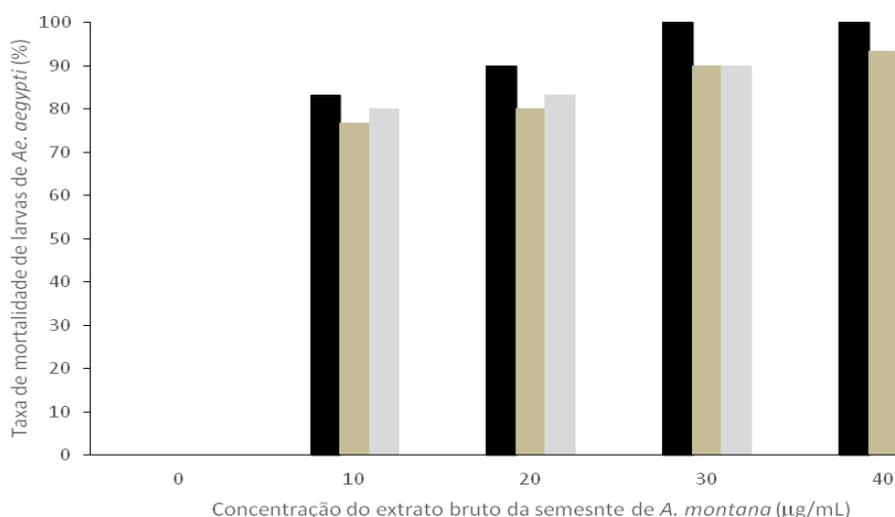
Contudo, apesar do aumento do número de estudos químicos e do potencial biológico das diferentes espécies de Annonaceae, nenhum trabalho envolvendo a atividade inseticida de *Annona montana*, bem como a presença de acetogeninas e mecanismo de ação dessa espécie foi descrita na literatura

RESULTADOS E DISCUSSÃO

até a data, sendo os resultados obtidos inéditos abrindo perspectivas para aprimoramento dos extratos desta planta.

Ainda em relação ao estudo com a fração metanólica do extrato das sementes de *A. montana*, o mesmo apresentou-se tóxico contra larvas de *A. aegypti*, exercendo efeito residual. Ao expor as larvas ao tratamento imediatamente após o primeiro, segundo, terceiro e quarto dia após o preparo da solução, as concentrações permaneceram com eficácia (figura 24).

Figura 24: Efeito larvicida residual da fração metanólica do extrato da semente de *A. montana*



Fonte: Pesquisa direta. Legenda: Foi avaliado a taxa de mortalidade das larvas de *Ae. aegypti* na presença do extrato preparado após 24 horas (barra em preto), 72 horas (barra em cinza escuro) e 96 horas (barra em cinza claro).

Esses resultados são semelhantes aos de Martins & Valle (2013), que relatou a persistência do extrato de azaractina durante 3 a 7 dias para o controle de pupa de *Chrysomya megacephala*. Nesta pesquisa, obteve-se efeito residual do extrato de *A. montana* por 4 dias em todas as concentrações, com efeito menor nas concentrações de 10 e 20 µg/mL.

A diferença no tempo de letalidade pode ocorrer por diferentes mecanismos de ação dos extratos vegetais nas larvas e pela forma em que esses extratos penetram nos organismos, se por ingestão ou por contato. Em relação aos sintéticos, ressalta-se a vantagem dos inseticidas naturais não

RESULTADOS E DISCUSSÃO

causarem contaminação ambiental por serem rapidamente degradáveis, persistindo por um período mais curto no ambiente (MORALES et al., 2004).

5.5.2 Atividade oviposicional

O número de ovos obtidos pelo teste de atividade oviposicional pode ser observado na tabela 8, com destaque para atividade inibidora na CL₅₀, o qual indicou que o total de ovopositados pelas fêmeas de *Aedes aegypti* foi apenas 8,8%, revelando influência do extrato de *Annona montana*.

Tabela 8 - Atividade inibidora da fração metanólica do extrato bruto de *A. montana* contra criadouros de *A. aegypti*.

