

RAQUEL LIMA E SILVA

Aplicação de óleos essenciais de plantas do Cerrado e quinonas para o controle de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*

Brasília-DF, 2021

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

RAQUEL LIMA E SILVA

Aplicação de óleos essenciais de plantas do Cerrado e quinonas para o controle de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Laila Salmen Espindola

Brasília

2021

RAQUEL LIMA E SILVA

Aplicação de óleos essenciais de plantas do Cerrado e quinonas para o controle de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 12 de agosto de 2021

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Laila Salmen Espindola – (presidente)
Universidade de Brasília

Vanderlan da Silva Bolzani
Universidade Estadual Paulista – Unesp/Araraquara

Paulo Cezar Vieira
Universidade de São Paulo

Rodrigo Gurgel Gonçalves
Universidade de Brasília

Patrícia Cardoso Cortelo – (suplente)
Universidade de Brasília

A Deus, o Autor da vida.
“Pois todas as coisas vêm Dele, existem por meio Dele e são para Ele. A Ele seja toda a glória para sempre! Amém”.

Romanos 11:36

AGRADECIMENTOS

À Deus por essa grande oportunidade, por me conduzir e dar coragem durante todo o processo. Aos meus pais, Raimundo e Valdemira, pelo incentivo durante toda a vida e formação acadêmica. Ao meu marido Josué Júnior, pelo cuidado e paciência. Aos meus familiares, pelo apoio.

À querida orientadora professora Laila Espindola, pelas palavras de encorajamento, dedicação, paixão pela ciência, pesquisa e ensino público de qualidade. Ao professor Walter Leal, pelo período de grande aprendizagem na *University of California – UC/Davis*. À professora Lorena, pelo apoio, desenvolvimento de protocolos, paciência e dedicação ao projeto. À família do Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília, pelo suporte científico e emocional.

A todos os colaboradores do projeto ArboControl. Ao Fundo Especial para o Projeto ArboControl Brasil, Processo TED74/2016 e TED42/2017 (Fundo Nacional de Saúde/Universidade de Brasília), pelo apoio financeiro. Ao programa Capes PrInt, pela oportunidade de realização de doutorado sanduíche na *University of California, Davis*, Estados Unidos.

À Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), pelo constante investimento na capacitação de seus servidores e pela liberação integral durante 4 anos para realização de doutorado na UnB após 12 anos dedicados ao serviço público.

RESUMO

Os inseticidas desempenham importante papel na redução do número de vetores no ambiente. Dengue, Zika, chikungunya e febre amarela urbana são doenças virais transmitidas a humanos pela picada de *Aedes aegypti*, sendo que o Zika vírus também foi isolado de *Culex quinquefasciatus*. Os inseticidas de fontes naturais constituem uma alternativa efetiva para o controle dos vetores de arboviroses. Este trabalho investigou a atividade larvicida, adulticida e repelente em *Aedes aegypti* de extratos, óleos essenciais e compostos extraídos de plantas do Cerrado, assim como de compostos comerciais relacionados a sua composição química. O extrato acetato de etila da madeira da raiz de *Connarus suberosus* Planch. (Connaraceae) apresentou 100% de mortalidade em larvas e, a partir desse extrato, foram isoladas três quinonas. Diante da atividade larvicida dessas substâncias, foram adquiridas 28 quinonas comerciais, sendo que oito apresentaram mortalidade > 80% a 25 µg/mL após 48 h de exposição, com destaque para a tectoquinona (CL₅₀ 1,1 µg/mL). A atividade larvicida residual em escala laboratorial, por sua vez, foi mais prolongada para tectoquinona e 2-etilantraquinona. Nos testes semi-campo, a tectoquinona apresentou mortalidade de 100% em larvas até o 5º dia, demonstrando seu potencial para o desenvolvimento de formulações para o controle de *Ae. aegypti*. Em relação ao estudo da atividade dos óleos essenciais das folhas de 13 espécies do Cerrado em *Ae. aegypti*, o óleo de *Hedyosmun brasiliense* apresentou melhor atividade larvicida (CL₅₀ 11,2 µg/mL em 24 h) e maior toxicidade em mosquitos adultos com porcentagem de nocaute de 97,2% ao final de 4 h de exposição. O óleo essencial de *Eugenia dysenterica* apresentou melhor atividade repelente espacial tanto para *Ae. aegypti* (índice de atividade espacial ponderado – wSAI 20,23), como para *Cx. quinquefasciatus* (Tempo de Proteção - TP 71%). O óleo essencial de *Blepharocalyx salicifolius* foi ativo em todos os ensaios conduzidos: larvicida (CL₅₀ 24,1 µg/mL em 24 h), adulticida (93,4% em 4 h), repelente espacial em *Ae. aegypti* (wSAI 14,80) e em *Cx. quinquefasciatus* (TP 60%). Os compostos majoritários dos óleos essenciais mencionados foram determinados por CG-EM. O potencial de aplicabilidade tecnológica de quinonas e de óleos essenciais no controle de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* destaca o bioma Cerrado como fonte de produtos naturais que podem contribuir para o controle das arboviroses.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, Cerrado, quinonas, óleos essenciais, inseticidas.

ABSTRACT

Insecticides play an important role in reducing the number of vectors in the environment. Dengue, Zika, chikungunya and urban yellow fever are viral diseases transmitted to humans through the *Aedes aegypti* mosquito bite and Zika virus has also been isolated from *Culex quinquefasciatus*. Insecticides of natural source are an effective alternative to control arbovirus vectors. Thus, in this contribution we investigated the larvicidal, adulticidal and repellent activity of plant extracts, essential oils and compounds extracted from Brazilian Cerrado plants, as well as commercial compounds related to their chemical composition. The ethyl acetate extract from the root wood of *Connarus suberosus* Planch. (Connaraceae) showed 100% mortality in larvae and, from this extract, three quinones were isolated. In view of the larvicidal activity of these substances, 28 commercial quinones were acquired, eight of which had mortality > 80% at 25 µg/mL after 48 h of exposure, with an emphasis on tectoquinone (LC₅₀ 1.1 µg/mL). The residual larvicidal activity at laboratory scale was higher for tectoquinone and 2-ethylanthraquinone. In the semifield tests, tectoquinone showed 100% mortality in larvae up to the 5th day, demonstrating its potential for the development of formulations to control *Ae. aegypti*. Regarding the study of essential oils extracted by hydrodistillation of leaves from Cerrado species, *Hedyosmum brasiliense* showed the best *Ae. aegypti* larvicidal activity (CL₅₀ de 11.2 µg/mL in 24h) and it was the most toxic for *Ae. aegypti* adults, with a knockdown percentage of 97.2% at the end of 4 hours of exposure. The essential oil of *Eugenia dysenterica* showed better spatial repellency activity for both *Ae. aegypti* (weighted spatial activity index - wSAI 20.23), as well as for *Cx. quinquefasciatus* (Protection Time - PT 71%). The essential oil of *Blepharocalyx salicifolius* was active in all tests performed: larvicide (LC₅₀ 24.1 µg/mL in 24 h), adulticide (93.4% in 4 h), space repellent in *Ae. aegypti* (wSAI 14.80) and in *Cx. quinquefasciatus* (PT 60%). The mentioned essential oils main compounds were determined by GC-MS. The quinones and essential oils technological applicability potential to control *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* highlights the Cerrado biome as a source of natural products that can contribute to the control of arboviruses.

Key-words: *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, Cerrado, quinones, essential oils, insecticides.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Curva epidêmica dos casos prováveis de dengue no Brasil, 2019 e 2020. Em 2020, foram notificados 979.764 casos. Fonte: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/dezembro/28/boletim_epidemiologico_svs_51.pdf.20
- Figura 2.** Curva epidêmica dos casos prováveis de chikungunya no Brasil, 2019 e 2020. Em 2020, foram notificados 80.914 casos. Fonte: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/dezembro/28/boletim_epidemiologico_svs_51.pdf.21
- Figura 3.** Curva epidêmica dos casos prováveis de Zika no Brasil, 2019 e 2020. Em 2020, foram notificados 7.119 casos. Fonte: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/dezembro/28/boletim_epidemiologico_svs_51.pdf.21
- Figura 4.** Ciclo de vida do mosquito *Ae. aegypti*.22
- Figura 5.** Ciclo de vida do mosquito *Culex quinquefasciatus*.23
- Figura 6.** Exemplo de código de identificação da amostra de acordo com o POP019 do Laboratório de Farmacognosia/UnB.32
- Figura 7.** Cromatogramas analíticos das pré-frações Arbo4A087D, Arbo4A087C, Arbo4A087B e Arbo4A087A. Picos referentes aos compostos: a) bergenina (32); b) embelina (3) e c) rapanona (2). A substância suberonona (1) apenas foi observada com coluna semipreparativa.39
- Figura 8.** Cromatogramas sucessivos com a utilização de coluna semipreparativa para isolamento de: b) embelina (3); c) rapanona (2) e d) suberonona (1).40
- Figura 9.** Fluxo de fracionamento do extrato bruto acetato de etila da madeira da raiz de *Connarus suberosus* e obtenção dos compostos: suberonona (1), rapanona (2), embelina (3) e bergenina (32).41
- Figura 10.** Derivados de quinonas 1-31: (1) suberonona; (2) rapanona; (3) embelina; (4) tectoquinona; (5) emodina; (6) plumbagina; (7) 2-etilantraquinona; (8) 1-cloroantraquinona; (9) antrona; (10) 2-(4-piridil)-1H-antra[1,2-d]imidazole-6,11-diona; (11) krisolamina; (12) ácido 2-carboxiantraquinona; (13) 4,5-dinitrocrisazina; (14) 1-aminoantraquinona; (15) 5,7,12,14-pentacenetetrona; (16) antrarufino; (17) antraquinona-2-sulfonato de sódio; (18) antraquinona; (19) ácido bromamínico; (20) 2-fenilantraquinona; (21) alizarina; (22) quinizarina; (23) reína; (24) 1-amino-4-hidroxiantraquinona; (25) 2-aminoantraquinona; (26) 1,5-diaminoantraquinona (27) dibromoaminoantraquinona; (28) 1,4-Bis(metilamino)antraquinona; (29) 1,8-dicloroantraquinona; (30) 1,5-dicloroantraquinona; (31) diacereína. Glicosídeo: (32) bergenina. *Compostos testados na concentração equivalente à 25 µg/mL. O tracejado ao redor das estruturas (1), (2), (3) e (32) indicam que essas foram extraídas a partir do extrato acetato de etila da madeira da raiz de *Connarus suberosus*.45
- Figura 11.** Estruturas de para-benzoquinonas com diferentes substituintes relacionados à atividade larvicida em *Ae. aegypti*. * Sousa DP et al. (2010); **dados experimentais.....46

Figura 12. (a) atividade larvicida residual da tectoquinona (4) em escala laboratorial após 20 dias. A mortalidade larval foi verificada a cada 24 h e as larvas (vivas e mortas) foram substituídas a cada 24 h. (b) atividade larvicida residual da 2-etilantraquinona (7) em escala laboratorial após 8 ciclos de 72 h. A mortalidade larval foi verificada a cada 24 h, com substituição das larvas (vivas e mortas) a cada 72 h. (c) atividade larvicida residual da antrona (9) em escala laboratorial após 4 dias. A mortalidade larval foi verificada a cada 24 h e as larvas (vivas e mortas) foram substituídas a cada 24 h. (d) atividade larvicida residual da 1-cloroantraquinona (8) em escala laboratorial após 3 ciclos de 72 h. A mortalidade larval foi verificada a cada 24 h, com substituição das larvas (vivas e mortas) a cada 72 h. As barras de erro representam o erro padrão da média da mortalidade larval.....51

Figura 13. Efeito larvicida residual da tectoquinona (4; 2,1 µg/mL, 3,5 µg/mL e 4,3 µg/mL) em escala semi-campo após 6 dias. A mortalidade larval foi determinada a cada 24 h com a troca diária das larvas do 3º estágio. A mortalidade para o controle negativo DMSO foi menor que 5%. A mortalidade para controle positivo temefós diminuiu de 99% (Dia 1) para 85% (Dia 6) e para menos de 56% (Dia 9). As barras de erro representam o erro padrão da média da mortalidade larval.53

Figura 14. Aparato de repelência espacial composto pelas seguintes partes: (1) cilindro externos de metal; (2) cilindro transparente; (3) tampa lateral; (4) conectores com válvulas borboleta; (5) cilindro interno de metal e (6) rede de tratamento.....65

Figura 15. Aparato para realização do surface landing and feeding assay. Em destaque tubos de Dudley, alfinetes, agulhas e rolos de algodão embebidos com sangue.....66

Figura 16. Aparato para realização do surface landing and feeding assay. Em detalhe, anéis de papel de filtro e aquecedor de água.....67

Figura 17. Aparato para realização do surface landing and feeding assay. Em detalhe, câmera de vídeo equipada com sistema infravermelho.....68

Figura 18. Mapa de calor para o estudo comparativo entre a composição das amostras de óleos essenciais de plantas do Cerrado. Relacionam-se: **Espécies x voláteis x família x NCarb** (número de carbonos), considerando-se os **teores** dos voláteis em porcentagem relativa (**% Relativa**).....81

Figura 20. Dados gráficos referentes à determinação dos valores de CL₅₀ para *C. adamantium* (Arbo0845), *E. dysenterica* (Arbo0846B e Arbo0846C), *B. salicifolius* (Arbo0847), *P. ovatum* (Arbo0848), *H. brasiliense* (Arbo0849B), *P. laruotteanum* (Arbo0850,) *X. aromatica* (Arbo0851), *M. torta* (Arbo0852), *C. sylvestris* (Arbo0854), *D. furfuracea* (Arbo0859), (S)-(-)-limoneno (ArboS47), (R)-(+)-limoneno (ArboS48), (-)-β-pineno (ArboS93) e *p*-cimeno (ArboS96).....94

Figura 21. Representação gráfica dos dados de toxicidade em *Ae. aegypti* para *C. adamantium* (Arbo0845), *E. dysenterica* (Arbo0846A), *B. salicifolius* (Arbo0847), *P. ovatum* (Arbo0848), *H. brasiliense* (Arbo0849A), *P. laruotteanum* (Arbo0850), *X. aromatica* (Arbo0851), *M. torta* (Arbo0852), *C. sylvestris* (Arbo0854), *M. guianensis* (Arbo0856), *D. furfuracea* (Arbo0859) *E. klotzchiana* (Arbo0861). No eixo y, é

representada a porcentagem de mosquitos nocauteados e no eixo x, o tempo em horas.....96

Figura 22. Representação gráfica dos resultados de *surface landing and feeding assay* em mosquitos adultos de *Cx. quinquefasciatus*. No eixo X estão dispostas as amostras de DEET juntamente com as espécies: *C. adamantium* (Arbo0845), *E. dysenterica* (Arbo0846A), *B. salicifolius* (Arbo0847), *P. ovatum* (Arbo0848), *H. brasiliense* (Arbo0849A), *X. aromatica* (Arbo0851) e *M. torta* (Arbo0852). No eixo y está representada a porcentagem do Tempo de Proteção (TP).100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações das amostras testadas em larvas do 3º estágio de <i>Ae. aegypti</i>	33
Tabela 2. Resultados de CL ₅₀ e CL ₉₀ em larvas do 3º estágio de <i>Ae. aegypti</i>	44
Tabela 3. Dados das espécies coletadas para obtenção dos óleos essenciais. Somente as folhas de cada planta foram utilizadas para tal procedimento.....	59
Tabela 4. Espécies de plantas do Cerrado investigadas e rendimento de seus respectivos óleos essenciais, obtidos no Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília.	71
Tabela 5. Dados referentes aos compostos majoritários identificados nas amostras de óleos essenciais obtidos a partir de folhas frescas de plantas do Cerrado. Foram considerados majoritários os compostos que apresentaram pelo menos 4% na quantificação relativa.....	82
Tabela 6. Dados referentes à atividade larvicida de óleos essenciais de plantas do Cerrado. São apresentados a faixa de concentrações utilizadas no teste e os valores determinados para CL ₅₀ e CL ₉₀	90
Tabela 7. Resultados da atividade repelente espacial de amostras de óleos essenciais de plantas do Cerrado em <i>Ae. aegypti</i>	97
Tabela 8. Resumo dos resultados obtidos a partir do estudo de óleos essenciais de plantas do Cerrado.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE -	Acetilcolinesterase
Anvisa -	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC -	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
CA -	Califórnia
CDC -	<i>Disease Control and Prevention</i>
CG/EM -	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas
CL ₅₀ -	Concentração Letal para 50% da população estudada
CL ₉₀ -	Concentração Letal para 90% da população estudada
CLAE -	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DEET -	<i>N,N'</i> -dietil- <i>m</i> -toluamida
DMSO -	Dimetilsulfóxido
ECHA -	<i>European Chemicals Agency</i>
EUA -	Estados Unidos da América
FET -	<i>Fish Embryo Toxicity</i>
GST -	Glutathione S-Transferase
IC -	Intervalo de Confiança
LDH -	Lactato Desidrogenase
MAPA -	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MMA -	Ministério do Meio Ambiente
MS -	Ministério da Saúde
OMS -	Organização Mundial de Saúde
SAI -	Índice de Atividade Espacial
TMS -	Tetrametilsilano
TP -	Tempo de Proteção
UC Davis-	<i>University of California, Davis, Estados Unidos</i>
EU -	União Europeia
UnB -	Universidade de Brasília
UR -	Umidade Relativa
wSAI -	Índice de Atividade Espacial Ponderada

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	18
<i>O contexto das doenças infecciosas</i>	18
<i>Arbovírus e os vetores Aedes aegypti e Culex quinquefasciatus</i>	18
<i>O uso de inseticidas sintéticos e de origem natural no controle de vetores</i>	24
<i>O potencial do bioma Cerrado</i>	25
<i>O potencial dos óleos essenciais</i>	26
<i>Registro de inseticidas no Brasil</i>	27
OBJETIVOS	28
PARTE I	29
A ATIVIDADE DE QUINONAS NO CONTROLE DO VETOR <i>Aedes aegypti</i>	29
1. RESUMO GRÁFICO	30
2. INTRODUÇÃO.....	30
3. MÉTODOS	31
3.1. MATERIAL VEGETAL	31
3.2. COMPONENTES QUÍMICOS E INSTRUMENTOS	31
3.3. IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	32
3.4. PERFIL QUÍMICO E ISOLAMENTO DE COMPOSTOS	32
3.5. ENSAIOS BIOLÓGICOS	34
3.5.1. Avaliação da atividade larvicida	34
3.5.2. Avaliação da atividade pupicida	35
3.5.3. Avaliação da atividade larvicida residual em escala laboratorial	35
3.5.4. Avaliação da atividade larvicida residual em escala semi-campo	36
3.6. ANÁLISE DE DADOS.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1. PERFIL QUÍMICO E ISOLAMENTO DE COMPOSTOS	37

4.2. Ensaio biológicos e aspectos estruturais das quinonas.....	43
4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA RESIDUAL EM ESCALA LABORATORIAL.....	49
4.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA EM ESCALA SEMI-CAMPO	51
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS – PARTE I.....	53
PARTE II	55
A ATIVIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS DO CERRADO E COMPOSTOS VOLÁTEIS NO CONTROLE DOS VETORES <i>Aedes aegypti</i> E <i>Culex quinquefasciatus</i>	55
1. RESUMO GRÁFICO	56
2. INTRODUÇÃO.....	56
3. MÉTODO	58
3.1. ESPÉCIES VEGETAIS E OBTENÇÃO DE ÓLEOS.....	58
3.2. COMPONENTES QUÍMICOS.....	60
3.3. PREPARO DE AMOSTRAS E CROMATOGRAFIA	60
3.4. MANUTENÇÃO DOS MOSQUITOS <i>Ae. aegypti</i> E <i>Cx. quinquefasciatus</i>	61
3.5. ENSAIOS BIOLÓGICOS	62
3.5.1. Avaliação da atividade larvicida	62
3.5.2. Teste de toxicidade em fêmeas adultas de <i>Ae. aegypti</i>.....	63
3.5.3. Teste de repelência espacial em <i>Ae. aegypti</i>	64
3.5.4. Teste de repelência em <i>Cx. quinquefasciatus</i> - surface landing and feeding assay	65
3.6. Análise de dados	68
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	69
4.1.2 Amostras Arbo0846A, Arbo0846B e Arbo0846C, óleo essencial de <i>E. dysenterica</i>	73

4.1.3 Óleos essenciais de <i>B. salicifolius</i> (Arbo0847) e <i>P. ovatum</i> (Arbo0848)	74
4.1.4 Amostras Arbo0849A e Arbo0849B, óleo essencial de <i>H. brasiliense</i>	75
4.1.5 Óleos essenciais de <i>P. laruotteanum</i> (Arbo0850) e <i>X. aromatica</i> (Arbo0851)	76
4.1.6 Óleos essenciais de <i>M. torta</i> (Arbo0852) e <i>C. sylvestris</i> (Arbo0854)	77
4.1.7 Óleos essenciais de <i>M. guianensis</i> (Arbo0856), <i>D. furfuracea</i> (Arbo0859), <i>E. klotzschiana</i> (Arbo0861)	78
4.1.8 Mapa de calor e compostos majoritários	79
4.2. ATIVIDADE LARVICIDA EM <i>Ae. aegypti</i>	89
4.3. TESTE DE TOXICIDADE EM <i>Ae. aegypti</i>	95
4.4. TESTE DE REPELÊNCIA ESPACIAL EM <i>Ae. aegypti</i>	97
4.5. TESTE DE REPELÊNCIA EM <i>Cx. quinquefasciatus</i> – SURFACE LANDING AND FEEDING ASSAY	98
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS – PARTE II	101
CONCLUSÃO	107
Anexos – Parte I	109
Anexos - Parte II	120
	122
REFERÊNCIAS	147

INTRODUÇÃO

O contexto das doenças infecciosas

As doenças infecciosas representam uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo (1). Infelizmente, os anos 2020 e 2021 serão lembrados pela pandemia causada pela infecção por coronavírus (COVID-19). Entretanto, no passado, as viroses foram responsáveis por, pelo menos, outras três pandemias: varíola, “gripe espanhola” (vírus influenza) e o, ainda em andamento, vírus da imunodeficiência adquirida (HIV/AIDS) com mais de 30 milhões de pessoas afetadas globalmente (2).

No Brasil, destaca-se também o surto de infecção por Zika vírus, que teve início em maio de 2015, reportado juntamente com o aumento do número de neonatos com microencefalopatia congênita nas regiões afetadas pelo vírus (3). Em 2016, foi publicado um trabalho que identificou que a infecção intrauterina por Zika vírus parece estar associada a severas anomalias cerebrais em neonatos, incluindo a microencefalopatia (4). O Zika vírus é muito similar ao vírus da Dengue. Entretanto, além de ser transmitido pela picada do mosquito infectado, também pode ser transmitido por outras vias como mãe-filho, sexual e transfusão de sangue (5).

Nesse contexto, o aprimoramento das condições de vida e sanitárias é um fator importante para a diminuição de incidência de doenças virais. Mas, o desenvolvimento de vacinas ainda é de primordial importância (6). Grande parte das vacinas atua na proteção contra viroses. Porém, para a maioria das arboviroses, ainda não existe vacina disponível. A exceção é a vacina contra a febre amarela urbana (7).

Arbovírus e os vetores *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*

Os vírus que são veiculados por artrópodes hematófagos e que têm parte do

seu ciclo replicativo dentro desses insetos são denominados arbovírus. Os arbovírus são considerados problemas de saúde pública e podem ser transmitidos aos seres humanos e a outros vertebrados por meio da picada de mosquitos, flebotomíneos e carrapatos, embora os mosquitos apresentem maior relevância como vetores desse grupo de vírus (8–10).

Os mosquitos têm a habilidade de transmitir uma variedade de agentes patogênicos responsáveis por causar doenças em humanos e continuam sendo responsáveis por milhões de mortes em todo o mundo. A incidência mundial de dengue cresceu mais de 30 vezes nos últimos 30 anos com o aumento do número de países que reportaram seus primeiros surtos. Zika, dengue, chikungunya e febre amarela urbana são viroses transmitidas a humanos por meio da picada do mosquito *Aedes aegypti* (11). O vetor *Ae. aegypti* representa uma ameaça mundial uma vez que está presente na maioria das regiões tropicais e subtropicais (12). A expansão geográfica dos vírus da dengue, juntamente com o vírus chikungunya e, mais recentemente, o vírus Zika serviu como lembretes de que novas epidemias podem surgir em qualquer momento dessa diversidade (13).

O vírus Zika foi isolado pela primeira vez na década de 1940 e recebeu o nome de acordo com a área geográfica de Uganda de onde foram feitos os isolamentos (14). Desde então, foi isolado de diversas espécies de *Aedes*: *Aedes aegypti*, *Aedes africanus*, *Aedes albopictus*, *Aedes hensilli* (15) e também do mosquito *Culex quinquefasciatus* (16). O mosquito *Cx. quinquefasciatus* é vetor doenças de relevância para a saúde pública, como as febres *West Nile* e *Rift Valley* (17). Em algumas regiões do Brasil, o *Cx. quinquefasciatus* é o principal vetor da filariose (18).

Apesar dos grandes esforços, apenas a vacina contra a febre amarela é bem estabelecida. A primeira vacina contra a dengue foi desenvolvida pela empresa Sanofi Pasteur e obteve seu registro em 2015. Após isso, foi licenciada por mais de 20 autoridades regulatórias em todo o mundo para o uso em regiões endêmicas em pessoas de 9 a 45 anos de idade. No entanto, foram realizadas análises adicionais em 2017 que recomendaram que a vacina deveria ser utilizada em pessoas que já haviam sido infectadas pelo vírus anteriormente, uma vez que a análise demonstrou que pacientes soronegativos vacinados apresentaram maior risco de contrair dengue severa ou de serem hospitalizados em relação aos pacientes que contraíram o vírus e não foram vacinados (19).

Em acréscimo, não há tratamentos etiológicos específicos para dengue, chikungunya e Zika. Assim, o controle do vetor permanece sendo a ação preventiva mais efetiva contra as arboviroses mencionadas (19,20). Os fatores que influenciam a presença do mosquito incluem as precipitações, a temperatura e a urbanização rápida sem planejamento (21).

Considerando-se a relevância sanitária das arboviroses urbanas no Brasil, periodicamente o Ministério da Saúde (MS) publica dados referentes aos casos de arboviroses transmitidas pela picada de *Ae. aegypti*. Os dados têm enfoque na sazonalidade das arboviroses, considerando-se os períodos de alta pluviosidade e altas temperaturas. Em 2020, foram notificados 979.764 casos prováveis de Dengue no país, indicando uma redução em relação a 2019. Entretanto, sugere-se que essa diminuição se deva principalmente à subnotificação de casos, à mobilização das equipes de vigilância epidemiológica no enfrentamento da pandemia causada pelo coronavírus e ao receio da população de procurar atendimento em uma unidade de saúde (22). A seguir podem ser observados os dados gráficos dos prováveis casos de dengue, chikungunya e Zika notificados em 2020 em comparação com 2019, **Fig. 1**, **Fig. 2** e **Fig.3**, respectivamente.

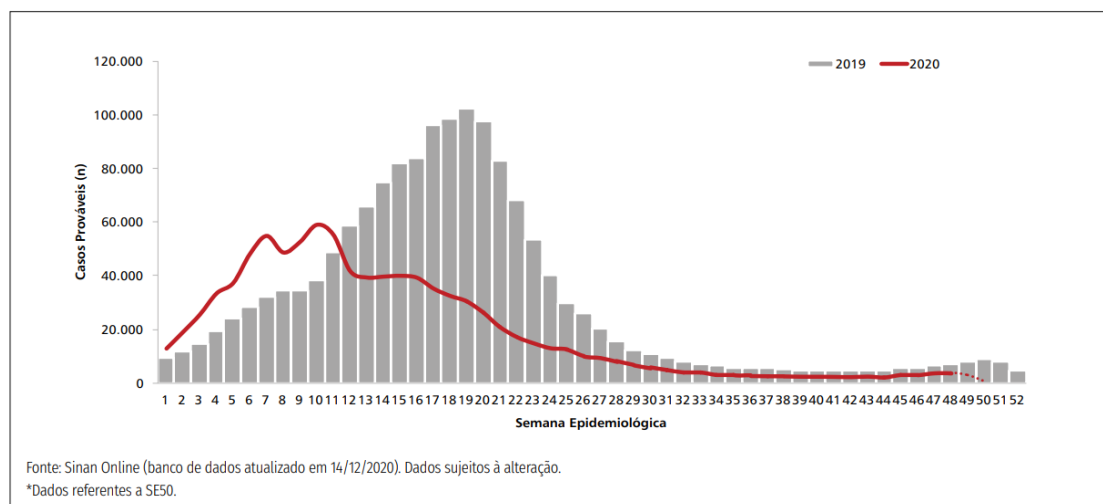


Figura 1. Curva epidêmica dos casos prováveis de dengue no Brasil, 2019 e 2020. Em 2020, foram notificados 979.764 casos. Fonte: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/dezembro/28/boletim_epidemiologico_svs_51.pdf.

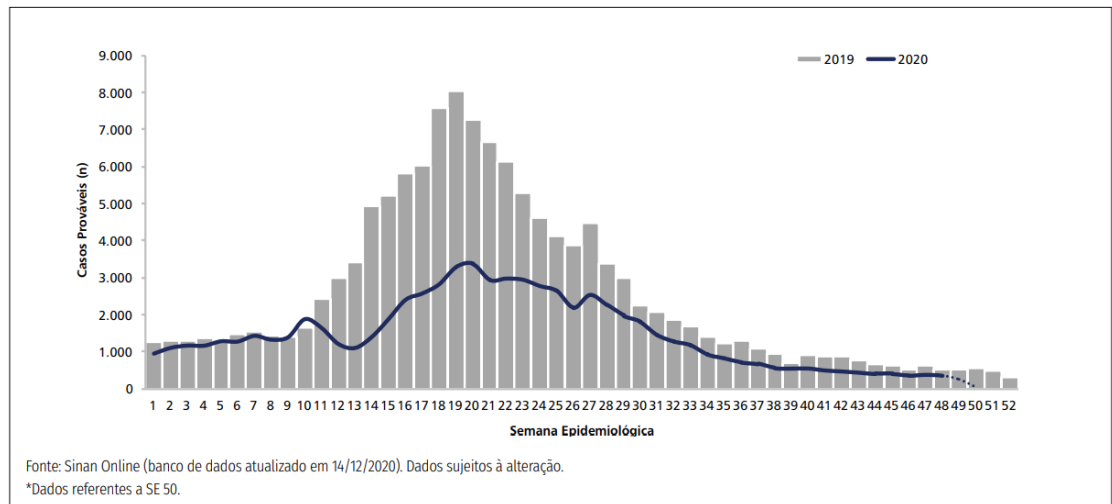


Figura 2. Curva epidêmica dos casos prováveis de chikungunya no Brasil, 2019 e 2020. Em 2020, foram notificados 80.914 casos. Fonte: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/dezembro/28/boletim_epidemiologico_svs_51.pdf.

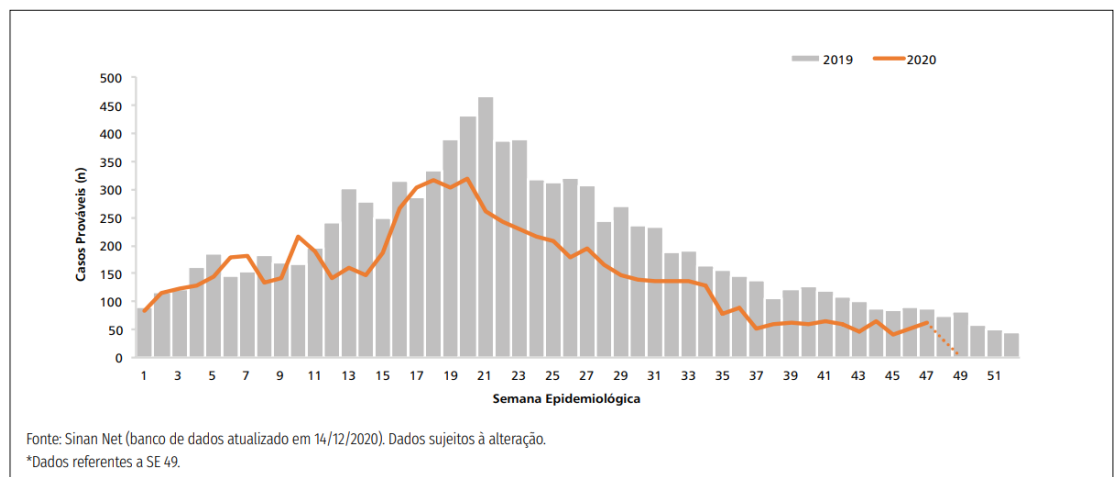


Figura 3. Curva epidêmica dos casos prováveis de Zika no Brasil, 2019 e 2020. Em 2020, foram notificados 7.119 casos. Fonte: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/dezembro/28/boletim_epidemiologico_svs_51.pdf.

O mosquito *Ae. aegypti* sofre metamorfose completa durante o seu desenvolvimento. A partir do ovo, ele eclode em larva, passa a pupa e, finalmente, chega à fase adulta. Após a alimentação com sangue, a fêmea produz, em média, 100 a 200 ovos por oviposição, podendo ovipositar mais de cinco lotes de ovos durante todo o seu período de vida. A postura dos ovos é feita em substratos de superfícies úmidas. Os ovos eclodem imediatamente após a submersão em água e podem sobreviver por mais de um ano em lugares secos. Após eclosão, as larvas se alimentam de matéria

orgânica dissolvida na água e passam por quatro estádios, passando um curto período nos três primeiros estádios e a maior parte do tempo no 4º estádio. Os machos se desenvolvem mais rápido que as fêmeas, por isso, geralmente, viram pupas primeiro. As pupas não se alimentam e podem demorar até dois dias para se desenvolverem. Os adultos emergem pela ingestão de oxigênio, que expande o abdômen e provoca a abertura do exoesqueleto da pupa. A forma adulta do mosquito pode durar de duas semanas a um mês a depender das condições ambientais. O ciclo de vida do mosquito pode se completar dentro do período de uma semana e meia a três semanas (**Fig. 4**) (23).

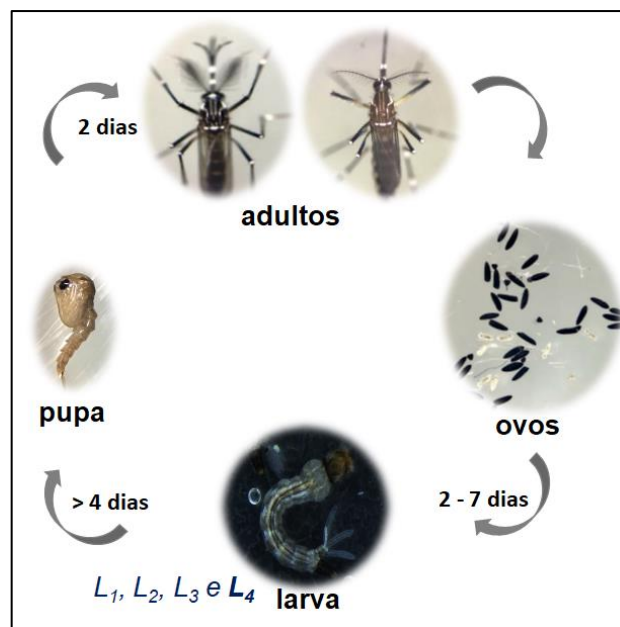


Figura 4. Ciclo de vida do mosquito *Ae. aegypti*.
Fotos: Arquivo do Laboratório de Farmacognosia/UnB.

De maneira similar, *Cx. quinquefasciatus* também sofre metamorfose completa durante seu ciclo de vida. As fêmeas adultas põem os ovos na superfície da água parada, um de cada vez, formando uma espécie de barca, com 100 a 300 ovos, que flutua na água. A partir desses ovos, as larvas eclodem e apresentam vida aquática, se alimentando de matéria orgânica encontrada na água. As larvas passam por quatro estágios e se desenvolvem em pupa no período de 5 dias. As pupas também vivem na água. No entanto, não possuem aparelhos bucais externos e não se alimentam durante esta fase. Após 2 ou 3 dias, as pupas emergem em mosquitos adultos. As fêmeas, que picam pessoas e animais, necessitam se alimentar de sangue para

produzir ovos. Após alimentação com sangue, procuram fontes de água para botar ovos e dar continuidade ao ciclo (**Fig. 5**) (24).

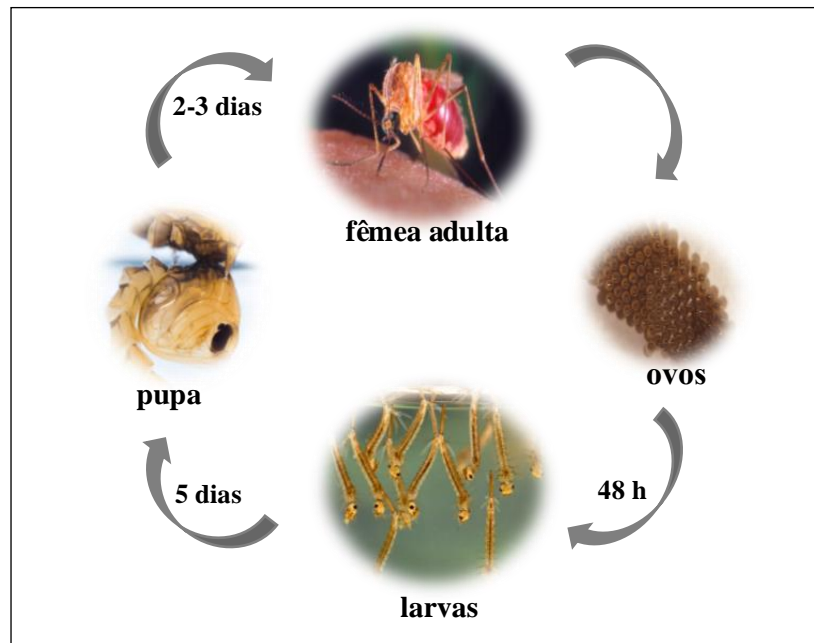


Figura 5. Ciclo de vida do mosquito *Culex quinquefasciatus*.
Fotos: https://www.cdc.gov/mosquitoes/pdfs/CulexLifeCycle_508.pdf

Conforme pôde ser observado, *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* compartilham padrões similares durante seu ciclo de vida, ambos apresentam estágios aquáticos e terrestre. Além disso, ambas as espécies tendem a colonizar, principalmente, áreas urbanas e suburbanas em regiões tropicais devido às condições climáticas adequadas ao seu desenvolvimento (25). Diferente de *Ae. aegypti*, que dissemina seus ovos por diversos criadouros, *Cx. quinquefasciatus* deposita seus ovos na água, todos juntos, no mesmo criadouro. Uma substância viscosa une uns aos outros, formando uma "jangada" com dezenas de ovos, de pé, flutuando na superfície da água. O mosquito *Ae. aegypti* é escuro e apresenta marcações brancas nas pernas e no corpo, enquanto *Cx. quinquefasciatus* apresenta coloração marrom. *Aedes aegypti* é mais ativo durante o dia, em especial no início da manhã e no fim da tarde, se alimentando de sangue para maturar seus ovos. O *Cx. quinquefasciatus*, por sua vez, é um mosquito noturno, que prefere se alimentar no horário em que as pessoas estão em repouso (18).

Considerando a complexidade do ciclo de vida do mosquito, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o controle do vetor deve ser integrado, com

foco tanto nas formas imaturas (ovos, larva e pupa) quanto na forma adulta do mosquito. A OMS classifica o controle do vetor de três maneiras distintas: biológico, ambiental e químico (11). Para o controle biológico, têm sido empregados predadores naturais das larvas do mosquito como pequenos peixes e bactérias. O controle ambiental ou mecânico consiste na eliminação ou redução ativa dos criadouros de mosquitos por meio da promoção da conscientização. O controle químico envolve o uso de inseticidas em larvas ou na forma adulta (11). Essas medidas levam em consideração que os mosquitos e seus locais de reprodução são o principal risco de infecção por arbovírus. Portanto, o encontro entre mosquitos e humanos deve ser evitado para controlar a disseminação das arboviroses. Para tanto, uma outra alternativa é o emprego de repelentes de mosquitos (26).

O uso de inseticidas sintéticos e de origem natural no controle de vetores

Nesse contexto, os inseticidas apresentam um papel importante para sociedade, não apenas para o controle de pestes na produção agrícola, mas também para a redução do número desses vetores, como os mosquitos, que representam um impacto direto na saúde pública (27). No entanto, nos últimos anos, o uso de inseticidas em programas de controle de pragas agrícolas em todo o mundo resultou em danos ambientais, ressurgimento de pragas e resistência a inseticidas, além de efeitos letais em organismos não-alvo (28,29). Ressalta-se que a aplicação contínua de inseticidas sintéticos como piretróides, carbamatos, organoclorados e organofosforados contribuem significativamente para o surgimento de resistência a inseticidas (30,31). A maioria dos inseticidas disponíveis no mercado são nocivos ao meio ambiente e seu uso intensivo, até a segunda metade do século passado, produziu efeitos negativos na saúde humana e em organismos não-alvo. Essa situação incentivou as empresas agroquímicas a reduzir ou evitar o uso de um número considerável de compostos nocivos. Assim, os pesquisadores buscaram produtos de origem natural como alternativas eficazes aos inseticidas sintéticos (27).

Conseqüentemente, novos compostos químicos, incluindo extratos de plantas, estão sendo investigados. As plantas são fontes de moléculas possivelmente ativas, que podem levar ao desenvolvimento de estruturas otimizadas ou produtos inseticidas

(32,33). Nesse contexto, inseticidas de origem natural podem ser uma alternativa ao uso de inseticidas sintéticos, considerando os numerosos casos reportados de seleção de mosquitos resistentes, a toxicidade em organismos não-alvo e a persistência no meio ambiente. Uma vez que a instrução de uso dos larvicidas é a aplicação em água, produtos de origem natural com baixa biodisponibilidade e baixa persistência no ambiente podem indicar menor toxicidade (34,35). Apesar de promissora, a pesquisa com inseticidas de origem natural é com frequência limitada à escala laboratorial. Dessa forma, há necessidade de realização de estudos em um ambiente de campo (36).

De acordo com os dados pesquisados, os repelentes de insetos foram desenvolvidos progressivamente a partir da fumaça gerada pela queima de plantas e pela aplicação tópica de óleos essenciais contendo compostos repelentes. Podem tanto ser extraídos de plantas quanto serem sintéticos, como é o caso do N,N-dimethyl-3-methylbenzamide (DEET), que é o produto repelente mais comumente utilizado no mundo inteiro (37). Os repelentes funcionam, primariamente, como espacial ou de contato. O repelente é considerado espacial quando atua à distância (38) e de contato quando os mosquitos aterrissam e fazem contato com uma superfície quimicamente tratada aumentando sua atividade de locomoção ou voando para longe (39). O DEET funciona como repelente espacial (40) e de contato (41). Porém, não é extensivamente utilizado em áreas endêmicas porque nem sempre é economicamente acessível às populações carentes (42).

O potencial do bioma Cerrado

O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil, depois da Amazônia, englobando aproximadamente 2 milhões km², sendo que 44% é constituído por flora endêmica (43). Devido a sua grande biodiversidade e alto número de espécies endêmicas, o bioma Cerrado é considerado um dos principais pontos mundiais para a preservação da biodiversidade (44,45). Abriga mais de 4.800 espécies de plantas e vertebrados combinados. Contribui com quase metade das águas superficiais do Brasil. Apesar de sua significância ambiental, 46% da sua vegetação nativa já foi devastada, com taxas de desmatamento 2,5 vezes maiores que o bioma Amazônico

entre os anos de 2002 e 2011 (45) e apenas 8,7% de seu território está resguardado em unidades de conservação (46). Em 2020, no Brasil, houve quase 14 mil km² de devastamento em todo território, sendo que quase um terço ocorreu no Cerrado (47). Devido aos altos níveis de biodiversidade e endemismo fica claro que o Cerrado é um ecossistema promissor na busca por inseticidas menos prejudiciais ao meio ambiente. Nesse contexto, há tentativas de fornecer estratégias para o controle seguro do vetor, por meio da identificação de metabólitos secundários de espécies vegetais da biodiversidade brasileira, com destaque para o Cerrado (48). No entanto, ainda existe um grande potencial a ser estudado no que se refere à identificação desses compostos ativos oriundos das plantas do Cerrado (49,50).

O potencial dos óleos essenciais

Ainda em relação à pesquisa de moléculas naturais, os óleos essenciais, que são misturas sintetizadas por plantas, constituem um importante grupo de compostos com evidências de atividade inseticida (51). Eles são definidos como óleos voláteis, apresentando misturas complexas contendo, aproximadamente, entre 20 e 60 compostos em concentrações variadas. São ricos em compostos voláteis pertencentes às classes dos monoterpenos e sesquiterpenos. Normalmente, são caracterizados por seus principais compostos, que frequentemente determinam suas propriedades biológicas (52).

Os óleos essenciais têm aplicação na medicina tradicional por meio do contato direto das plantas aromáticas com a pele ou por meio do preparo de infusões. Em escala industrial, são utilizados na produção de cosméticos, como ingredientes alimentícios ou como repelentes agrícolas (53). Assim, são fontes promissoras para a pesquisa e o desenvolvimento de novos produtos inseticidas, uma vez que diversos estudos demonstraram sua atividade em insetos, além da sua segurança para os mamíferos, no que diz respeito à administração oral e dérmica, com a obtenção de valores altos de Concentração Letal para 50% da população estudada (CL₅₀). Em acréscimo, há evidências de que são degradados mais facilmente por mecanismos naturais do ecossistema, indicando uma maior segurança ao meio ambiente (36).

Registro de inseticidas no Brasil

As normas aplicadas ao registro e à análise de inseticidas no Brasil são determinadas por diferentes órgãos públicos, além de serem observadas as diretrizes da OMS. Assim, não há uma única norma que preconize todos os requisitos necessários. As três instituições federais relacionadas ao registro de inseticidas são o Ministério da Saúde (MS), por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e o Ministério do Meio Ambiente (MMA). As normas brasileiras trazem exigências consoantes com as internacionais, como as preconizadas pelas agências reguladoras dos Estados Unidos da América (EUA) e da União Europeia (UE). No entanto, ainda existe a necessidade de elaboração e disponibilização de guia específico sobre o desenvolvimento de inseticidas inovadores para o controle do mosquito *Ae. aegypti*, por exemplo (54).

Nesse cenário, cabe à Anvisa conceder o registro de produtos inseticidas destinados ao uso em ambientes urbanos, industriais, domiciliares, públicos ou coletivos, ao tratamento de água e ao uso em campanhas de saúde pública, como é o caso dos inseticidas utilizados para o controle do vetor *Ae. aegypti* (55). Ainda sob responsabilidade da Anvisa, está o registro de repelentes de insetos de uso tópico, classificados como cosméticos pela agência (56). De acordo com a OMS, é recomendado o uso de seis inseticidas no controle de mosquitos vetores adultos. Desses, cinco fazem parte da classe de piretróides: deltametrina, lambda-cialotrina, permetrina, aletrina, cifenotrina. Por último, tem-se o malathion, que é um organofosforado (57). No Brasil, o malathion tem sido adotado para o controle dos mosquitos, em razão da seleção de vetores resistentes ao uso de piretróides (58,59).

Dentre os larvicidas utilizados no Brasil, têm-se piriproxifeno (60), metopreno (61), o óleo de neem (azadiractina) (61), diflubenzurom (60), novalurom (62), Bti (58) e espinosade (63). No que se refere a repelentes, são comercializados de forma regular os produtos à base de DEET, icaridina e IR3535. No entanto, a Anvisa alerta que os inseticidas chamados “naturais”, à base de citronela, andiroba, óleo de cravo, entre outros, não possuem comprovação de eficácia. Portanto, são produtos comercializados de maneira irregular no Brasil, sendo o óleo de neem aprovado para uso larvicida, desde que o produto possua registro na agência (64).

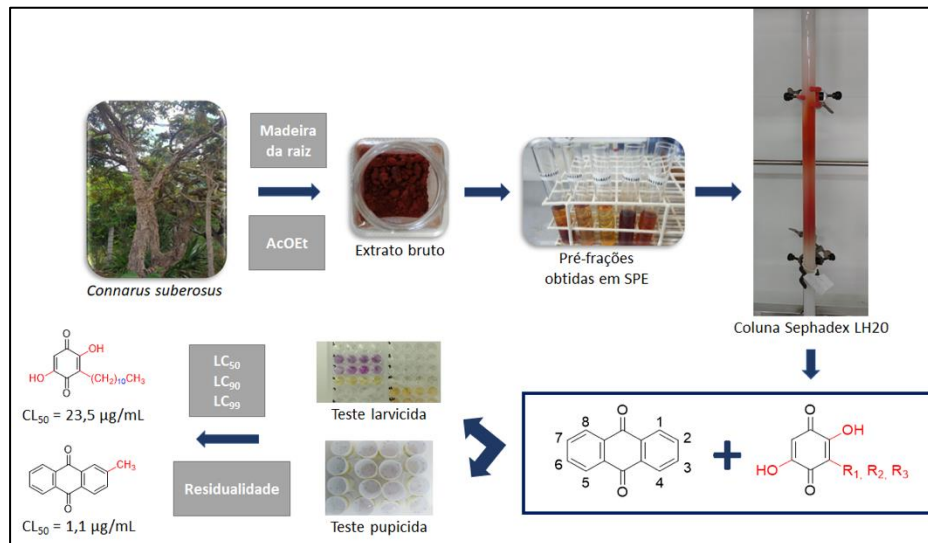
OBJETIVOS

- Investigar a atividade em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* de extratos e óleos essenciais de espécies do bioma Cerrado, tendo como ponto de partida o extrato acetato etila da madeira da raiz de *Connarus suberosus*.
- Isolar e identificar compostos oriundos dos extratos, bem como identificar os compostos majoritários nos óleos essenciais.
- Obter dados de diferentes atividades biológicas que sejam indicativos para o desenvolvimento futuro de um protótipo inseticida, visando o controle integrado de vetores, conforme diretrizes e protocolos da OMS.

PARTE I

**A ATIVIDADE DE QUINONAS NO CONTROLE
DO VETOR *Aedes aegypti***

1. RESUMO GRÁFICO



2. INTRODUÇÃO

Para a primeira parte deste trabalho, cabe contextualizar que a família Connaraceae apresenta 20 gêneros e mais de 300 espécies distribuídas na África, sudeste asiático e América tropical (65). Apenas cinco gêneros representam essa família na América tropical. Entre eles, os mais representativos são *Connarus* e *Rourea* (66). *Connarus suberosus* Planch (Connaraceae) apresenta características comumente associadas com as espécies do bioma Cerrado, como casca espessa e cortiça, ramos tortuosos e pilosidade densa (67).

Na **Parte I** deste trabalho de doutorado, foram avaliadas as atividades larvicida e pupicida de 31 derivados de quinonas, isolados de *C. suberosus* e de outras fontes. Além disso, durante o desenvolvimento de um novo larvicida, é essencial conhecer a extensão do efeito residual do composto/formulação com a finalidade de determinar a frequência necessária de sua aplicação para controlar efetivamente o vetor. O efeito residual representa o período de tempo em que a amostra permanece ativa (68). Assim, foi avaliado, em escala laboratorial, o efeito residual de 4 quinonas pela primeira vez. Além disso, foi conduzido estudo de residualidade em escala semi-

campo para a tectoquinona e discutidos os requerimentos estruturais das quinonas em relação à atividade larvívica em *Ae. aegypti*. Foi utilizado como controle positivo o larvívica temefós, que possui registro no Brasil e para o qual a linhagem Rockefeller é conhecidamente susceptível.

3. MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

A espécie *C. suberosus* Planch. (Connaraceae) foi coletada em 2010 no bioma Cerrado na área da Lagoa Formosa, Planaltina, Distrito Federal. Coordenadas geográficas: latitude sul 15° 27' 34.2"; longitude sul 47° 92' 3.3". Em uma altitude de 1071 m. A espécie foi identificada pelo botânico Prof. José Elias de Paula/UnB e um voucher foi depositado no Herbário da Universidade de Brasília (UnB) sob o número (UB) 3820. A madeira da raiz foi separada, dessecada, estabilizada, pulverizada e extraída por maceração em acetato de etila. A solução extrativa foi concentrada em rotaevaporador para obtenção do extrato bruto, que foi armazenado à temperatura de -20° C.

3.2. COMPONENTES QUÍMICOS E INSTRUMENTOS

O padrão do inseticida organofosforado temefós foi comprado da empresa Sigma Aldrich (Buchs, Suíça). Os padrões de quinonas foram adquiridos da empresa Alfa Aeser (Ward Hill, MA, Estados Unidos). Todos os solventes utilizados nos processos de extração e isolamento foram grau HPLC.

Os espectros de ¹H RMN (Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio), foram gerados em um espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 600

MHz (Bruker, Rheinstteten, Alemanha) e os espectros de ^{13}C RMN (Ressonância Magnética Nuclear de Carbono) foram gerados em um espectrômetro Varian 300 MHz (Palo Alto, CA, Estados Unidos). Em ambos os casos o tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão interno. A massa molecular dos compostos foi determinada por espectrômetro de massas AB Sciex TripleTOF 5600+ para embelina, rapanona e suberonona ou HRMS (*High Resolution Mass Spectrometry*) (qTOF-*quadrupole-time-of-flight*) (Bruker, Bremen, Alemanha) para bergenina.

3.3. IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

A identificação das amostras obedeceu aos critérios estabelecidos no Procedimento Operacional Padrão do Laboratório de Farmacognosia/UnB: POP019 - Organização do caderno de laboratório. Todas as amostras receberam um código Arbo, conforme exemplo a seguir (**Fig. 6**).

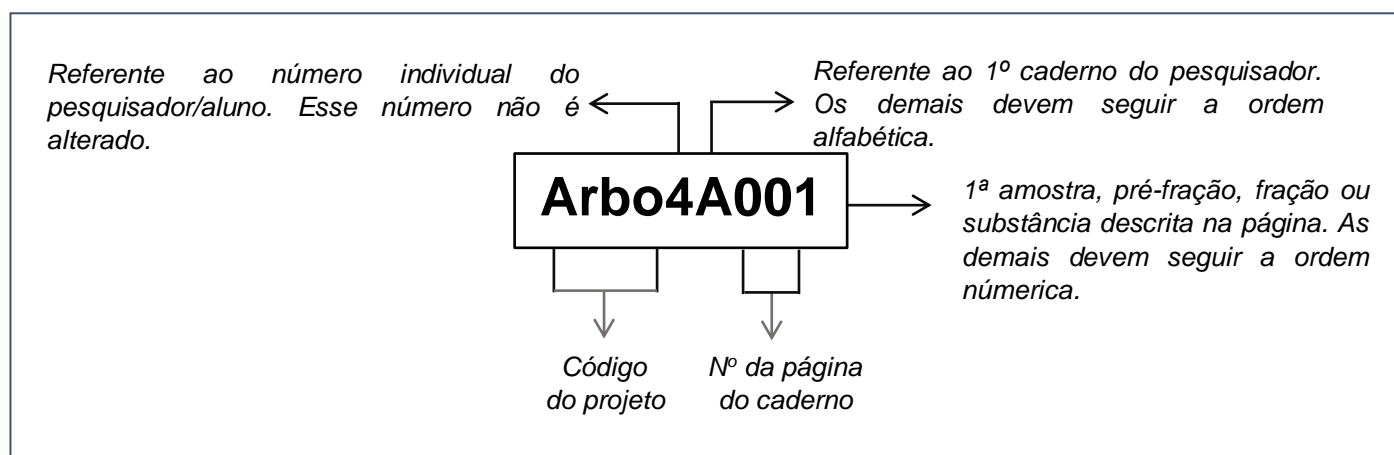


Figura 6. Exemplo de código de identificação da amostra de acordo com o POP019 do Laboratório de Farmacognosia/UnB.

3.4. PERFIL QUÍMICO E ISOLAMENTO DE COMPOSTOS

Para guiar o isolamento de compostos ativos, as amostras foram testadas em quadruplicata, nas concentrações descritas na **Tabela 1**, que correspondem a valores pré-estabelecidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacognosia/UnB:

Tabela 1. Concentrações das amostras testadas em larvas do 3º estágio de *Ae. aegypti*.

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO
Extrato Bruto	250 µg/mL
Pré-fração	125 µg/mL
Fração	100 µg/mL
Substância Pura	25 µg/mL

O extrato bruto acetato de etila da madeira da raiz da espécie *C. suberosus* foi testado em larvas do 3º estágio de *Ae. aegypti*, com 100% de mortalidade a 250 µg/mL e pré-fracionado em cartuchos de DIOL Spe-ed SPE (Applied Separations, Allentown, PA, Estado Unidos) em cinco pré-frações: A (hexano e diclorometano 9:1), B (diclorometano e acetato de etila 20:1), C (acetato de etila 100%), D (acetato de etila e metanol 5:1) e (metanol 100%).

Após testes biológicos, as pré-frações Arbo4A087A (349,1 mg) e Arbo4A087B (645,8 mg) foram as que apresentaram maior porcentagem de mortalidade em larvas de *Ae. aegypti*, ambas com 100% de mortalidade larval a 125 µg/mL. Em seguida, os perfis químicos das pré-frações foram analisados em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Waters, Milford, MA, USA). A pré-fração Arbo4A087B foi selecionada para prosseguir com o fracionamento em CLAE semipreparativa para separação dos constituintes de interesse com coluna 10 mm d.i. × 250 mm SunFire C18 5µm (Waters, Dublin, Irlanda) tendo como fase móvel gradiente de água e metanol [65:35 (0-4 min), 0:100 (4-21 min), 65:35 (21-30min) por volume] sob fluxo 4 mL/min. A separação foi monitorada em detector UV a 270 nm.

Após o fracionamento da pré-fração Arbo4A087B, foi dada continuidade ao estudo com as pré-frações Arbo4A087A, Arbo4A087C e Arbo4A087D. As pré-frações Arbo4A087A e Arbo4A087C foram submetidas à CLAE semipreparativa, sob as mesmas condições citadas anteriormente, e a fração Arbo4A087D foi fracionada em coluna aberta de sílica (15 mg – 0,063-0,2 mm), altura da fase estacionária de 10 cm, altura da coluna de 50 cm, diâmetro da coluna de 2,5 cm, como fase móvel gradiente hexano/acetato de etila/metanol [hexano : acetato de etila (1:1); hexano : acetato de etila (2:8); acetato de etila : metanol (7:3) e acetato de etila : metanol (1:1)].

3.5. ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.5.1. Avaliação da atividade larvicida

Larvas de *Ae. aegypti* no 3º estágio (L₃), da linhagem Rockefeller, com idade entre 72 h e 96 h, e pupas com mais de 12 h foram coletadas da colônia de mosquitos mantida no Insetário ArboControl (Laboratório José Elias de Paula / Anexo do Laboratório de Farmacognosia /UnB) sem exposição a nenhum inseticida. Os mosquitos foram mantidos a 28 ± 2 °C e $70 \pm 10\%$ Umidade Relativa (UR) em um fotoperíodo de 12 h. A eclosão dos ovos ocorreu em água da torneira e as larvas foram alimentadas com ração de peixe. A alimentação dos insetos adultos é realizada com solução de açúcar a 10% impregnada em papel de filtro (Whatman, Canterbury, Reino Unido) duas vezes por semana. Para alimentação das fêmeas, também é utilizado sangue equino (Hospital Veterinário da Universidade de Brasília) três vezes por semana para permitir a produção de ovos.

Os ensaios larvicidas foram realizados conforme preconizado pelo guia da OMS (2005) (69) com modificações. Inicialmente, o método foi adaptado com a finalidade de se realizar uma triagem com pequenas quantidades das amostras. O extrato bruto, concentração final de 250 µg/mL, foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) e transferido com auxílio de pipetador automático para placas de 12 poços. Um total de 120 larvas foi exposto em quatro replicatas de 10 larvas por poço com volume final de 3 mL. O teste foi realizado três vezes em dias diferentes com diferentes lotes de larvas. Após 24 h e 48 h de exposição, o número de larvas mortas foi contado e a porcentagem de mortalidade foi calculada. Foram consideradas mortas as larvas com total ausência de movimento, mesmo após estímulo pelo toque. Os ensaios com o controle positivo (temefós) e o controle negativo (< 1% DMSO em água da torneira) foram conduzidos em paralelo. O mesmo procedimento foi seguido para pré-frações (125 µg/mL), frações (100 µg/mL) e compostos (25 µg/mL) de origem natural e comercial.

Após os resultados, tendo como critério o percentual de mortalidade ($\geq 80\%$), foram calculados os valores de CL₅₀ em microgramas por mililitro em um Intervalo de Confiança (IC) de 95%. Como controle negativo foi utilizado DMSO (<1% em água da torneira) e como controle positivo foi utilizado temefós em água da torneira para

assegurar a validade do teste. O controle negativo ocorreu em paralelo a cada teste realizado e o controle positivo foi realizado em triplicata. As curvas de dose-respostas foram estimadas conforme estabelecido pelo guia da OMS para testes larvicidas. Para cada bioensaio, 25 larvas de *Ae. aegypti* do 3º estágio foram transferidas para copos contendo um volume final de 20 mL ou 120 mL de água da torneira mais a amostra a ser testada na concentração desejada. A diferença nesse volume final se deve à quantidade em miligramas disponível de cada amostra a ser testada.

Para calcular os valores de CL_{50} , foram utilizadas 5 a 6 concentrações dentro do intervalo de atividade de cada substância. Um total de 200 a 600 larvas foram expostas a cada substância em quatro réplicas com 25 larvas por concentração, três vezes, utilizando-se três diferentes lotes de larvas da mesma colônia. A porcentagem de mortalidade larval foi obtida após a exposição de 24 h, 48 h ou 72 h. Para cada bioensaio, a temperatura foi mantida a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ UR em um fotoperíodo de 12 h.

3.5.2. Avaliação da atividade pupicida

A triagem da atividade pupicida foi realizada com o extrato bruto (250 $\mu\text{g/mL}$), compostos isolados de *C. suberosus* (50 $\mu\text{g/mL}$) e derivados de quinonas obtidos comercialmente (25 $\mu\text{g/mL}$) solubilizados em DMSO e transferidos para um copo contendo um volume final de 20 mL incluindo o volume da amostra. Após a inclusão das pupas nos copos, esses foram cobertos com o tecido organza para que, caso houvesse mosquitos transformados, esses não escapassem durante o teste. Foram utilizados quatro copos por concentração (10 pupas por copo) e a mortalidade foi aferida após 24 h de exposição. Um total de 40 pupas foi exposto por amostra. Optamos por utilizar a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ para os compostos isolados de *C. suberosus* porque, durante os testes para cálculo de CL_{50} da rapanona, foi observada uma pupa morta nessa concentração.

3.5.3. Avaliação da atividade larvicida residual em escala laboratorial

A atividade residual das amostras em larvas foi investigada, em escala laboratorial, a partir da menor concentração utilizada para cálculo de CL_{50} em que foi

observada a maior mortalidade das larvas. Para cada ensaio, as amostras foram solubilizadas em DMSO e adicionadas em copos contendo água da torneira, resultando em um volume final de 120 mL. Em cada copo foram adicionadas 25 larvas do 3º estágio. As amostras foram testadas em quadruplicata. A taxa de mortalidade foi aferida a cada 24 h. Em ambos os testes, todas as larvas (vivas e mortas) foram substituídas por larvas de outro lote a cada 24 h ou 72 h a depender da taxa de mortalidade observada. O mesmo procedimento foi aplicado ao controle negativo (máximo 1% em água da torneira) e ao controle positivo temefós (0,025 µg/mL), conduzidos em paralelo. Os testes foram finalizados quando observada uma redução de 80% ou 90% da atividade larvicida inicial.

Devido ao grande número de ensaios conduzidos para a determinação dos valores de CL₅₀ e CL₉₀, foram observadas diferentes atividades larvicidas entre os compostos testados. Algumas atingiram a mortalidade máxima após 24 h e outras após 72 h. Dessa forma, os estudos de residualidade foram conduzidos de duas maneiras diferentes: (1) a mortalidade larval foi aferida a cada 24 h, com a reposição das larvas (vivas e mortas) a cada 24 h e (2) a mortalidade larval foi aferida a cada 24 h em estudo cíclico da atividade larvicida de 72 h, com a reposição das larvas (vivas e mortas) a cada 72 h.

3.5.4. Avaliação da atividade larvicida residual em escala semi-campo

A atividade larvicida residual em escala semi-campo foi realizada em recipientes plásticos cheios com 10 L de água da torneira. Após 24 h, foram adicionadas 30 larvas de *Ae. aegypti* do 3º estágio a cada recipiente. Passadas 2 h de ambientação, foi adicionada tectoquinona (4) diluída em DMSO a cada recipiente em três níveis diferentes de concentrações: 2,1 µg/mL (CL₉₀), 3,5 µg/mL (CL₉₀ × 1,5) e 4,3 µg/mL (CL₉₀ × 2). DMSO foi utilizado como controle negativo (máximo 1% em água da torneira). Cada concentração e o controle negativo foram testados em quadruplicata. Os testes com o controle positivo (temefós 0,013 µg/mL) foram conduzidos em paralelo. Os recipientes foram cobertos com uma tela de malha em náilon, examinados a cada 24 h e o número de larvas vivas contado para determinar a mortalidade larval pós-tratamento. As larvas (vivas e mortas) foram substituídas a cada 24 h até que a mortalidade fosse reduzida para menos de 80% (limite

determinado na triagem laboratorial).

3.6. ANÁLISE DE DADOS

As porcentagens da mortalidade larval de cada uma das replicatas foram inseridas no software GraphPad Prism 8 para cálculo da CL₅₀ e CL₉₀ em um intervalo de confiança (IC) de 95%. Para determinação da atividade larvicida de cada substância, foram realizadas três réplicas com larvas de diferentes lotes em diferentes períodos e os resultados foram calculados considerando-se todos os dados obtidos por concentração (n = 300 larvas por concentração). De acordo com o guia da OMS, os testes que apresentarem mortalidade > 5% no controle negativo devem ser corrigidos pela fórmula de Abbott e os testes que apresentarem mortalidade > 20% devem ser descartados.

Fórmula de Abbott:

$$\text{Mortalidade corrigida \%} = \frac{(X-Y)}{X} \times 100$$

onde X = % de sobrevivência no controle negativo e Y = % de sobrevivência nas amostras testadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PERFIL QUÍMICO E ISOLAMENTO DE COMPOSTOS

O extrato bruto acetato de etila da madeira da raiz de *C. suberosus* (250 µg/mL) apresentou 100% de mortalidade em larvas de *Ae. aegypti* do 3º estágio. A partir desse resultado, foi dada continuidade ao fracionamento bioguiado. Um total de 3,6 g do extrato bruto foi submetido ao pré-fracionamento em SPE DIOL, obtendo-se as seguintes pré-frações: Arbo4A087A (349,1 mg); Arbo4A087B (645,8 mg);

Arbo4A087C (345,6 mg); Arbo4A087D (534,2 mg) e Arbo4A087E (635,7 mg). As pré-frações (125 µg/mL) foram testadas em larvas de *Ae. aegypti* do 3º estágio apresentando as seguintes porcentagens de mortalidade: Arbo4A087A (100%); Arbo4A087B (100%); Arbo4A087C (75%); Arbo4A087D (inativa) e Arbo4A087E (inativa). Em seguida, as pré-frações foram monitoradas em CLAE em comprimento de onda de 270 nm.

Nos resultados das análises em CLAE (**Fig. 7**), os picos majoritários identificados nas pré-frações Arbo4A087A, Arbo4A087B, Arbo4A087C e Arbo4A087D apresentaram perfis químicos semelhantes entre si. As *para*-benzoquinonas suberonona (**1**) (70) (2,5-diidroxi-3-entadecilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona) (RT = 24,2 min., rendimento 0,46%), rapanona (**2**) (70) (2,5-diidroxi-3-tridecilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona) (RT = 22,0 min., rendimento 3,3%) e embelina (**3**) (71) (2,5-diidroxi-3-undecilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona) (RT=20,1 min., rendimento 5,6%) (**Fig. 8**) foram isoladas a partir das pré-frações Arbo4A087A, Arbo4A087B e Arbo4A087C. Enquanto a bergenina (**32**) (72) (C-glicosídeo do 4-O-metil ácido gálico) foi isolada das pré-frações Arbo4A087C e Arbo4A087D. O fluxo do fracionamento pode ser observado na **Fig. 9**.

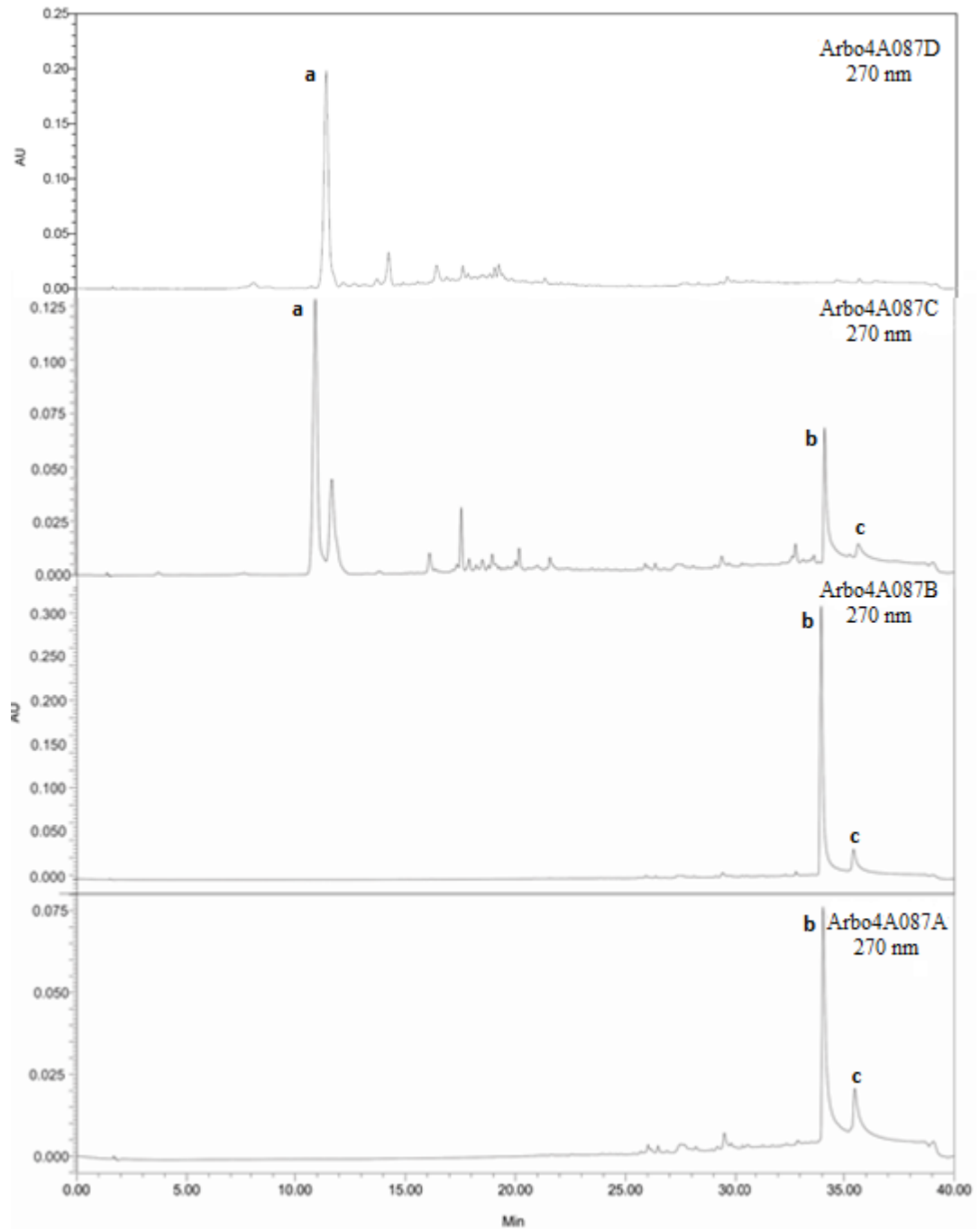


Figura 7. Cromatogramas analíticos das pré-frações Arbo4A087D, Arbo4A087C, Arbo4A087B e Arbo4A087A. Picos referentes aos compostos: a) bergenina (**32**); b) embelina (**3**) e c) rapanona (**2**). A substância suberonona (**1**) apenas foi observada com coluna semipreparativa.

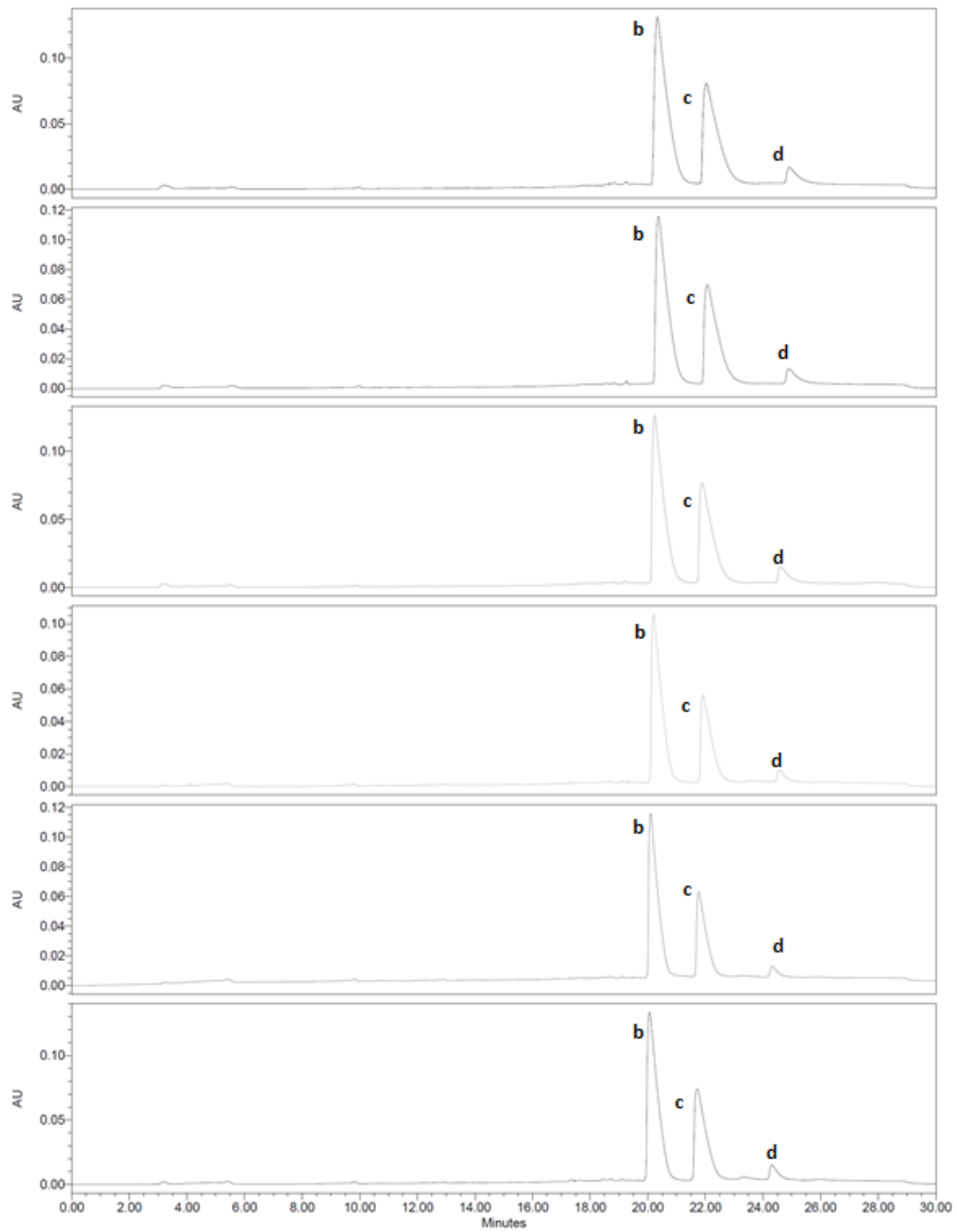


Figura 8. Cromatogramas sucessivos com a utilização de coluna semipreparativa para isolamento de: b) embelina (**3**); c) rapanona (**2**) e d) suberonona (**1**).

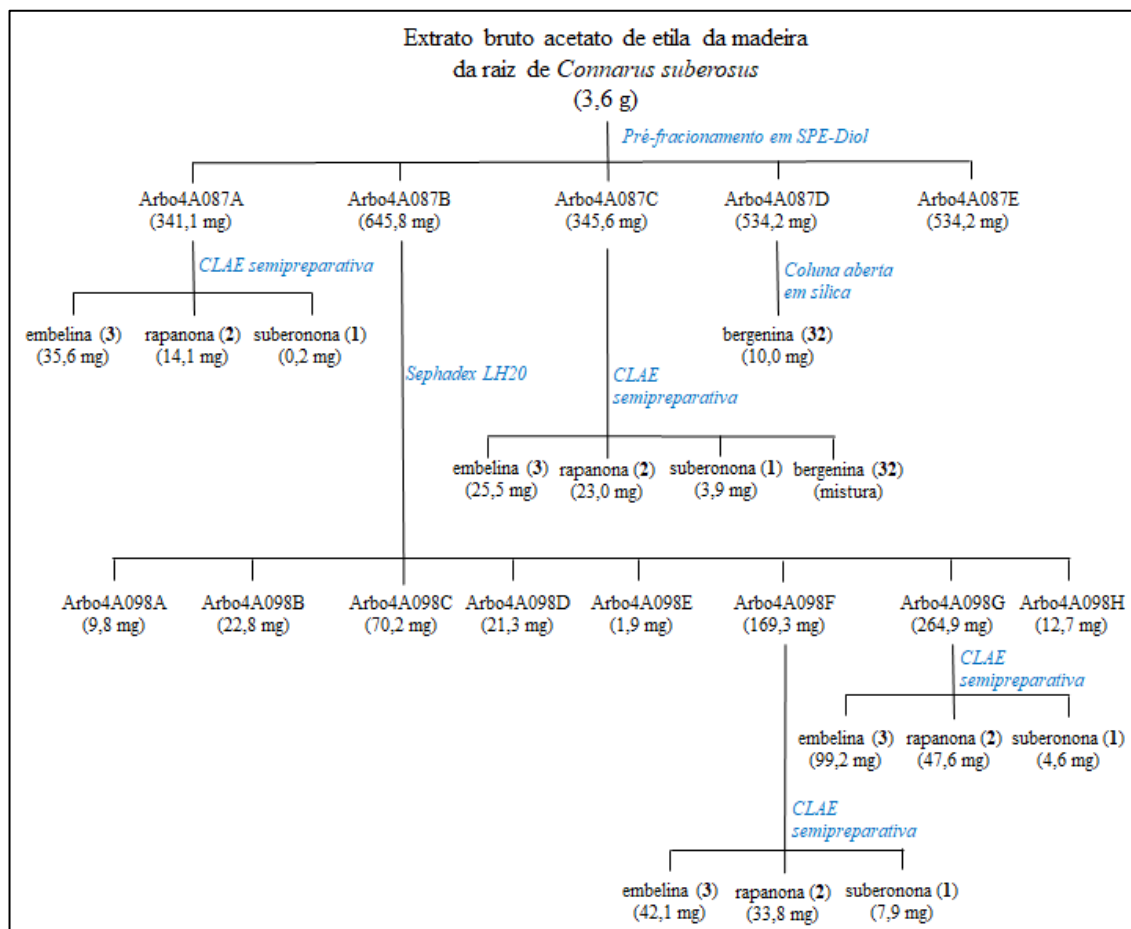


Figura 9. Fluxo de fracionamento do extrato bruto acetato de etila da madeira da raiz de *Connarus suberosus* e obtenção dos compostos: suberonona (1), rapanona (2), embelina (3) e bergenina (32).

As quinonas são compostos amplamente distribuídas na natureza caracterizadas pela presença de anéis quinonóidicos podendo ser subdivididas em três subgrupos as benzoquinonas, naftoquinonas e antraquinonas. As *para*-benzoquinonas embelina (3), rapanona (2) e suberonona (1) apresentadas na **Fig. 10** foram isoladas da espécie *Connarus suberosus*. Estas três *p*-benzoquinonas foram identificadas pelo conjunto de dados obtidos por meio de ressonância magnética nuclear (RMN), espectros de infravermelho (IV), espectrometria de massas de alta resolução (EM) e estudos comparativos com a literatura.

Conforme a **Fig. 10**, as estruturas químicas destes três compostos se diferenciam pela cadeia carbônica lateral ligada ao carbono na posição C-3. Embelina (3), rapanona (2) e suberonona (1) apresentam essas cadeias laterais com 11, 13 e 15 carbonos, respectivamente. Por esse motivo os espectros de RMN de ^1H (**Anexo**

I, Fig. AI-1, AI-2, AI-3) foram bem similares, distinguindo-se basicamente pelo número de hidrogênios dos grupos CH₂, os quais foram representados por um sinal intenso com deslocamento químico em 1,23 ppm. Adicionalmente, há um singleto com δ 5,76 ppm referente ao hidrogênio ligado ao carbono da posição C-6 e outros dois sinais, um com δ 2,27 ppm correspondendo ao grupo CH₂ ligado diretamente ao C-3 e o outro com δ 0,85 ppm atribuído à metila terminal da cadeia lateral.

De acordo com a literatura (73,74), a justificativa para a falta destes sinais nos espectros de RMN de ¹³C é devido ao efeito fluxional causado por ligações intramoleculares de hidrogênio. Tal efeito pode resultar em um tempo de relaxação longo, em que os carbonos quaternários relaxam mais rapidamente que carbonos primários, levando a um sinal de intensidade muito baixa ou indetectável.

Visando detectar a função carbonila presente nas estruturas químicas das *p*-benzoquinonas optou-se por obter os espectros de infravermelho. Esse objetivo foi alcançado observando-se os estiramentos correspondentes a essa função orgânica em 1606 cm⁻¹ para embelina (3) (Anexo I, Fig. AI-7), e 1610 cm⁻¹ para rapanona (2) (Anexo I, Fig. AI-8) e suberonona (1) (Anexo I, Fig. AI-9). Posteriormente, os espectros de massas foram obtidos (Anexo I, Fig. AI-10, AI-11, AI-12), dos quais confirmaram-se os íons desprotonados com m/z 293,1738 [M-H]⁻ calculado para C₁₇H₂₅O₄, m/z 321,2025 [M-H]⁻ calculado para C₁₉H₂₉O₄ e m/z 349,2360 [M-H]⁻ calculado para C₂₁H₃₃O₄, os quais foram referentes à embelina (3) C₁₇H₂₆O₄, rapanona (2) C₁₉H₃₀O₄ e suberonona (1) C₂₁H₃₄O₄, respectivamente.

Em relação ao isolamento da suberonona (1), em um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, a partir do extrato bruto acetato de etila da casca da raiz de *C. suberosus*, foi obtida uma mistura de rapanona e suberonona (70). No presente estudo, foi a primeira vez em que a suberonona (1) foi separada e teve sua atividade investigada em larvas de *Ae. aegypti*. Em 1964, os compostos rapanona e bergenina foram obtidos a partir de extratos de raiz de *Connarus monocarpus* (75). Porém, essa foi a primeira vez em que embelina (3) e bergenina (32) foram isoladas da espécie *C. suberosus*.

Durante a revisão da bibliografia científica relacionada ao presente estudo, foi observado que não é comum serem encontrados trabalhos que seguiram os critérios estabelecidos no guia da OMS (69). Entende-se que essa metodologia padronizada

oferece mais confiabilidade em termos de correlação da estrutura-atividade que pode ser usada em estudos futuros para otimização do composto principal.

4.2. Ensaios biológicos e aspectos estruturais das quinonas

Os ensaios larvicidas e pupicidas foram realizados de acordo com os critérios estabelecidos pela OMS (69). As amostras foram diluídas em DMSO, os ensaios conduzidos em quadruplicata e repetidos três vezes com larvas L₃ de diferentes lotes da mesma colônia de *Ae. aegypti*. O número de larvas mortas foi verificado após 24 h e 48 h de exposição e as respectivas taxas de mortalidade foram calculadas. Os valores de CL₅₀ foram determinados por meio de 5 a 6 diferentes concentrações de cada substância. Entre 200 e 600 larvas foram expostas aos compostos em 4 replicatas de 25 larvas. A mortalidade larval foi determinada após 24 h e 48 h (**Tabela 2**). Os testes com controle positivo temefós e o controle negativo DMSO foram realizados em paralelo para assegurar a validade dos testes.

Todos os compostos foram inicialmente testados a 25 µg/mL, sendo que o valor de CL₅₀ foi determinado apenas para aquelas com porcentagens de mortalidade ≥ 80% em 24 h. Para os compostos com mortalidade < 80% após 24 h, apenas as porcentagens de mortalidade foram reportadas na **Fig. 10**. Com o objetivo de explorar e entender os aspectos estruturais das quinonas relacionados à atividade larvicida, foram testados 28 derivados de quinonas. As atividades larvicidas foram mensuradas após 24, 48 e 72 h. Após os resultados de atividade larvicida preliminares, os compostos mais ativos foram submetidos a uma curva dose-resposta para determinação dos valores de CL₅₀ e CL₉₀ (**Tabela 2**).

Tabela 2. Resultados de CL₅₀ e CL₉₀ em larvas do 3º estágio de *Ae. aegypti*.