PORCENTAGEM TOTAL DE OVOS (n)	CONTROLE (n)	REPELENTE COMERCIAL (n)	EXTRATO CL ₅₀ (n)	EXTRATO CL ₉₀ (n)
100 (328)	69,3 (227)	0,3 (1)	8,8 (29)	21,6 (71)

Fonte: Pesquisa direta

Estudos têm mostrado que o mosquito *A. aegypti* raramente oviposita diretamente na água, pois exibe preferência em depositá-los na parede do recipiente logo acima da linha da água. Assim, a deposição de ovos da água só seria realizada em recipientes extremamente lisos que não oferecem aderência suficiente (CHRISTOPHER, 1960; FAY & PERRY, 1965).

Nesse sentido, Lopes et al. (1993), afirma que o *A. aegypti* não mostra preferência por tipo de criadouro, mas prefere ambientes com água que não contém altos níveis de poluentes. No presente trabalho, as fêmeas preferiram ovipositar no controle de DMSO 1%. Um ambiente considerado favorável para a oviposição, no qual está associado com condições que o meio apresenta para o desenvolvimento e a sobrevivência de mosquitos imaturos.

Em relação ao extrato de *Annona montana* os resultados indicam similaridade do comportamento de oviposição nos mosquitos *A. aegypti*, quando comparados com pesquisas realizadas com sementes de *M. azedarach* (CANDIDO; BESSERA, 2015).

6 CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

6.0 CONCLUSÃO

Em função das características e condições relacionadas ao presente estudo, foi possível obter as seguintes conclusões:

- Levando em consideração as variáveis do rendimento das frações orgânicas obtidas pelo processo partição, o maior rendimento foi obtido com a fração hexânica nas sementes e fração metanólica nas folhas.

- Em relação aos métodos de quantificação, foi possível verificar os teores de polifenóis, flavonóides e alcalóides por meio de técnicas espectrofotométricas associadas a parâmetros de validação, tais como: linearidade, limite de detecção e limite de quantificação. Estes foram importantes por não permitir a quantificação do teor de taninos, mesmo sendo construída a curva de calibração e equação da reta.

- O melhor resultado para atividade larvicida, efeito residual e teste oviposicional foi obtido com a fração metanólica da semente, mortalidade de 100% das larvas de *a aegypti* em 24h e 48 h para as concentrações de 30 e 40 ug/ml.

- Contudo, há necessidade de maiores pesquisas com esta espécie de anonácea, principalmente, referente a bioensaios e quantificação de metabólitos, alémde efeitos sinérgicos de alcalóides e acetogeninas.

7 REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

ABDUALRAHMAN, M. A. Y. Postharvest physicochemical properties of the pulp and seed oil from *Annona squamosa* L. (Gishta) fruit grown in Darfur region, Sudan. **Arabian Journal of Chemistry**, 2016.

ABREU, F. F.; FARIA, G. G.; AFFELDT, P. E. S. **Atividade inseticida de látex e extratos de vegetais lactescentes frente a culicídeos**. 21p (Monografia - Graduação em Farmácia). Pinadamonhangaba - SP: Fundação Universitária Vida Cristã de Pindamonhangaba (FUNVIC), 2015.

AJANAL, M.; GUNDKALE, M. B.; NAYAK, S. U. Estimation of total alkaloid in *Chitrakadivati* by UV-Spectrophotometer. **Anc Science Lite**. v. 31, n. 4, p. 198-201, 2012.

ANJOLLETE, A. F. F.; MACORIS, M. L. G. Técnicas para manutenção de *Aedes aegypti* em laboratório. **BEPA**. v. 13, n. 156, p. 19-29, 2016.

BERMEJO, A. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and Mechanisms of Action. **Natural Products Reports**, v. 22, p. 269–303, 2005.

BESSA, N. G. F. D.; BORGES, J. C. M.; BESERRA, F. P.; CARVALHO, R. H. A.; PEREIRA, M. A. B.; FAGUNDES, R.; CAMPOS, S. L.; RIBEIRO, L. U.; QUIRINO, M. S.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; ALVES, A. 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.

BIMAKR, M. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 1, p. 67–72, 2011.

BOBADILLA, A. M., F. ZAVALA, M. SISNIEGAS, G. ZAVALA, J. MOSTACERO & L. TARAMONA. Evaluacion lervicida de suspensiones acuosas de *Annona muricata* Linnaeus “guanabana” sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae). **Revista Peruana de Biología**. v.12, n. 1, p. 145-152, 2005.