Composto	Concentração (µg/mL)	^a VF (mL)	^b N	^c n	CL ₅₀ µg/mL		CL ₉₀ µg/mL	
					24h*, 48h**, 72h*** (95% ^d IC)	24h*, 48h**, 72h*** (95% IC)	24h*, 48h**, 72h*** (95% IC)	24h*, 48h**, 72h*** (95% IC)
2	200; 100; 50; 25; 12,5	3	12	600	72,62* (65,27 – 81,02)	> 200,0*	38,63** (35,47 – 42,14)	77,95** (65,59 – 92,02)
3	50; 25; 20; 15; 10; 5	20	12	1800	23,51* (22,12 – 25,16)	48,36* (40,66 – > 50,0)	15,55** (14,64 – 16,51)	26,51** (23,39 – 30,05)
4	3,5; 1,75; 0,88; 0,44; 0,22; 0,11	120	12	1800	1,10* (1,04 – 1,17)	2,11* (1,86 – 2,39)	0,75** (0,70 – 0,82)	1,71** (1,45 – 2,01)
					0,53*** (0,49 – 0,57)	1,31*** (1,10 – 1,56)		
5	50; 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56	20	12	1800	4,99* (4,52 – 5,50)	10,05* (8,31 – 12,13)	4,70** (4,35 – 5,09)	7,57** (6,78 – 8,42)
6	25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78	20	12	1800	6,52* (6,17 – 6,88)	12,70* (11,18 – 14,39)	4,91** (4,45 – 5,41)	10,84** (8,88 – 13,13)
7	10; 4; 1,6; 0,64; 0,26; 0,10	120	12	1800	> 10,0*	> 10,0*	2,27** (1,99 – 2,59)	8,30** (6,24 – > 10,0)
					1,28*** (1,19 – 1,37)	3,06*** (2,66 – 3,50)		
8	10; 1; 0,1; 0,01	120	12	1200	> 10,0*	> 10,0*	5,98** (5,31 – 6,76)	> 10,0**
					2,80*** (2,18 – 3,58)	> 10,0***		
9	150; 37,5; 9,38; 2,34; 0,59; 0,5	120	12	1800	12,87* (10,13 – 16,38)	> 150,0*	5,44** (4,16 – 7,15)	107,4** (58,83 – >150,0)
					1,83*** (1,48 – 2,27)	17,09*** (10,79 – 26,75)		
temefós	0,025; 0,0125; 0,00625; 0,003125; 0,0015625	120	12	1000	0,0081* (0,0076 – 0,0085)	0,0130* (0,0117 – 0,0144)	0,0064** (0,0063 – 0,0068)	0,0107** (0,0096 – 0,0121)
					0,0054*** (0,0055 – 0,0060)	0,0096*** (0,0088 – 0,0109)		

^aVF: volume final. ^bN: número de replicatas. ^cn: número de larvas. ^dIC: intervalo de confiança. DMSO (controle negativo) – mortalidade larval < 20%. DMSO foi usado como controle negativo – mortalidade larval < 20%. Compostos: rapanona (**2**), embelina (**3**), tectoquinona (**4**), emodina (**5**), plumbagina (**6**), 2-etilantraquinona (**7**), 1-cloroantraquinona (**8**), antrona (**9**).

Em relação aos compostos isolados de *C. suberosus*, a embelina (**3**) apresentou CL₅₀ igual a 23,5 µg/mL e a rapanona (**2**) apresentou CL₅₀ igual a 72,6 µg/mL após 24 h. Enquanto suberonona (**1**) e bergenina (**32**) foram inativas a 25 µg/mL. Um sal potássico de embelina misturado com rapanona, previamente isolada de *Rapanea melanphloes* (Myrsinaceae), foi testado em larvas de *Ae. aegypti* e apresentou CL₅₀ de 2,4 µg/mL após 48 h de exposição (76). Entretanto, a metodologia empregada não estava de acordo com as diretrizes da OMS e um menor número de larvas foi testado. A embelina foi também isolada de *Oxalis erythrorhiza* (Oxalidaceae) e relatada por inibir bactérias, fungos e *Trypanosoma cruzi* (77).

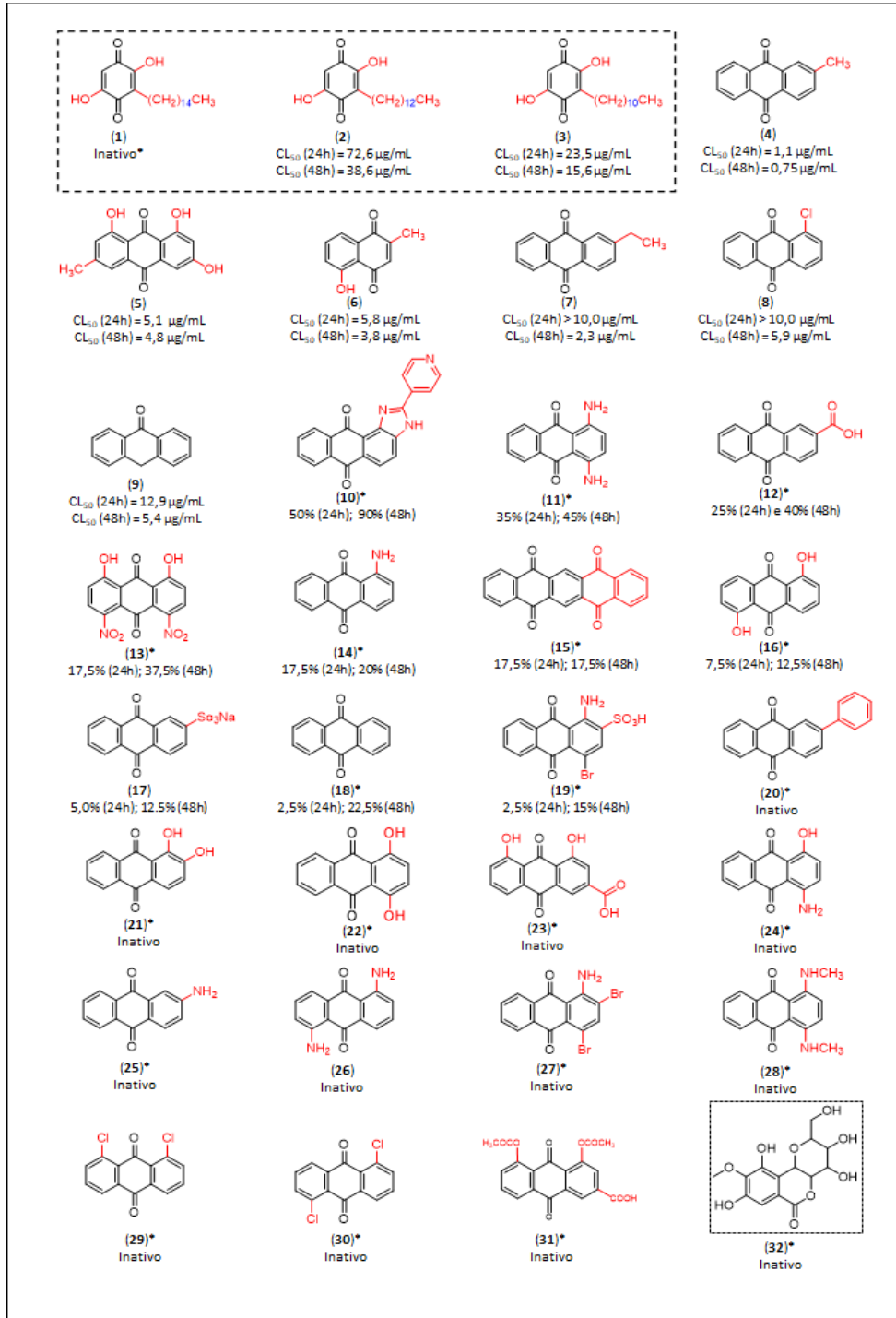


Figura 10. Derivados de quinonas 1-31: (1) suberonona; (2) rapanona; (3) embelina; (4) tectoquinona; (5) emodina; (6) plumbagina; (7) 2-etilantraquinona; (8) 1-cloroantraquinona; (9) antrona; (10) 2-(4-piridil)-1H-antra[1,2-d]imidazole-6,11-diona; (11) krisolamina; (12) ácido 2-carboxiantraquinona; (13) 4,5-dinitrocisazina; (14) 1-aminoantraquinona; (15) 5,7,12,14-pentacenetetrona; (16) antrurifino; (17) antraquinona-2-sulfonato de sódio; (18) antraquinona; (19) ácido bromamínico; (20) 2-fenilantraquinona; (21) alizarina; (22) quinizarina; (23) reína; (24) 1-amino-4-hidroxiantraquinona; (25) 2-aminoantraquinona; (26) 1,5-diaminoantraquinona (27) dibromoaminoantraquinona; (28) 1,4-Bis(metilamino)antraquinona; (29) 1,8-dicloroantraquinona; (30) 1,5-dicloroantraquinona; (31) diacereína. Glicosídeo: (32) bergenina. *Compostos testados na concentração equivalente à 25 $\mu\text{g/mL}$. O tracejado ao redor das estruturas (1), (2), (3) e (32) indicam que essas foram extraídas a partir do extrato acetato de etila da madeira da raiz de *Conarus suberosus*.

Estudos demonstraram que algumas *para*-benzoquinonas presentes em plantas, como embelina (misturada com rapanona), mirsinona e mirsinaquinona, demonstraram 90% de letalidade em larvas do 2º estágio de *Ae. aegypti* nas concentrações de 4 a 5 µg/mL (76). Além disso, Sousa DP *et al.* (2010) relataram seis *para*-benzoquinonas larvicidas, nas quais a *para*-benzoquinona não substituída (sem grupos hidroxila ou alquil) era menos ativa (CL₅₀ 90 µg/mL), enquanto a 2-isopropil-*para*-benzoquinona (cadeia de 3C) era mais ativa (CL₅₀ 33 µg/mL) após 24 h. Em geral, a presença de grupos alquil está associada ao aumento da potência do composto que é modulado pelo número, posição e tamanho desse grupo (78).

No presente estudo, a embelina (**2**), que possui cadeia de 11C, apresentou uma porcentagem de mortalidade larval (CL₅₀ 23,5 µg/mL) maior que a 2-isopropil-*para*-benzoquinona (CL₅₀ 33 µg/mL) (78). No entanto, a mortalidade diminuiu com o aumento da cadeia de carbono: rapanona (**2**; cadeia de 13C) apresentou CL₅₀ 72,6 µg/mL e suberonona (**1**; cadeia de 15C) não apresentou mortalidade na concentração de 25 µg/mL. Uma vez que os grupamentos hidroxila da embelina, rapanona e suberonona encontram-se nas mesmas posições do anel (C-2 e C-5), foi possível avaliar uma possível influência do tamanho da cadeia carbônica, que é a única diferença na estrutura desses compostos, na atividade larvicida. Isso sugere que o impacto do tamanho do grupo alquil no aumento da atividade larvicida pode ser limitado (**Fig. 11**).

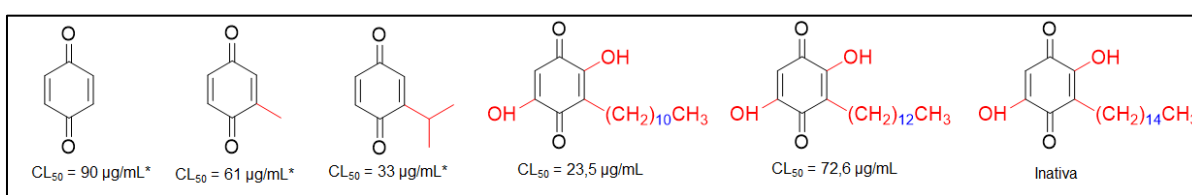


Figura 11. Estruturas de *para*-benzoquinonas com diferentes substituintes relacionados à atividade larvicida em *Ae. aegypti*. * Sousa DP *et al.* (2010); **dados experimentais.

Foi observado que o grupo metil ligado diretamente ao anel aromático do núcleo antracênico é relevante e apresenta um papel importante na atividade larvicida. A antraquinona mais ativa, tectoquinona (**4**: CL₅₀ 1.1 µg/mL após 24 h), possui um grupo metil na posição C-2. Foi observada uma diminuição na atividade larvicida em comparação com a 2-etilantraquinona (**7**; CL₅₀ > 10 µg/mL após 24 h), que possui um

grupo etil na mesma posição C-2. Além disso, a antraquinona (**18**), sem nenhum substituinte, não apresentou atividade larvicida após 24 h. A emodina (**5**; CL₅₀ 5,0 µg/mL após 24 h), que possui um grupo metil diretamente ligado ao anel aromático do núcleo antracênico na posição C-6, apresentou a segunda maior atividade larvicida entre as quinonas.

Cheng SS *et al.* (2008) reportou a atividade em larvas do 4º estágio de *Ae. aegypti* para tectoquinona (CL₅₀ 3,3 µg/mL e CL₉₀ 8,8 µg/mL) isolada da espécie *Cryptomeria japonica* (Cupressaceae); antraquinona (CL₅₀ e CL₉₀ > 25 µg/mL); emodina (CL₅₀ 5,3 µg/mL e CL₉₀ 19,1 µg/mL); alizarina (CL₅₀ e CL₉₀ > 25 µg/mL), e do ácido 2-carboxiantraquinona (CL₅₀ 16,3 µg/mL e CL₉₀ 25 µg/mL). Os autores também concluíram, por meio da comparação das atividades larvicidas das estruturas congêneres de antraquinonas, que aquelas com um grupo metil na posição C-2, como a tectoquinona, apresentaram as maiores atividades larvicidas (79).

Na presente avaliação da atividade larvicida da tectoquinona (**4**), foram determinadas a CL₅₀ 1,1 µg/mL e a CL₉₀ 2,1 µg/mL. É importante ressaltar que os ensaios larvicidas conduzidos no presente estudo diferem consideravelmente dos ensaios realizados no estudo de 2008 (79) mencionado acima: número de quinonas testadas (31 vs. 7), estágio larval (L₃ vs. L₄) número total de larvas expostas por substância (1800 vs. 360), volume final (120 mL vs. 25 mL), número de larvas em cada recipiente (25 vs. 10), número de replicatas (4 utilizando 3 lotes diferentes vs. 4), duração (24, 48 e 72 h vs. 24 h) e protocolo (OMS, 2005 vs. Momin & Nair, 2001) (80). Em acréscimo, além de serem testadas 31 quinonas de acordo com os critérios estabelecidos pelo OMS, essa foi a primeira vez em que foi reportada a atividade larvicida residual para tectoquinona, 2-etilantraquinona, antrona e 1-cloroantraquinona em larvas do 3º estágio de *Ae. aegypti*. O resultado para plumbagina (**6**; CL₅₀ 5,8 µg/mL em 24 h) também foi consistente com o reportado na literatura para plumbagina isolada de *Plumbago capensis* (81).

Conforme demonstrado por estudos anteriores, a emodina apresenta uma variedade de atividades biológicas (82), incluindo propriedade laxativa, semelhantes à reína, e apesar dos dois compostos possuírem grupos hidroxila nas posições C-1 e C-8, o primeiro apresenta um grupo metil (C-6) e o segundo um grupo carboxil (C-3). No entanto, no presente estudo, foi possível verificar que as porcentagens de mortalidade larvicida da emodina (**5**; CL₅₀ 4,9 µg/mL e CL₉₀ 10 µg/mL após 24 h) e

reína (**23**; não ativa a 25 µg/mL) não foram similares. Estes resultados sugerem que a atividade larvicida não está ligada à semelhança estrutural do anel antracênico com as hidroxilas em C1 e C8. Essa conclusão é consistente com os achados de Yang *et al.* (2003) (83) e Cheng *et al.* (2008) (79).

Existem diversos mecanismos de ação descritos para as quinonas na literatura (84). Mais especificamente em insetos, a juglona, um derivado de quinona, apresentou inibição competitiva tanto com a glutathione S-transferase quanto com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (85), enquanto a emodina exerceu atividade de inibir a alimentação e causou danos no intestino médio após a sua ingestão (86). Além disso, também é descrita a inibição do complexo III mitocondrial por quinonas (87). Entretanto, são necessários estudos adicionais para um melhor entendimento do mecanismo de ação de quinonas em *Ae. aegypti*.

De acordo com as informações de registro da *European Chemicals Agency* (ECHA), a tectoquinona (**4**) não é hidrolisável em água e, portanto, não é esperado que a substância seja prontamente biodegradável. Entretanto, a tectoquinona não se bioacumula na cadeia alimentar e nem é persistente no solo. O risco de exposição para animais que vivem no solo é considerado moderado a baixo. A meia-vida de 37,5 dias (estimada pelo *Estimation Programs Interface*, 2018) indica que essa substância não é persistente em água e o risco de exposição para animais aquáticos é considerado moderado a baixo (88).

Em acréscimo, foi realizado um estudo colaborativo no Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade de Brasília, relacionado à avaliação da toxicidade da tectoquinona (**4**) em organismos não-alvo em modelo peixe-zebra. Foram incluídos: (i) *Fish Embryo Toxicity* (FET), que avalia efeitos embriotóxicos agudos, utilizando-se ovos fertilizados expostos à substância química em estudo e (ii) testes genotóxicos em adultos, que avalia danos no DNA e alterações mutagênicas. Em embriões, foi constatada baixa toxicidade considerando-se os valores das concentrações de tectoquinona às quais os embriões foram expostos e a CL₅₀ em *Ae. aegypti* (1,1 µg/mL). Após 96 h de exposição, foi possível observar a partir da concentração de 4,78 mg/L um aumento na porcentagem de organismos mortos, e a 100 mg/L essa porcentagem atingiu 45%, mostrando que a CL₅₀ da tectoquinona em peixe-zebra está acima da concentração limite estabelecida pelo protocolo OECD nº 236 (*Guideline on Fish Embryo Toxicity Test – FET*) (89). Dessa forma, não foi

possível estabelecer a CL_{50} em peixe-zebra, acrescentando-se o fato de o valor de 100 mg/mL está bem acima do estabelecido para CL_{50} da tectoquinona em *Ae. aegypti* (90).

Em relação aos testes realizados em adultos de peixe-zebra, não houve evidências de neurotoxicidade, uma vez que não foi observada alteração da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), nem evidências de genotoxicidade e mutagenicidade. Além disso, apenas na concentração de 100 mg/L ocorreu alteração da lactato desidrogenase (LDH) e a glutathione S-transferase (GST) teve atividade aumentada, respondendo à exposição à tectoquinona, provavelmente, provocando uma resposta de desintoxicação. Por fim, a conclusão desse estudo colaborativo indica que apesar de serem observadas algumas alterações embriotóxicas e nos biomarcadores, nas concentrações sugeridas para a atividade larvicida em *Ae. aegypti*, a tectoquinona aparenta ser segura para organismo não-alvo (peixe-zebra), sendo uma possível candidata para futuras formulações e testes mais específicos (90).

No que diz respeito ao ensaio pupicida, nenhum dos compostos apresentou atividade nas concentrações testadas [50 μ g/mL ou 25 μ g/mL] após 24 h de exposição, o que pode sugerir um mecanismo de ação específico em larvas ou falta de biodisponibilidade para pupas.

4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA RESIDUAL EM ESCALA LABORATORIAL

A atividade larvicida residual foi determinada substituindo-se as larvas (vivas e mortas) em todos os recipientes a cada 24 h ou 72 h até que fosse observada uma perda significativa da atividade biológica (mortalidade larval < 20%). Tendo como base os resultados previamente obtidos, os ensaios de residualidade foram conduzidos de duas maneiras diferentes: (a) uma investigação da atividade larvicida com monitoramento de 24 h e substituição das larvas (vivas e mortas) a cada 24 h até observação de redução significativa da atividade biológica; (b) uma investigação da atividade larvicida com monitoramento em ciclos de três dias, determinação da porcentagem de mortalidade a cada 24 h e substituição das larvas (vivas e mortas) a

cada 72 h. O teste foi finalizado quando observada mortalidade larval abaixo de 20%. Os testes com o controle positivo (temefós 0,025 µg/mL) e o controle negativo (< 1% DMSO em água da torneira) foram realizados em paralelo.

Apesar de a espécie *C. suberosus* ter sido a fonte inicial de compostos para o presente estudo, as quinonas isoladas a partir da planta apresentaram atividade larvicida menor que as quinonas adquiridas no comércio. Assim, dentre as 8 quinonas mais ativas, foram selecionadas quatro para a realização dos testes de residualidade: tectoquinona (**4**), 2-etilantraquinona (**7**), 1-cloroantraquinona (**8**) e antrona (**9**). Para tanto, foram levadas em consideração tanto a atividade larvicida quanto a quantidade de substância disponível. O controle positivo temefós apresentou CL₅₀ de 0,008 µg/mL. Os resultados dos testes de residualidade podem ser observados na (**Fig. 12**).

Tectoquinona (**4**) e 2-etilantraquinona (**7**) apresentaram maior tempo de efeito residual. De acordo com os resultados observados na curva dose-resposta para cálculo de CL₅₀, a maior mortalidade para tectoquinona (**4**) ocorreu após 24 h de exposição e, para 2-etilantraquinona (**7**), após 72 h de exposição. A tectoquinona (**4**; 3,5 µg/mL) apresentou mortalidade de 95% após 24 h (Dia 1) caindo para 37% após o 9º dia (Dia 9) (**Fig. 12a**). Enquanto, após o primeiro ciclo de 72 h de exposição, a 2-etilantraquinona (**7**; 10 µg/mL) apresentou mortalidade de 98% e, ao final do sexto ciclo (18º dia), foi observada mortalidade de apenas 34% (**Fig. 12b**). A antrona (**9**; 150 µg/mL) apresentou uma redução da mortalidade de 100% para, aproximadamente, 30% após 48 h (Dia 2) (**Fig. 12c**). 1-cloroantraquinona (**8**; 10 µg/mL) apresentou mortalidade de 74% após o 1º ciclo de 72 h e, no segundo ciclo, a mortalidade caiu para 5% (**Fig. 12d**).

Foi a primeira vez que a atividade residual em larvas do 3º estágio de *Ae. aegypti* foi reportada para a tectoquinona (**4**), 2-etilantraquinona (**7**), antrona (**9**) e 1-cloroantraquinona (**8**). Os resultados mais promissores para a atividade residual foram da tectoquinona (**4**) e da 2-etilantraquinona (**7**), uma vez que suas porcentagens de mortalidade permaneceram acima de 80% até o 7º dia do teste e acima de 90% até o final do 5º ciclo de 72 h (15º dia), respectivamente. Ressalta-se que os dados foram obtidos a partir de ativos não formulados. Atualmente, estudos de formulação e toxicidade em organismos não-alvo estão sendo investigados por nosso grupo de pesquisa para prolongar o efeito larvicida residual.

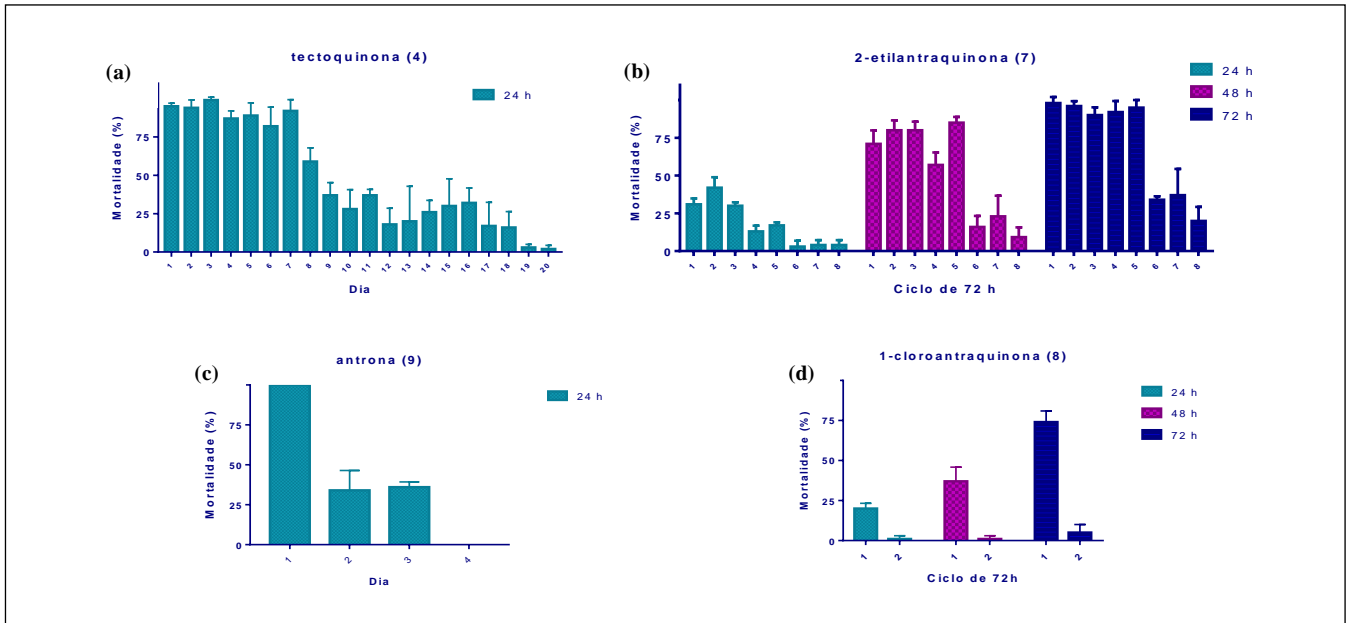


Figura 12. (a) atividade larvicida residual da tectoquinona (4) em escala laboratorial após 20 dias. A mortalidade larval foi verificada a cada 24 h e as larvas (vivas e mortas) foram substituídas a cada 24 h. (b) atividade larvicida residual da 2-etilantraquinona (7) em escala laboratorial após 8 ciclos de 72 h. A mortalidade larval foi verificada a cada 24 h, com substituição das larvas (vivas e mortas) a cada 72 h. (c) atividade larvicida residual da antrona (9) em escala laboratorial após 4 dias. A mortalidade larval foi verificada a cada 24 h e as larvas (vivas e mortas) foram substituídas a cada 24 h. (d) atividade larvicida residual da 1-cloroantraquinona (8) em escala laboratorial após 3 ciclos de 72 h. A mortalidade larval foi verificada a cada 24 h, com substituição das larvas (vivas e mortas) a cada 72 h. As barras de erro representam o erro padrão da média da mortalidade larval.

4.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA EM ESCALA SEMI-CAMPO

A atividade larvicida residual em escala semi-campo foi conduzida em recipientes de plástico com 10 L de água da torneira, com reposição do volume a cada 24 h. Os testes com o controle positivo (temefós 0,013 $\mu\text{g/mL}$) e o controle negativo (< 1% DMSO em água da torneira) foram conduzidos em paralelo. Todas as larvas foram substituídas (vivas e mortas) a cada 24 h até que fosse observada mortalidade larval abaixo de 80%, conforme limite estabelecido no *screening* laboratorial.

Os testes para a avaliação da atividade larvicida residual em escala semi-campo foram realizados com a tectoquinona (4), uma vez que essa apresentou a maior mortalidade em 24 h até o Dia 7 no teste de residualidade em escala laboratorial (Fig. 12a). A tectoquinona apresentou 100% de mortalidade para as três concentrações testadas (2,1 $\mu\text{g/mL}$, 3,5 $\mu\text{g/mL}$ e 4,3 $\mu\text{g/mL}$) até o Dia 5 no teste para

avaliação da atividade residual em escala semi-campo. Foi observada mortalidade larval abaixo de 80% (limite laboratorial) no Dia 6, quando o teste foi finalizado. A concentração referente a CL_{90} (2,1 $\mu\text{g/mL}$) apresentou a maior atividade (72,5%) no Dia 6, enquanto a maior concentração e a concentração intermediária apresentaram mortalidade abaixo de 50% (**Fig. 13**), o que pode ser explicado pela observação de precipitado durante a realização do teste. A menor concentração poderá ser, portanto, considerada para a realização de estudos em escala de campo e para o desenvolvimento de protótipo larvicida. A mortalidade induzida pelo controle positivo temefós reduziu de 99% (Dia 1) para 85% (Dia 6) e para abaixo de 56% (Dia 9).

Em acréscimo, a mortalidade causada pela tectoquinona (**4**) nos testes semi-campo (100%; **Fig. 13**) foi maior que a mortalidade observada nos testes em escala laboratorial (99% a 87%; **Fig. 12a**) durante os 5 primeiros dias. Tal resultado sugere que o volume de água utilizado, o tipo de recipiente e as condições ambientais, podem interferir na atividade larvicida de determinada substância.

Ressalta-se que para esse estudo com a tectoquinona também não foi avaliado nenhum tipo de formulação. Entretanto, existe a possibilidade de se aumentar o número de dias de efeito residual desenvolvendo-se uma formulação que controle a liberação da tectoquinona ao longo do tempo. Em acréscimo, a curta meia-vida pode ser tratada de maneira similar, uma vez que, por meio do controle da liberação da substância a partir de uma formulação é possível atingir uma situação de equilíbrio (*steady state*), ou seja, manter a concentração da substância ativa constante na faixa de atividade biológica por um período prolongado, utilizando-se de uma única dosagem (91).

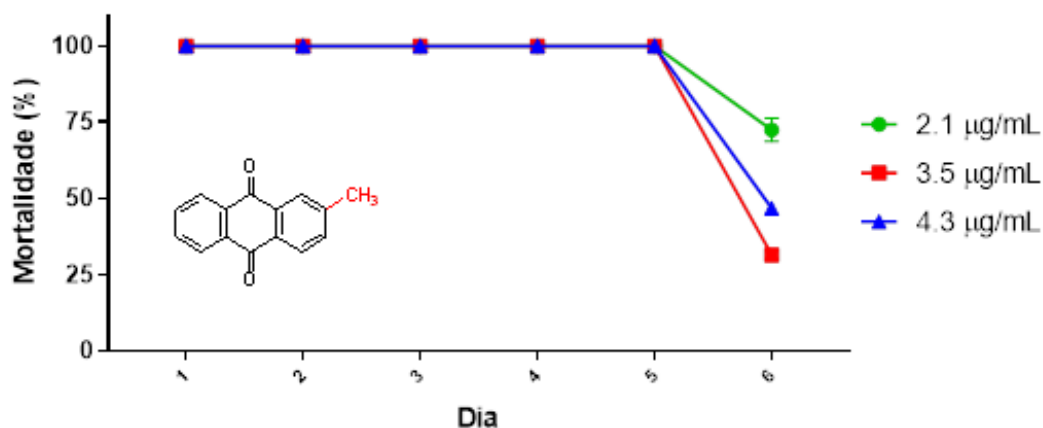


Figura 13. Efeito larvicida residual da tectoquinona (**4**; 2,1 µg/mL, 3,5 µg/mL e 4,3 µg/mL) em escala semi-campo após 6 dias. A mortalidade larval foi determinada a cada 24 h com a troca diária das larvas do 3º estágio. A mortalidade para o controle negativo DMSO foi menor que 5%. A mortalidade para controle positivo temefós diminuiu de 99% (Dia 1) para 85% (Dia 6) e para menos de 56% (Dia 9). As barras de erro representam o erro padrão da média da mortalidade larval.

Os resultados da avaliação do efeito residual são de fundamental importância para as que as autoridades responsáveis gerenciem a logística de controle de vetores. No Brasil, a aquisição de inseticidas para uso em campanhas de saúde pública é responsabilidade do Ministério da Saúde (MS). A diretriz atual especifica a aplicação do larvicida em intervalos de dois meses apenas em residências ou locais públicos em que não haja outra forma de eliminação do criadouro (58). Portanto, os estudos de formulação visam desenvolver um protótipo seguro e eficaz com um efeito residual prolongado.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS – PARTE I

Apesar da grande biodiversidade do Cerrado e do potencial das plantas como fonte de moléculas biologicamente ativas, esse ainda é pouco estudado e continua a sofrer com a ocorrência de desmatamento no território brasileiro. Diante do exposto, o presente estudo contribuiu com o primeiro relato do isolamento de suberonona (**1**),

rapanona (2), embelina (3) e bergenina (32) a partir do extrato acetato de etila da madeira da raiz de *Connarus suberosus* e da atividade larvicida de embelina (3) e rapanona (2) em *Ae. aegypti*.

Em decorrência dos resultados preliminares da atividade larvicida em *Ae. aegypti* obtidos para suberonona (3) e rapanona, foram avaliadas as atividades larvicida e pupicida de 31 derivados de quinonas de fontes natural e comercial em *Ae. aegypti*. Oito compostos apresentaram porcentagem de mortalidade em larvas do 3º estágio de *Ae. aegypti* acima de 80% a 25 µg/mL após 48 h de exposição. Das três quinonas isoladas de *C. suberosus*, a embelina (3) mostrou-se a mais ativa (CL₅₀ 23,5 µg/mL após 24 h), enquanto a tectoquinona (4) foi a mais potente (CL₅₀ 1,1 µg/mL) dentre as 28 quinonas de fontes comerciais.

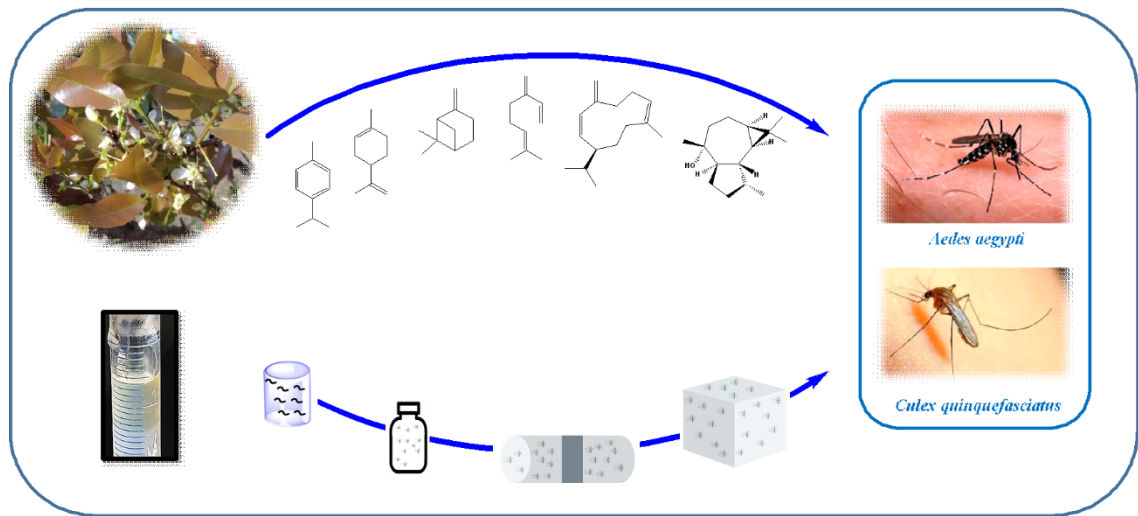
Visando o conhecimento da extensão do efeito residual da atividade larvicida, que determina a frequência necessária de sua aplicação no meio para o controle efetivo de vetores, esse foi o primeiro relato dessa atividade em larvas de *Ae. aegypti* para tectoquinona (4), 2-etilantraquinona (7), 1-cloroantraquinona (8) e antrona (9), sendo que a tectoquinona (4) e a 2-etilantraquinona (7) apresentaram os resultados mais promissores para a atividade larvicida residual. A tectoquinona apresentou 100% de mortalidade até o dia 5.

Conforme resultados obtidos, as propriedades da tectoquinona são indicativas de sua adequação como candidata para o desenvolvimento de um protótipo larvicida: LC₅₀ de 1,1 µg/mL e manutenção da mortalidade larval de 100% durante 5 dias. Em acréscimo, de acordo com as informações disponíveis no banco de dados da *European Chemicals Agency* (ECHA), a tectoquinona não apresentou evidência de bioacumulação na cadeia alimentar ou persistência no solo (88). Adicionalmente, os resultados do estudo colaborativo realizado pelo Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade de Brasília em modelo peixe-zebra indicam que a concentração necessária para causar mortalidade em embriões foi bem maior do que a concentração para causar mortalidade em *Ae. aegypti* e, em adultos, começaram a ser observadas alterações na enzima lactato desidrogenase (LDH) apenas a partir da concentração de 100 µg/mL, ou seja, bem acima do valor da CL₅₀ para larvas de *Ae. aegypti* (1,1 µg/mL). No entanto, a atividade da enzima glutational S-transferase (GST) respondeu de forma positiva, possivelmente desintoxicando o organismo tanto nas brânquias quanto no tronco (90).

PARTE II

**A ATIVIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE
PLANTAS DO CERRADO E COMPOSTOS
VOLÁTEIS NO CONTROLE DOS VETORES
Aedes aegypti E *Culex quinquefasciatus***

1. RESUMO GRÁFICO



2. INTRODUÇÃO

Na **Parte II** deste trabalho de doutorado, contribuiu-se com o estudo de óleos essenciais oriundos de 13 espécies do Cerrado pertencentes a 7 diferentes famílias, no que se refere à avaliação das atividades biológicas em *Ae. aegypti* e em *Cx. quinquefasciatus*. *Connarus suberosus* da família Connaraceae. *Blepharocalyx salicifolius*, *Campomanesia adamantium*, *Eugenia dysenterica*, *Eugenia klotzchiana*, *Myrcia torta* e *Psidium laruotteanum* da família Myrtaceae. *Casearia sylvestris* da família Salicaceae. *Duguetia furfuracea* e *Xylopia aromatica* da família Annonaceae. *Hedyosmum brasiliense* da família Chloranthaceae. *Myrsine guianensis* da família Primulaceae. *Protium ovatum* da família Burseraceae, bem como de compostos de outras fontes. A espécie *C. suberosus* foi descrita, anteriormente, na **Parte I** deste trabalho.

A família Myrtaceae apresenta grande relevância quanto à quantidade de árvores frutíferas, sendo uma das principais famílias de árvores de interesse comercial em todo o mundo. Os gêneros *Eugenia* e *Campomanesia* merecem destaque, dentre os 121 gêneros pertencentes a essa família, por serem constituídos de uma grande

variedade de espécies frutíferas com relevante potencial econômico, grande valor nutricional e fontes de compostos químicos, incluindo fenólicos, carotenóides e voláteis. Há estudos que demonstram que tais compostos estão associados à prevenção e ao tratamento de doenças crônicas e degenerativa, como câncer, doença cardiovascular, diabetes mellitus tipo 2 e obesidade (92).

O gênero *Casearia* Jacq. (Salicaceae) compreende cerca de 180 espécies de ampla distribuição geográfica, incluindo África, Ásia, Austrália, Américas do Norte e Sul e ilhas do Pacífico. Esse gênero é considerado um dos mais importantes da família Salicaceae no Brasil, devido a sua facilidade de adaptação a diferentes condições ambientais e grande variedade de espécies (93). A espécie *C. sylvestris* tem sido estudada devido ao seu uso na medicina tradicional e pelo fato de ser rica em diterpenos com propriedades citotóxica, antitumoral, inseticida e antifúngica (94). A família Annonaceae é composta por cerca de 2300 espécies. Embora haja disponibilidade de poucos estudos químicos com essas plantas tropicais, sabe-se que são ricas em acetogeninas, metabólitos secundários com ampla descrição de atividades biológicas como antineoplásica, antiparasitária, citotóxica, imunossupressora, antiparasitária e pesticida (95).

A família Chloranthaceae consiste em 75 espécies distribuídas em quatro gêneros, incluindo o gênero *Hedyosmum* (96). Espécies dessa família demonstraram ter efeitos antitumorais, anti-inflamatórios, antinociceptivos e antimicrobianos (97). A família Primulaceae consiste em quase 1000 espécies distribuídas em 22 gêneros (98). Foram descritas diversas propriedades farmacológicas para espécies dessa família, incluindo anti-infecciosa, anti-inflamatória e antiparasitária (99). A família Burseraceae compreende aproximadamente 700 espécies em 19 gêneros distribuídos nos trópicos e subtropicais (100). A maioria dessas espécies são árvores e arbustos que apresentam dutos de resina que produzem óleos aromáticos e resinas de goma, muitas vezes responsáveis por suas propriedades medicinais (101).

Apesar de os óleos essenciais serem constituídos de uma complexa mistura de compostos, geralmente, eles são caracterizados por dois ou três compostos presentes em altas concentrações, entre 20 e 70%, quando comparados a outros compostos em quantidades bem menores (102). Assim, o objetivo da Parte II deste trabalho de doutorado foi obter dados de diferentes atividades biológicas que sejam indicativos para o desenvolvimento futuro de um protótipo inseticida, a partir da extração de óleos

essenciais de plantas do Cerrado, visando o controle integrado de vetores, conforme diretrizes e protocolos da OMS.

3. MÉTODO

3.1. ESPÉCIES VEGETAIS E OBTENÇÃO DE ÓLEOS

Na segunda parte deste trabalho, foram coletadas folhas frescas de 13 espécies do bioma Cerrado, pelo botânico Dr. Thiago R. B. Mello (Pós-Doutorando do Laboratório de Farmacognosia/UnB), responsável pela identificação e depósito das exsiccatas para cada espécie no Herbário da Universidade de Brasília (UB). As espécies *Myrcia torta* DC. (UB) 217302 e *Hedyosmum brasiliense* (MaTR.) ex Miq. (UB) 217287 foram coletadas na Reserva Ecológica do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Recor-IBGE). Houve uma segunda coleta da espécie *H. brasiliense* (UB) 217288 na Estação Ecológica do Jardim Botânico de Brasília (EEJBB) com a finalidade de obtenção de maior quantidade de amostra. As espécies *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg. (UB) 217304, *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg. (UB) 217297, *Casearia sylvestris* Sw. (UB) 217295, *Connarus suberosus* Planch (UB) 217291, *Duguetia furfuracea* (A.St.-Hil.) Saff. (UB) 217290, *Eugenia dysenterica* (MaTR.) DC. (UB) 217305, *Eugenia klotzchiana* O.Berg. (UB) 217298, *Myrsine guianensis* (Aubl.) Kuntze (UB) 217293, *Protium ovatum* Engl. (UB) 217303 e *Psidium laruotteanum* Cambess. (UB) 217299 foram coletadas no Campus Universitário Darcy Ribeiro da Universidade de Brasília. A espécie *E. dysenterica* foi coletada mais duas vezes, do mesmo indivíduo, sob o mesmo número de voucher, com a finalidade de obtenção de maior quantidade de amostra. A espécie *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart (UB) 217300 foi coletada na região do Lago Sul-DF. Os dados completos referentes às coletas podem ser observados na **Tabela 3**.

Na obtenção dos óleos essenciais, as folhas frescas de cada espécie foram cortadas com auxílio de tesoura em pequenas partes e transferidas para um balão de fundo redondo com capacidade de 6 L contendo 3 L de água destilada. O balão foi

aconditionado a uma manta elétrica aquecedora, acoplado ao aparelho de Clevenger e o processo de hidrodestilação foi iniciado quando a água atingiu a temperatura de 100 °C. O processo de extração levou de 6 a 24 h a depender do volume constante de cada óleo essencial, observando-se a escala graduada do Clevenger. Os óleos essenciais *in natura* foram armazenados em frascos de vidro hermeticamente fechados, envolvidos por papel alumínio e mantidos em freezer a -20 °C até a sua utilização.

Tabela 3. Dados das espécies coletadas para obtenção dos óleos essenciais. Somente as folhas de cada planta foram utilizadas para tal procedimento.

Família	Espécie	Coleta	Latitude	Longitude	Localização	Exsicata (n°)
Annonaceae	<i>Duguetia furfuracea</i>	21/09/2020	-15,774	-47,868	UnB	(UB) 217290
	<i>Xylopia aromatica</i>	29/01/2020	-15,877	-47,801	Lago Sul	(UB) 217300
Burseraceae	<i>Protium ovatum</i>	11/12/2019	-15,774	-47,865	UnB	(UB) 217303
Chloranthaceae	<i>Hedyosmum brasiliense</i>	10/01/2020	-15,896	-47,845	Recor-IBGE	(UB) 217287
		07/10/2020	-15,947	-47,867	EEJBB	(UB) 217288
Connaraceae	<i>Connarus suberosus</i>	14/09/2020	-15,774	-47,868	UnB	(UB) 217291
	<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	12/12/2019	-15,774	-47,867	UnB	(UB) 217304
	<i>Campomanesia adamantium</i>	26/12/2019	-15,774	-47,868	UnB	(UB) 217297
Myrtaceae	<i>Eugenia dysenterica</i>	16/12/2019	-15,770	-47,867	UnB	(UB) 217305
		06/08/2020				
		08/10/2020				
	<i>Eugenia klotzchiana</i>	10/08/2020	-15,774	-47,866	UnB	(UB) 217298
<i>Myrcia torta</i>	12/03/2020	-15,927	-47,872	Recor-IBGE	(UB) 217302	
<i>Psidium laruotteanum</i>	16/01/2020	-15,774	-47,866	UnB	(UB) 217299	
Primulaceae	<i>Myrsine guianensis</i>	08/09/2020	-15,774	-47,867	UnB	(UB) 217293
Salicaceae	<i>Casearia sylvestris</i>	31/08/2020	-15,774	-47,868	UnB	(UB) 217295

3.2. COMPONENTES QUÍMICOS

O inseticida organoclorado temefós, o padrão repelente *N,N'*-dietil-*m*-toluamida (DEET), os padrões de compostos voláteis β -cariofileno, óxido cariofileno, linalol, α -pineno, (+)- β -pineno, α -terpineol, *p*-cimeno, (*R*)-(+)-limoneno, (*S*)-(-)-limoneno e (-)- β -pineno, bem como a série homóloga de *n*-alcanos C₈-C₂₀ foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich (Brasil, China e Suíça).

3.3. PREPARO DE AMOSTRAS E CROMATOGRAFIA

Inicialmente, uma alíquota de 16 mg de cada amostra de óleo essencial *in natura* foi solubilizada em 4 mL de hexano, grau cromatográfico, em frascos de vidro com 20 mL de capacidade, resultando em concentrações finais de 4 mg/mL. Em seguida, 1 mL de cada amostra foi transferido para frascos apropriados ao cromatógrafo. Posteriormente, 1 μ L de cada amostra foi analisado por cromatografia em fase gasosa acoplado a espectrometria de massas (CG-EM). As análises foram feitas em equipamento da marca Shimadzu – QP2010 equipado com injetor *split/splitless* e amostrador automático AOC – 20Si. A temperatura no injetor foi mantida a 240 °C, operando com razão de *split* 2:1. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 1,0 mL/min. A temperatura na fonte de íon foi mantida a 280 °C com tempo de corte de solvente de 3 min. Todos os espectros de massas foram obtidos no modo de varredura a 70 eV (40-500 m/z). Uma coluna capilar de sílica fundida Restek Rtx MS-5 medindo 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m foi utilizada neste estudo. A temperatura do forno foi programada linearmente de 45 a 240 °C elevando-se 5 °C/min, com tempo total de análise cromatográfica de 39 min.

Na obtenção dos índices de Kovats calculados, os hidrocarbonetos (*n*-alcanos) utilizados neste experimento foram: *n*-octano C₈, *n*-nonano C₉, *n*-decano C₁₀, *n*-undecano C₁₁, *n*-tridecano C₁₃, *n*-tetradecano C₁₄, *n*-pentadecano C₁₅, *n*-hexadecano C₁₆, *n*-heptadecano C₁₇, *n*-octadecano C₁₈, *n*-nonadecano C₁₉, e *n*-eicosano C₂₀. Esses padrões foram solubilizados em hexano grau cromatográfico na concentração de 5 mg/mL. Em seguida, injetou-se 1 μ L dessa solução de padrões seguindo-se a mesma metodologia cromatográfica, sendo as amostras de óleos essenciais e hidrocarbonetos preparadas e analisadas no mesmo dia. Logo após, foi efetuado o

estudo comparativo entre os perfis cromatográficos dos óleos em relação à série homóloga de hidrocarbonetos. Desse modo, utilizando-se a equação descrita por Clement (1990) faz-se a relação entre os tempos de retenção e número de carbonos dos *n*-alcanos comparativamente aos componentes detectados nas amostras de óleos, calculando-se os respectivos índices de Kovats.

$$IK = \left\{ \frac{[(tr_x - tr_{cn-1}) \times (C_n - C_{n-1}) \cdot 100]}{(tr_{cn} - tr_{cn-1})} \right\} + 100 \cdot C_{n-1}; \text{ (CLEMENT, 1990)}$$

Em que:

tr_x : tempo de retenção do analito;

tr_{cn} : tempo de retenção do *n*-alcano posterior ao analito;

tr_{cn-1} : tempo de retenção do *n*-alcano anterior ao analito;

C_n : número de carbono do *n*-alcano posterior;

C_{n-1} : número de carbono do *n*-alcano anterior.

Para identificação dos compostos nas amostras de óleos essenciais, foram levados em consideração quatro critérios: (1) índices de similaridades entre os espectros acima de 90%; (2) perfis de fragmentação em comparação com a biblioteca do sistema de dados Wiley 7.0; (3) fórmulas moleculares e peso; (4) a comparação entre o índice de Kovats calculado para cada volátil em relação àqueles listados na literatura (103). O percentual relativo de cada pico identificado foi obtido pela razão entre áreas a partir do cromatograma de íons totais - *TIC*.

3.4. MANUTENÇÃO DOS MOSQUITOS *Ae. aegypti* E *Cx. quinquefasciatus*

Para realização dos ensaios biológicos, foram coletas larvas de *Ae. aegypti* do 3º estágio, da linhagem Rockefeller, com idade de 72-96 h e fêmeas adultas da colônia de mosquitos mantida no Insetário do Laboratório de Farmacognosia da Universidade

de Brasília sem exposição prévia a nenhum inseticida. Os mosquitos foram mantidos a temperatura de 28 ± 2 °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12:12 h. A eclosão dos ovos ocorreu em água de torneira. Foi utilizada ração para peixes como fonte de nutrientes durante o estágio aquático de desenvolvimento e os insetos adultos foram alimentados por meio de papel de filtro (Whatman, Canterbury, UK) embebido com solução de açúcar 10%, trocado duas vezes por semana. As fêmeas que não foram separadas para os estudos adúlticida e de repelência também foram alimentadas com sangue equino, conforme previamente descrito no item 3.5.1 da Parte I deste trabalho.

As fêmeas adultas de *Cx. quinquefasciatus* foram obtidas de uma colônia proveniente de mosquitos adultos coletados em Merced, Califórnia (CA, Estados Unidos), na década de 1950 (40) e mantida no *Kearney Agricultural Research Center, University of California*, Parlier, CA. Especificamente para este trabalho, foram utilizadas fêmeas da colônia da *University of California, Davis* (UC Davis) iniciada há cerca de 8 anos com mosquitos da colônia Kearney. Em Davis, os mosquitos foram mantidos à temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa de $75 \pm 5\%$, em um fotoperíodo de 12:12 h.

3.5. ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.5.1. Avaliação da atividade larvicida

Os testes larvicidas foram conduzidos de acordo com os critérios estabelecidos pelo guia da OMS (69), com modificações, previamente detalhados no item 3.4.1 da **Parte I** e por Silva RL *et al.*, 2020 (104). Resumidamente, 25 larvas do 3º estágio de *Ae. aegypti* foram adicionadas a copos com 120 mL de água da torneira. As amostras em estudo, previamente solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO), foram adicionadas separadamente a esses copos e testadas na concentração final de 250 µg/mL para óleos essenciais e a 25 µg/mL para compostos voláteis. Um total de 300 larvas por amostra foram expostas em quatro replicatas com 25 larvas por copo e cada teste foi repetido, de maneira independente, por três vezes. Após 24, 48 e 72 h de exposição às amostras, o número de larvas mortas foi contado e a porcentagem de mortalidade

calculada. Foram consideradas mortas as larvas que não apresentaram movimento mesmo após uma leve agitação dos copos. Temefós com concentrações finais entre 0,0016 e 0,0250 µg/mL foi utilizado como controle positivo e DMSO < 1,0%, como controle negativo. Destaca-se que o temefós tem registro no Brasil e é ativo em larvas da linhagem Rockefeller, que é a linhagem utilizada nos testes realizados no Laboratório de Farmacognosia/UnB. O temefós não é mais um dos inseticidas de escolha das campanhas de saúde pública no Brasil devido à identificação de seleção de espécies resistentes nas linhagens de campo (105).

Os valores de CL₅₀ foram determinados para os óleos essenciais e compostos que apresentaram mortalidade larval maior ou igual a 80% nas leituras de 24, 48 ou 72 h. Para a determinação de CL₅₀ foram utilizadas quatro concentrações diferentes de cada óleo essencial e de cada composto solubilizados em DMSO, dentro do seu intervalo e atividade larvicida. Um total de 1200 larvas foram expostas em 4 replicatas de 25 larvas por copo, em cada concentração. O teste foi repetido três vezes para cada amostra, utilizando-se larvas de três lotes diferentes em cada dia. A mortalidade larval foi avaliada após 24, 48 ou 72 h. Para cada bioensaio, a temperatura foi mantida a 28 ± 2 °C, em umidade relativa de 70 ± 10% e fotoperíodo de 12:12 h.

3.5.2. Teste de toxicidade em fêmeas adultas de *Ae. aegypti*

O teste de toxicidade em *Ae. aegypti* foi realizado tendo como base as diretrizes preconizadas pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (106). Para preparação do teste, garrafas Scott de 250 mL foram uniformemente impregnadas com 1 mL de solução de cada óleo essencial, em acetona, na concentração final de 500 µg/garrafa. As garrafas utilizadas como controle negativo foram internamente impregnadas com 1 mL de acetona e as utilizadas como controle positivo, impregnadas com 1 mL de solução de malathion, em acetona, na concentração final de 50 µg/garrafa. As garrafas foram mantidas na posição horizontal *overnight*, ao abrigo da luz, de forma a permitir a evaporação da acetona.

Quando certificado de que a acetona havia evaporado completamente, aproximadamente 12 fêmeas foram gentilmente transferidas para cada garrafa. O

ensaio foi realizado com as garrafas na posição vertical. Cada garrafa foi examinada no tempo zero para verificação do número de mosquitos nocauteados. Esse procedimento foi repetido a cada 15 min até 2 h teste, depois após 3 e 4 h, quando o teste foi finalizado. Cada ensaio foi repetido três vezes.

3.5.3. Teste de repelência espacial em *Ae. aegypti*

O teste de repelência espacial foi previamente descrito por Grieco JP *et al.*, 2007 (39). Esse teste foi conduzido em um equipamento com três câmaras conectadas. Em uma das extremidades do equipamento está a câmara onde foi inserida a rede com o tratamento e, na outra extremidade, a câmara com a rede controle. As câmaras de tratamento e de controle são conectadas uma à outra por meio de um cilindro transparente que possui válvulas do tipo borboleta em cada um dos lados permitindo a conexão com cada uma das câmaras. Vinte (20 ± 2) fêmeas, com 4-7 dias de vida, com privação de açúcar por 24 h, foram transferidas para o cilindro transparente e o centro do aparato foi coberto por um tecido escuro com a finalidade de ambientar os mosquitos dentro do equipamento e certificar que apenas o estímulo da amostra, se houver, será responsável pela movimentação dos mosquitos de um lado para outro. Após 30 segundos de descanso, as válvulas do tipo borboleta foram abertas (**Fig. 14**). Passados 10 min., as válvulas foram fechadas e o número total de mosquitos em cada câmara foi contado, bem como o número de mosquitos nocauteados. O aparato foi desmontado entre as repetições para permitir que a amostra volatilizada fosse ventilada para fora da câmara. Foram realizadas nove replicatas para cada amostra. Os testes foram conduzidos nos períodos de luz do dia, das 8 às 18 h.

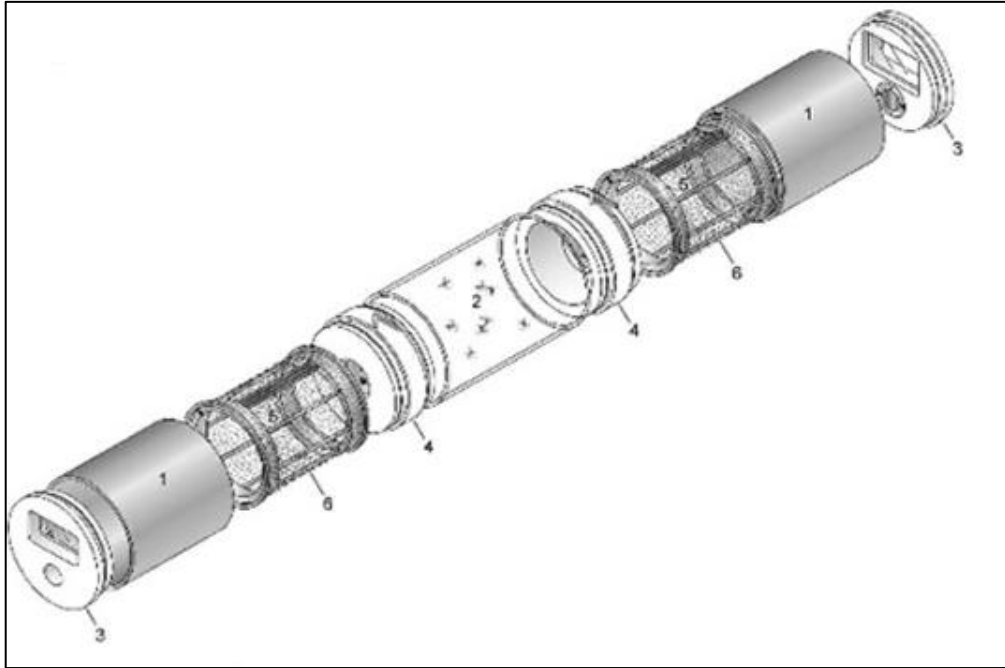


Figura 14. Aparato de repelência espacial composto pelas seguintes partes: (1) cilindro externos de metal; (2) cilindro transparente; (3) tampa lateral; (4) conectores com válvulas borboleta; (5) cilindro interno de metal e (6) rede de tratamento.

Neste teste, foi aplicada uma solução da amostra de óleo essencial a 1% em acetona, totalizando um volume de 1,5 mL, em uma rede de poliéster de 275 cm². Redes individuais foram saturadas com a solução de tratamento e o excesso de solvente foi completamente evaporado em temperatura ambiente durante 20 min. antes do teste. O mesmo procedimento foi aplicado para a acetona em redes de controle. Na quinta repetição, uma nova rede de tratamento foi colocada na câmara com a finalidade de garantir a concentração do óleo essencial em todas as repetições. Linalol a 10% foi utilizado como controle positivo (107).

3.5.4. Teste de repelência em *Cx. quinquefasciatus* - surface landing and feeding assay

O método utilizado no *surface landing and feeding assay* foi desenvolvido pelo pesquisador Walter Leal (Universidade da California, Davis, Estados Unidos) e está descrito na literatura (108). O ensaio foi conduzido em uma gaiola para mosquitos sustentada por uma placa de madeira (30 x 30 x 2,5 cm). Nessa estrutura, foram

mantidos dois tubos de Dudley pintados internamente de preto, separados transversalmente um do outro por 17 cm no meio da placa de madeira (**Fig. 15**). Um lado da gaiola foi fechado para manter os mosquitos, enquanto o outro foi coberto por uma cartolina vermelha, que se abre para permitir a inserção dos tubos de Dudley. Agulhas de seringas foram colocadas a 8 mm dos tubos de Dudley e inseridas 4 cm de profundidade na gaiola de mosquitos. Essas seringas fornecem CO₂, a 50 mL / min., para a gaiola e mantêm rolos de algodão posicionados acima dos tubos de Dudley. Com a finalidade de aquecimento dos tubos, foi circulada água a 38 °C e, quando os mosquitos foram colocados na gaiola, os rolos de algodão foram embebidos em sangue (**Fig. 15**).

Pedaços de papel de filtro foram impregnados com 200 µL apenas de solvente (controle) ou 200 µL de uma solução teste (por exemplo DEET ou a amostra a 1% no solvente controle). O solvente foi evaporado por dois min. antes da inserção do papel de filtro na gaiola. Os papéis de filtro foram mantidos em torno dos tubos (**Fig. 16**).

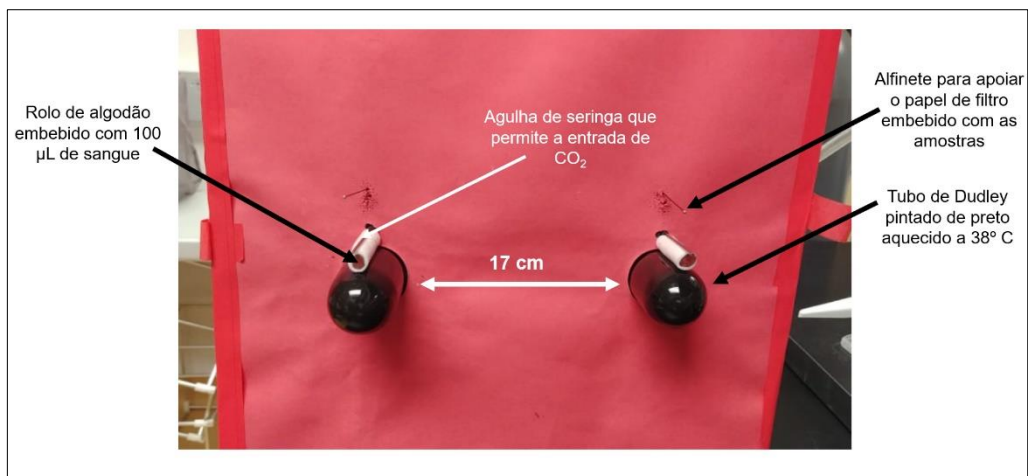


Figura 15. Aparato para realização do *surface landing and feeding assay*. Em destaque tubos de Dudley, alfinetes, agulhas e rolos de algodão embebidos com sangue.

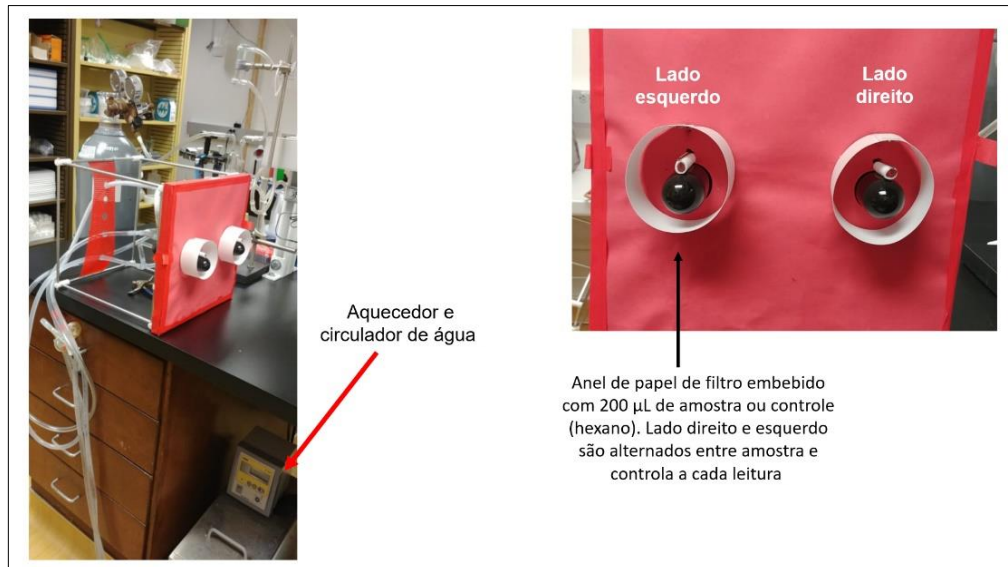


Figura 16. Aparato para realização do surface landing and feeding assay. Em detalhe, anéis de papel de filtro e aquecedor de água.

Mosquitos fêmeas, com 6 a 8 dias de idade sem alimentação com sangue, alimentados apenas com açúcar e água, foram separados em gaiola específica, pelo menos, 30 min antes do início do teste. Os ensaios foram gravados com uma câmera de vídeo equipada com o sistema infravermelho (**Fig. 17**). Após 5 min, o número de fêmeas que pousou em cada lado foi contado. Os mosquitos foram gentilmente removidos dos tubos e dos rolos de algodão, com o auxílio de lenços de papel, e o teste foi reiniciado com a alternância de lado esquerdo e lado direito entre controle e tratamento. Neste estudo, a repelência para cada conjunto de teste, referente a cada amostra testada, foi medida com o papel de filtro impregnado com a mesma amostra pelo menos 10 vezes à esquerda e 10 vezes à direita da arena.



Figura 17. Aparato para realização do *surface landing and feeding assay*. Em detalhe, câmera de vídeo equipada com sistema infravermelho.

3.6. Análise de dados

Os dados de mortalidade larval média foram submetidos à análise pelo software GraphPad Prism 8 para determinação dos valores de CL₅₀ e CL₉₀. As análises levaram em consideração os limites de confiança de 95% inferior e superior (intervalo de confiança). Os testes larvicidas foram realizados em quadruplicata, em três testes independentes (n = 300 por concentração). De acordo com o guia da OMS (69), os resultados dos testes que apresentaram mortalidade no controle acima de 5% foram corrigidos pela fórmula de Abbott e os que apresentaram mortalidade no controle acima de 20% foram descartados.

O tempo médio para nocaute dos mosquitos no teste de toxicidade e o tempo de proteção médio para o *surface landing and feeding assay* foram calculados utilizando-se o software GraphPad Prism 8. Os dados do ensaio de repelência espacial foram analisados por um teste não paramétrico de sinais de Wilcoxon (PROC UNIVARIATE, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA 2012-2018) para determinar se o índice de atividade espacial (SAI) médio para cada tratamento foi significativamente diferente de zero. O SAI, baseado no índice de oviposição (109), foi utilizado para avaliar as respostas das fêmeas do mosquito no ensaio de repelência espacial. O SAI foi calculado para cada amostra como:

$$SAI = (Nc - Nt)/(Nc + Nt)$$

em que Nc é o número de fêmeas na câmara do controle e Nt é o número de fêmeas na câmara do tratamento do aparato de repelência espacial.

O valor de SAI varia de -1 a +1, sendo que o valor igual a 0 indica que não houve resposta dos mosquitos. Um valor de SAI negativo indica que uma proporção maior de mosquitos se moveu em direção da câmara de tratamento, indicando uma resposta atrativa. Enquanto um valor SAI positivo indica que a maior proporção de mosquitos migrou para a câmara do controle, indicando uma ação repelente.

Também foi calculado para o teste de repelência espacial o índice de atividade espacial ponderada (wSAI), obtido por meio da multiplicação da porcentagem de mosquitos que responderam ao estímulo da amostra (PERESP) pelo valor de SAI. O percentual de resposta (P) foi obtido conforme a seguinte equação:

$$PERESP = [(Nc + Nt)/N] \times 100$$

em que Nc é o número de fêmeas na câmara do controle, Nt é o número de fêmeas na câmara do tratamento e N é o número total de fêmeas no aparato de repelência espacial. O wSAI representa a magnitude da atividade atrativa ou repelente, enquanto o SAI indica a existência ou não de movimento direcional.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Para coleta das folhas, com a finalidade de obtenção de óleos essenciais, priorizou-se plantas do Cerrado, cuja atividade em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* de seus respectivos óleos essenciais ainda não havia sido descrita na literatura. Outra característica levada em consideração foi o fato de suas folhas apresentarem odor persistente quando fragmentadas no momento da coleta. As folhas da espécie *Connarus suberosus* não apresentaram odor persistente. Ainda assim, foram feitas

tentativas de obter o seu respectivo óleo essencial com a finalidade de se dar continuidade ao estudo fitoquímico dessa espécie. No entanto, observou-se que tal amostra não apresentou fragrância marcante, sendo inativa para as formas imaturas e adulta de *Ae. aegypti*. Portanto, os esforços foram concentrados na busca de óleos essenciais extraídos de outras espécies do Cerrado. Optou-se pela coleta de um número maior de plantas da família Myrtaceae, ao todo cinco, considerando-se os dados da literatura que indicam atividade repelente e larvicida para alguns de seus gêneros como *Eucalyptus* L'Hér. (36,110,111) e *Eugenia* L. (112,113).

Os óleos essenciais das folhas das espécies listadas na **Tabela 4** apresentaram-se incolores ou amarelados, possuindo um aroma forte e duradouro. Na literatura, esses óleos já foram testados como antimicrobianos, antiparasitários, broncoespasmóticos e antifúngicos, por exemplo (114–117). No entanto, a investigação das atividades biológicas em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* é considerada inovadora.

Na avaliação geral dos procedimentos adotados, o processo de extração por hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger é o método oficial da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) para obtenção de óleos voláteis em escala laboratorial (118). A massa obtida para os óleos variou de 0,6 a 3,6 g com rendimento entre 0,1 e 1,3%. Os dados completos podem ser observados na **Tabela 4**. Entende-se que, no que diz respeito aos óleos essenciais com algum tipo de atividade biológica de interesse para a indústria, quanto maior for seu rendimento, maior são as possibilidades comerciais. No contexto de espécies nativas, que ainda não foram submetidas aos estudos de cultivo, levando-se em consideração os dados históricos do Laboratório de Farmacognosia/UnB na obtenção de óleos essenciais, pode-se sugerir uma estratificação do rendimento, considerando-se como baixo rendimento valores menores que 0,49%, médio rendimento entre 0,5 e 0,99% e alto rendimento acima de 1,0%.

Tabela 4. Espécies de plantas do Cerrado investigadas e rendimento de seus respectivos óleos essenciais, obtidos no Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília.

Código Arbo	Espécie	Data Coleta	Massa Folhas (g)	Massa Óleo (g)	Rendimento (%)
Arbo0845	<i>Campomanesia adamantium</i>	26/12/2019	754	1,6	0,2
Arbo0846A	<i>Eugenia dysenterica</i>	16/12/2019	1100	1,0	0,1
Arbo0846B		06/08/2020	260	0,5	0,2
Arbo0846C		08/10/2020	214	2,6	1,2
Arbo0847	<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	12/12/2019	663	1,3	0,2
Arbo0848	<i>Protium ovatum</i>	11/12/2019	1032	1,7	0,2
Arbo0849A	<i>Hedyosmum brasiliense</i>	10/01/2020	983	1,0	0,1
Arbo0849B		07/10/2020	361	0,6	0,2
Arbo0850	<i>Psidium laruotteanum</i>	16/01/2020	641	1,2	0,2
Arbo0851	<i>Xylopia aromatica</i>	29/01/2020	1150	1,7	0,2
Arbo0852	<i>Myrcia torta</i>	12/03/2020	396	3,6	0,9
Arbo0854	<i>Casearia sylvestris</i>	31/08/2020	191	2,5	1,3
Arbo0856	<i>Myrsine guianensis</i>	08/09/2020	422	3,2	0,8
Arbo0859	<i>Duguetia furfuracea</i>	21/09/2020	237	2,1	0,9
Arbo0861	<i>Eugenia klotzchiana</i>	10/08/2020	263	1,3	0,5

Das espécies estudadas, nove amostras listadas na **Tabela 4** apresentaram rendimentos variando entre 0,1 e 0,2%. As amostras Arbo0852 Arbo0856, Arbo0859, Arbo0861 mostraram rendimentos variando entre 0,5 e 0,9% e para duas amostras, Arbo0846C e Arbo0854 tais valores foram de 1,2 e 1,3%, respectivamente. Observe-se que as três amostras coletadas do mesmo exemplar e localidade de *Eugenia dysenterica* apresentaram rendimentos variados de 0,1; 0,2 e 1,2% (**Tabela 4**). Muito provavelmente essas diferenças podem estar correlacionadas à época distinta de coletas, além de algum tipo de estresse natural ocorrido na planta como, por exemplo, ataque de algum predador, deficiência hídrica ou acúmulos de raios solares. O dado

inicial de baixo rendimento para nove amostras em estudo não desqualifica tais amostras para o estudo aqui proposto uma vez que as características aromáticas, biológicas e químicas foram mantidas e/ou determinadas, existindo a perspectiva de melhorar tal rendimento caso exista o interesse na proposição de cultivo. Adicionalmente, as outras seis amostras (**Tabela 4**) mostraram rendimento de médio para alto, o que também as qualifica para tais investigações.

Em relação ao procedimento analítico, a técnica por CG-EM é considerada a modalidade cromatográfica de primeira escolha na determinação de compostos voláteis em óleos essenciais devido às suas vantagens nas separações de amostras complexas e na efetividade dos parâmetros de resolução e detecção (119). Os critérios utilizados para as caracterizações estavam em conformidade com as boas práticas laboratoriais e permitiram a identificação de 6 a 40 compostos voláteis, de acordo com cada espécie. Para melhor visualização, na **Tabela 5**, foram listados os principais compostos voláteis de cada amostra, considerando-se aqueles que apresentaram pelo menos 4% na quantificação relativa. Nos **Quadros 01, 02, 03 e 04** podem ser observadas as estruturas químicas dos compostos voláteis majoritários de cada espécie.

Avaliando-se os perfis cromatográficos apresentados no **Anexo II**, observam-se a efetiva separação e a alta resolução para todos os *n*-alcanos utilizados na determinação dos índices de Kovats. Quanto aos perfis dos óleos essenciais, observou-se a resolução adequada para a maioria dos compostos identificados, com a determinação de compostos minoritários e majoritários, a partir de perfis cromatográficos relativamente complexos contendo as classes de monoterpenos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados. Esses procedimentos analíticos, bem como essas características cromatográficas, foram reproduzíveis e confiáveis para todas as amostras estudadas, conforme os dados brutos na íntegra demonstrados no **Anexo II**.

4.1.1 Óleo essencial de *C. adamantium* (Arbo0845)

Anexo II:

Figura AII-1: Perfis cromatográficos;

Tabela AII-1: Dados de caracterizações;

Figura AII-2: Estruturas químicas identificadas.

No óleo essencial da espécie *C. adamantium*, popularmente conhecida como gabirola, foram identificados 19 compostos voláteis. Os principais monoterpenos foram α -pineno (7,7%), β -pineno (9,7%) e limoneno (21%). Os voláteis linalol, α -terpineol, β -cariofileno, biciclogermacreno, espatulenol, globulol e 1*H*-cicloprop(*E*)azulenol-4 resultaram em teores variando entre 3,72 e 8,4%. O conteúdo de monoterpenos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados foram determinados com valores de 39, 12, 13 e 19%, respectivamente. Na análise dos teores totais, estes 19 compostos representaram 83,61% dos voláteis identificados. Este óleo essencial foi reportado na literatura como antioxidante e antimicrobiano (120).

4.1.2 Amostras Arbo0846A, Arbo0846B e Arbo0846C, óleo essencial de *E. dysenterica*

Anexo II:

Figuras AII-3, AII-5 e AII-7: Perfis cromatográficos;

Tabelas AII-2, AII-3 e AII-4: Dados de caracterizações;

Figuras AII-4, AII-6 e AII-8: Estruturas químicas identificadas.

As amostras Arbo0846A, Arbo0846B e Arbo0846C de *E. dysenterica*, conhecida como cagaita, foram coletadas do mesmo indivíduo na mesma localidade em épocas distintas, mais precisamente em 16/12/2019, 06/08/2020 e 08/10/2020, respectivamente. As novas coletas foram realizadas no sentido de obter maior quantidade do óleo essencial para o prosseguimento adequado dos trabalhos. Conforme já discutido anteriormente, notou-se variações de rendimento relativamente significativas para estas três amostras. Tais variações para Arbo0846A e Arbo0846B foram aproximadas de 0,1 e 0,2%. No entanto, para a amostra Arbo0846C, o valor de rendimento foi de 1,2%, bem superior às demais. A composição química dessas amostras também variou. Na Arbo0846A foram identificados 15 picos representando 70% da amostra em que β -mirceno, β -cariofileno, α -humuleno, gurjuneno, α -panasiseno, óxido de cariofileno e humuladienona apresentaram teores variando entre 5 e 12%. Dez compostos foram identificados na amostra Arbo0846B, em um total de 75%, destacando-se β -mirceno e *cis*-ocimeno com 17 e 21%, seguidos por β -cariofileno, α -humuleno e gurjuneno, oscilando entre 7 e 12%, com a humuladienona detectada de forma minoritária com 1,25%. Já para a amostra Arbo084C, foram identificados seis componentes, correspondendo a 96% do total da amostra, em que

somente o *cis*-ocimeno demonstrou-se como amplo majoritário equivalendo-se ao teor de 67%. O β -mirceno, *trans*-ocimeno, *neo*-alocimeno, α -terpinoleno e gurjuneno mostraram teores de 8, 13, 4, 1 e 2%, respectivamente.

O β -mirceno foi detectado nessas três amostras Arbo0846A (7%), Arbo0846B (17%) e Arbo0846C (8%). O β -cariofileno, α -humuleno e gurjuneno foram identificados com teores similares nas amostras Arbo0846A e Arbo0846B. A humuladienona também foi determinada nessas duas amostras, porém com teores distintos de 7,25 e 1,25%, respectivamente. O α -panasiseno e o óxido de cariofileno foram detectados somente na Arbo0846A. As composições químicas de Arbo0846A e Arbo0846B estão mais parecidas quando comparadas com a amostra Arbo0846C, na qual não foram observados o β -cariofileno, α -humuleno gurjuneno e humuladienona. No entanto, na Arbo0846C, o *cis*-ocimeno representou 67% de seu teor, o qual também foi detectado na Arbo0846B com 21%. Ao conferir o sistema analítico, bem como o preparo dessas amostras, nenhum desvio foi observado que pudesse justificar essas variações químicas e de rendimento. O intervalo de coleta de Arbo0846A para Arbo0846B foi de 8 meses, enquanto o período entre a coleta de Arbo0846B para Arbo0846C foi de 2 meses. Conforme o breve relato na justificativa para os diferentes valores de rendimento, sabe-se que o metabolismo vegetal pode ser influenciado por diferentes fatores como herbivoria, umidade, dias chuvosos, presença de nutrientes, polinização, dentre outros. A soma desses fatores influenciadores, bem como a proximidade de coleta entre Arbo0846B e Arbo0846C, certamente justificam com melhores confiabilidades as diferenças químicas e de rendimento observadas nessas amostras. Adicionalmente, o óleo de *E. dysenterica* já foi estudado quanto ao seu poder antifúngico demonstrando também atividade antioxidante (114,121).

4.1.3 Óleos essenciais de *B. salicifolius* (Arbo0847) e *P. ovatum* (Arbo0848)

Anexo II:

Figuras All-9 e All-11: Perfis cromatográficos;

Tabelas All-5 e All-6: Dados de caracterizações;

Figuras All-10 e All-12: Estruturas químicas identificadas.

No óleo essencial de *B. salicifolius*, popularmente conhecido como maria preta, foram identificados 25 compostos. Os voláteis γ -terpineno, β -cariofileno e aromadendreno demonstraram teores promissores variando entre 10 e 17%. Os

componentes α -pineno, *p*-cimeno, α -terpinoleno, ledeno e globulol foram detectados com 9; 6,5; 5,25; 5 e 5,2%, respectivamente. Desses 25 compostos, 12 foram considerados minoritários com teores abaixo de 1%, o que é um bom indicativo de que o método analítico e preparo de amostras foram eficientes pois foram capazes de abranger voláteis minoritários e majoritários em amostras relativamente complexas. O total de compostos determinados representou 83% da amostra, em que os conteúdos de monoterpenos com 43% e sesquiterpenos com 29% foram relevantes. Esse óleo essencial já foi estudado quanto aos seus aspectos de citotoxicidade (122), bem como já foi considerado como antimicrobiano e antiespasmódico (123).

O óleo de *P. ovatum*, também conhecido como almécega, apresenta atividade antiparasitária (116). Ao perfil cromatográfico dessa amostra, foi possível definir claramente duas regiões, sendo a primeira entre 5 e 10 min., apresentando três monoterpenos visualmente diferenciados e a segunda entre 20 e 25 min. destacando-se a presença de cinco sesquiterpenos relevantes. Os monoterpenos α -pineno (3,22%), sabineno (3,85%) e limoneno (16,99%) foram aqueles detectados na primeira região de análise. Os sesquiterpenos β -cariofileno, γ -elemeno, germacreno-*D*, biciclogermacreno e germacreno-*B*, que apresentaram os respectivos teores de 14; 10; 15,7 e 8%, foram os voláteis da segunda região cromatográfica. A determinação de monoterpenos (26%), monoterpenos oxigenados (0,7%), sesquiterpenos (62%) e sesquiterpenos oxigenados (7%) contribuiu para 95% de compostos identificados no total.

4.1.4 Amostras Arbo0849A e Arbo0849B, óleo essencial de *H. brasiliense*

Anexo II:

Figuras AII-13 e AII-15: Perfis cromatográficos;

Tabelas AII-7 e AII-8: Dados de caracterizações;

Figuras AII-14 e AII-16: Estruturas químicas identificadas.

Visando obter alíquotas suficientes de óleo essencial de *H. brasiliense*, conhecido popularmente como chá de soldado, essa planta foi coletada duas vezes. A primeira coleta Arbo0849A foi realizada em janeiro de 2020 na Reserva Ecológica – IBGE e a segunda coleta Arbo0849B em outubro de 2020 na Estação Ecológica – EEJBB. Tratando-se, portanto, de dois exemplares em localidades distintas coletados

em duas épocas do ano. O rendimento dessas amostras foi considerado baixo, de 0,1% para Arbo0849A, apresentando a detecção de 40 picos, e de 0,2% para Arbo0849B, detectando-se 26 picos. Embora exista essa diferença no número de detectáveis, essas duas amostras foram relativamente parecidas. Os componentes α -tujeno, α -pineno, canfeno, β -mirceno, α -felandreno, *p*-cimeno, limoneno, *trans*-ocimeno, γ -terpineno, linalol, β -citronelol, bicicloelemeno, acetato de α -terpineol e metil-eugenol estão presentes nas duas amostras, com teores variando entre 0,18 e 5,47%. Os voláteis sabineno, *trans*-ocimeno, 4-terpineol e carotol também foram identificados nas duas amostras, porém com variações consideráveis em seus teores com 2,6; 1,1; 0,8 e 41% na Arbo0849A e 17; 8,75; 10,2 e 17,7 na Arbo0849B, respectivamente. Certamente, essas oscilações em teores estão relacionadas às coletas e localidades distintas. Os sesquiterpenos biciclogermacreno, β -bisaboleno, δ -cadineno, elemol, germacreno-*B*, globulol e β -eudesmol com teores entre 0,27 e 3,71% foram alguns exemplos detectados somente na amostra Arbo0849A. Na identificação total de voláteis, 40 picos em Arbo0849A e 26 picos em Arbo0849B representaram 90 e 88% de cada amostra estudada. Um estudo conduzido por Kirchner *et al.*, (124) divulgou que o óleo essencial de *H. brasiliense* foi ativo contra bactérias Gram-positivas e fungos.

4.1.5 Óleos essenciais de *P. laruotteanum* (Arbo0850) e *X. aromatica* (Arbo0851)

Anexo II:

Figuras All-17 e All-19: Perfis cromatográficos;

Tabelas All-9 e All-10: Dados de caracterizações;

Figuras All-18 e All-20: Estruturas químicas identificadas.

Durante os procedimentos e processamentos analíticos, foram identificados 35 compostos no óleo essencial de *P. laruotteanum*, conhecido como araçá cascudo, distribuídos em 37% de monoterpenos, 24% de monoterpenos oxigenados, 21% de sesquiterpenos e 5% de sesquiterpenos oxigenados, representando 87% no total de voláteis identificados. Na análise do perfil cromatográfico, foi possível destacar pelo menos 10 compostos, quais sejam, α -pineno, α -felandreno, limoneno, 1,8-cineol, *trans*-ocimeno, α -terpinoleno, linalol, *p*-ment-1-en-8-ol, α -copaeno e δ -cadineno com, no mínimo, 3% e, no máximo, 9,6% em seus teores. Em estudo envolvendo 12

espécies nativas de Myrtaceae do Cerrado, *P. laruotteanum* apresentou alto potencial antioxidante (125).

Embora no óleo de *X. aromatica*, conhecida popularmente como pimenta de macaco, tenha sido identificado 29 voláteis, somente três monoterpenos α -pineno (10,5%), β -pineno (15,7%), limoneno (26,3%) e um sesquiterpeno oxigenado, o espatulenol, com teor de 9,12% se destacaram como majoritários. Os compostos β -mirceno, biciclogermacreno, globulol e guaiol foram detectados com valores entre 2 e 3,6%. Os outros 21 componentes dessa amostra foram minoritários com percentuais abaixo de 1%. O total de compostos identificados correspondeu a 83% deste óleo, em que a literatura relata a redução da oviposição de *Bemisia tabaci*, peste relacionada aos grãos de feijão, além de apresentar atividade antimicrobiana (115,126).

4.1.6 Óleos essenciais de *M. torta* (Arbo0852) e *C. sylvestris* (Arbo0854)

Anexo II:

Figuras All-21 e All-23: Perfis cromatográficos;

Tabelas All-11 e All-12: Dados de caracterizações;

Figuras All-22 e All-24: Estruturas químicas identificadas.

Na espécie *M. torta*, prevaleceu a classe de sesquiterpeno totalizando 89% na identificação destes compostos. Três voláteis germacreno-D, α -amorfeno e δ -cadineno apresentaram teores de 10,3; 19,8 e 12,5%, respectivamente. Os sesquiterpenos bicicloelemeno, α -copaeno, β -elemeno, β -cariofileno, α -humuleno, alo-aromadendreno, γ -muuroleno, germacra-1(10),4(15),5-trieno, espatulenol, globulol, 1*H*-cicloprop(*E*)Azulenol-4, ledol α -cedrol, τ -muurolol, torreiol e α -cadinol foram determinados com valores oscilando entre 1 e 5,5%.

No óleo essencial de *C. sylvestris*, também conhecida como guaçatonga, foi detectado somente sesquiterpenos com e sem oxigênio nas respectivas estruturas químicas num total de 91% dessa amostra. O biciclogermacreno foi o majoritário com teor de 47,4%. Os percentuais de bicicloelemeno, β -cariofileno, germacreno-D, globulol, 1*H*-cicloprop(*E*)azulenol-4, τ -cadinol e α -cadinol oscilaram de, no mínimo, 3 a, no máximo, 5,46%. *C. sylvestris* é conhecida popularmente como “Guaçatonga” ou “Chá de Bugre” e suas folhas são consumidas como chás anti-inflamatórios,

depurativos e anti-reumáticos, além de pesquisas indicarem contribuições farmacológicas, haja vista sua diversidade química (127).

4.1.7 Óleos essenciais de *M. guianensis* (Arbo0856), *D. furfuracea* (Arbo0859), *E. klotzschiana* (Arbo0861)

Anexo II:

Figuras All-25, All-27 e All-29: Perfis cromatográficos;

Tabelas All-13, All-14 e All-15: Dados de caracterizações;

Figuras All-26, All-28 e All-30: Estruturas químicas identificadas.

Inicialmente, ao cromatograma da amostra Arbo0856, referente à *M. guianensis*, foi observado um pico entre 3 e 4 min., atribuído à uma impureza de solvente pelo estudo comparativo com amostra branco. Ademais, todos os voláteis de interesse foram eluídos a partir de 5 min. de análise. Essa amostra não apresentou monoterpenos, sendo o conteúdo de sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados de 47,4 e 16,4%. Os principais voláteis foram β -cariofileno (18,2%) e δ -cadineno (14,3%), seguidos por τ -muurolol (6,65%), γ -cadineno (5,13%), α -cadinol (4,2%) e globulol (3,9%). O total de compostos identificados correspondeu à 64%. *M. guianensis* apresenta uso tradicional como anti-inflamatório de picadas de insetos e na cicatrização de feridas (128).

Na análise envolvendo *D. furfuracea*, conhecida popularmente como araticum do campo, foram detectados dois picos próximos, em 15 e 29 min., que não foram determinados por não se encaixarem aos critérios de identificação estabelecidos neste trabalho. Dos 11 sesquiterpenos identificados, 9 voláteis equivalentes à 71,9% apresentaram oxigenação na estrutura química. O elemol, com conteúdo de 53,8%, foi o majoritário. O 10-epi- γ -eudesmol e a mistura de α -eudesmol/ β -eudesmol apresentaram teores de 5,8 e 8,6%. *D. furfuracea* é popularmente chamada de “araticum-seco” com uso medicinal para tratar inflamações e dores. O óleo essencial desta planta produz efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos centrais e periféricos (129).