BRAGA, I. A., VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde** 16 p. 279-293, 2007.

BRANCO, P. C. et al. Characterization of *Annona cherimola* Mill . Seed Oil from Madeira Island : a Possible Biodiesel Feedstock Characterization of *Annona cherimola* Mill . Seed Oil from Madeira Island : a Possible Biodiesel Feedstock. **Journal of the American Oil Chemists’ Society**, v. 87, p. 429 – 436, April 2009.

REFERÊNCIAS

BRASIL. MS Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de **Situação de Saúde**. Dados e indicadores selecionados. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.

_____. MS – Ministério da Saúde. SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde, **Boletim Epidemiológico da Dengue; Chikungunya, Zika vírus**. 2017. Disponível em: <http://www.portaldasaude.gov.br/> (Acessado em 03.03.2018).

_____. MS – Ministério da Saúde. SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde, **Informe especial sobre febre amarela no Brasil**. 2017.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**. v. 13, p. 129-146, 2003.

BRITO, E. F. **Extratos de anonáceas e piperáceas sobre tuta absoluta (meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) bioatividade de extratos de anonáceas e piperáceas sobre tuta absoluta (meyrick)**. 2014. 92 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2014.

BUCKERIDGE, M. S. Seed cell wall storage polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. **Plant Physiology**, v. 154, n. 3, p. 1017–1023, 2010.

CARNEIRO, A. P. **Atividade biocida de *Annona coriacea* Mart 1841 sobre o vetor *Rhodnius neglectus* Lent 1954 (Hemiptera: Reduviidae)**. 70p (Dissertação – Mestrado em Ciências Ambientais). Cáceres. UNEMAT, 2010.

CARVALHO, C. A.; SANTANA, G. S.; AMARO, M. O. F.; LIMA, L. M.; PIRES, F. B.; PRÁ, V. D.; CARDOSO, S. A.; ROSA, M. B.; OLIVEIRA, L. L. Aspectos químicos e atividade antibacteriana de *Piptadenia gonoacantha* (Fabaceae). **Ciência e Natura**, v. 36, n. 2, p. 732-744, 2014.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. Desenvolvimento de métodos por HPLC, Fundamentos, Estratégias e Validação. São Carlos: (2001).

CAVALCANTE, K. R. L. J.; TAUIL, P. L. Características da febre amarela no Brasil, 2000-2012. **Epidemiol. Serv. Saúde**. v. 25, n. 1, p. 11-20, 2016.

CHANG, F.; WU, Y. Novel Cytotoxic Annonaceous Acetogenins from *Annona muricata*. **Journal of Natural Products** **64**: p. 925-931, 2001.

CHEN, C. Y.; CHANG, F. R.; WU, Y. C. Cherimolina, a novel alkaloid from the stems of *Annona cherimola*. **Tetrahedron Letters**. v. 38, p. 6247-6248, 1997.

CHATROU, L. W. 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.

REFERÊNCIAS

CORDEIRO, C. H. G; CHUNG M. C.; DO SACRAMENTO, L. V. S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticu*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, n. 3. Pag. 272-278, 2005.

CORREA, J.; ORTIZ, D.; LARRAHONDO, J.; SANCHEZ, M.; PACHON, H. Actividad antioxidante en guanábana (*Annona muricata* L.): una revisión bibliográfica. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago de Chile, v.11, n.2, p.111-126, 2012.

COSTA, E. V. et al. Essential oil from the leaves of *Annona vepretorum*: chemical composition and bioactivity. **Natural Product Communications**. Westerville, v. 7, n. 2, p. 265-266, 2012.

DEWICK, P. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**, 3rd Edition. John Wiley & Sons, Ltd, 2009.

DOLAN, M. C.; DIETRICH, G.; PANELLA, N. A.; MONTENIERI, J. A., KARCHESY, J. J. Biocidal activity of three wood essential oils against *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae), *Xenopsylla cheopis* (Siphonaptera: Pulicidae), and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 100, n. 2, p. 622-625, 2007.