Os componentes germacreno-D, biciclogermacreno, globulol, τ -muurolol e α -cadinol com percentuais de 7,3; 10,2; 12,9; 14,4 e 22%, respectivamente, foram os principais sesquiterpenos presentes no óleo essencial de *E. klotzschiana*, também conhecida como pera do Cerrado. O espatulenol, 1*H*-cicloprop(*E*)azulenol-4, ledol e

torriol apresentaram teores oscilando entre 4,3 e 5,6%. O total de voláteis identificados foi equivalente à 88% da amostra. Nomeada como Pera do Cerrado, estudo realizado com essa planta indicou atividade antioxidante (130).

4.1.8 Mapa de calor e compostos majoritários

No contexto de avaliações comparativas finais, foi elaborado um mapa de calor no qual relacionaram-se todas as espécies em estudo, suas respectivas famílias e a grande maioria dos voláteis identificados com seus respectivos teores (**Fig. 18**). Nesse mapa, para melhores visualizações, os valores numéricos de teores foram determinados com $\geq 4\%$. Contudo, todos os teores variam de zero com a cor azul clara para até 70% representado pela cor vermelha intensa, conforme escala nessa figura. Avaliando-se esses dados, levando em conta os perfis de voláteis pelo mapa de calor, as espécies *D. furfuracea* e *dysenterica* **C** foram as que mais se diferenciaram entre todas as plantas estudadas. *H. brasiliense* **A** e **B** foram semelhantes. *P. ovatum*, *X. aromatica* e *C. adamantium* demonstram uma certa similaridade. *E. dysenterica* **A** e **B** foram consideradas parecidas. *P. laruotteanum* e *B. salicifolius*, ambas da família Myrtaceae estão mais aproximadas quimicamente. *E. klotzschiana*, *M. guianensis* e *M. torta* foram análogas. *C. sylvestris* foi considerada um pouco semelhante a *E. klotzschiana*.

Com a finalidade de otimizar a discussão relacionada às atividades biológicas, foram listadas na **Tabela 5** os compostos considerados majoritários, ou seja, com percentual relativo $\geq 4\%$. Nos **Quadros 01, 02, 03** e **04**, podem ser observadas as estruturas químicas desses óleos majoritários. Em relação à família Myrtaceae, não foi identificado composto majoritário presente nas oito amostras referentes aos óleos essenciais das cinco espécies coletadas. No entanto, foi observado que, houve predominância de monoterpenos em cinco amostras, *B. salicifolius* (43%), *C. adamantium* (39%), *E. dysenterica* Arbo0846B (39%), *E. dysenterica* Arbo0846C (94%) e *P. laruotteanum* (37%). Para *E. dysenterica* Arbo0846A e *M. torta*, houve destaque para os sesquiterpenos com percentual relativo de 38 e 62%, respectivamente. Enquanto para *E. klotzschiana* predominaram sesquiterpenos

oxigenados (69%). Em relação à duas espécies da família Annonaceae, *D. furfuracea* e *X. aromatica* não foram observadas similaridades que possam ser destacadas quanto ao perfil cromatográfico.

Nos itens 4.2 a 4.5, a seguir, estão descritas algumas correlações entre as atividades biológicas e o perfil químico de cada amostra. Para tanto, foi possível realizar os testes larvicidas com alguns compostos majoritários identificados nas amostras e adquiridos comercialmente. Os demais testes foram realizados unicamente com óleos essenciais. Assim, quando não foi possível adquirir os compostos e testá-los quanto à sua atividade biológica, foram utilizados resultados disponíveis na literatura relacionados à mesma atividade. Na ausência de resultados individuais ou de dados disponíveis em literatura, considerou-se os compostos majoritários ($\geq 4\%$) para tal correlação tendo em vista que, normalmente, são caracterizados por seus principais compostos, que frequentemente determinam suas propriedades biológicas (52). No entanto, é necessário considerar que os óleos essenciais são misturas complexas de compostos majoritários e minoritários, que podem atuar em sinergismo ou antagonismo, contribuindo para o resultado final da atividade larvicida.

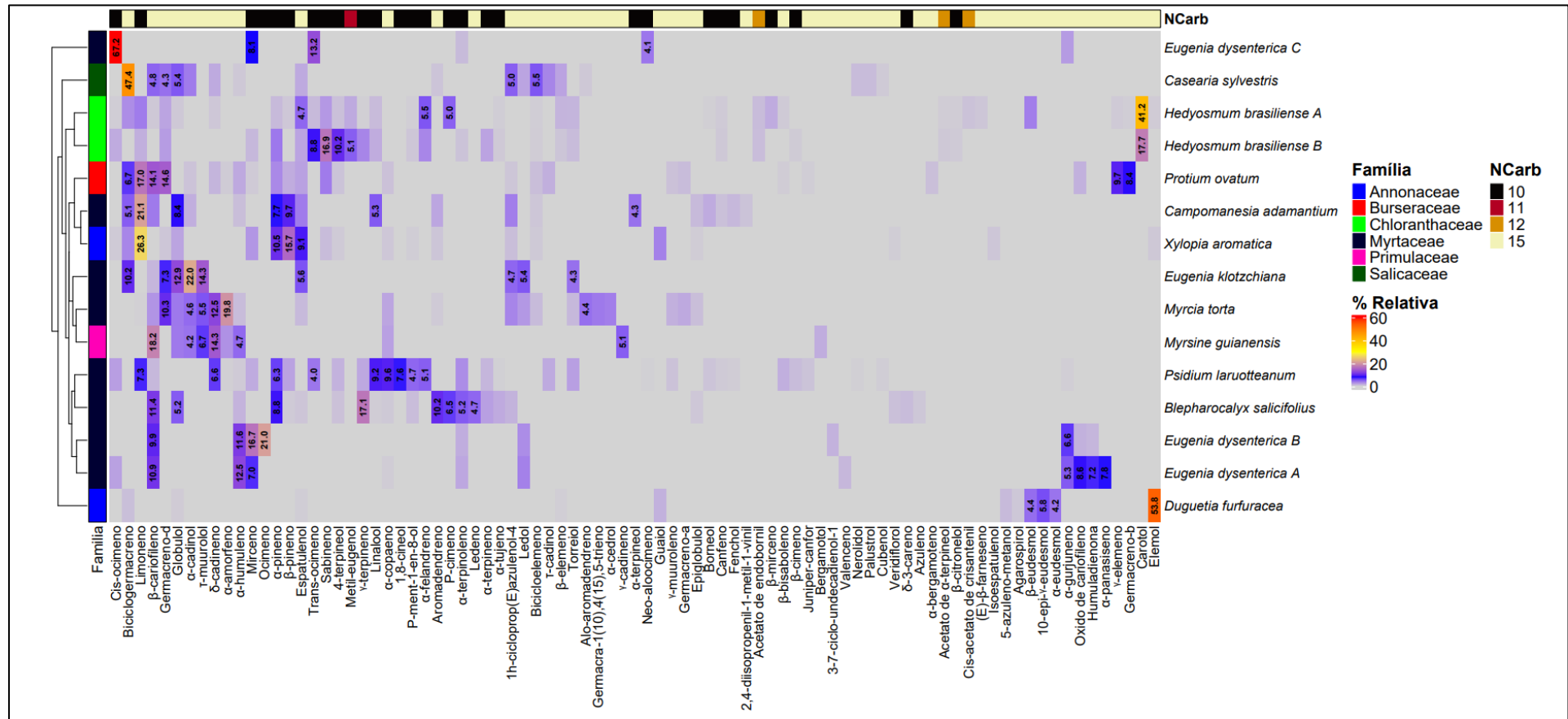


Figura 18. Mapa de calor para o estudo comparativo entre a composição das amostras de óleos essenciais de plantas do Cerrado. Relacionam-se: **Espécies x voláteis x família x NCarb** (número de carbonos), considerando-se os **teores** dos voláteis em porcentagem relativa (**% Relativa**).

Tabela 5. Dados referentes aos compostos majoritários identificados nas amostras de óleos essenciais obtidos a partir de folhas frescas de plantas do Cerrado. Foram considerados majoritários os compostos que apresentaram pelo menos 4% na quantificação relativa.

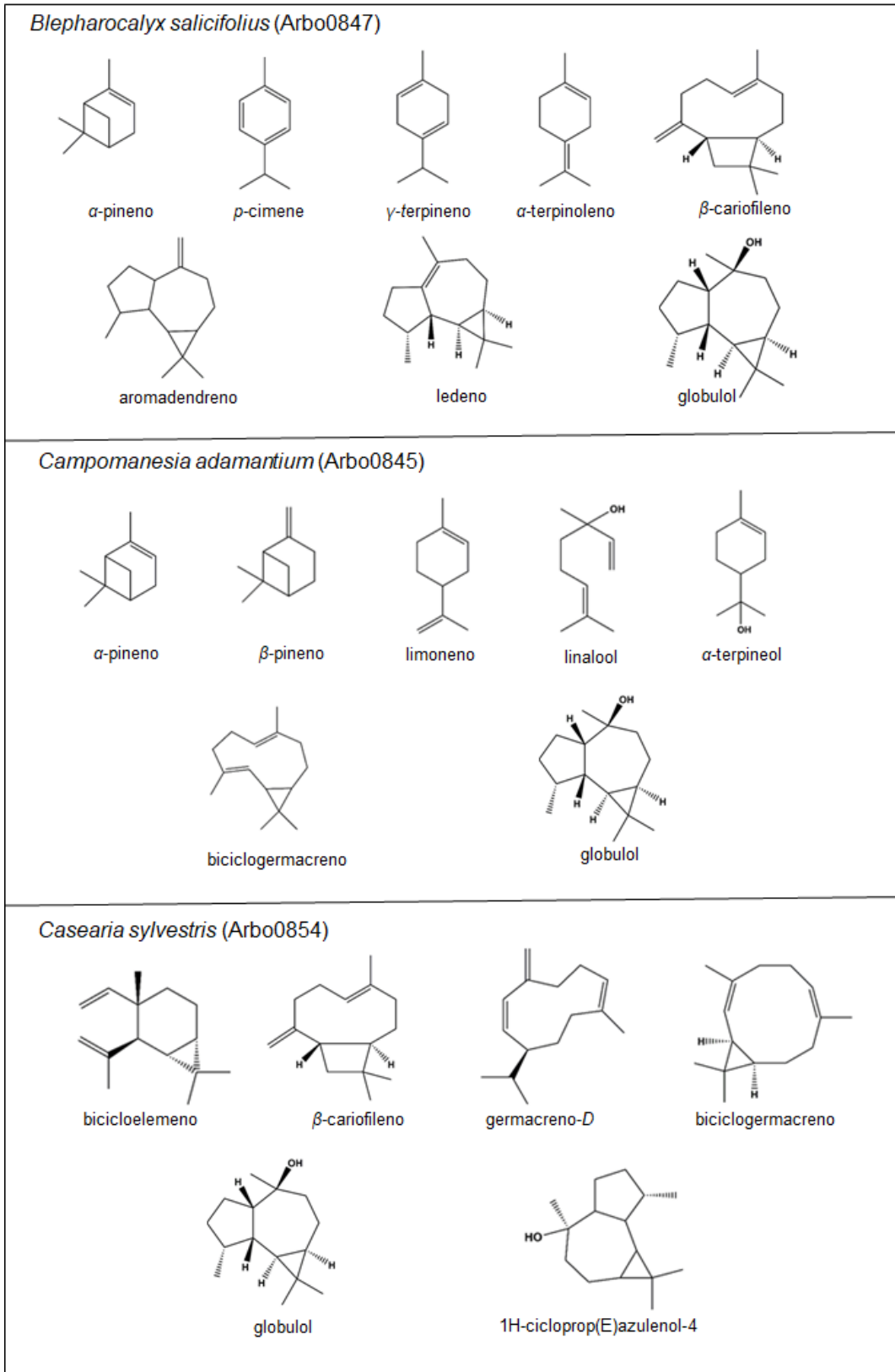
Espécies	Compostos	^a TR	^b IKc	^c IKp	^d IS (%)	^e MM	^f F. molecular	^g (%)
<i>Blepharocalyx salicifolius</i> Arbo0847	α -pineno	6,0	934	935	97	136	C ₁₀ H ₁₆	8,8
	<i>p</i> -cimeno	8,4	1026	1026	96	134	C ₁₀ H ₁₄	6,5
	γ -terpineno	9,4	1062	1059	96	136	C ₁₀ H ₁₆	17,1
	α -terpinoleno	10,2	1091	1078	97	136	C ₁₀ H ₁₆	5,2
	β -cariofileno	19,7	1428	1428	97	204	C ₁₅ H ₂₄	11,4
	aromadendreno	20,2	1448	1443	95	204	C ₁₅ H ₂₄	10,3
	ledeno	21,7	1504	1500	94	204	C ₁₅ H ₂₄	4,7
	globulol	23,9	1595	1580	94	222	C ₁₅ H ₂₆ O	5,2
<i>Campomanesia adamantium</i> Arbo0845	α -pineno	6,0	935	935	97	136	C ₁₀ H ₁₆	7,7
	β -pineno	7,1	979	977	98	136	C ₁₀ H ₁₆	9,7
	limoneno	8,6	1032	1031	97	136	C ₁₀ H ₁₆	21,1
	linalol	10,6	1102	1103	97	154	C ₁₀ H ₁₈ O	5,3
	α -terpineol	13,3	1195	1195	98	154	C ₁₀ H ₁₈ O	4,3
	biciclogermacreno	21,7	1506	1500	96	204	C ₁₅ H ₂₄	5,1
	globulol	24,0	1596	1580	94	222	C ₁₅ H ₂₆ O	8,4
<i>Casearia sylvestris</i> Arbo0854	bicicloelemeno	17,4	1342	1336	91	204	C ₁₅ H ₂₄	5,5
	β -cariofileno	19,7	1426	1428	96	204	C ₁₅ H ₂₄	4,8
	germacreno- <i>D</i>	21,3	1489	1488	90	204	C ₁₅ H ₂₄	4,3
	biciclogermacreno	21,8	1506	1500	96	204	C ₁₅ H ₂₄	47,4
	globulol	23,9	1594	1580	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	5,4
	1 <i>H</i> -cicloprop(<i>E</i>) azulenol-4	24,1	1602	1600	94	222	C ₁₅ H ₂₆ O	5,1
<i>Duguetia furfuracea</i> Arbo0859	elemol	23,1	1562	1558	95	222	C ₁₅ H ₂₆ O	53,8
	10-epi- γ -eudesmol	25,1	1643	1632	91	222	C ₁₅ H ₂₆ O	5,8
	β -eudesmol	25,5	1662	1662	91	222	C ₁₅ H ₂₆ O	4,4
	α -eudesmol	25,6	1665	1667	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	4,2
<i>Eugenia dysenterica</i> Arbo0846A	β -mirceno	7,4	992	992	97	136	C ₁₀ H ₁₆	7,0
	β -cariofileno	19,7	1427	1427	97	294	C ₁₅ H ₂₄	11,0
	α -humuleno	20,6	1462	1462	96	204	C ₁₅ H ₂₄	12,5
	gurjuneno	21,6	1499	1475	92	204	C ₁₅ H ₂₄	5,3
	α -panainseno	22,3	1528	1527	90	204	C ₁₅ H ₂₄	7,8
	óxido de cariofileno	23,9	1594	1593	93	220	C ₁₅ H ₂₄ O	8,6
	humuladienona	24,6	1621	1580	90	220	C ₁₅ H ₂₄ O	7,3
<i>Eugenia dysenterica</i> Arbo0846B	β -mirceno	7,4	992	992	97	136	C ₁₀ H ₁₆	16,7
	<i>cis</i> -ocimeno	8,7	1039	1041	95	136	C ₁₀ H ₁₆	21,0
	β -cariofileno	19,7	1427	1428	97	204	C ₁₅ H ₂₄	9,9
	α -humuleno	20,6	1462	1462	96	204	C ₁₅ H ₂₄	11,6
	gurjuneno	21,6	1498	1475	93	204	C ₁₅ H ₂₄	6,6
<i>Eugenia dysenterica</i> Arbo0846C	β -mirceno	7,4	991	991	97	136	C ₁₀ H ₁₆	8,1
	<i>cis</i> -ocimeno	8,7	1039	1038	95	136	C ₁₀ H ₁₆	67,2
	<i>trans</i> -ocimeno	9,0	1048	1048	92	136	C ₁₀ H ₁₆	13,2
	<i>neo</i> -aloocimeno	11,4	1130	1140	93	136	C ₁₀ H ₁₆	4,1

Espécies	Compostos	^a TR	^b IKc	^c IKp	^d IS (%)	^e MM	^f F. molecular	^g (%)
<i>Eugenia klotzschiana</i> Arbo0861	germacreno- <i>D</i>	21,3	1488	1488	91	204	C ₁₅ H ₂₄	7,3
	biciclogermacreno	21,7	1504	1500	95	204	C ₁₅ H ₂₄	10,2
	espatulenol	23,7	1587	1585	93	220	C ₁₅ H ₂₄ O	5,6
	globulol	23,9	1593	1580	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	12,9
	1 <i>H</i> -cicloprop(<i>E</i>) azulenol-4	24,1	1601	1600	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	4,7
	ledol	24,4	1613	1608	91	222	C ₁₅ H ₂₆ O	5,4
	<i>r</i> -muurolol	25,3	1651	1647	93	222	C ₁₅ H ₂₆ O	14,4
	torreiol	25,4	1655	1658	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	4,3
<i>α</i> -cadinol	25,6	1664	1662	93	222	C ₁₅ H ₂₆ O	22,0	
<i>Hedyosmum brasiliense</i> Arbo0849A	<i>α</i> -felandreno	7,8	1006	1006	97	136	C ₁₀ H ₁₆	5,5
	<i>p</i> -cimeno	8,4	1026	1026	96	134	C ₁₀ H ₁₄	5,0
	espatulenol	23,8	1591	1585	94	220	C ₁₅ H ₂₄ O	4,7
	carotol	24,4	1614	1600	95	222	C ₁₅ H ₂₆ O	41,2
<i>Hedyosmum brasiliense</i> Arbo0849B	sabineno	7,0	974	974	96	136	C ₁₀ H ₁₆	16,9
	<i>trans</i> -ocimeno	9,0	1049	1048	97	136	C ₁₀ H ₁₆	8,8
	4-terpineol	12,8	1181	1180	97	154	C ₁₀ H ₁₈ O	10,2
	metil-eugenol	19,2	1409	1409	90	178	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	5,1
	carotol	24,3	1609	1600	94	222	C ₁₅ H ₂₆ O	17,7
<i>Myrcia torta</i> Arbo0852	<i>α</i> / <i>o</i> -aromadendreno	20,8	1471	1468	95	204	C ₁₅ H ₂₄	4,4
	germacreno- <i>D</i>	21,4	1492	1488	93	204	C ₁₅ H ₂₄	10,3
	<i>α</i> -amorfenol	21,9	1510	1519	92	204	C ₁₅ H ₂₄	19,8
	<i>δ</i> -cadineno	22,5	1536	1530	92	204	C ₁₅ H ₂₄	12,5
	globulol	24,0	1597	1580	94	222	C ₁₅ H ₂₆ O	4,0
	<i>r</i> -muurolol	25,4	1656	1647	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	5,5
	<i>α</i> -cadinol	25,7	1669	1662	92	222	C ₁₅ H ₂₆ O	4,6
<i>Myrsine guianensis</i> Arbo0856	<i>β</i> -cariofileno	19,7	1426	1428	96	204	C ₁₅ H ₂₄	18,2
	<i>α</i> -humuleno	20,6	1461	1462	92	204	C ₁₅ H ₂₄	4,7
	<i>γ</i> -cadineno	21,2	1483	1483	90	204	C ₁₅ H ₂₄	5,1
	<i>δ</i> -cadineno	22,3	1530	1530	90	204	C ₁₅ H ₂₄	14,3
	<i>r</i> -muurolol	25,3	1651	1647	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	6,7
	<i>α</i> -cadinol	25,6	1664	1662	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	4,2
<i>Protium ovatum</i> Arbo0848	limoneno	8,5	1032	1031	97	136	C ₁₀ H ₁₆	11,0
	<i>β</i> -cariofileno	19,8	1429	1428	96	204	C ₁₅ H ₂₄	14,1
	<i>γ</i> -elemeno	20,1	1441	1437	95	204	C ₁₅ H ₂₄	9,7
	germacreno- <i>D</i>	21,4	1492	1488	92	204	C ₁₅ H ₂₄	14,6
	biciclogermacreno	21,8	1506	1500	96	204	C ₁₅ H ₂₄	6,7
	germacreno- <i>B</i>	23,3	1569	1569	94	204	C ₁₅ H ₂₄	8,4
<i>Psidium laruotteanum</i> Arbo0850	<i>α</i> -pineno	6,0	934	935	97	136	C ₁₀ H ₁₆	6,3
	<i>α</i> -felandreno	7,8	1006	1006	98	136	C ₁₀ H ₁₆	5,1
	limoneno	8,5	1031	1031	92	136	C ₁₀ H ₁₆	7,3
	1,8-cineol	8,6	1033	1032	94	154	C ₁₀ H ₁₈ O	7,6
	<i>trans</i> -ocimeno	9,0	1049	1048	97	136	C ₁₀ H ₁₆	4,0
	linalol	10,6	1103	1103	97	154	C ₁₀ H ₁₈ O	9,2
	<i>p</i> -ment-1-en-8-ol	13,3	1195	1193	98	154	C ₁₀ H ₁₈ O	4,7

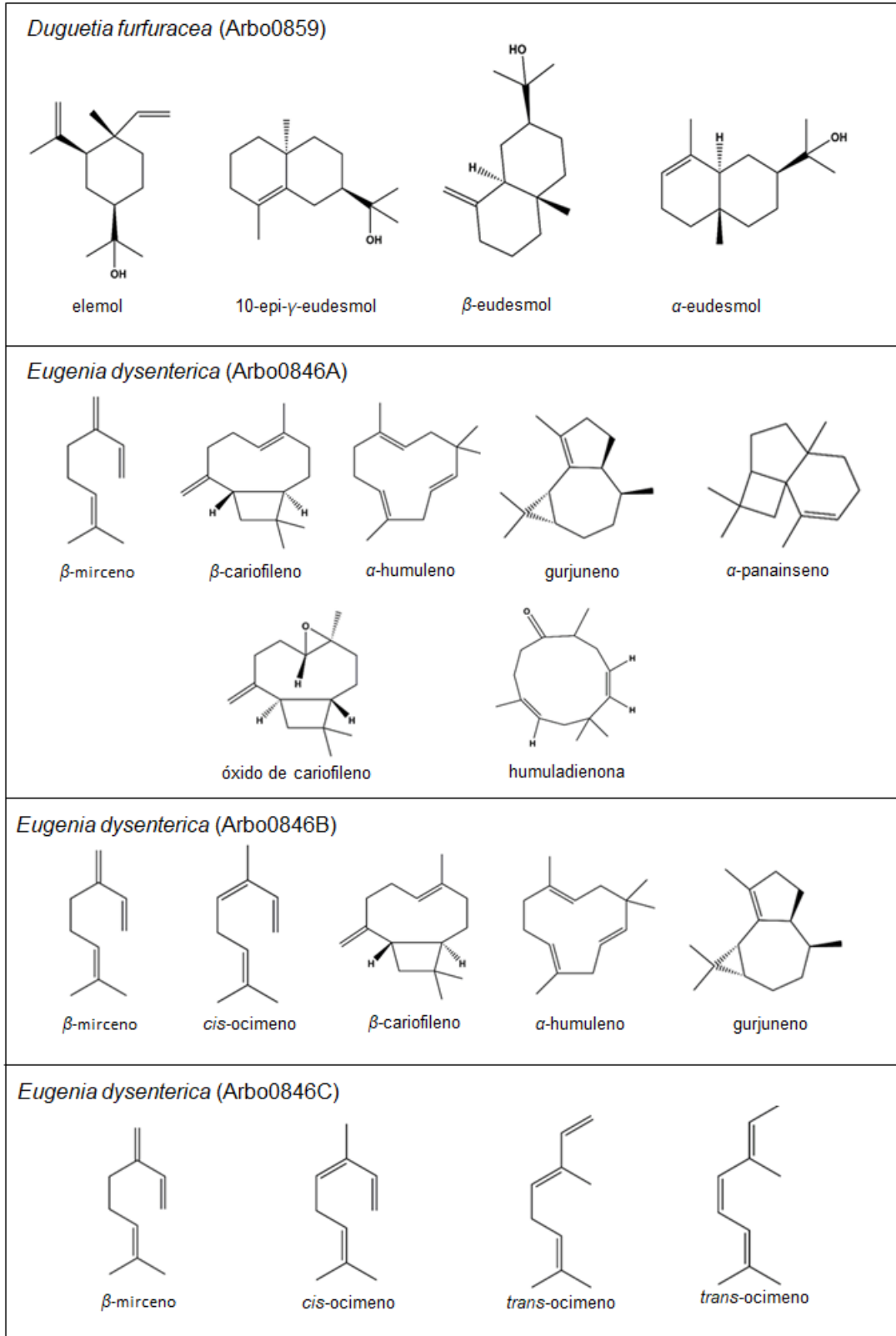
Espécies	Compostos	^a TR	^b IKc	^c IKp	^d IS (%)	^e MM	^f F. molecular	^g (%)
	α -copaeno	18,5	1383	1381	95	204	C ₁₅ H ₂₄	9,6
	δ -cadineno	22,4	1532	1530	93	204	C ₁₅ H ₂₄	6,6
<i>Xylopi</i> <i>a arom</i> <i>atica</i> Arbo0851	α -pineno	6,0	934	935	97	136	C ₁₀ H ₁₆	10,5
	β -pineno	7,1	978	977	98	136	C ₁₀ H ₁₆	15,7
	limoneno	8,5	1031	1031	97	136	C ₁₀ H ₁₆	26,3
	espatulenol	23,8	1589	1585	94	220	C ₁₅ H ₂₄ O	9,1

^aTR = tempo de retenção, min.; ^bIKc = Índice de Kovats calculado; ^cIKp = Índice de Kovats publicado (103); ^dIS = Índice de similaridade espectral; ^eMM = massa molecular; ^fF. Molecular = Fórmula Molecular; ^g(%) = percentual relativo.

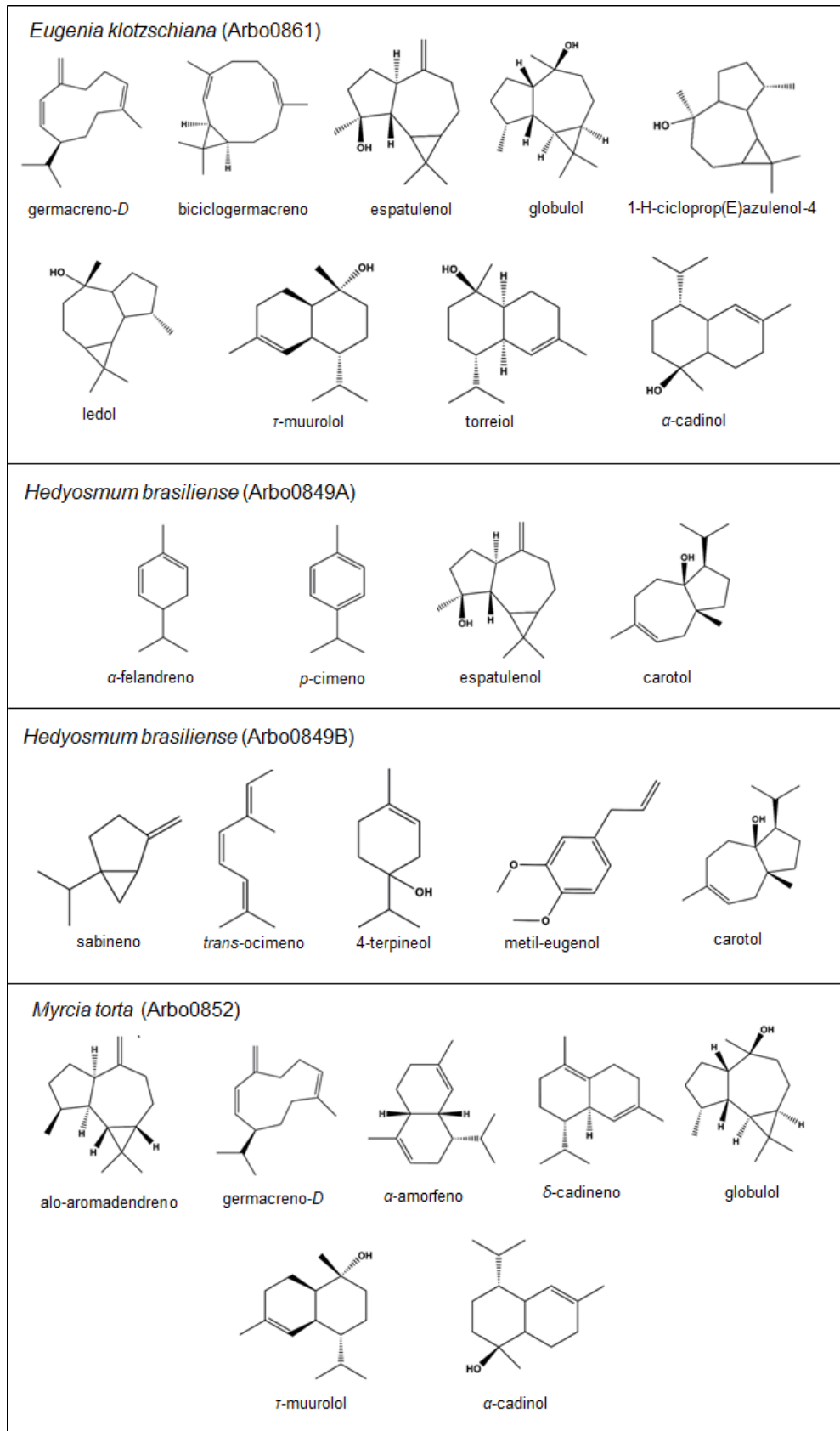
Quadro 01. Compostos majoritários identificados nas espécies *B. salicifolius* (Arbo0847), *C. adamantium* (Arbo0845) e *C. sylvestris* (Arbo0854).



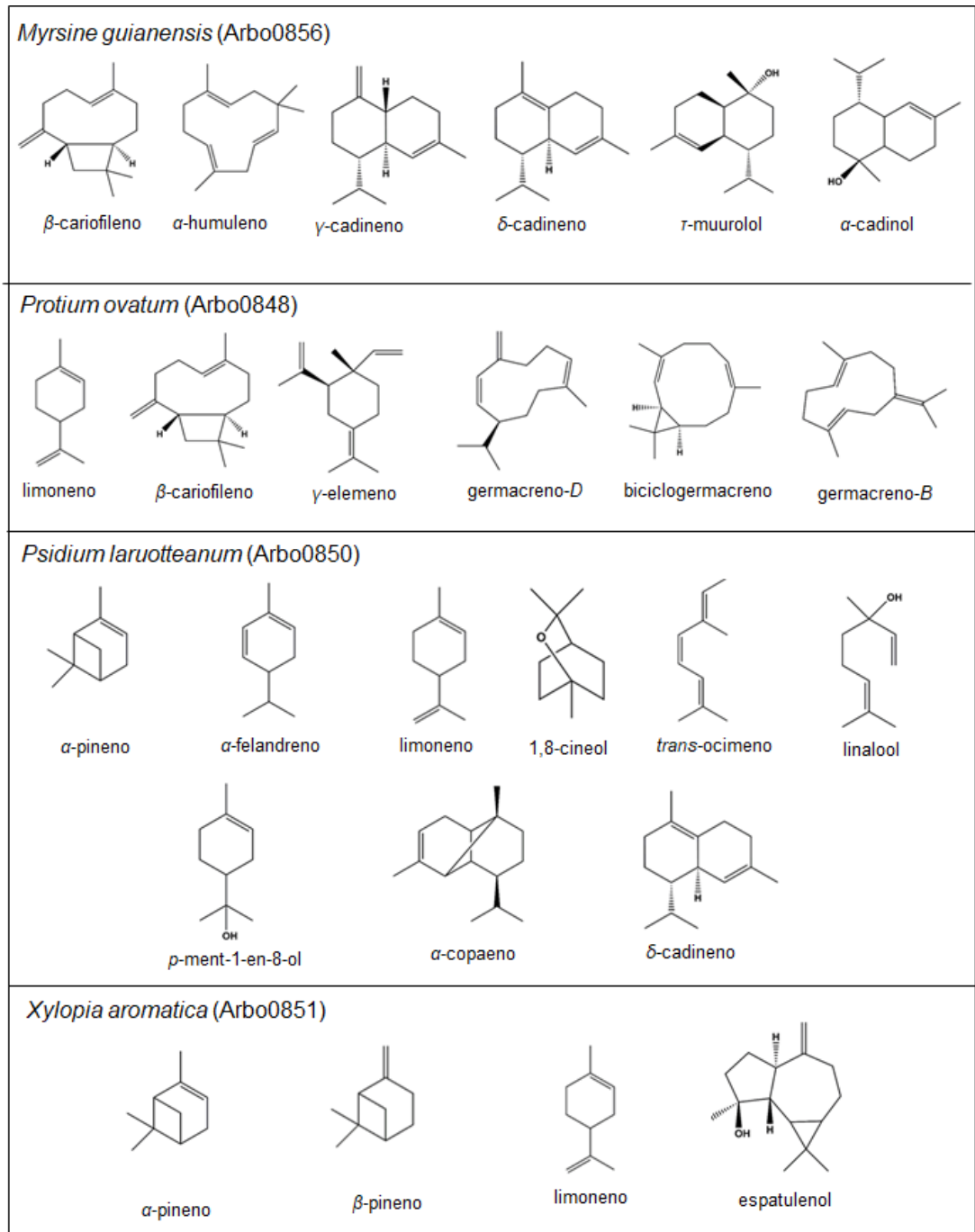
Quadro 02. Compostos majoritários identificados nas espécies *D. furfuracea* (Arbo0859) e *E. dysenterica* (Arbo0846A, Arbo0846B e Arbo0846C).



Quadro 03. Compostos majoritários identificados nas espécies *E. klotzschiana* (Arbo0861), *H. brasiliense* (Arbo0849A e Arbo0849B) e *M. torta* (Arbo0852).



Quadro 04. Compostos majoritários identificados nas espécies *M. guianensis* (Arbo0856), *P. ovatum* (Arbo0848), *P. larotleanum* (Arbo0850) e *X. aromatica* (Arbo0851).



4.2. ATIVIDADE LARVICIDA EM *Ae. aegypti*

O óleo essencial que apresentou a maior atividade larvicida foi das folhas de *H. brasiliense* (Arbo0849B), coletadas especificamente para esse fim, com CL₅₀ de 11,2 µg/mL em 24 h. Provavelmente, o sesquiterpeno carotol (17,7%), juntamente com o monoterpeno sabineno (16,9%) contribuíram para atividade larvicida apresentada. Não foi possível a realização do teste larvicida com a amostra de Arbo0849A tendo em vista a baixa quantidade de óleo essencial disponível. Os dados completos do teste larvicida podem ser observados na **Tabela 6**. Em seguida, temos o óleo essencial de *X. aromatica* com CL₅₀ de 12,1 µg/mL em 24 h, *M. torta* e *C. adamantium* com valores de CL₅₀ iguais a 17,9 µg/mL e 18,0 µg/mL, respectivamente, em 24 h de exposição, não havendo diferença significativa entre os dois últimos. Dentre os compostos majoritários das espécies *X. aromatica* e *M. torta*, foram identificados os monoterpenos β-pineno e limoneno, que tiveram suas atividades larvicidas demonstradas individualmente neste trabalho (**Tabela 6**).

Foi possível testar a atividade larvicida das três amostras coletadas de *E. dysenterica*, sendo que Arbo0846A não apresentou atividade a 250 µg/mL e Arbo0846B foi a amostra mais ativa com CL₅₀ de 37,4 µg/mL em 24 h, seguida de Arbo0846C com CL₅₀ de 47,2 µg/mL em 24 h. A diferença entre as atividades larvicidas pode ser explicada pelas diferentes composições químicas. O único composto comum às três amostras foi o β-mirceno. No entanto, as amostras ativas Arbo0846B e Arbo0846C apresentaram como composto com maior percentual relativo o *cis*-ocimeno com 21 e 67,2%, respectivamente. Sendo β-mirceno e *cis*-ocimeno os únicos majoritários comuns às duas amostras ativas, provavelmente, *cis*-ocimeno corroborou com a atividade larvicida. Os óleos essenciais de *M. guianensis* e *klotzschiana* não apresentaram atividade larvicida à 250 µg/mL e, por esta razão, não foram determinados valores de CL₅₀ e de CL₉₀ para essas espécies. Os óleos essenciais das espécies *B. salicifolius*, *P. ovatum* e *P. laruotteanum* apresentaram valores de CL₅₀ de 24,1; 31,7 e 67,2 µg/mL, respectivamente. Na amostra de *B. salicifolius* foram detectados *p*-cimeno 6,5% e o valor de CL₅₀ determinado para *p*-cimeno foi de 9,5 µg/mL (**Tabela 6**). Dessa forma, entende-se que o *p*-cimeno contribuiu para a atividade larvicida do óleo de *B. salicifolius*.

O maior valor de CL₅₀ determinado neste trabalho foi para o óleo essencial das folhas de *C. sylvestris* (135,1 µg/mL em 24 h), seguido de *D. furfuracea* (113,9 µg/mL em 24 h). As demais espécies apresentaram valores de CL₅₀ de 67,2 a 11,2 µg/mL em 24 h demonstrando o potencial de óleos essenciais de plantas do Cerrado no controle larvicida de *Ae. aegypti*. Por exemplo, os óleos essenciais de *Trachyspermum ammi*, *Illicium verum* e *Syzygium aromaticum*, comumente utilizados na culinária, foram testados em larvas de *Ae. aegypti*, segundo os critérios estabelecidos pela OMS e apresentaram valores de CL₅₀ iguais a 39,48; 41,30 e 66,90, respectivamente (131). Obedecendo a mesma metodologia, com o mesmo vetor, foi determinada a atividade larvicida para *Cymbopogon citratus* (CL₅₀ 120,6 µg/mL), *Cymbopogon winterianus* (CL₅₀ 38,8 µg/mL), *Eucalyptus citriodora* (CL₅₀ 104,4 µg/mL) e *Eucalyptus camaldulensis* (CL₅₀ 33,7 µg/mL) (132). No presente trabalho, dentre as 11 amostras testadas, seis apresentaram CL₅₀ abaixo de 32 µg/mL.

Tabela 6. Dados referentes à atividade larvicida de óleos essenciais de plantas do Cerrado. São apresentados a faixa de concentrações utilizadas no teste e os valores determinados para CL₅₀ e CL₉₀.

Óleo Essencial/ Composto	Concentração (µg/mL)	^a VF (mL)	^b N	^c n	CL ₅₀ µg/mL			CL ₉₀ µg/mL		
					24h*	48h**	72h***	24h*	48h**	72h***
					(95% ^d IC)			(95% IC)		
<i>Blepharocalyx salicifolius</i> Arbo0847	60; 30; 15; 7,5	120	12	1200	24,1*	(22,6 – 25,9)		36,9*	(33,6 – 40,5)	
					23,5**	(22,1 – 25,0)		36,7**	(33,5 – 40,1)	
					22,9***	(21,5 – 24,5)		36,2***	(32,7 – 39,7)	
<i>Campomanesia adamantium</i> Arbo0845	50; 25; 12,5; 6,25	120	12	1200	18,0*	(17,3– 18,8)		28,2*	(26,3 – 30,1)	
					17,4**	(16,8 – 18,1)		27,8**	(25,9 – 29,6)	
					16,9***	(16,3 – 17,5)		27,2***	(25,4 – 29,1)	
<i>Casearia sylvestris</i> Arbo0854	250; 125; 62,5; 31,25	120	12	1200	135,1*	(126,9 – 143,7)		> 250*		
					121,6**	(112,9 – 130,7)		> 250**		
					116,0***	(107,6 – 124,9)		> 250***		
<i>Duguetia furfuracea</i> Arbo0859	250; 125; 62,5; 31,25	120	12	1200	113,9*	(103,1 – 125,8)		243,0*	(196,3 - >250)	
					105,4**	(95,3 – 116,4)		224,9**	(182,5 - >250)	
					100,7***	(91,3 – 110,8)		214,7***	(175,9 - >250)	

Óleo Essencial/ Composto	Concentração (µg/mL)	^a VF (mL)	^b N	^c n	CL ₅₀ µg/mL 24h*, 48h**, 72h*** (95% dIC)	CL ₉₀ µg/mL 24h*, 48h**, 72h*** (95% IC)
<i>Eugenia dysenterica</i> Arbo0846B	50; 25; 12,5; 6,25	120	4	400	37,4* (35,6 – 39,1) 34,6** (33,1 – 36,2) 34,0*** (32,6 – 35,6)	50,0* (45,9 – >50) 48,2** (43,3 – >50) 48,2*** (43,1 – >50)
<i>Eugenia dysenterica</i> Arbo0846C	50; 25; 12,5; 6,25	120	8	800	47,2* (43,7 – 51,3) 45,3** (42,2 – 48,8) 43,1*** (40,1 – 46,5)	> 50* > 50** > 50***
<i>Hedyosmun brasiliense</i> Arbo0849B	50; 25; 12,5; 6,25	120	12	1200	11,2* (10,3 – 12,1) 11,1** (10,2 – 12,0) 10,6*** (9,8 – 11,5)	17,9* (15,3 – 21,3) 17,5** (15,0 – 20,7) 17,3*** (15,0 – 20,0)
<i>Myrcia torta</i> Arbo0852	50; 25; 12,5; 6,25	120	12	1200	17,9* (16,8 – 19,1) 17,6** (16,5 – 18,7) 16,9*** (15,8 – 18,0)	28,4* (25,5 – 31,2) 27,6** (24,8 – 30,4) 26,2*** (23,2 – 29,2)
<i>Protium ovatum</i> Arbo0848	60; 30; 15; 7,5	120	12	1200	31,7* (30,0-33,5) 30,7** (29,2 – 32,4) 30,5*** (28,9 -32,2)	56,8* (49,3 – >60) 55,1** (48,2 – >60) 54,9*** (47,8 – >60)
<i>Psidium laruotteanum</i> Arbo0850	250; 125; 62,5; 31,25	120	12	1200	67,2* (58,3 – 78,0) 62,8** (55,7 – 71,4) 60,2*** (53,9 – 67,5)	132,8* (98,0 – 178,4) 115,1** (88,1 – 150,7) 109,3*** (85,8 – 139,8)
<i>Xylopia aromatica</i> Arbo0851	40; 20; 10; 5	120	12	1200	12,1* (10,7 – 13,6) 12,1** (10,6 – 13,5) 12,1*** (10,6 – 13,5)	19,6* (15,5 – 24,3) 19,5** (15,4 – 24,1) 19,5*** (15,4 – 24,1)
<i>p-cimeno</i> ArboS96	40; 20; 10;5	120	12	1200	9,5* (8,7 – 10,3) 9,3** (8,5 – 10,2) 9,3*** (8,5 – 10,2)	15,4* (12,6 – 19,1) 15,0** (12,3 – 18,7) 14,9*** (12,2 – 18,7)
(R)-(+)-limoneno ArboS48	15; 7,5; 3,75; 1,875	120	12	1200	4,6* (4,2 – 5,0) 4,4** (3,9 – 5,0) 4,3*** (3,8 – 4,7)	6,2* (5,1 – 7,3) 5,9** (4,5 – 7,6) 5,7*** (4,4 – 7,5)
(S)-(-)-limoneno ArboS47	25; 12,5; 6,25; 3,125	120	12	1200	6,5* (5,6 – 7,6) 6,4** (5,5-7,4) 6,2*** (5,2 – 7,3)	14,2* (10,3 – 19,3) 13,5** (10,0 – 18,2) 14,1*** (10,1 – 19,6)
(-)-β-pineno ArboS93	40; 20; 10; 5	120	12	1200	8,7* (8,2 – 9,3) 8,3** (7,9 – 8,8) 8,1*** (7,6 – 8,6)	13,8* (12,3 – 15,5) 13,1** (11,8 – 14,4) 12,3*** (11,3 – 13,4)

Óleo Essencial/ Composto	Concentração (µg/mL)	^a VF (mL)	^b N	^c n	CL ₅₀ µg/mL 24h*, 48h**, 72h*** (95% ^d IC)	CL ₉₀ µg/mL 24h*, 48h**, 72h*** (95% IC)
temefós	0,025; 0,0125; 0,00625; 0,003125; 0,0015625	120	12	1500	0,008* (0,008 – 0,009) 0,007** (0,006 – 0,007) 0,006*** (0,005 – 0,006)	0,013* (0,012 – 0,014) 0,011** (0,010 – 0,012) 0,010*** (0,009 – 0,011)

^aVF = Volume Final; ^bN = número de replicatas; ^cn = número total de larvas; ^dIC = intervalo de confiança de 95%.

Também foram testados, em larvas do 3º estágio de *Ae. aegypti*, dez compostos voláteis comerciais, com grau de pureza acima de 95%, detectados nos óleos essenciais em estudo. β -cariofileno, óxido cariofileno, linalol, α -pineno, (+)- β -pineno e α -terpineol apresentaram mortalidade abaixo de 10%, após 72 h de teste, na concentração de 25 µg/mL. Enquanto *p*-cimeno (ArboS96), (*R*)-(+)-limoneno (ArboS48), (*S*)-(-)-limoneno (ArboS47), e (-)- β -pineno (ArboS93) a 25 µg/mL apresentaram mortalidade \geq 80% após 24 h de exposição, sendo seus valores de CL₅₀ iguais a 9,5; 4,6; 6,5 e 8,7 µg/mL, respectivamente (**Tabela 6**). A atividade larvicida já havia sido reportada em literatura para *R*-limoneno (27 µg/mL) e *S*-limoneno (30 µg/mL) (133); *p*-cimeno (69,4 µg/mL) (134) e (-)- β -pineno (35,9 µg/mL) (135). A diferença entre os resultados reportados na literatura e os resultados obtidos neste trabalho pode ser explicado pelos diferentes métodos utilizados pelos autores citados, incluindo menor volume final e menor quantidade de larvas por ensaio. Santos *et al.*, 2011 conduziu os testes com vinte larvas do 3º estágio e três replicatas por concentração em um volume final de 20 mL. Cheng *et al.*, 2013 utilizou dez larvas do 4º estágio por concentração em um volume final de 25 mL e repetiu cada teste quatro vezes. Baser, 2014 adicionou cinco larvas com um dia de vida, por concentração, em placas de 24 poços em um volume final de 26 µL.

Cabe ressaltar que, geralmente, em óleos essenciais, as formas dextrogiros (+) e levogiros (-) podem coexistir como misturas das configurações *R,S*. Dentre os compostos que tiveram sua atividade larvicida testada individualmente, o limoneno é destacado como composto mais ativo, sendo identificado entre os compostos majoritários da segunda espécie mais ativa *X. aromatica* (CL₅₀ 12,1 µg/mL), e também de *C. adamantium* (CL₅₀ 18,0 µg/mL), *P. ovatum* (CL₅₀ 31,7 µg/mL) e *P. laruotteanum*

(CL₅₀ 67,2 µg/mL). Em relação à atividade larvicida de *X. aromatica*, provavelmente, não apenas a presença de limoneno ou β-pineno influenciaram no resultado obtido. A soma dos percentuais relativos de limoneno e β-pineno nos óleos essenciais de *X. aromatica* e *C. adamantium* foram 42 e 30,8%, respectivamente, o que pode ter contribuído para os respectivos valores de CL₅₀ de 12,1 e 18,0 µg/mL. Uma vez que foram determinados baixos valores de CL₅₀ para limoneno e β-pineno (**Tabela 6**), acredita-se que quanto maior a soma do percentual relativo nos dois compostos, maior a atividade larvicida.

Os resultados larvicidas obtidos contribuíram para a seleção de compostos majoritários que podem ser facilmente adquiridos no mercado em suas formas isoladas, sendo promissores para o controle do mosquito *Ae. aegypti* quando utilizados em baixas concentrações. Destaca-se que o limoneno, por exemplo, é comumente encontrado em frutas cítricas e a extração de óleos essenciais a partir de resíduos da indústria alimentícia já é descrito na literatura (136). Destaca-se que, para maioria das amostras de óleos essenciais e voláteis testados, o tempo de exposição das larvas aos compostos não influenciou de maneira significativa na porcentagem de mortalidade larval. Apenas os óleos essenciais de *C. sylvestris*, *D. furfuracea* e *P. laruotteanum* apresentaram uma diferença maior ou igual a 7% entre os valores de CL₅₀ de 24 e 48 h (**Tabela 6**). Esses resultados podem ser constatados também na **Fig. 19**, em que praticamente não se observa distanciamento entre as curvas dos gráficos de CL₅₀ de 24, 48 e 72h.

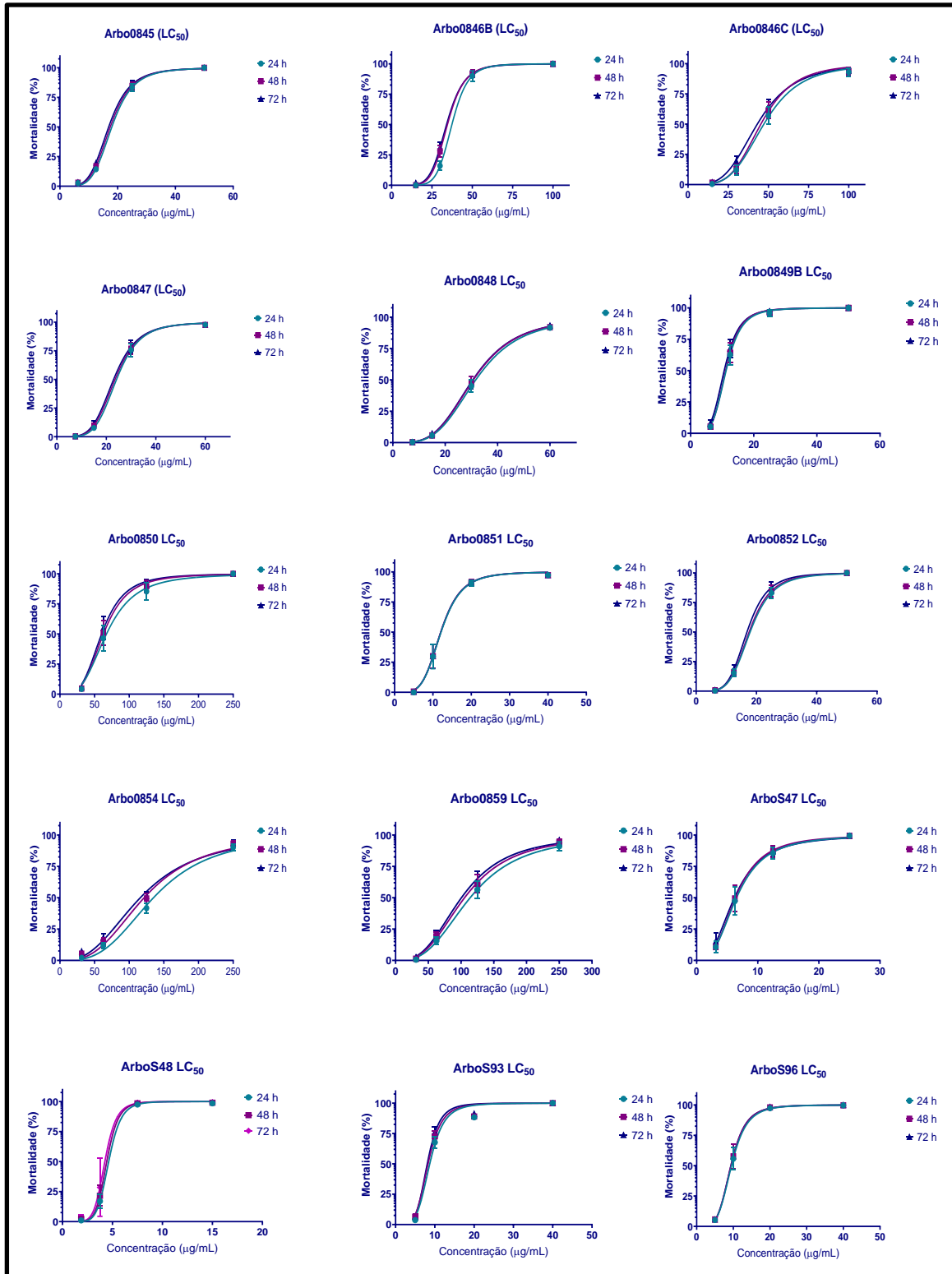


Figura 19. Dados gráficos referentes à determinação dos valores de CL₅₀ para *C. adamantium* (Arbo0845), *E. dysenterica* (Arbo0846B e Arbo0846C), *B. salicifolius* (Arbo0847), *P. ovatum* (Arbo0848), *H. brasiliense* (Arbo0849B), *P. laruotteanum* (Arbo0850,) *X. aromatica* (Arbo0851), *M. torta* (Arbo0852), *C. sylvestris* (Arbo0854), *D. furfuracea* (Arbo0859), (*S*)-(-)-limoneno (ArboS47), (*R*)-(+)-limoneno (ArboS48), (-)-β-pineno (ArboS93) e *p*-cimeno (ArboS96).

4.3 TESTE DE TOXICIDADE EM *Ae. aegypti*

Devido à quantidade em massa de óleo essencial obtida para cada espécie e coleta, as seguintes amostras foram incluídas no teste de toxicidade em *Ae. aegypti*: *C. adamantium* (Arbo0845), *E. dysenterica* (Arbo0846A), *B. salicifolius* (Arbo0847), *P. ovatum* (Arbo0848), *H. brasiliense* (Arbo0849A), *P. laruotteanum* (Arbo0850), *X. aromatica* (Arbo0851), *M. torta* (Arbo0852), *C. sylvestris* (Arbo0854), *M. guianensis* (Arbo0856), *D. furfuracea* (Arbo0859) e *klotzchiana* (Arbo0861).

Das 12 amostras testadas, metade apresentou toxicidade acima de 80% durante o período de teste, sendo que a primeira amostra a apresentar mais de 80% dos mosquitos nocauteados foi *H. brasiliense* (Arbo0849A) com 80,2% em 45 min., seguida de *M. torta* (Arbo0852) com 80,7% em 90 min. Após 2 horas de teste, foram obtidas as seguintes porcentagens de mosquitos nocauteados: 82,1% para *C. adamantium*, 81% para *B. salicifolius*, 92,6% para *H. brasiliense* (Arbo0849A) e 82,6% para *X. aromatica* e 85,1% para *M. torta*. A amostra de *D. furfuracea* atingiu valores acima de 80% apenas após 3 h do início do teste, com 85,5% de mosquitos nocauteados. O inseticida malathion, na concentração de 50 µg/garrafa, foi utilizado como controle positivo apresentando uma porcentagem de 100% de mosquitos nocauteados após 45 min. do início do teste. Os resultados gráficos do teste de toxicidade podem ser observados na **Fig. 20**.

Ao final do teste, ou seja, após 4 h, a amostra que apresentou maior percentual de mosquitos nocauteados foi *H. brasiliense* com 97,2%, seguida de *C. adamantium* com 93,8% e *B. salicifolius* com 93,4%. As espécies *M. torta*, *D. furfuracea* e *X. aromatica* apresentaram percentual de nocaute de 92,5%, 91,7% e 87,2%, respectivamente. De acordo com os dados publicados em literatura, o óleo essencial de *Thymus vulgaris*, que possui *p*-cimeno e γ -terpineno, foi tóxico em adultos de *Ae. aegypti* (137). Esses dois monoterpenos foram identificados no óleo essencial de *B. salicifolius* em uma alíquota total de 23,6%. Também foi identificado *p*-cimeno na amostra de *H. brasiliense* com percentual relativo de 5,0%. O volátil 4-terpineol foi considerado fortemente adulticida em *Ae. albopictus* (138). A soma de monoterpenos em *C. adamantium* foi de 48,1% e um desses compostos se refere ao α -terpineol, que é muito similar ao 4-terpineol. O conteúdo de 47% de sesquiterpenos somado ao conteúdo de 14,1% de sesquiterpenos oxigenados determinados em *M. torta*,

provavelmente contribuíram para o nocaute dos mosquitos, assim como o total de sesquiterpenos oxigenados (72%) em *D. furfuracea*. O espatulenol, detectado no óleo essencial das folhas de *Croton argyrophyllus* em um percentual relativo de 22,8%, teve sua toxicidade reportada em *Ae. aegypti* (116,139). Destaca-se a presença de espatulenol a 4,7% na amostra do óleo essencial de *H. brasiliense* e a 9,3% na amostra de *X. aromatica*, que apresentaram significativa toxicidade em *Ae. aegypti*. Cabe ressaltar que *H. brasiliense* foi a espécie mais ativa tanto no teste larvicida quanto no teste de toxicidade em adultos de *Ae. aegypti*.

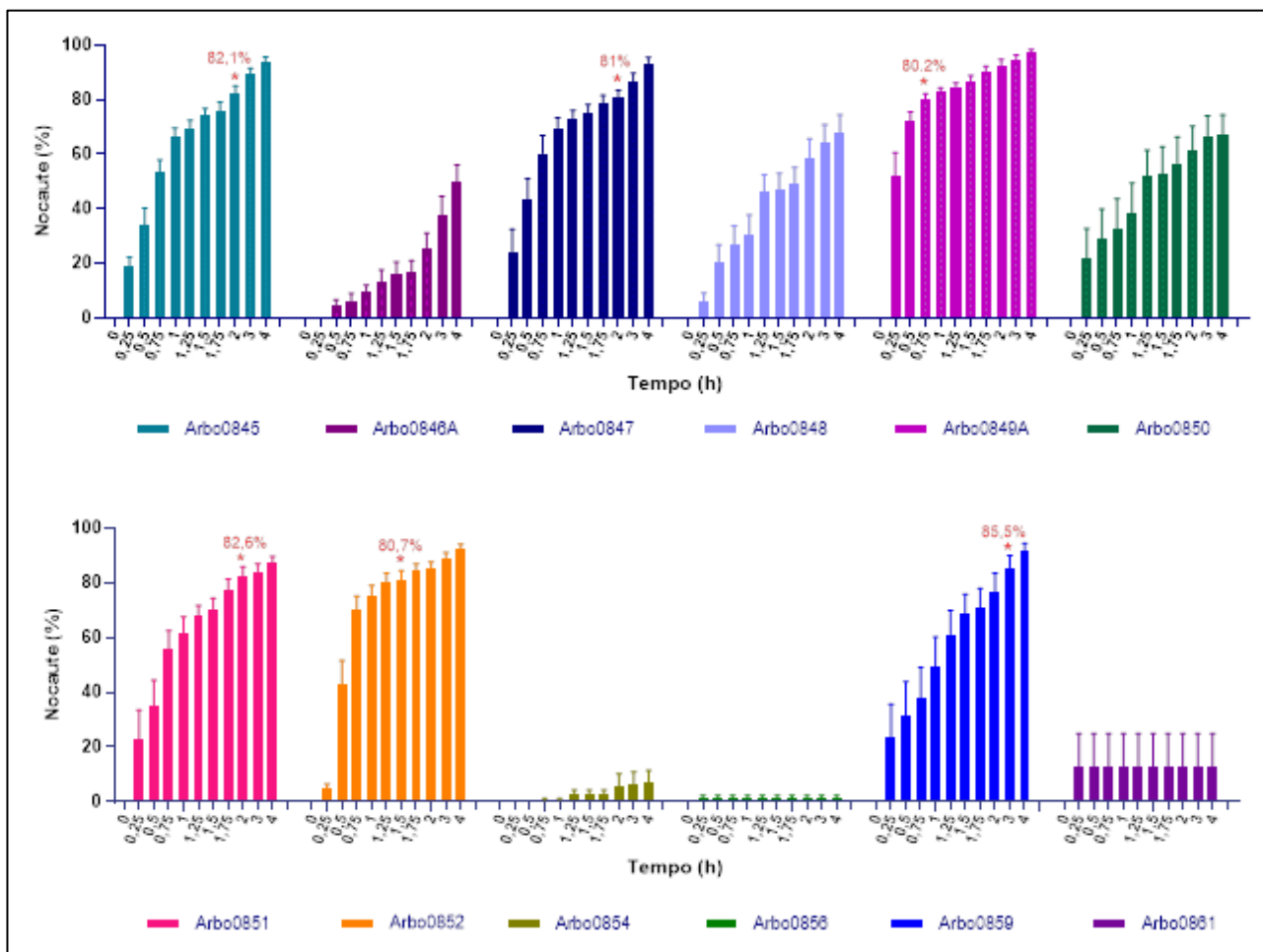


Figura 20. Representação gráfica dos dados de toxicidade em *Ae. aegypti* para *C. adamantium* (Arbo0845), *E. dysenterica* (Arbo0846A), *B. salicifolius* (Arbo0847), *P. ovatum* (Arbo0848), *H. brasiliense* (Arbo0849A), *P. larrotteanum* (Arbo0850), *X. aromatica* (Arbo0851), *M. torta* (Arbo0852), *C. sylvestris* (Arbo0854), *M. guianensis* (Arbo0856), *D. furfuracea* (Arbo0859) *E. klotzchiana* (Arbo0861). No eixo y, é representada a porcentagem de mosquitos nocauteados e no eixo x, o tempo em horas.

4.4. TESTE DE REPELÊNCIA ESPACIAL EM *Ae. aegypti*

Das seis amostras de óleos essenciais de plantas do Cerrado testadas na concentração de 1% quanto a sua atividade de repelência espacial, três promoveram a repelência das fêmeas de *Ae. aegypti*. O repelente mais potente foi o óleo essencial das folhas de *E. dysenterica* (Arbo0846A) apresentando SAI igual a 0,74 e wSAI igual a 20,23, seguida por *B. salicifolius* (SAI = 0,61; wSAI = 14,80) e *M. torta* (SAI = 0,59; wSAI = 8,80). As amostras dos óleos essenciais de *C. adamantium*, *P. ovatum* e *X. aromatica* não apresentaram atividade de repelência espacial quando testados na concentração de 1%. Linalol, à 10%, foi utilizado como controle positivo com valor de SAI igual a 0,87 e wSAI igual a 36,88. Os resultados podem ser observados na **Tabela 7**.

Tabela 7. Resultados da atividade repelente espacial de amostras de óleos essenciais de plantas do Cerrado em *Ae. aegypti*.

^a AMOSTRA	^b replicatas (mosq.)	^c PERESP ± ^d EP	^e SAI ± ^d EP	^f P > S (SAI)	^g wSAI ± ^d EP	^h P > S (wSAI)
Arbo0845	9 (182)	8,70 ± 2,54	0,48 ± 0,24	0,125	6,42 ± 2,77	0,063
Arbo0846A	9 (182)	28,96 ± 5,45	0,74 ± 0,13	0,008	20,23 ± 5,36	0,012
Arbo0847	9 (175)	21,91 ± 4,87	0,61 ± 0,16	0,031	14,80 ± 4,60	0,031
Arbo0848	9 (179)	15,42 ± 2,37	0,24 ± 0,27	0,375	2,40 ± 3,53	0,203
Arbo0849A	9 (184)	29,01 ± 5,64	0,37 ± 0,24	0,164	13,78 ± 6,28	0,078
Arbo0851	9 (185)	26,46 ± 7,67	0,35 ± 0,25	0,238	7,79 ± 9,27	0,570
Arbo0852	9 (175)	21,19 ± 3,35	0,59 ± 0,18	0,023	8,80 ± 4,09	0,109

^aCódigo Arbo da amostra, de acordo com os critérios laboratoriais. ^bNúmero de replicatas seguido do número total de fêmeas utilizadas no teste entre parênteses. ^cValor do percentual de resposta. ^dErro padrão. ^eÍndice de atividade espacial (SAI). ^fValor de P referente ao teste não paramétrico de sinais para SAI. ^gSAI corrigido pelo PERESP. ^hValor de P referente ao teste não paramétrico de sinais para SAI.

O linalol foi escolhido como controle positivo por ser um repelente de origem natural (107) e demonstrou um maior efeito repelente quando comparado aos resultados das amostras testadas. Entretanto, deve-se considerar que o linalol é um composto puro, enquanto os óleos essenciais são uma complexa mistura de compostos. Além disso, o linalol foi testado em uma concentração 10 vezes maior que a concentração das amostras. Assim, nossos resultados corroboram com dados prévios de Estrada *et al.*, 2019, que demonstraram que a atividade biológica do linalol

é concentração dependente, uma vez que o óleo essencial de *C. adamantium* contém 5,3% de linalol em percentual relativo e não apresentou atividade repelente em *Ae. aegypti*. Provavelmente, o baixo percentual de linalol na amostra testada em baixa concentração (1%), juntamente com a mistura de outros compostos presentes no óleo de *C. adamantium* desfavoreceram a sua atividade repelente. As outras amostras testadas não apresentaram linalol entre seus compostos majoritários.

Apesar da sua boa atividade repelente em *Ae. aegypti*, o óleo de *E. dysenterica* (Arbo0846A) foi inativo em larvas de *Ae. aegypti* e apresentou porcentagem de nocaute de mosquitos abaixo de 80% após 4 h de exposição no teste de toxicidade. A amostra de *E. dysenterica* (Arbo0846A) foi a única a apresentar β -mirceno em uma porcentagem de 7,0% somado a outros 6 sesquiterpenos, com um total de 52,5 de percentual relativo. De acordo com a literatura, o óleo essencial de *Siparuna guianensis*, rico em β -mirceno, apresentou potencial efetivo como repelente em *Ae. aegypti* (140). Assim, a presença de β -mirceno em sua composição, provavelmente, auxiliou na atividade repelente da amostra testada. A composição de 37,6% de monoterpenos em *B. salicifolius* e 61,1% de sesquiterpenos em *M. torta* pode ter contribuído para a sua atividade repelente em *Ae. aegypti*.

Optou-se por testar as amostras de óleos essenciais na baixa concentração de 1% com o objetivo de dispensar no ambiente a menor quantidade de amostra possível. Em acréscimo, a mesma concentração de amostra foi utilizada no outro ensaio comportamental realizado neste trabalho em *Cx. quinquefasciatus*, *surface landing and feeding assay* com o intuito de se comparar os resultados de comportamento dos mosquitos. Os óleos essenciais de *E. dysenterica* e *B. salicifolius* apresentaram atividade repelente em ambos os vetores.

4.5. TESTE DE REPELÊNCIA EM *Cx. quinquefasciatus* – SURFACE LANDING AND FEEDING ASSAY

Das sete amostras de óleos essenciais testadas, quatro apresentaram um com Tempo de Proteção (TP) quando testadas a 1%. O TP é calculado pela seguinte fórmula:

$$TP = \left(1 - \frac{T}{C}\right) \times 100$$

em que: T é número de fêmeas que pousou no lado do aparato em que havia sido aplicado o tratamento e C é número de fêmeas que pousou no lado do aparato em que havia sido aplicado o controle.

O óleo essencial mais ativo foi o de *E. dysenterica* (Arbo0846A) com 71% de TP, seguido por *H. brasiliense* (Arbo0849A) com 70% de TP, *C. adamantium* com 61% de TP e *B. salicifolius* com 60% de TP. *Myrcia torta*, *P. ovatum* e *X. aromatica* apresentaram 35, 42 e 44% de TP, respectivamente. Os últimos três resultados, com TP abaixo de 50% não foram considerados significativamente relevantes para a atividade repelente em *Cx. quinquefasciatus*. Os resultados podem ser observados na **Fig. 21**.

O *surface landing and feeding assay*, conduzido com *Cx. quinquefasciatus*, permite uma avaliação da atividade repelente de uma determinada amostra na presença de sangue, temperatura aproximada de 36 °C e CO₂. Por outro lado, o teste de repelência espacial, conduzido com *Ae. aegypti*, permite a avaliação da atividade repelente intrínseca de uma amostra em um determinado ambiente. Considerando os diferentes princípios de cada teste, *E. dysenterica* (Arbo0846A) foi o óleo essencial com maior atividade repelente em ambos os testes. A literatura descreve um alto conteúdo de β-mirceno no óleo essencial de *Siparuna guianensis*, que também demonstrou atividade repelente em *Cx. quinquefasciatus* (140). O β-mirceno, juntamente com uma mistura de sesquiterpenos, identificados no óleo essencial de *E. dysenterica* (Arbo0846A) podem justificar a propriedade repelente desse óleo.

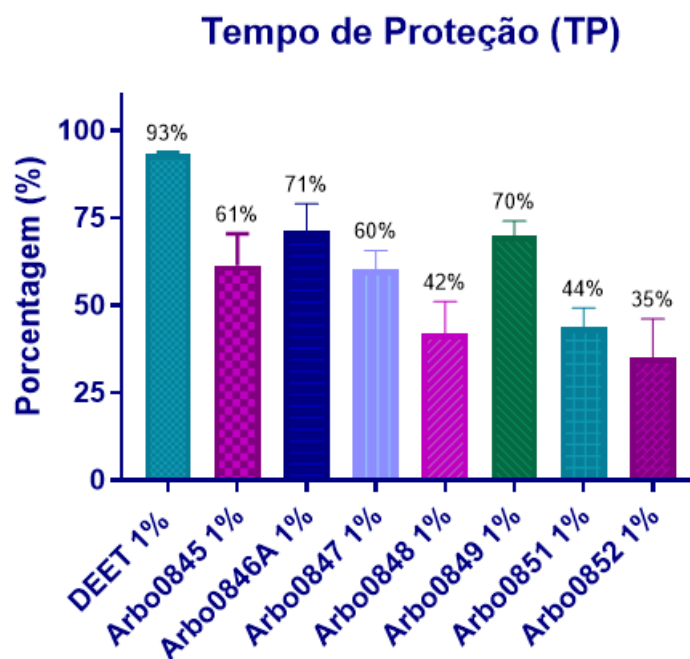


Figura 21. Representação gráfica dos resultados de *surface landing and feeding assay* em mosquitos adultos de *Cx. quinquefasciatus*. No eixo X estão dispostas as amostras de DEET juntamente com as espécies: *C. adamantium* (Arbo0845), *E. dysenterica* (Arbo0846A), *B. salicifolius* (Arbo0847), *P. ovatum* (Arbo0848), *H. brasiliense* (Arbo0849A), *X. aromatica* (Arbo0851) e *M. torta* (Arbo0852). No eixo y está representada a porcentagem do Tempo de Proteção (TP).

A amostra de *H. brasiliense* (Arbo0849A), com o segundo maior efeito repelente, é rica em carotol com percentual relativo de 41,2% e possui em sua composição o *p*-cimeno (5,0%), também identificado na amostra de *B. salicifolius*. O sesquiterpeno globulol é comum nas amostras das espécies *C. adamantium* e *B. salicifolius*. Em adição, uma mistura de *p*-cimeno, γ -terpineno e α -terpinoleno foi determinada no óleo de *B. salicifolius*. Enquanto, os monoterpenos α -pineno a 7,7%, β -pineno a 9,7% e limoneno a 21,1% foram identificados na amostra de *C. adamantium*. A interação do globulol com esses outros três compostos de cada espécie, possivelmente contribuiu para os valores de TP de 60% para *B. salicifolius* e 61% para *C. adamantium*.

O óleo essencial das folhas de *B. salicifolius* foi o único a apresentar resposta positiva em todos os testes biológicos conduzidos neste trabalho. Entende-se que esse é um resultado promissor, uma vez que, segundo a OMS, o controle do vetor deve ocorrer de maneira integrada, com foco tanto nas formas imaturas quanto na forma adulta dos mosquitos (11).

Em relação ao resultado obtido para o DEET de 93% de tempo de proteção, utilizado como controle positivo no *surface landing and feeding assay*, cabe ressaltar que se trata de um composto com 99% de pureza. Portanto, possui um número muito maior de moléculas ativas do que qualquer outro óleo essencial testado. Em contrapartida, os óleos essenciais são constituídos por uma mistura complexa de compostos e os ingredientes ativos encontram-se uma concentração, na maioria das vezes, abaixo de 50% do volume total da amostra. Assim, os resultados obtidos corroboram para o uso de óleos essenciais em baixas concentrações para o controle de vetores com relevância em saúde pública.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS – PARTE II

Os óleos essenciais são fontes promissoras para a pesquisa e o desenvolvimento de novos produtos inseticidas. Diversos estudos demonstraram sua atividade em insetos, além da sua segurança para os mamíferos e há evidências de que são degradados mais facilmente por mecanismos naturais do ecossistema (36). Nesse sentido, as investigações das atividades biológicas reportadas neste trabalho de doutorado são inovadoras para os óleos essenciais das folhas das espécies estudadas.

O óleo essencial de *B. salicifolius* foi o único a apresentar resposta positiva em todos os testes reportados, atendendo às diretrizes de controle integrado de vetores. O óleo essencial de *H. brasiliense* (Arbo0849B) foi o mais ativo em larvas de *Ae. aegypti* com CL_{50} de 11,2 $\mu\text{g/mL}$ em 24 h. Enquanto o óleo essencial extraído das folhas da mesma espécie, porém em épocas de colheita diferentes (Arbo0849A), foi o que apresentou maior toxicidade em mosquitos adultos de *Ae. aegypti*, apresentando 97,2% de mosquitos nocauteados ao final de 4 h de teste.




A amostra de *E. dysenterica* (Arbo0846A) foi inativa em larvas de *Ae. aegypti*. Enquanto amostras da mesma espécie (mesmo indivíduo) coletadas em datas diferentes, Arbo0846B e Arbo0846C, apresentaram CL_{50} em larvas de 37,4 e 47,2




$\mu\text{g/mL}$ em 24 h, respectivamente. Os valores de CL_{50} determinados para os óleos essenciais das demais espécies estudadas neste trabalho foram considerados promissores para o controle larvicida quando comparados a dados da literatura, uma vez que das 14 amostras de óleos essenciais testadas, seis apresentaram valores de CL_{50} entre 31,7 e 11,2 $\mu\text{g/mL}$ em 24 h.




No que diz respeito ao ensaio de toxicidade em *Ae. aegypti*, além de *H. brasiliense* (Arbo0849A), foram observadas as seguintes porcentagens de mosquitos nocauteados após 4 h de exposição: 93,8% para *C. adamantium*, 93,4% para *B. salicifolius*, 92,5% para *M. torta* e 87,2% para *X. aromatica*. Apesar de apresentar toxicidade abaixo de 50% em *Ae. aegypti*, *E. dysenterica* (Arbo0846A) apresentou a melhor atividade repelente tanto em *Ae. aegypti* (SAI 0,737; wSAI 20,229) quanto em *Cx. quinquefasciatus* (TP 71%). *B. salicifolius* (SAI 0,611; wSAI 14,804) e *M. torta* (SAI 0,586; wSAI 8,798) também foram repelentes em *Ae. aegypti*. Por outro lado, o mosquito *Cx. quinquefasciatus* também foi repelido pelos óleos essenciais das folhas de *C. adamantium* (TP 61%) e *B. salicifolius* (TP 60%). Na **tabela 8** podem ser observados os principais resultados obtidos no presente trabalho.



Levando-se em consideração todos os resultados obtidos, espera-se que a utilização de óleos essenciais e seus compostos majoritários, em baixas concentrações, sejam efetivos para o desenvolvimento de formulações sustentáveis de inseticidas, levando-se em consideração a recomendação da OMS de que o controle vetorial deve ocorrer de maneira integrada, com foco nas formas imatura e na forma adulta dos mosquitos.

Tabela 8. Resumo dos resultados obtidos a partir do estudo de óleos essenciais de plantas do Cerrado.

Código	Espécie	Larvicida CL ₅₀ e CL ₉₀ (µg/mL) 24 h; 48 h; 72 h	Adulticida <i>Ae. aegypti</i>	Repelente Espacial <i>Ae. aegypti</i>	Repelente <i>C. quinquefasciatus</i>
Arbo0845	<i>Campomanesia adamantium</i> 	CL ₅₀ = 18; 17,4; 16,9 CL ₉₀ = 28,2; 27,8; 27,2	93,8% em 4 h	Inativo	61% de tempo de proteção
Arbo0846A	<i>Eugenia dysenterica</i> 	Inativo	Inativo	SAI = 0,74 ± 0,13 wSAI = 20,23 ± 5,36	71% de tempo de proteção
Arbo0846B		CL ₅₀ = 37,4; 34,6; 34,0 CL ₉₀ = 50,0; 48,2; 48,2	Não testado	Não testado	Não testado
Arbo0846C		CL ₅₀ = 47,2; 45,3; 43,1 CL ₉₀ = 80,2; 74,8; 80,0	Não testado	Não testado	Não testado
Arbo0847	<i>Blepharocalyx salicifolius</i> 	CL ₅₀ = 24,1; 23,5; 22,9 CL ₉₀ = 36,9; 36,7; 36,2	93,4% em 4 h	SAI = 0,61 ± 0,16 wSAI = 14,80 ± 4,60	60% de tempo de proteção

Código	Espécie	Larvicida CL₅₀ e CL₉₀ (µg/mL) 24 h; 48 h; 72 h	Adulticida <i>Ae. aegypti</i>	Repelente Espacial <i>Ae. aegypti</i>	Repelente <i>C. quinquefasciatus</i>
Arbo0849A	<i>Hedyosmun brasiliense</i> 	Não testado	97,2% em 4 h	Inativo	70% de tempo de proteção
Arbo0849B		CL ₅₀ = 11,2; 11,1; 10,6 CL ₉₀ = 17,9; 17,5; 17,3	Não testado	Não testado	Não testado
Arbo0850	<i>Psidium laruotteanum</i> 	CL ₅₀ = 67,2; 62,8; 60,2 CL ₉₀ = 132,8; 115,1; 109,3	Inativo	Não testado	Não testado
Arbo0851	<i>Xylopia aromatica</i> 	CL ₅₀ = 12,1; 12,1; 12,1 CL ₉₀ = 19,6; 19,5; 19,5	87,2% em 4 h	Inativo	Inativo

Código	Espécie	Larvicida CL ₅₀ e CL ₉₀ (µg/mL) 24 h; 48 h; 72 h	Adulticida <i>Ae. aegypti</i>	Repelente Espacial <i>Ae. aegypti</i>	Repelente <i>C. quinquefasciatus</i>
Arbo0852	<i>Myrcia torta</i> 	CL ₅₀ = 17,9; 17,6; 16,9 CL ₉₀ = 28,4; 27,6; 26,2	92,5% em 4 h	SAI = 0,59 ± 0,18 wSAI = 8,80 ± 4,09	Inativo
Arbo0854	<i>Casearia sylvestris</i> 	CL ₅₀ = 135,1; 121,6; 116,0 CL ₉₀ > 250	Inativo	Não testado	Não testado
Arbo0856	<i>Myrsine guianensis</i> 	Inativo	Inativo	Não testado	Não testado

Código	Espécie	Larvicida CL₅₀ e CL₉₀ (µg/mL) 24 h; 48 h; 72 h	Adulticida <i>Ae. aegypti</i>	Repelente Espacial <i>Ae. aegypti</i>	Repelente <i>C. quinquefasciatus</i>
Arbo0859	<i>Duguetia furfuracea</i> 	CL ₅₀ = 113,9; 105,4; 100,7 CL ₉₀ = 243,0; 224,9; 214,7	91,7% em 4 h	Não testado	Não testado
Arbo0861	<i>Eugenia klotzschiana</i> 	Inativo	Inativo	Não testado	Não testado

CONCLUSÃO

O presente estudo teve como ponto de partida a investigação da atividade larvicida, em *Ae. aegypti*, do Banco de Extratos de Plantas do bioma Cerrado do Laboratório de Farmacognosia/UnB. A partir dessa triagem, optou-se por continuar a análise biológica e química do extrato acetato de etila da madeira da raiz de *C. suberosus*, o que levou ao isolamento de três quinonas suberonona: (1), rapanona (2), embelina (3) e do glicosídeo bergenina (32), sendo o primeiro relato do isolamento e atividade larvicida desses compostos a partir de tal extrato.

Devido ao potencial larvicida da quinona embelina (3), que apresentou CL_{50} de 23,5 $\mu\text{g/mL}$ em 24 h, foram avaliadas as atividades larvicida e pupicida, em *Ae. aegypti*, de mais 30 derivados de quinonas de fontes natural e comercial. Oito compostos apresentaram porcentagem de mortalidade em larvas do 3º estágio de *Ae. aegypti* acima de 80% a 25 $\mu\text{g/mL}$ após 48 h de exposição. A tectoquinona (4) foi a mais potente (CL_{50} 1,1 $\mu\text{g/mL}$) dentre as 28 quinonas de fontes comerciais. As propriedades da tectoquinona destacam sua adequação como candidata para o desenvolvimento de um protótipo larvicida, ou seja, o baixo valor de CL_{50} e a manutenção da mortalidade larval de 100% durante 5 dias. Destaca-se que de acordo com as informações do banco de dados da *European Chemicals Agency* (ECHA) não há evidência de sua bioacumulação na cadeia alimentar ou persistência no solo. Além de a tectoquinona ter apresentado resultados de toxicidade em modelo peixe zebra em concentrações bem acima da CL_{50} em larvas de *Ae. aegypti*. Em acréscimo, a tectoquinona pode ser obtida de fontes naturais como o extrato metanólico da madeira de *Cryptomeria japonica* (79) ou facilmente adquirida no mercado em sua forma isolada.

Em seguida, em conformidade com as diretrizes da OMS de que o controle de vetores deve ser realizado de maneira integrada, com foco tanto nas formas imaturas quanto adulta, foi realizada a investigação da atividade biológica em adultos de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, esse último com menor representatividade nas questões de saúde pública no Brasil, porém com potencial de ser carreador do Zika vírus e o principal vetor da filariose em algumas regiões brasileiras. Assim, optou-se

por trabalhar com amostras voláteis, tendo em vista a pesquisa das atividades repelentes.

Foram investigadas as atividades larvicida, repelente e a toxicidade de óleos essenciais extraídos de 13 diferentes espécies de plantas do Cerrado, sendo a investigação das atividades biológicas, reportadas neste trabalho, novas para os óleos essenciais estudados. Como as folhas de *C. suberosus* não atenderam aos critérios estabelecidos nesta pesquisa para a extração de óleos essenciais, os esforços foram direcionados para a coleta de outras espécies. Ressalta-se que o óleo essencial de *B. salicifolius* foi o único a apresentar resposta positiva em todos os testes reportados, sendo um excelente candidato para o desenvolvimento de um protótipo larvicida, considerando o controle integrado do vetor *Ae. aegypti*.

O óleo essencial de *H. brasiliense* (Arbo0849B) foi o mais ativo em larvas de *Ae. aegypti* com CL_{50} de 11,2 $\mu\text{g/mL}$ em 24 h. Enquanto o óleo essencial extraído das folhas da mesma espécie, porém em épocas de colheita diferentes (Arbo0849A), foi o que apresentou maior toxicidade em mosquitos adultos de *Ae. aegypti*, apresentando 97,2% de mosquitos nocauteados ao final de 4 h de teste. No que diz respeito aos ensaios de repelência, o óleo essencial de *E. dysenterica* (Arbo0846A) apresentou a melhor atividade repelente tanto em *Ae. aegypti* (SAI 0,737; wSAI 20,229) quanto em *Cx. quinquefasciatus* (TP 71%). A *E. dysenterica*, também conhecida como cagaita, pertence à família Myrtaceae conhecida por apresentar uma grande variedade de espécies frutíferas com relevante potencial econômico, grande valor nutricional e fontes de compostos químicos, incluindo fenólicos, carotenóides (92). Na região Centro-Oeste, existe o cultivo sustentável dessas espécie por produtores de polpas, picolés, geleias, entre outros produtos do fruto da cagaita (141), sendo possível um contato com esses produtores para a obtenção das folhas de *E. dysenterica* em determinadas épocas do ano.

Levando-se em consideração todos os resultados obtidos, espera-se que a utilização de óleos essenciais e seus compostos majoritários, em baixas concentrações, sejam efetivos para o desenvolvimento de formulações sustentáveis de inseticidas. Por fim, nossos resultados corroboram com a aplicabilidade tecnológica de quinonas e de óleos essenciais no controle de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, demonstrando a potencialidade do bioma Cerrado brasileiro na identificação de novas moléculas para o controle vetorial.

Anexos – Parte I

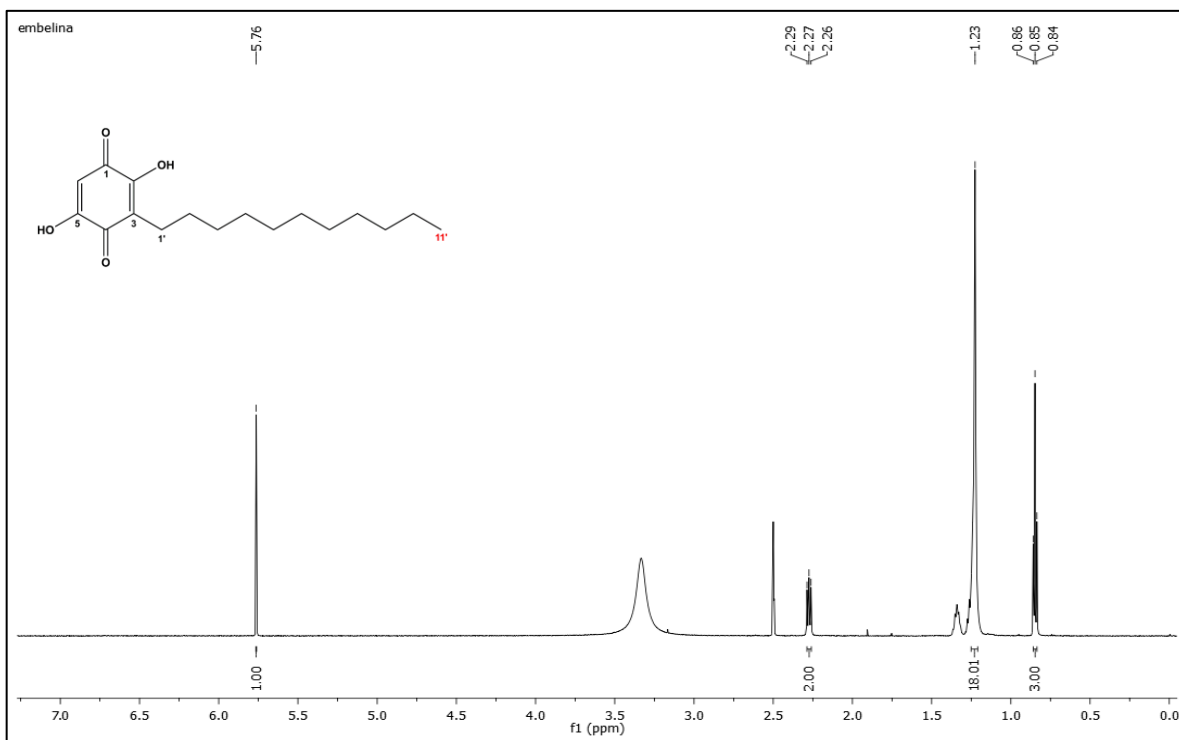


Figura AI-1: Espectro de RMN de ^1H da embelina (3) (DMSO-*d*₆; 600 MHz).