EDWIN, E. S et al. Anti-dengue efficacy of bioactive andrographolide from *Andrographis paniculata* (Lamiales: Acanthaceae) against the primary dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Acta tropica**. v. 163, n. 2, p. 167-178, 2016.

FERNÁNDEZ, A. E. L.; OBLEDO-VÁZQUEZ, E. N.; VIVAR-VERA, M. A.; AYERDI, S. G. S.; GONZÁLEZ, E. M. Evaluation of emerging methods on the polyphenol content, antioxidant capacity and qualitative presence of acetogenins in soursop pulp (*Annona muricata* L.). **Rev. Bras. Frutic**. v. 39, p. e-358, 2017.

FIGUEIREDO, C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, n. November, p. 206–213, 2007.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**, vol.2. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 864p. 2002.

FURTADO, R. F., M. G. A. DE LIMA, M. A. NETO, J. N. S. BEZERRA & M. G. DE V. SILVA. Atividade Larvicida de Oleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**. v. 34, n. 5, p. 843-847, 2005

GALLE, J.-B. et al. Unusual benzylated flavonoids from *Mitrella mesnyi* (Pierre) Bân. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 48, p. 9–11, jun. 2013.

REFERÊNCIAS

GILLIJ, Y. G.; GLEISER, R. M.; ZYGADLO, J. A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. **Bioresource Technology**. v. 99, n. 3, p. 2507-2515, 2008.

GUARIDO, M. M. **Atividade inseticida de extratos de *Annona foetida* Mart. (Annonaceae) sobre imaturos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)**. [Dissertação de mestrado em Ciências Biológica] 69p. Universidade Federal do Paraná, 2009.

IBGE (10 de outubro de 2002). **Área territorial oficial**. Resolução da Presidência do IBGE de nº 5 (R.PR-5/02). Acessado em 03 de março de 2018.

KANTOR, I. N. Dengue, Zika, Chikungunya y el desarrollo de vacunas. **Medicina**. v. 78, p. 23-28, 2018.

KRINSKI, D.; MASSAROLI, A.; MACHADO, M. Potencial inseticida de plantas da família Annonaceae. In : International Congress & Brazilian meeting about Annonaceae: from gene to exportation, 5., 2013, Botucatu. **Proceedings...** Botucatu: Universidade Estadual, Instituto de Biociências. v. 36, edição especial, p. 225-242, 2014.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K. et al. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**. v. 21, n. 12, p. 2783-2813, 1982.

LEITE, A. A. **Avaliação do potencial larvicida da *Operculina hamiltonii* (G. DON) D.F Austin & Staples (1983) no controle populacional do vetor da dengue *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)** [monografia]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, 2011.

LEMOES, E. L. **Análise físico-química e fitoquímica do extrato etanólico bruto das raízes de *Harrisia adscendens* (Gürke) Britton & Rose (CACTACEAE)**. [Manuscrito] 29 p. Universidade Estadual da Paraíba, 2015.

LIMA, L. A. R. S.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. **Food Chemistry**, Reading, v. 122, n. 4, p. 1129-1138, 2010.

LIMA, M. D. **Perfil cromatográfico dos extratos brutos das sementes de *Annona muricata* L. e *Annona squamosa* L. através da cromatografia líquida de alta eficiência**. [Dissertação]. Maceió. Universidade Federal de Alagoas, 2007.

LIU, Y. Biological evaluation of new mimetics of annonaceous acetogenins: alteration of right scaffold by click linkage with aromatic functionalities. **European journal of medicinal chemistry**, v. 78, p. 248–58, 2014.

LUNA, J. S. **Estudo de plantas bioativas**. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. 233f, 2006