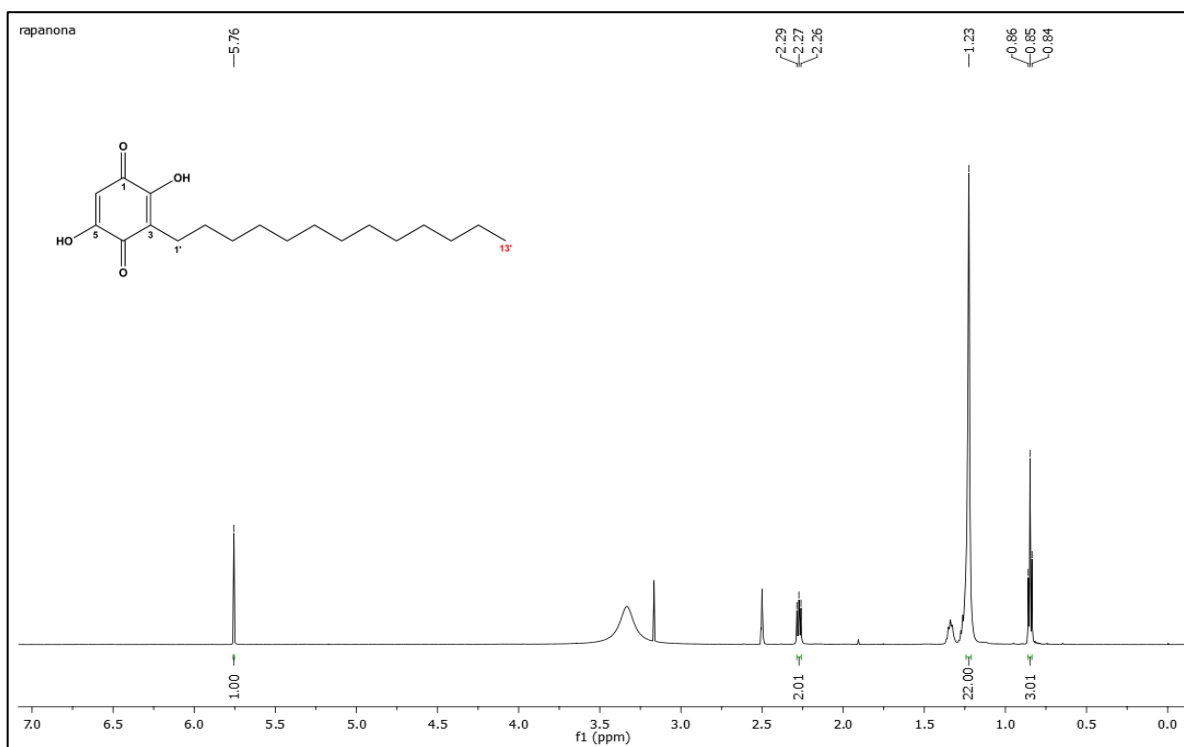


Figura AI-2: Espectro de RMN de ^1H da rapanona (2) (DMSO-*d*₆; 600 MHz).

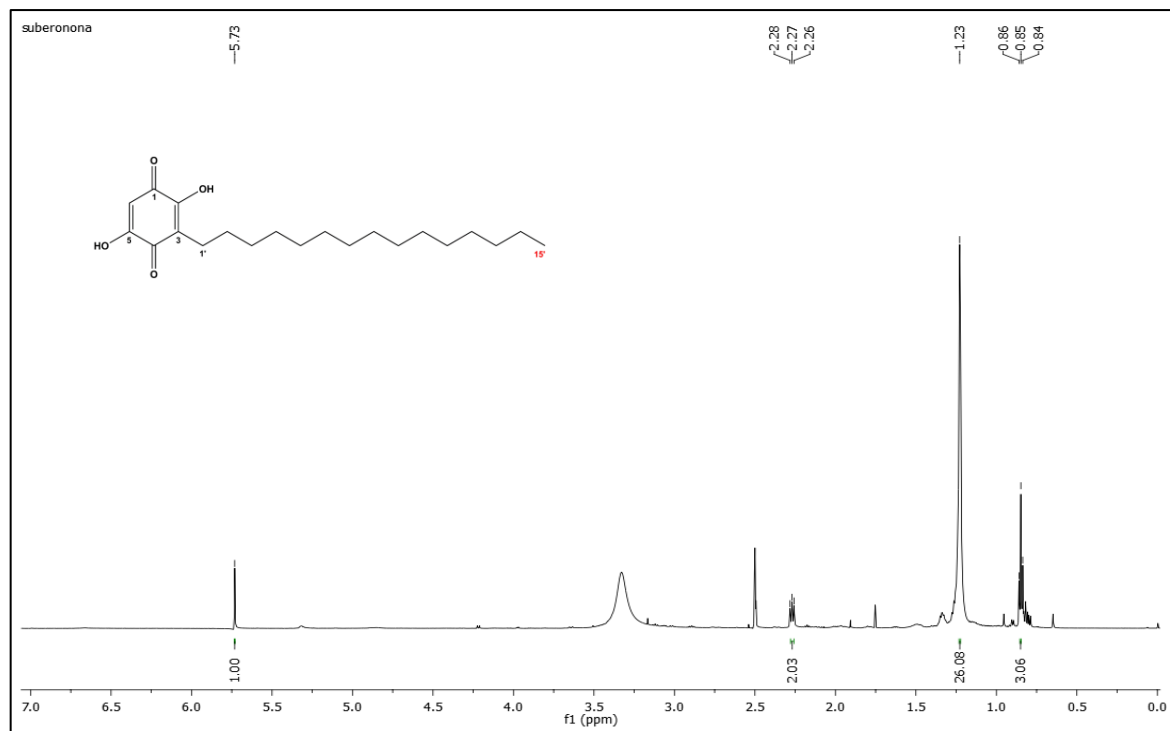


Figura AI-3: Espectro de RMN de ^1H da suberonona (1) (DMSO-*d*₆; 600 MHz).

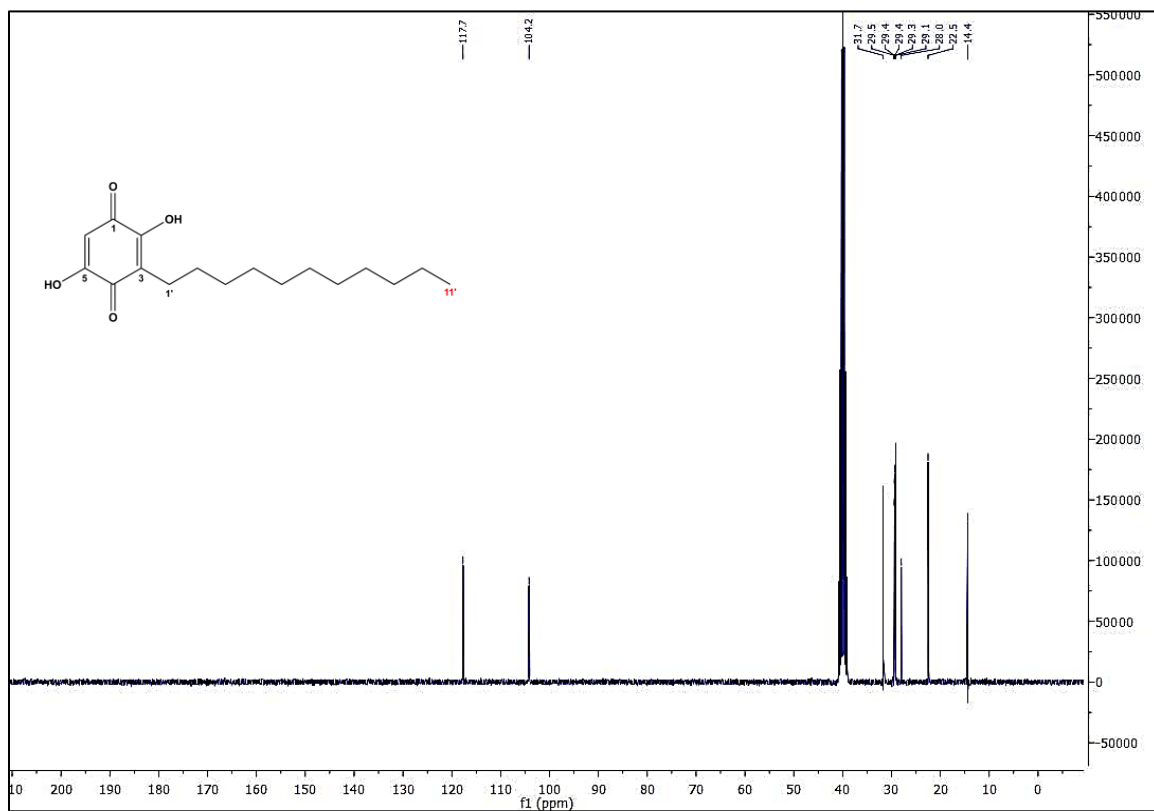


Figura AI-4. Espectro de RMN de ^{13}C da embelina (3) (DMSO-*d*₆; 75 MHz).

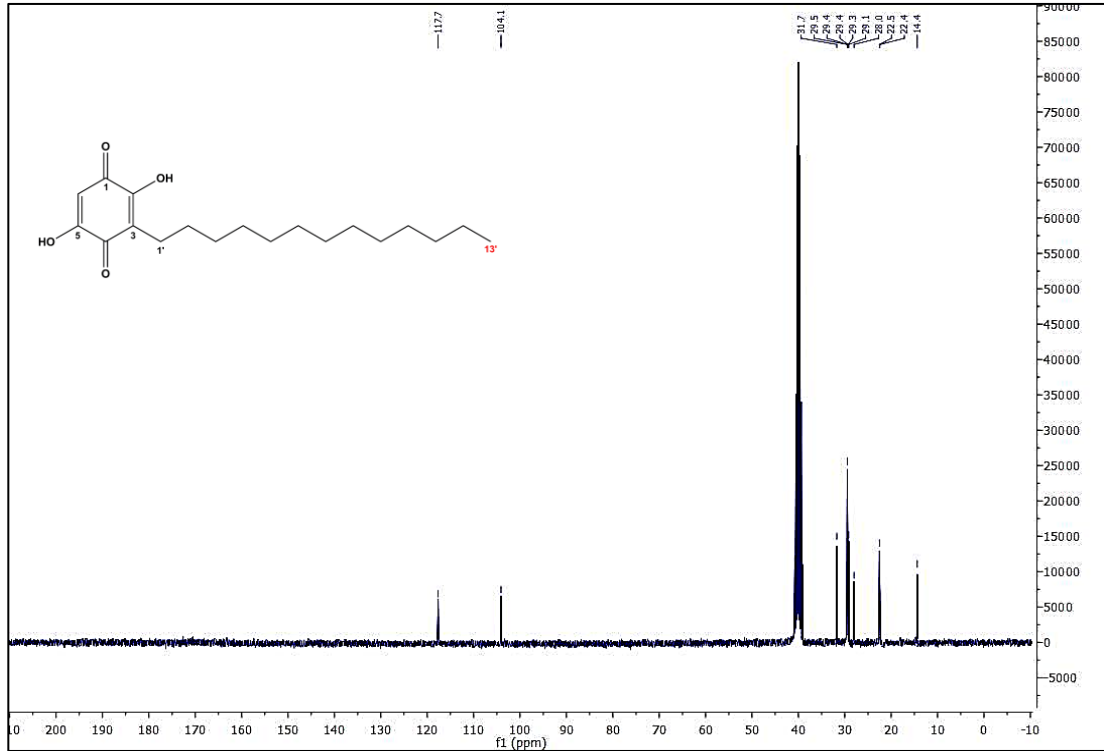


Figura AI-5. Espectro de RMN de ¹³C da rapanona (2) (DMSO-*d*₆; 75 MHz).

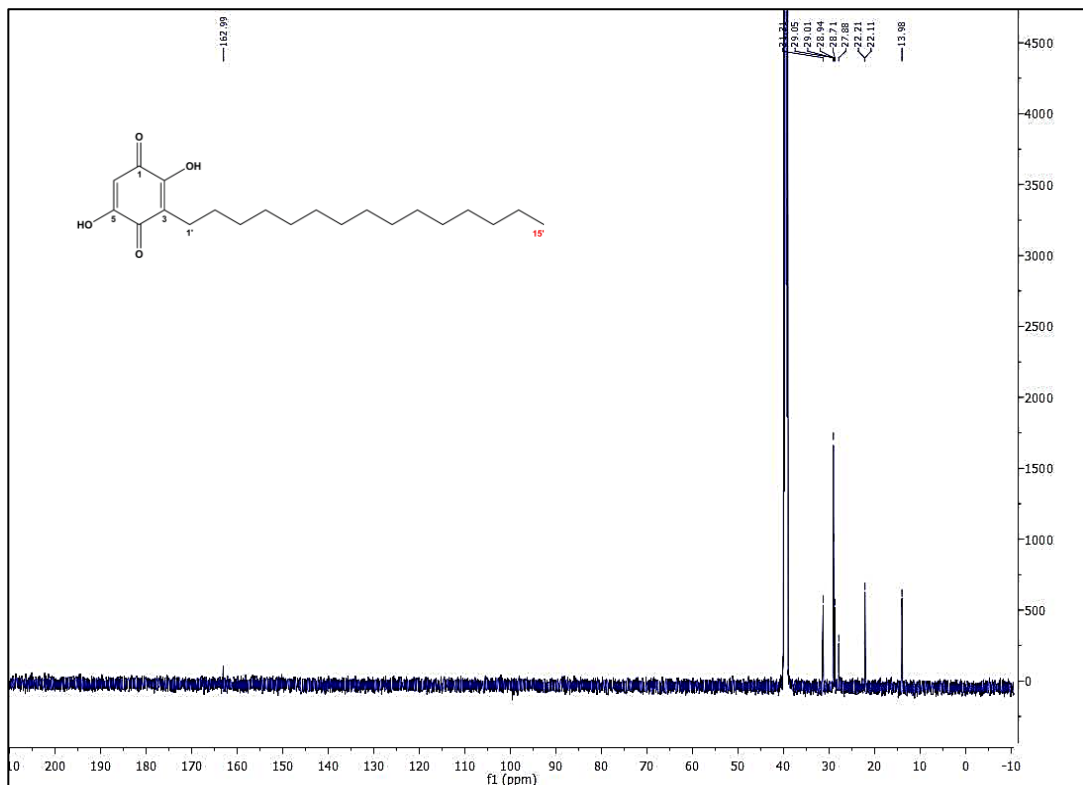


Figura AI-6. Espectro de RMN de ¹³C da suberonona (1) (DMSO-*d*₆; 75 MHz).

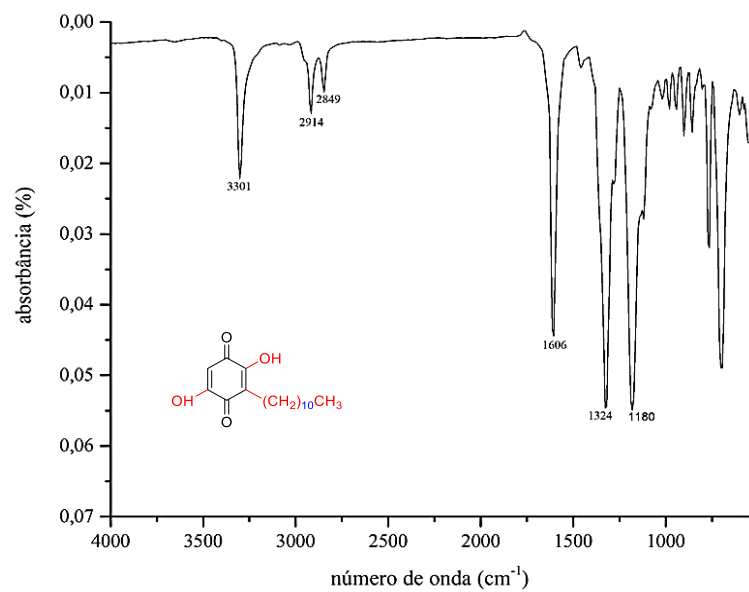


Figura AI-7. Espectro de infravermelho da embelina (**3**) com sinal correspondente à carbonila em 1606 cm⁻¹.

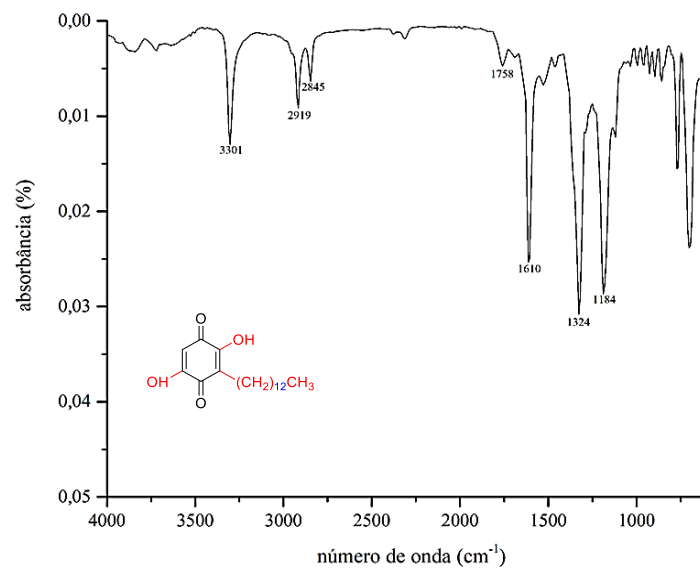


Figura AI-8. Espectro de infravermelho da rapanona (**2**) com sinal correspondente à carbonila em 1610 cm⁻¹.

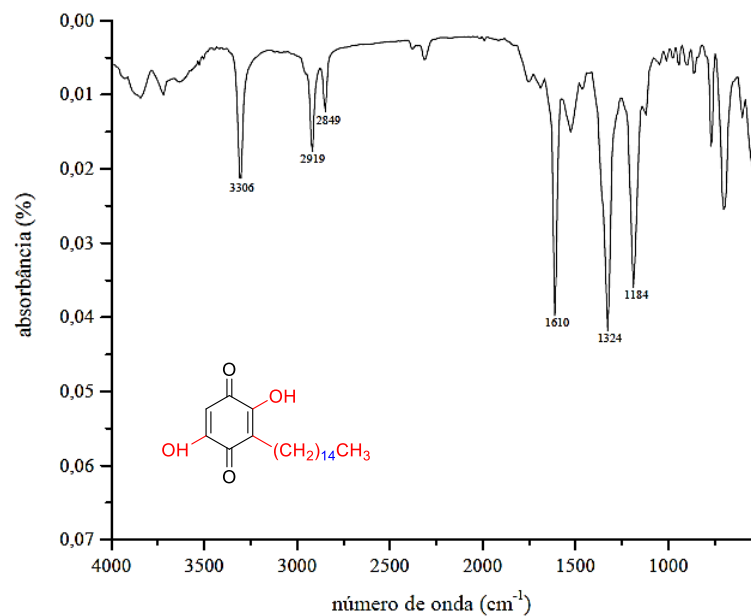


Figura A1-9. Espectro de infravermelho da suberonona (**1**) com sinal correspondente à carbonila em 1610 cm⁻¹.

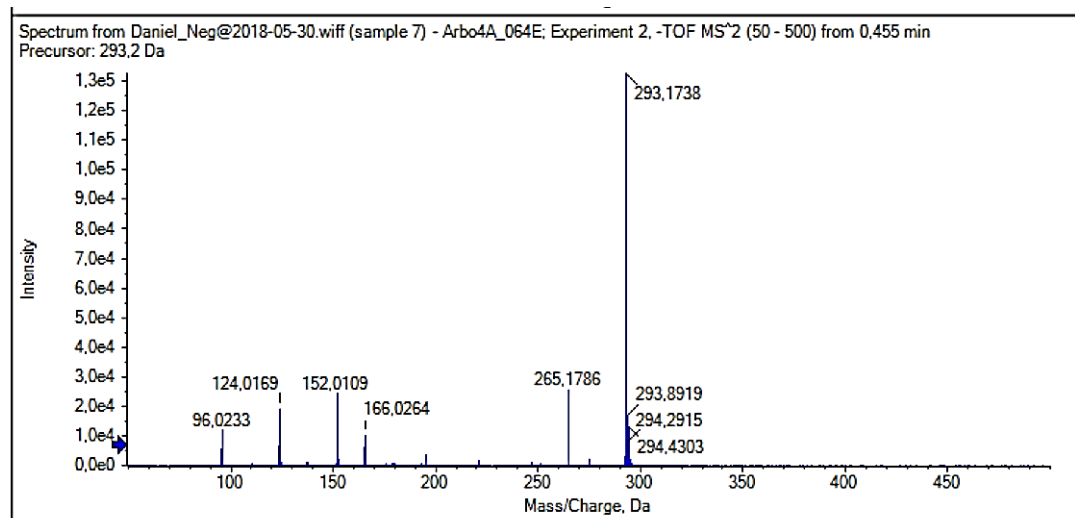


Figura A1-10. Espectro de massas da embelina (**3**) com m/z 293,1738 [M-H]⁻ calculado para C₁₇H₂₅O₄.

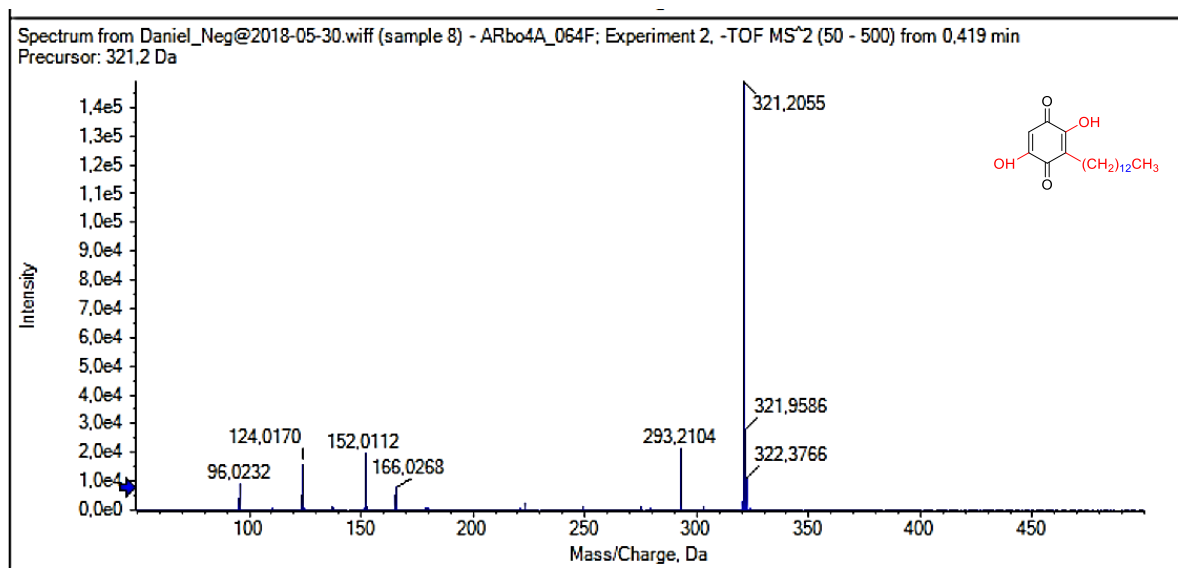


Figura A-11. Espectro de massas da rapanona (**2**), com m/z 321,2025 $[M-H]^-$ calculado para $C_{19}H_{29}O_4$.

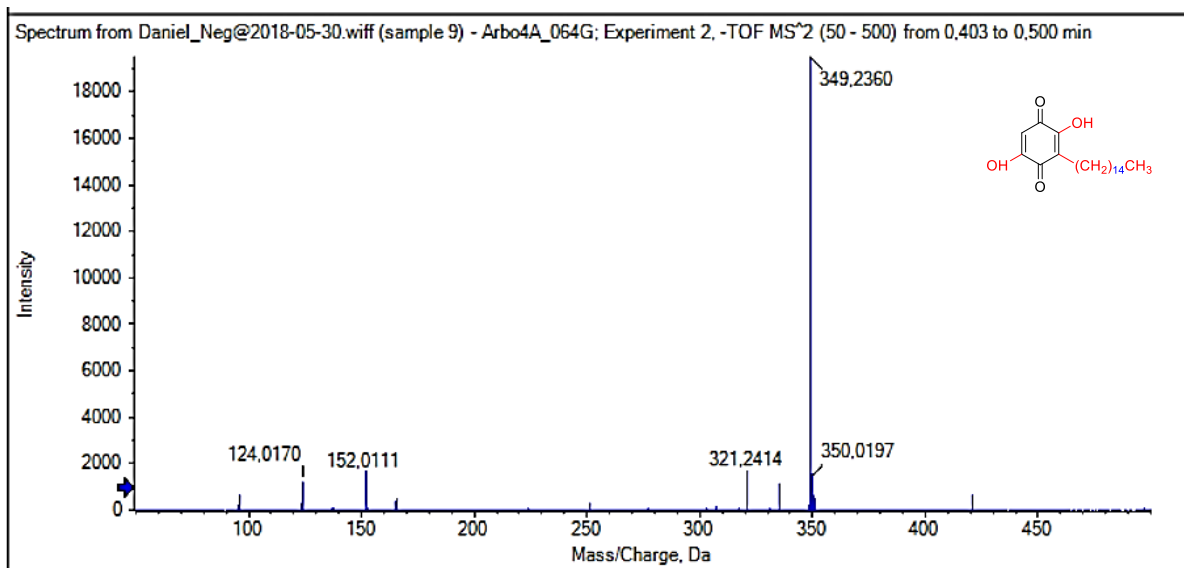


Figura A-12. Espectro de Massas da suberonona (**1**) com m/z 349,2360 $[M-H]^-$ calculado para $C_{21}H_{33}O_4$.

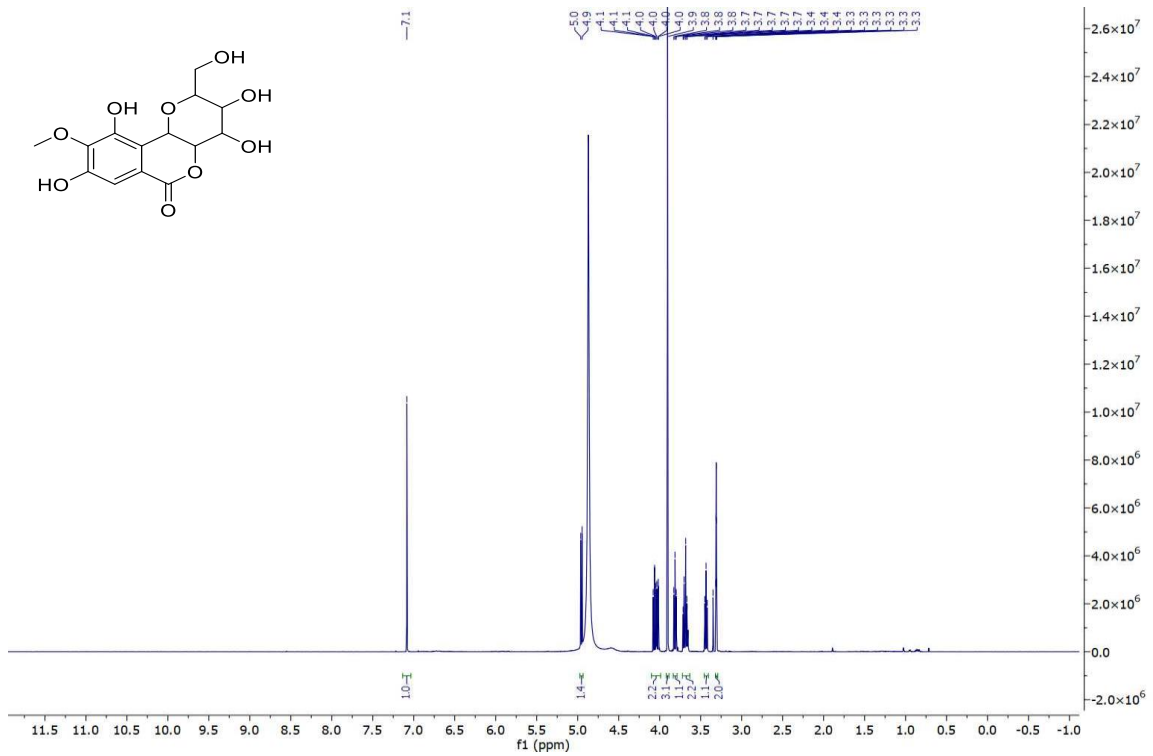


Figura AI-13. Espectro de RMN ¹H (600 Mz) bergenia (32) em CD₃OD.

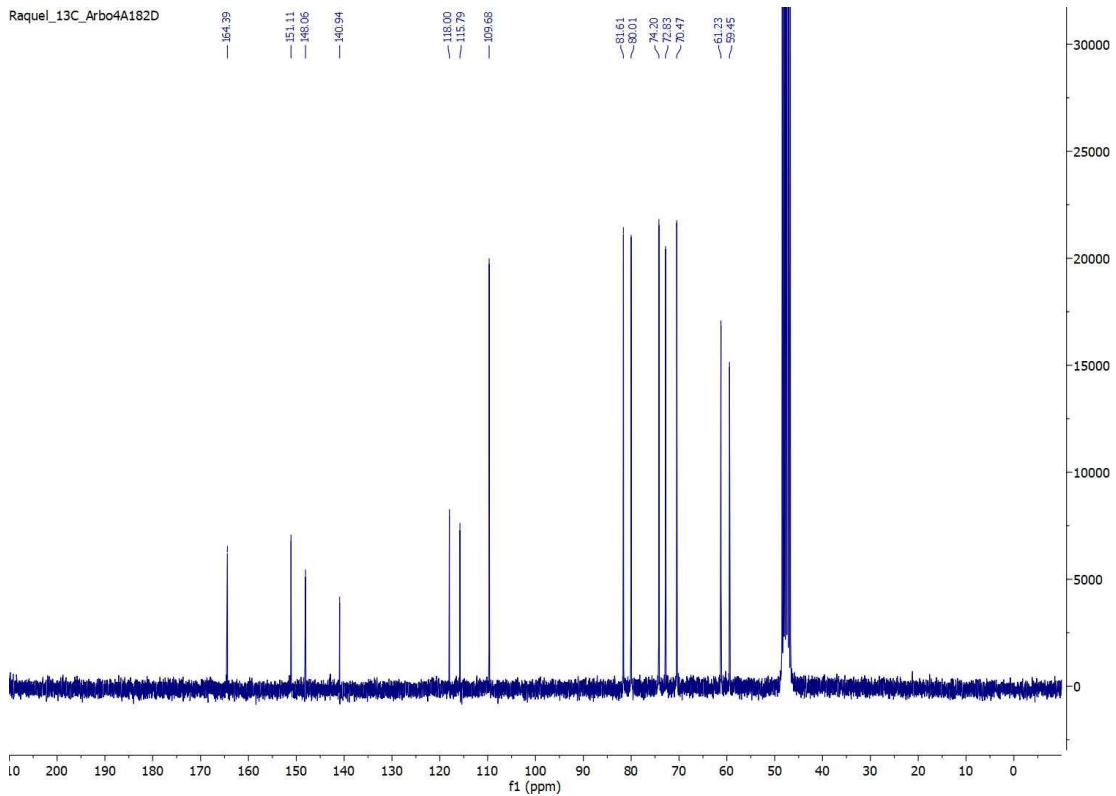


Figura AI-14. Espectro de RMN ¹³C (300 Mz) bergenia (32) em MeOD.

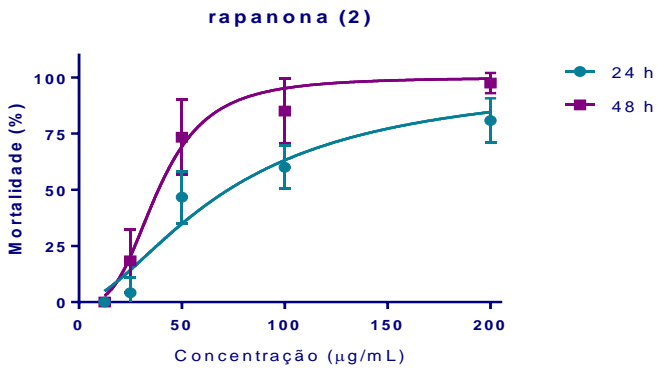


Figura AI-15. Gráfico referente à CL₅₀ rapanona (2)

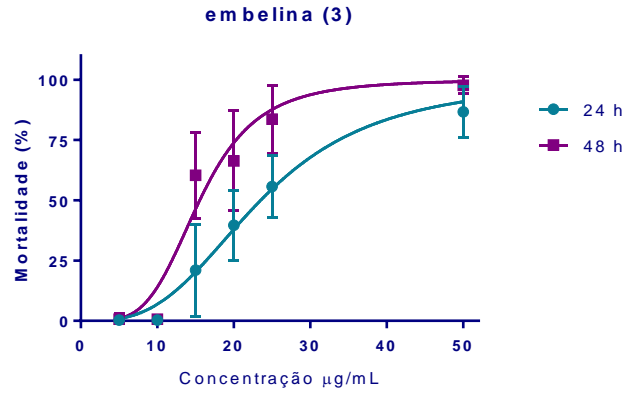


Figura AI-16. Gráfico referente à CL₅₀ embelina (3)

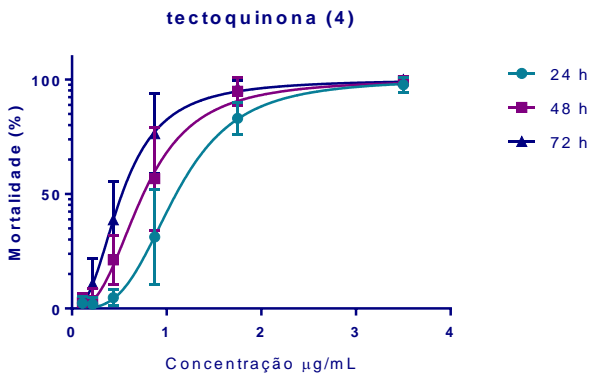


Figura AI-17. Gráfico referente à CL₅₀ tectoquinona (4).

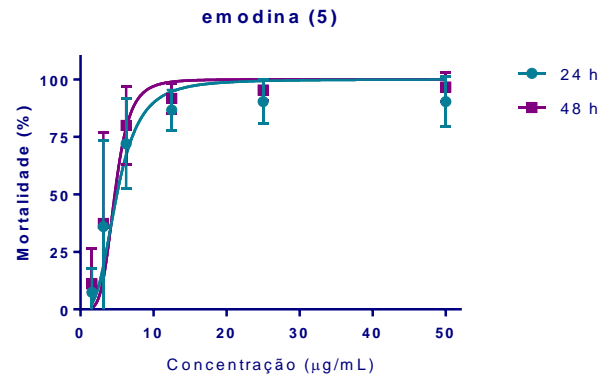


Figura AI-18. Gráfico referente à CL₅₀ emodina (5).

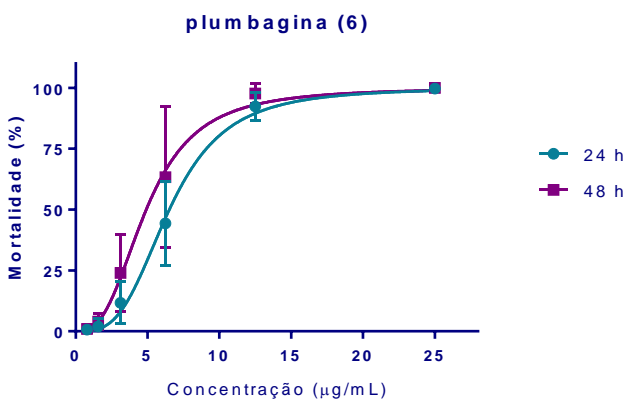


Figura AI-19. Gráfico referente à CL₅₀ plumbagina (6).

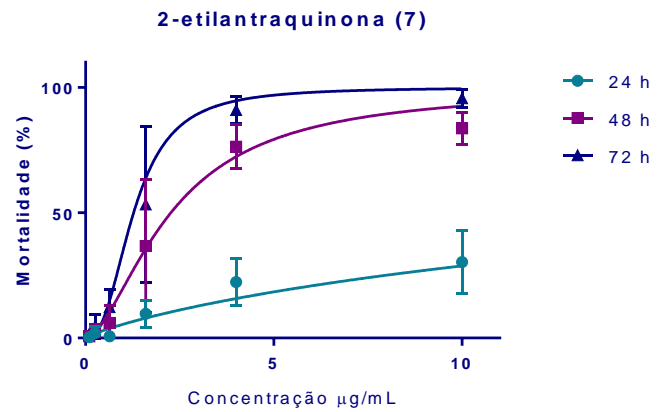


Figura AI-20. Gráfico referente à CL₅₀ 2-etilntraquinona (7).

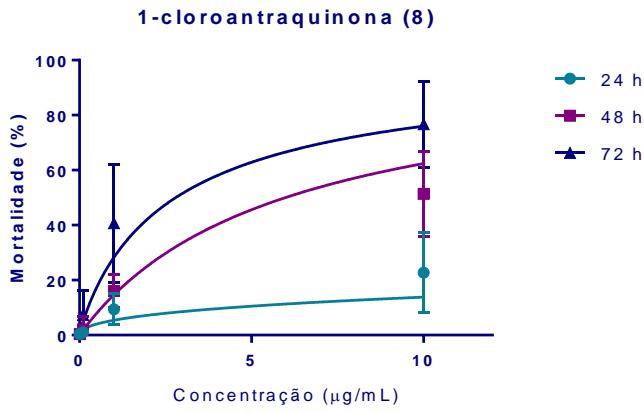


Figura AI-21. Gráfico referente à CL₅₀ 1-cloroantraquinona (8).

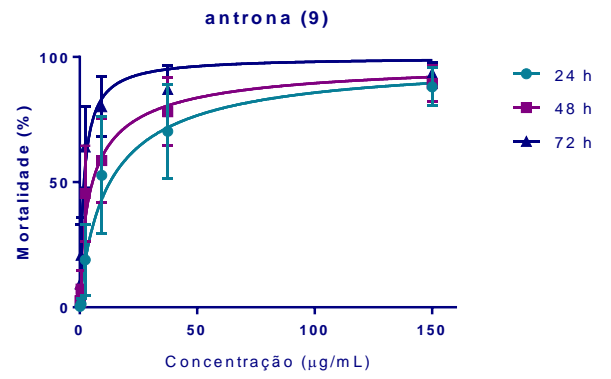


Figura AI-22. Gráfico referente à CL₅₀ antrona (9).

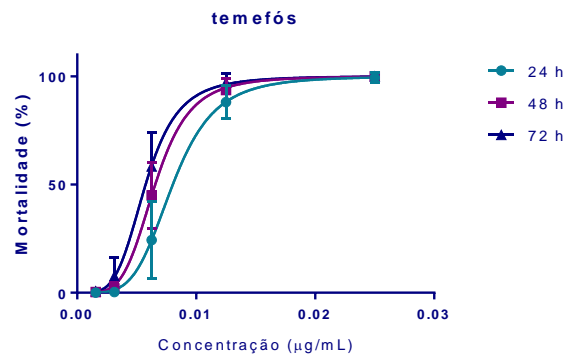


Figura AI-23. Gráfico referente à CL₅₀ temefós.

Tabela AI-1. Dados adicionais dos derivados de quinonas.

Nº Artigo	Nome comum	Nome químico (IUPAC)	Massa molecular (g/mol)
1	suberonona	2,5-diidroxi-3-entadecilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona	349,2
2	rapanona	2,5-diidroxi-3-tridecilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona	322,4
3	embelina	2,5-diidroxi-3-undecilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona	294,4
4	tectoquinona	2-metilantraceno-9,10-diona	222,24
5	emodina	1,3,8-triidroxi-6-metilantraceno-9,10-diona	270,24
6	plumbagina	5-hidroxi-2-metilnaftaleno-1,4-diona	188,18
7	2-etilantraquinona	2-etilantraceno-9,10-diona	236,26
8	1-cloroantraquinona	1-cloroantraceno-9,10-diona	242,658
9	antrona	10 <i>H</i> -antraceno-9-ona	194,23
10	-	2-(4-piridil)-1 <i>H</i> -antra[1,2 <i>d</i>]imidazol-6,11-diona	325,33
11	crisolamina	1,4-diaminoantraceno-9,10-diona	238,246
12	ácido 2-carboxiantraquinona	Ácido 9,10-dioxoantraceno-2-carboxílico	252,22
13	4,5-dinitrocrisazina	1,8-diidroxi-4,5-dinitroantraceno-9,10-diona	330,21
14	1-aminoantraquinona	1-aminoantraceno-9,10-diona	223,23
15	5,7,12,14-pentacenotetrona	pentaceno-5,7,12,14-tetrona	338,318
16	antrarufina	1,5-diidroxi-antraceno-9,10-diona	240,21
17	smoke red f	1,5-diaminoantraceno-9,10-diona	238,24
18	antraquinone	Antraceno-9,10-diona	208,216
19	Ácido bromamínico	Ácido 1-amino-4-bromo-9,10-dioxoantraceno-2-sulfônico	382,184
20	2-fenilantraquinona	2-fenylantraceno-9,10-diona	284,3
21	alizarina	1,2-diidroxi-antraceno-9,10-diona	240,21
22	quinizarina	1,4-diidroxi-antraceno-9,10-diona	240,214
23	reína	Ácido 4,5-diidroxi-9,10-dioxoantraceno-2-carboxílico	284,223
24	calcosyn pink b	1-amino-4-hidroxiantraceno-9,10-diona	239,23
25	2-aminoantraquinona	2-aminoantraceno-9,10-diona	223,23
26	antraquinona-2-sulfonato de sódio	9,10-dioxoantraceno-2-sulfonato de sódio	310,26
27	dibromoaminoantraquinona	1-amino-2,4-dibromoantraceno-9,10-diona	381,02
28	disperse blue 14	1,4-bis(metilamino)antraceno-9,10-diona	266,3
29	1,8-dicloroantraquinona	1,8-dicloroantraceno-9,10-diona	277,1
30	1,5-dicloroantraquinona	1,5-dicloroantraceno-9,10-diona	277,1
31	diacereína	Ácido 4,5-diacetiloxi-9,10-dioxoantraceno-2-carboxílico	368,3

Anexos - Parte II

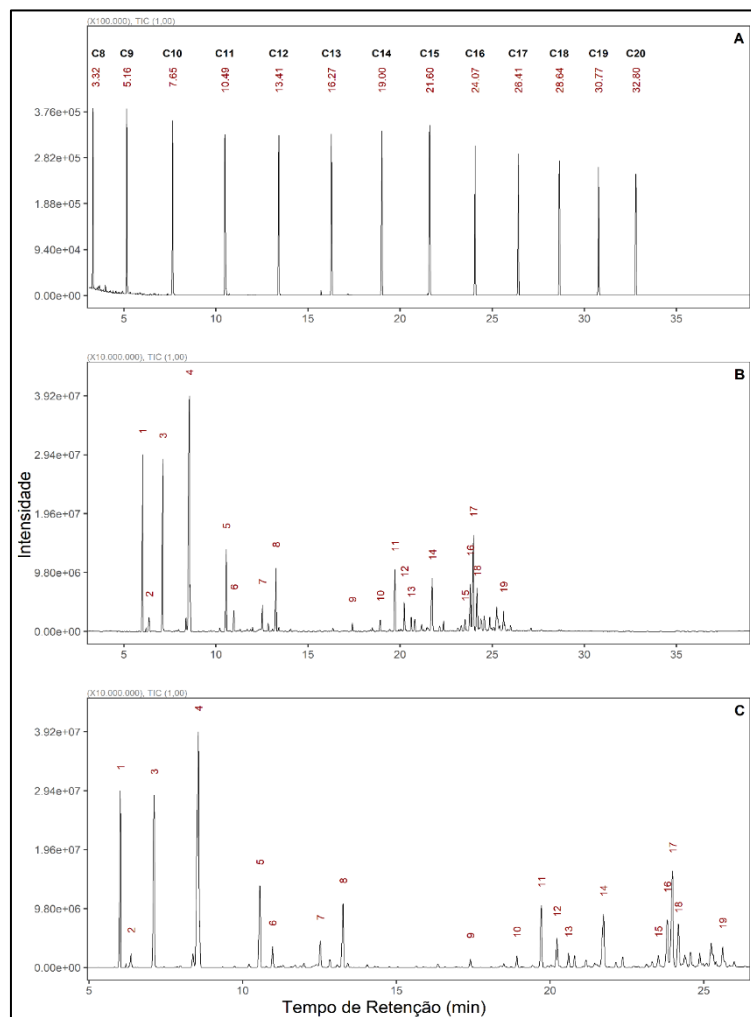


Figura AII-1: Perfis cromatográficos por CG-EM. **A)** Série homogênea de hidrocarbonetos C₈-C₂₀. **B)** Amostra Arbo0845, óleo essencial de *C. adamantium*. **C)** Expansão de **B**. A numeração de cada pico corresponde ao estudo de identificação tabelado.