REFERÊNCIAS

- MAAS, P.; LOBÃO, A.; RAINER, H. **Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.** Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110219>>. Acesso em: 26 nov. 2016
- MACIEL, M. V.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; AMÓRA, S. S. A. Extratos vegetais usados no controle de dípteros vetores de zoonoses. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.** Botucatu. v. 12, n. 1, p. 105-112, 2010.
- MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Vanillin-HCl method for condensed tannins: Effect of organic solvents used for extraction of tannins. **Journal of Chemical Ecology**, n. 4, v. 19, 1993.
- MARTINS, L. M. A.; VIERIA, F. O. Alternativas para o controle biológico do agente transmissor da dengue – *Aedes aegypti* L. **Acervo da Iniciação Científica**, 2013.
- MASRURI, L. et al. Renewable Oil Extracted from Indonesian Srikaya ' s (*Annona squamosa* sp .) Seed : Another Potent Source for Biodiesel. **Journal Pure Applied Chemistry Research**, v. 1, p. 51–57, Dec. 2012.
- MATSUMOTO, R. S. et al. Potencial alelopático do extrato foliar de *Annona glabra* L. (Annonaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 3, p. 631–635, 2010.
- MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOUJMA, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Bukina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**. v. 91, p. 571-577, 2005.
- MENDES, C. S. O. **Caracterização da composição química e atividade biológica de extratos de *alternanthera brasiliana* (l.) kuntze *amaranthaceae*** Montes Claros. 2012. 100 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.
- MIAO, Y. J. Three cytotoxic Annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. **Phytochemistry Letters**, v. 16, p. 92–96, 2016.
- MIREKU, E. A.; MENSAH, M. L. K.; MENSAH, A. Y. Prenylated indole alkaloids from the stem bark of *Hexalobus monopetalus*. **Phytochemistry Letters**, v. 16, p. 108–114, 2016.
- MORALES, C.A.; GONZALEZ, R. & ARAGON, R. Evaluacion de la actividad larvicida de extractos polares y no polares de acetogeninas de *Annona muricata* sobre larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). **Revista Colombiana de Entomología**. v. 30, n. 2, p. 187-192, 2004

REFERÊNCIAS

- NASCIMENTO, A. M. D. **Atividade repelente e larvicida de *Xylopia laevigata*, *X. frutescens* (Annonaceae) e *Lippia penduculosa* (Verbenaceae) sobre *Aedes aegypti***. 64p. (Dissertação - Mestrado em Biologia Parasitária) - Universidade Federal de Sergipe, 2014.
- NERIO, L. S.; VERBEL, J. O.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: A review. **Bioresource Technology**. v. 101, n. 2, p. 372-378, 2010.
- NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. Editora Atheneu, 11^a ed. São Paulo, 2010.
- NUNES, C. R.; BERNARDES, N. R.; GLÓRIA, L. L.; BARBOSA, J. B.; PEREIRA, S. M. F.; OLIVEIRA, D. B. Atividade antioxidante e o teor de taninos e fenóis totais dos frutos de *Annona muricata* L. **Vértices**. v. 15, n. 3, p. 93-110, 2013.
- PAES, M. M.; CORTES, M. R. G.; KANASHIRO, M. M. Potencial citotóxico de acetogeninas do gênero *Annona*. **Rev. Virtual Quim**. v. 8, n. 3, p. 945-980, 2016.
- PAVELA, R.; BENELLI, G. Ethnobotanical knowledge on botanical repellents employed in the African region against mosquito vectors - A review. **Experimental Parasitology**. v. 167, n. 4, p.103-108, 2016.
- PEREIRA, A. C. R. L.; OLIVEIRA, J. V.; JÚNIOR, M. G. C. G.; CÂMARA, C. A. G. Insecticide activity of essential and fixed oils in *Callosobruchus maculatus* (FABR., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) in cowpea grains [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.]. **Ciênc. agrotec**. v. 32, n. 3, p. 717-724, 2008.
- PRABHU, K.; MURUGAN, K.; NARESHKUMAR, A.; RAMABRAMANIAN, N.; BRAGADEESWARAN, S. Larvicidal and repellent potential of *Moringa oleifera* against malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston (Insecta: Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. p. 124-129, 2011.
- PROPHIRO, J. S. **Análise de susceptibilidade de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) a organofosforado e alternativa de controle de imaturos do vetor de *Aedes aegypti* utilizando produtos de origem botânica**. Dissertação de Mestrado. Paraná, Brasil, 120 p. 2008.
- RABÊLO, S. V. **Revisão de alcaloides do gênero *Annona*, estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de atemoia (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*)**. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Petrolina, Petrolina-PE, 2014.
- RATTAN, R. S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop Prot**. v. 29, n. 9, p. 913–920, 2010.

REFERÊNCIAS

- RIBEIRO, L. DO P. et al. *Annona mucosa* Jacq. (Annonaceae): A promising source of bioactive compounds against *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 55, p. 6–14, out. 2013.
- RIECK, U. W.; MAY, B.; LANKES, C.; WÜST, M. Methylerythritol and Mevalonate Pathway Contributions to Biosynthesis of Mono-, Sesqui-, and Diterpenes in Glandular Trichomes and Leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **J. Agric. Food Chem.** v. 62, n. 2, p. 2428–2435, 2014.
- ROSA, J. P. P. Resistência de *Aedes aegypti* ao inseticida temefos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**. Três Corações, v. 14, n. 1, p. 607-610, 2016.
- RUPPRECHT, J. K. Annonaceous Acetogenins: A Review. **Journal of Natural Products**. v. 53, n. 2, p. 237-278, 1990.
- SANTHOSH, S. B.; RAGAVENDRAN, C.; NATARAJAN, D. Spectral and HRTEM analyses of *Annona muricata* leaf extract mediated silver nanoparticles and its Larvicidal efficacy against three mosquito vectors *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus*, and *Aedes aegypti*. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**. v. 153, n. 5, p. 184-190, 2015.
- SESAPI. Secretaria de Estado de Saúde do Estado do Piauí. Coordenação de Vigilância Epidemiológica do Piauí. 2018.
- SILVA, H. H. G DA, I. G. DA SILVA, R. M. G DOS SANTOS, E. R. FILHO & C. N. ELIAS. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 37, n. 5, p. 396-399, 2004.
- SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.
- SOARES, N. P.; SANTOS, P. L.; VIEIRA, V. S.; PIMENTA, V. S. C. ARAÚJO, E. G. Técnicas de prospecção fitoquímica e sua importância para o estudo de biomoléculas derivadas de plantas. **Enciclopédia Biosfera**. v. 13, n. 24, p. 991, 2016.
- SOBRINHO, R. B. Produção integrada de Anonáceas no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. spe1, p. 102–107, 2014.
- SOBRINHO, T.J.S. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.4, p.683-9, 2008.
- SOUSA, E. A. et al. Terpenes and steroids from leaves of *Oxandra sessiliflora* R. E. Fries. **Phytochemistry Letters**, v. 8, p. 193–195, maio 2014.

REFERÊNCIAS

SOUSA, A. A.; FRAGA, E.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H.; BARROS, M. C. Genetic differentiation in populations of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) dengue vector from the Brazilian state of Maranhão. **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 61, n. 2, p. 51-59, 2017.

SOUZA, L. M. B. **Avaliação da ação inseticida de extratos vegetais, óleos essenciais e substâncias sobre imaturos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE), em condições de laboratório** [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2012.

SWAIN, T.; HILLS, W. E. The phenolic constituents of *Punnusdomestica*. I- quantitative analysis of phenolicsconstituintes. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 19, p.63-68, 1959.

TEIXEIRA, A. H.; BEZERRA, M. M.; CHAVES, H. V.; DO VAL, D. R.; PEREIRA FILHO, S. M.; E SILVA, A. A. R. Conhecimento popular sobre o uso de plantas medicinais no município de Sobral-Ceará, Brasil. **SANARE**. v. 13, n. 1, p. 23-28, 2014.

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

TÉLLEZ, A. V. C.; GÓNZALEZ, E. M.; YAHIA, E.; VÁZQUEZ, E. N. O. *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. **Arabian Journal of Chemistry**, 2016.

YANG, H. Two new cytotoxic acetogenins from *Annona squamosa*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 11, n. 3, p. 250–256, 2009.

YOU, C. X et al. Chemical composition of essential oils extracted from six *Murrayaspecies* and their repellent activity against *Tribolium castaneum*. **Industrial Crops and Products**. v. 76, n. 5, p. 681-687, 2015.

UTSUNOMIYA, H. S. M.; LOUSAN, N. E. P.; BREIER, T. B.; BARRELA, W. Influência do Parque da Biquinha como foco de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* em relação à área urbana. **Revista de Entomologia**, vol. 1, n. 3, p. 21-30, 2008.

WHO. World health organization. **Guidelines for efficacy testing of mosquito repellents for human skin**, 2009.

REFERÊNCIAS