Tabela AII-1. Dados para identificação de voláteis por CG-EM a partir da amostra Arbo0845. Óleo essencial das folhas frescas de *C. adamantium*.

Nº	Compostos identificados	TR	IKc	IKp	IS (%)	PM	F. molecular	(%)
1	α -Pineno	6,0	935	935	97	136	C ₁₀ H ₁₆	7,74
2	Canfeno	6,4	949	948	96	136	C ₁₀ H ₁₆	0,84
3	β -Pineno	7,1	979	977	98	136	C ₁₀ H ₁₆	9,69
4	Limoneno	8,6	1032	1031	97	136	C ₁₀ H ₁₆	21,06
5	Linalool	10,6	1102	1103	97	154	C ₁₀ H ₁₈ O	5,30
6	Fenchol	11,0	1117	1117	96	154	C ₁₀ H ₁₈ O	1,18
7	Borneol	12,5	1170	1173	97	154	C ₁₀ H ₁₈ O	1,73
8	α -Terpineol	13,3	1195	1195	98	154	C ₁₀ H ₁₈ O	4,28
9	Bicicloelemeno	17,4	1342	1336	91	204	C ₁₅ H ₂₄	0,54
10	β -Elemeno	18,9	1397	1396	94	204	C ₁₅ H ₂₄	0,70
11	β -Cariofileno	19,7	1427	1428	97	204	C ₁₅ H ₂₄	3,89
12	Aromadendreno	20,2	1447	1447	95	204	C ₁₅ H ₂₄	1,96
13	α -Humuleno	20,6	1462	1462	96	204	C ₁₅ H ₂₄	0,90
14	Biciclogermacreno	21,7	1506	1500	96	204	C ₁₅ H ₂₄	5,14
15	Epiglobulol	23,5	1578	1576	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	1,07
16	Espatulol	23,8	1590	1585	94	220	C ₁₅ H ₂₄ O	3,85
17	Globulol	24,0	1596	1580	94	222	C ₁₅ H ₂₆ O	8,42
18	1 <i>H</i> -Cicloprop(<i>E</i>)Azulenol-4	24,2	1604	1600	91	222	C ₁₅ H ₂₆ O	3,72
19	α -Cadinol	25,6	1666	1662	94	222	C ₁₅ H ₂₆ O	1,60
Monoterpenos								39,33
Monoterpenos oxigenados								12,49
Sesquiterpenos								13,13
Sesquiterpenos oxigenados								18,66
Total de compostos identificados								83,61

Nº = Numeração de cada pico no cromatograma; TR = tempo de retenção, min.; IKc = Índice de Kovats calculado; IKp = Índice de Kovats publicado (1-Adams R. P. 2007; 2-*Pherobase*; 3-*NIST*; 4-*PubChem*); IS = Índice de similaridade espectral; PM = peso molecular; F = Fórmula; (%) = percentual relativo.

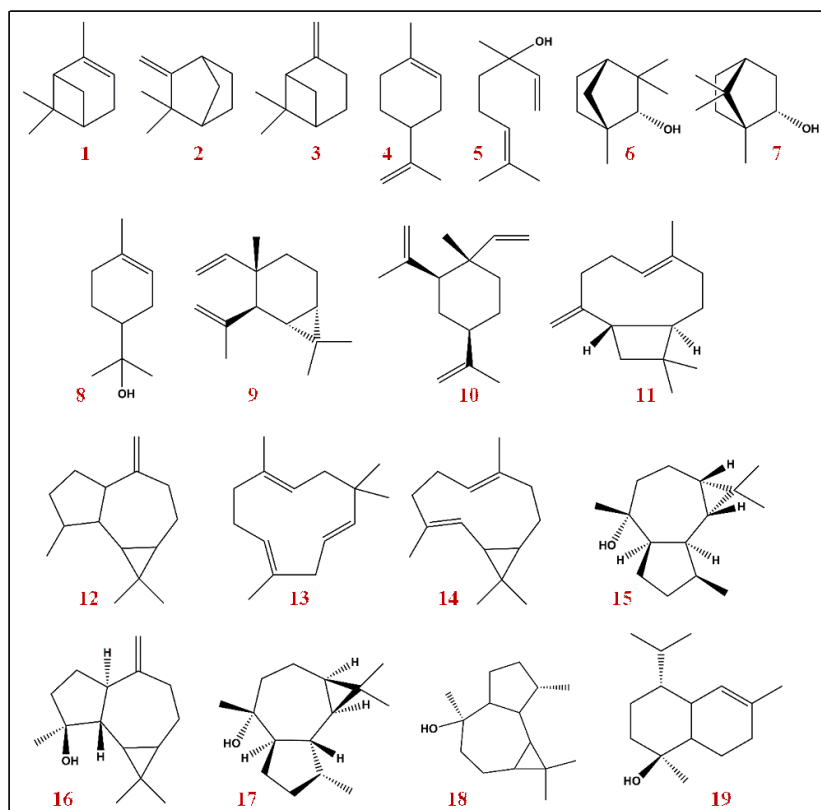


Figura AII-2: Estruturas químicas dos compostos identificados a partir da amostra Arbo0845. Óleo essencial de *C. adamantium*. A numeração segue conforme tabela identificação.

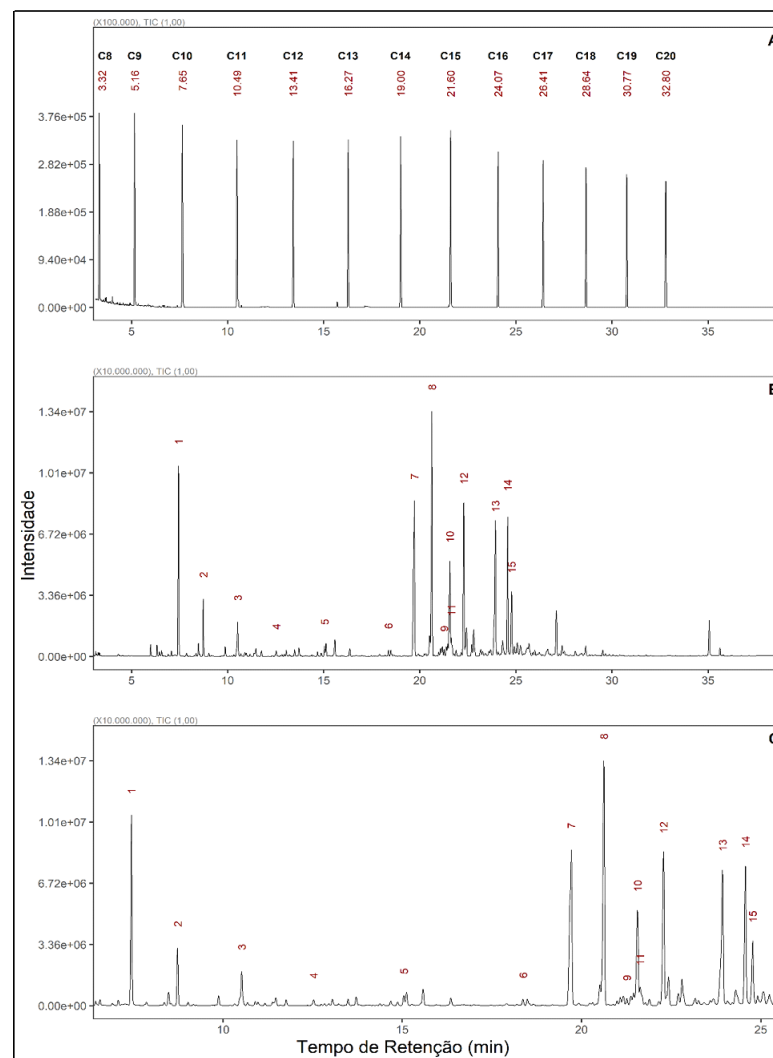


Figura AII-3: Perfis cromatográficos por CG-EM. A) Série homogênea de hidrocarbonetos C₈-C₂₀. B) Amostra Arbo0846A, óleo essencial de *Eugenia dysenterica*. C) Expansão de B. A numeração de cada pico corresponde ao estudo de identificação tabelado.

Tabela AII-2. Dados para identificação de voláteis por CG-EM a partir da amostra Arbo0846A, óleo essencial de folhas frescas de *E. dysenterica*.

Nº	Compostos identificados	TR	IKc	IKp	IS (%)	PM	F. molecular (%)
1	β -Miraceno	7,4	992	992	97	136	C ₁₀ H ₁₆ 7,04
2	<i>cis</i> -Ocimeno	8,7	1038	1038	95	136	C ₁₀ H ₁₆ 2,17
3	α -Terpinoleno	10,5	1101	1104	97	136	C ₁₀ H ₁₆ 1,89
4	<i>p</i> -Ment-1,5-Dienol-8	12,5	1170	1170	90	152	C ₁₀ H ₁₆ O 0,32
5	Geraniol	15,0	1257	1257	96	154	C ₁₀ H ₁₈ O 0,47
6	α -Copaeno	18,4	1377	1377	91	204	C ₁₅ H ₂₄ 0,30
7	β -Cariofileno	19,7	1427	1427	97	294	C ₁₅ H ₂₄ 11,00
8	α -Humuleno	20,6	1462	1462	96	204	C ₁₅ H ₂₄ 12,5
9	α -Muuroloeno	21,3	1487	1487	92	204	C ₁₅ H ₂₄ 0,34
10	Gurjuneno	21,6	1499	1475	92	204	C ₁₅ H ₂₄ 5,29
11	Valenceno	21,6	1501	1496	91	204	C ₁₅ H ₂₄ 1,20
12	α -Panasiseno	22,3	1528	1527	90	204	C ₁₅ H ₂₄ 7,78
13	Óxido de Cariofileno	23,9	1594	1593	93	220	C ₁₅ H ₂₄ O 8,55
14	Humuladienona	24,6	1621	1580	90	220	C ₁₅ H ₂₄ O 7,25
15	Ledol	24,8	1630	1608	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O 3,56
Monoterpenos							11,10
Monoterpenos oxigenados							0,79
Sesquiterpenos							38,41
Sesquiterpenos oxigenados							19,36
Total de compostos identificados							69,66

Nº = Numeração de cada pico no cromatograma; TR = tempo de retenção, min.; IKc = Índice de Kovats calculado; IKp = Índice de Kovats publicado (1-Adams R. P. 2007; 2-*Pherobase*; 3-*NIST*; 4-*PubChem*); IS = Índice de similaridade espectral; PM = peso molecular; F = Fórmula; (%) = percentual relativo.

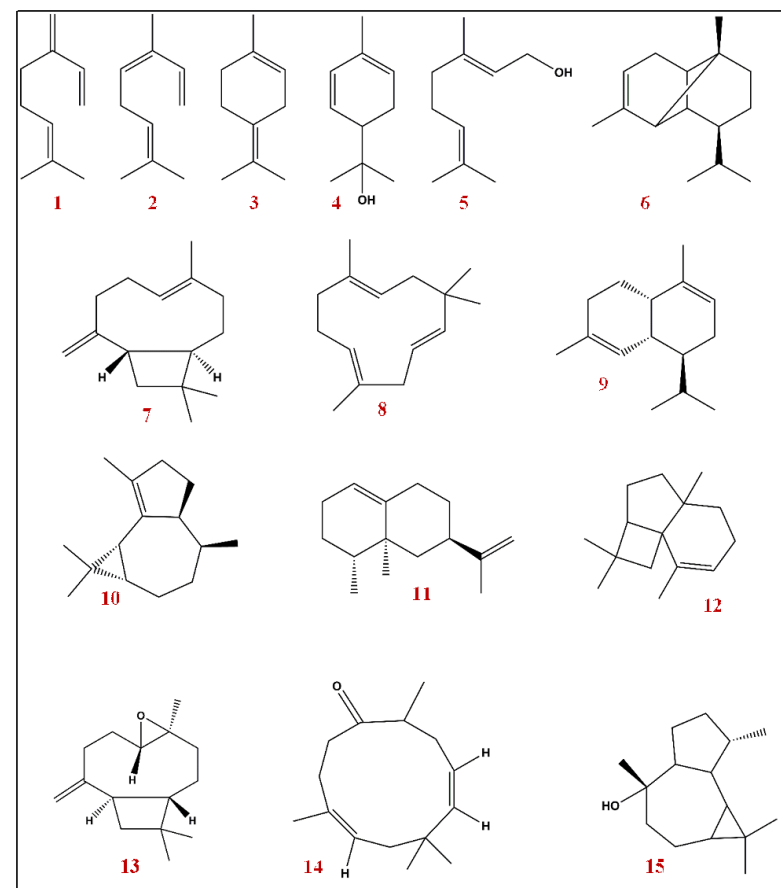


Figura AII-4: Estruturas químicas dos compostos identificados a partir da amostra Arbo0846A. Óleo essencial de *E. dysenterica*. A numeração segue conforme tabela de identificação.

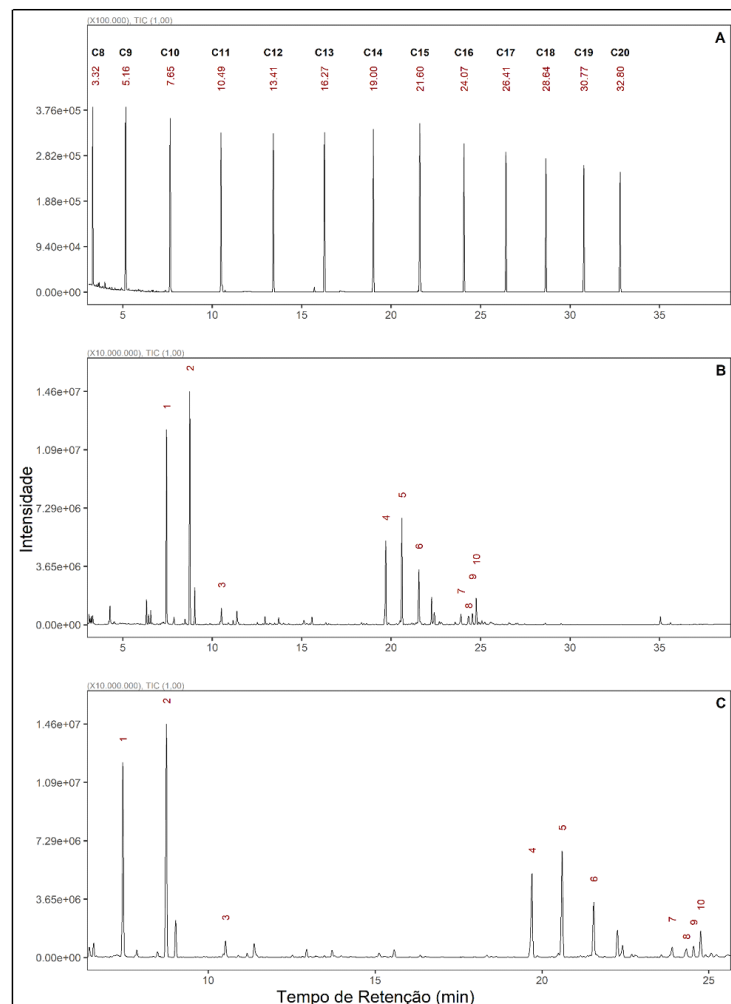


Figura AII-5: Perfis cromatográficos por CG-EM. **A)** Série homóloga de hidrocarbonetos C₈-C₂₀. **B)** Amostra Arbo0846B, óleo essencial de *E. dysenterica*. **C)** Expansão de **B**. A numeração de cada pico corresponde ao estudo de identificação tabelado.

Tabela AII-3: Dados para identificação de voláteis por CG-EM a partir da amostra Arbo0846B, óleo essencial de folhas frescas de *E. dysenterica*.

Nº	Compostos identificados	TR	IKc	IKp	IS (%)	PM	F. molecular	(%)
1	β -Mirreno	7,4	992	992	97	136	C ₁₀ H ₁₆	16,72
2	<i>cis</i> -Ocimeno	8,7	1039	1041	95	136	C ₁₀ H ₁₆	20,98
3	α -Terpinoleno	10,5	1101	1104	97	136	C ₁₀ H ₁₆	1,66
4	β -Cariofileno	19,7	1427	1428	97	204	C ₁₅ H ₂₄	9,94
5	α -Humuleno	20,6	1462	1462	96	204	C ₁₅ H ₂₄	11,60
6	Gurjuneno	21,6	1498	1475	93	204	C ₁₅ H ₂₄	6,61
7	Óxido-de-Cariofileno	23,9	1593	1593	92	220	C ₁₅ H ₂₄ O	1,49
8	(3 <i>E</i> ,7 <i>E</i>)Tetrametilcicloudecadienol	24,3	1611	1618	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	1,41
9	Humuladienona	24,5	1620	1580	90	220	C ₁₅ H ₂₄ O	1,25
10	Ledol	24,8	1629	1608	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	3,06
Monoterpenos								39,36
Monoterpenos oxigenados								0
Sesquiterpenos								28,15
Sesquiterpenos oxigenados								7,21
Total de compostos identificados								74,72

Nº = Numeração de cada pico no cromatograma; TR = tempo de retenção, min.; IKc = Índice de Kovats calculado; IKp = Índice de Kovats publicado (1-Adams R. P. 2007; 2-*Pherobase*; 3-*NIST*; 4-*PubChem*); IS = Índice de similaridade espectral; PM = peso molecular; F = Fórmula; (%) = percentual relativo.

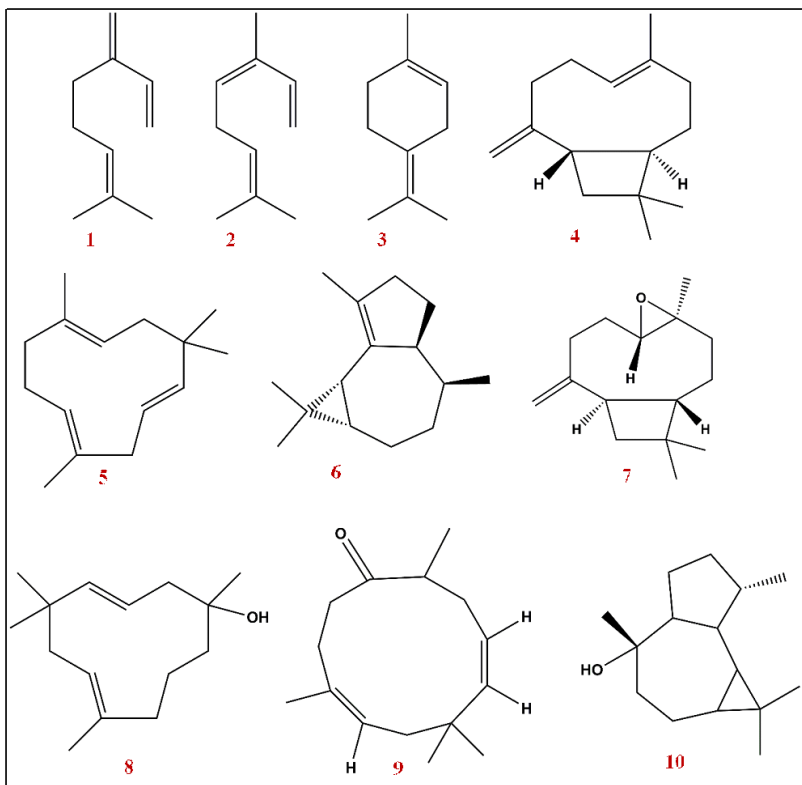


Figura AII-6: Estruturas químicas dos compostos identificados a partir da amostra Arbo0846B. Óleo essencial de *E. dysenterica*. A numeração segue conforme tabela de identificação.

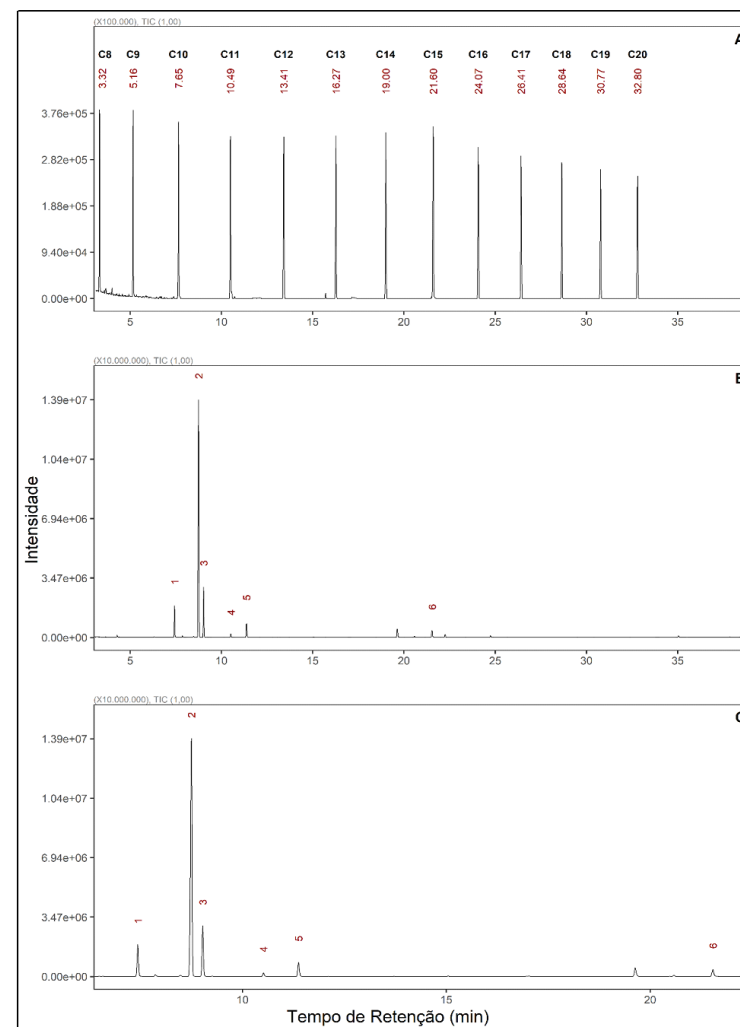


Figura AII-7: Perfis cromatográficos por CG-EM. **A)** Série homogênea de hidrocarbonetos C₈-C₂₀. **B)** Amostra Arbo0846C, óleo essencial de *E. dysenterica*. **C)** Expansão de B. A numeração de cada pico corresponde ao estudo de identificação tabelado.

Tabela AII-4: Dados para identificação de voláteis por CG-EM a partir da amostra Arbo0846C, óleo essencial das folhas frescas de *E. dysenterica*.

Nº	Compostos identificados	TR	IKc	IKp	IS (%)	PM	F. molecular	(%)
1	β -Miraceno	7,4	991	991	97	136	C ₁₀ H ₁₆	8,12
2	<i>cis</i> -Ocimeno	8,7	1039	1038	95	136	C ₁₀ H ₁₆	67,22
3	<i>trans</i> -Ocimeno	9,0	1048	1048	92	136	C ₁₀ H ₁₆	13,2
4	α -Terpinoleno	10,5	1101	1104	97	136	C ₁₀ H ₁₆	1,05
5	neo-Alcoocimeno	11,4	1130	1140	93	136	C ₁₀ H ₁₆	4,06
6	Gurjuneno	21,5	1498	1475	91	204	C ₁₅ H ₂₄	2,45
Monoterpenos								93,65
Monoterpenos oxigenados								0
Sesquiterpenos								2,45
Sesquiterpenos oxigenados								0
Total de compostos identificados								96,10

Nº = Numeração de cada pico no cromatograma; TR = tempo de retenção, min.; IKc = Índice de Kovats calculado; IKp = Índice de Kovats publicado (1-Adams R. P. 2007; 2-*Pherobase*; 3-*NIST*; 4-*PubChem*); IS = Índice de similaridade espectral; PM = peso molecular; F = Fórmula; (%) = percentual relativo.

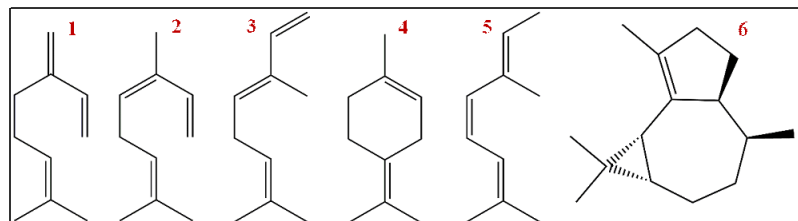


Figura AII-8: Estruturas químicas dos compostos identificados a partir da amostra Arbo0846C. Óleo essencial de *E. dysenterica*. A numeração segue conforme tabela de identificação.

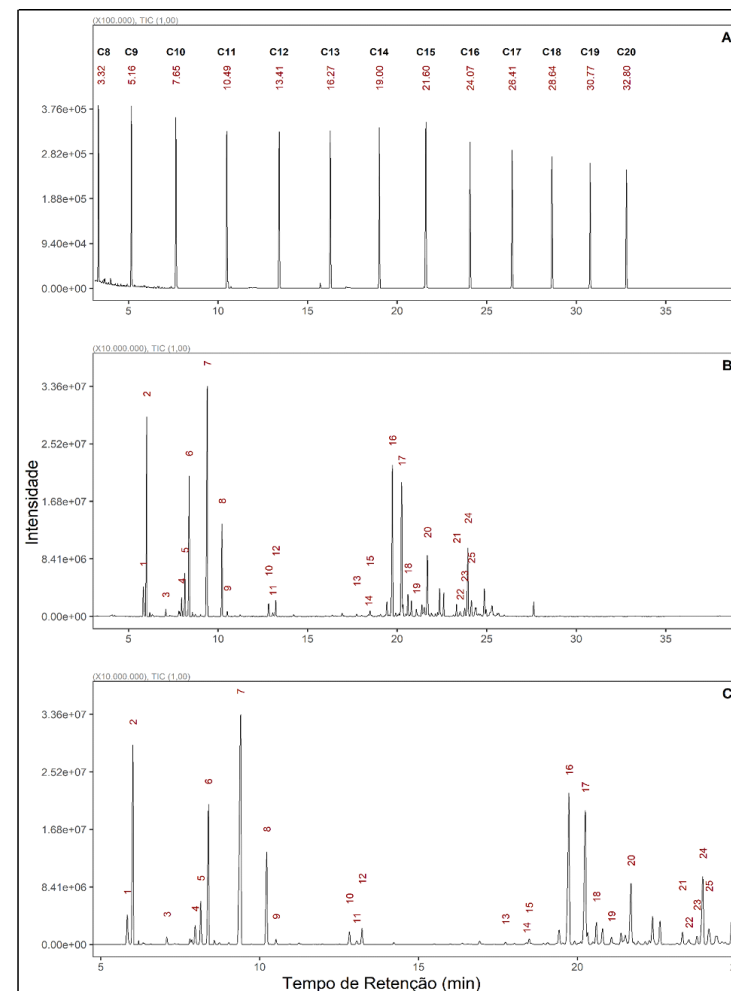


Figura AII-9: Perfis cromatográficos por CG-EM. A) Série homogênea de hidrocarbonetos C₈-C₂₀. B) Amostra Arbo0847, óleo essencial de *Blepharocalyx salicifolius*. C) Expansão de B. A numeração de cada pico corresponde ao estudo de identificação tabelado.

Tabela AII-5: Dados para identificação de voláteis por CG-EM a partir da amostra Arbo0847, óleo essencial de folhas frescas de *B. salicifolius*.

Nº	Compostos identificados	TR	IKc	IKp	IS (%)	PM	F. molecular	(%)
1	α -Tujeno	5,8	927	927	95	136	C ₁₀ H ₁₆	1,76
2	α -Pímeno	6,0	934	935	97	136	C ₁₀ H ₁₆	8,78
3	β -Pímeno	7,1	977	977	98	136	C ₁₀ H ₁₆	0,37
4	?-3-Careno	8,0	1011	1011	95	136	C ₁₀ H ₁₆	1,00
5	α -Terpineno	8,1	1018	1018	95	136	C ₁₀ H ₁₆	2,28
6	<i>p</i> -Cimeno	8,4	1026	1026	96	134	C ₁₀ H ₁₄	6,48
7	γ -Terpineno	9,4	1062	1059	96	136	C ₁₀ H ₁₆	17,08
8	α -Terpinoleno	10,2	1091	1078	97	136	C ₁₀ H ₁₆	5,24
9	Linalool	10,5	1101	1103	96	154	C ₁₀ H ₁₈ O	0,29
10	4-Terpineol	12,8	1180	1180	96	154	C ₁₀ H ₁₈ O	0,77
11	<i>p</i> -Cimeno-8	13,1	1188	1188	95	150	C ₁₀ H ₁₄ O	0,26
12	<i>p</i> -Ment-1-en-8-ol	13,2	1193	1193	98	154	C ₁₀ H ₁₈ O	0,95
13	α -Cubebeno	17,7	1354	1354	93	204	C ₁₅ H ₂₄	0,14
14	Isolédono	18,4	1378	1377	91	204	C ₁₅ H ₂₄	0,15
15	α -Copaeno	18,5	1381	1381	95	204	C ₁₅ H ₂₄	0,44
16	β -Cariofileno	19,7	1428	1428	97	204	C ₁₅ H ₂₄	11,39
17	Aromadendreno	20,2	1448	1443	95	204	C ₁₅ H ₂₄	10,25
18	α -Humuleno	20,6	1461	1462	95	204	C ₁₅ H ₂₄	1,37
19	Azuleno	21,1	1480	1479	90	204	C ₁₅ H ₂₄	0,52
20	Ledeno	21,7	1504	1500	94	204	C ₁₅ H ₂₄	4,72
21	Viridiflorol	23,3	1569	1580	91	222	C ₁₅ H ₂₆ O	0,81
22	Epiglobulol	23,5	1577	1576	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	0,51
23	Espatuleno	23,8	1588	1585	92	220	C ₁₅ H ₂₄ O	0,59
24	Globulol	23,9	1595	1580	94	222	C ₁₅ H ₂₆ O	5,20
25	1 <i>H</i> -Ciclop(<i>E</i>)Azuleno-4	24,1	1603	1600	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	1,39
Monoterpenos								42,99
Monoterpenos oxigenados								2,27
Sesquiterpenos								28,98
Sesquiterpenos oxigenados								8,50
Total de compostos identificados								82,74

Nº = Numeração de cada pico no cromatograma; TR = tempo de retenção, min.; IKc = Índice de Kovats calculado; IKp = Índice de Kovats publicado (1-Adams R. P. 2007; 2-*Pherobase*; 3-*NIST*; 4-*PubChem*); IS = Índice de similaridade espectral; PM = peso molecular; F = Fórmula; (%) = percentual relativo.

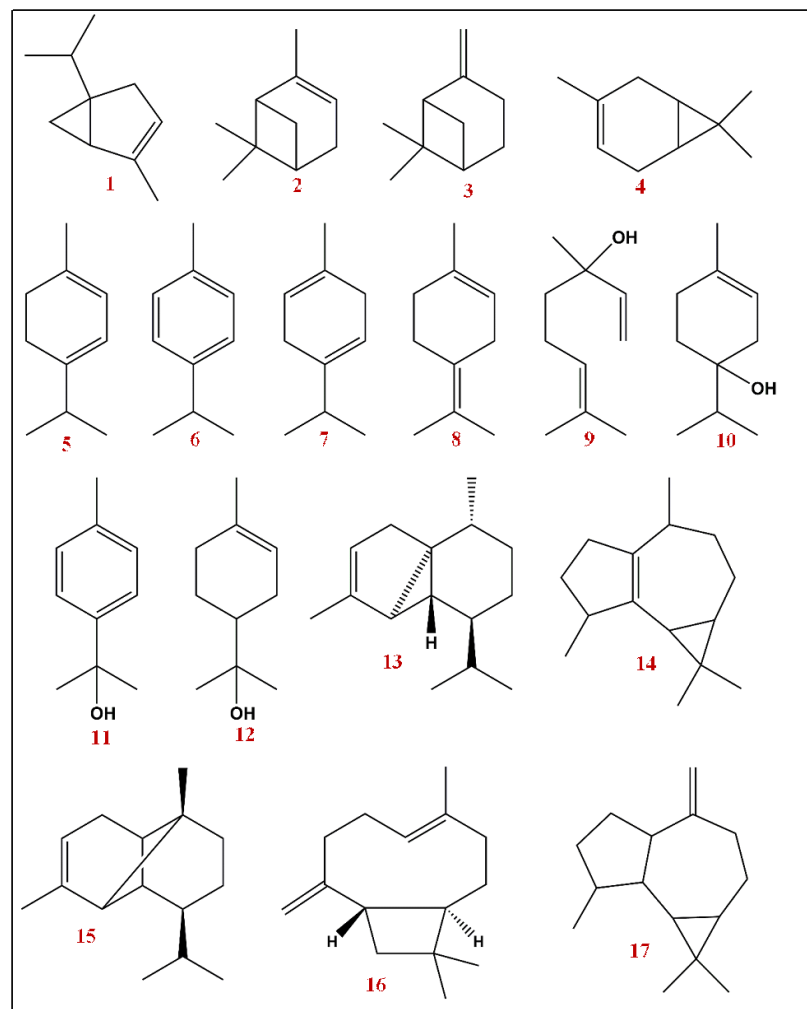


Figura AII-10: Estruturas químicas dos compostos identificados a partir da amostra Arbo 0847, óleo essencial de *B. salicifolius*. A numeração segue conforme tabela de identificação.

Continua

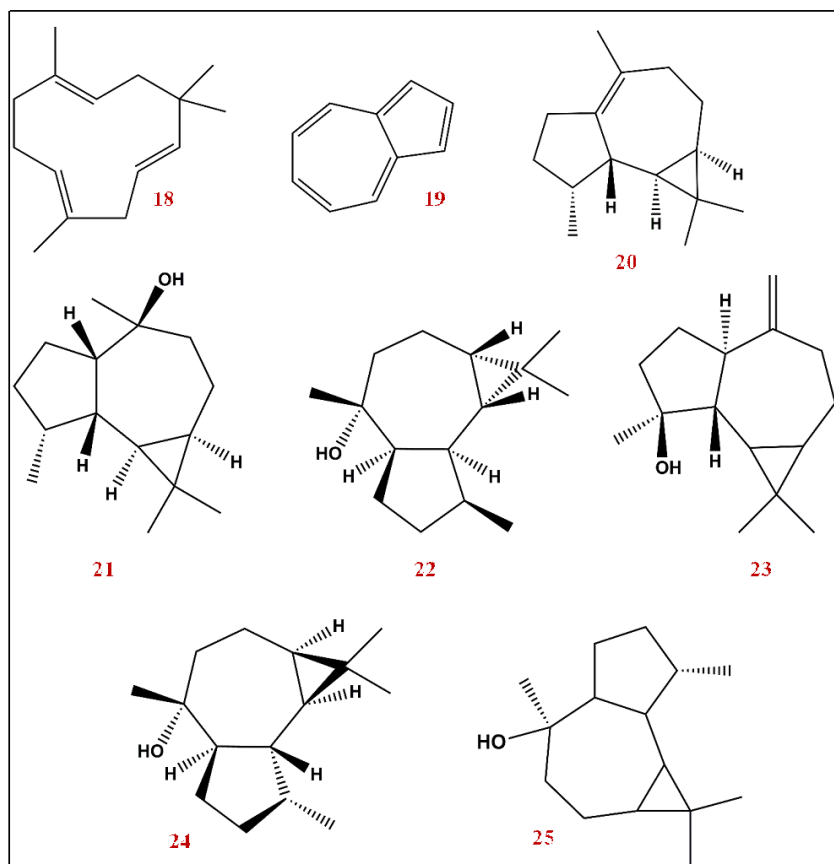


Figura AII-10: Estruturas químicas dos compostos identificados a partir da amostra Arbo 0847, óleo essencial de *B. salicifolius*. A numeração segue conforme tabela de identificação.

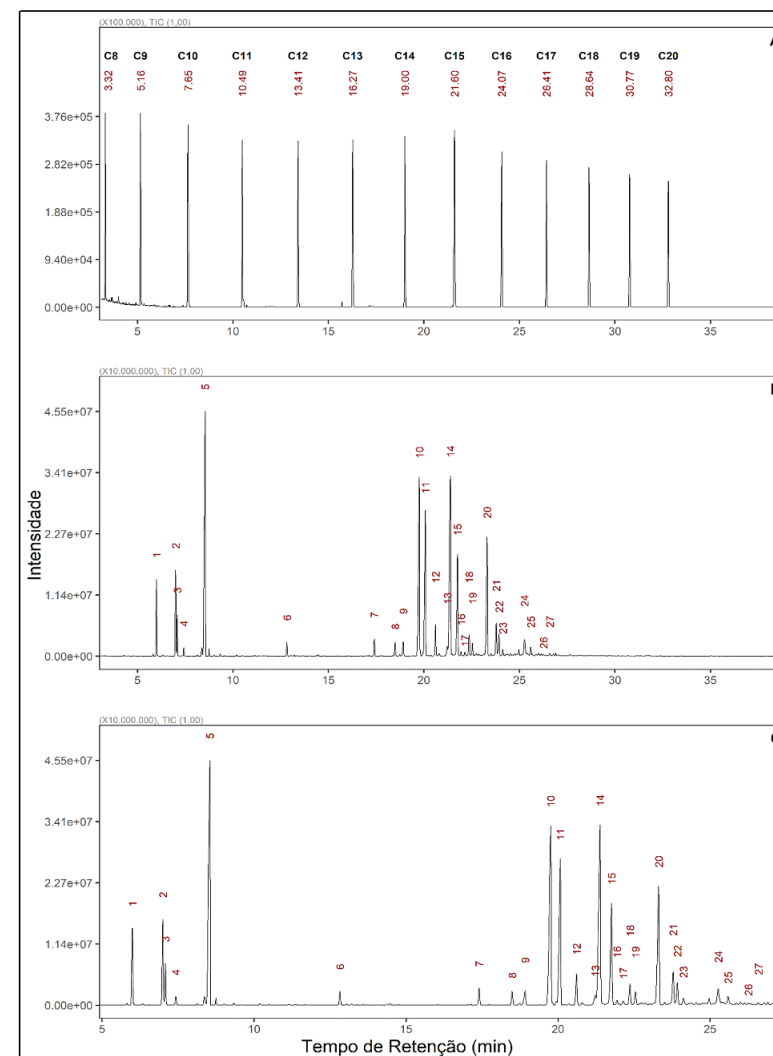


Figura AII-11: Perfis cromatográficos por CG-EM. **A)** Série homogênea de hidrocarbonetos C₈-C₂₀. **B)** Amostra Arbo0848, óleo essencial de *Protium ovatum*. **C)** Expansão de **B**. A numeração de cada pico corresponde ao estudo de identificação tabelado.

Tabela AII-6. Dados para identificação de voláteis por CG-EM a partir da amostra Arbo0848, óleo essencial de folhas frescas de *P. ovatum*.

Nº	Compostos identificados	TR	IKc	IKp	IS (%)	PM	F. molecular	(%)
1	α -Pinoeno	6,0	934	935	97	136	C ₁₀ H ₁₆	3,22
2	Sabineno	7,0	974	974	96	136	C ₁₀ H ₁₆	3,85
3	β -Pinoeno	7,1	977	977	98	136	C ₁₀ H ₁₆	1,69
4	β -Miraceno	7,4	991	991	97	136	C ₁₀ H ₁₆	0,39
5	Limoneno	8,5	1032	1031	97	136	C ₁₀ H ₁₆	16,99
6	4-Terpineol	12,8	1180	1180	98	154	C ₁₀ H ₁₈ O	0,71
7	Bicicloelemeno	17,4	1342	1336	92	204	C ₁₅ H ₂₄	0,90
8	α -Copaeno	18,5	1381	1381	96	204	C ₁₅ H ₂₄	0,77
9	β -Elemeno	18,9	1397	1397	93	204	C ₁₅ H ₂₄	1,01
10	β -Cariofileno	19,8	1429	1428	96	204	C ₁₅ H ₂₄	14,11
11	γ -Elemeno	20,1	1441	1437	95	204	C ₁₅ H ₂₄	9,70
12	α -Humuleno	20,6	1462	1462	95	204	C ₁₅ H ₂₄	1,82
13	γ -Muuroleno	21,2	1485	1485	92	204	C ₁₅ H ₂₄	0,76
14	Germacreno-D	21,4	1492	1488	92	204	C ₁₅ H ₂₄	14,61
15	Biciclogermacreno	21,8	1506	1500	96	204	C ₁₅ H ₂₄	6,66
16	β -Bisaboleno	21,9	1514	1514	94	204	C ₁₅ H ₂₄	0,30
17	α -Amorfeno	22,1	1522	1519	91	204	C ₁₅ H ₂₄	0,35
18	δ -Cadineno	22,4	1531	1530	92	204	C ₁₅ H ₂₄	1,32
19	α -Bergamoteno	22,5	1538	1440	90	204	C ₁₅ H ₂₄	0,85
20	Germacreno-B	23,3	1569	1569	94	204	C ₁₅ H ₂₄	8,40
21	Espatuleno	23,8	1588	1585	94	220	C ₁₅ H ₂₄ O	2,17
22	Óxido de Cariofileno	23,9	1594	1593	93	220	C ₁₅ H ₂₄ O	1,49
23	1 <i>H</i> -Cicloprop(<i>E</i>)Azulenol-4	24,1	1602	1600	93	222	C ₁₅ H ₂₆ O	0,55
24	τ -Cadinol	25,3	1651	1646	92	222	C ₁₅ H ₂₆ O	1,54
25	α -Cadinol	25,6	1665	1662	93	222	C ₁₅ H ₂₆ O	0,67
26	α -Bisabolol	26,3	1693	1697	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	0,16
27	Juniper-Canfor	26,6	1708	1700	91	222	C ₁₅ H ₂₆ O	0,24
Monoterpenos								26,14
Monoterpenos oxigenados								0,71
Sesquiterpenos								61,56
Sesquiterpenos oxigenados								6,82
Total de compostos identificados								95,23

Nº = Numeração de cada pico no cromatograma; TR = tempo de retenção, min.; IKc = Índice de Kovats calculado; IKp = Índice de Kovats publicado (1-Adams R. P. 2007; 2-*Pherobase*; 3-*NIST*; 4-*PubChem*); IS = Índice de similaridade espectral; PM = peso molecular; F = Fórmula; (%) = percentual relativo.

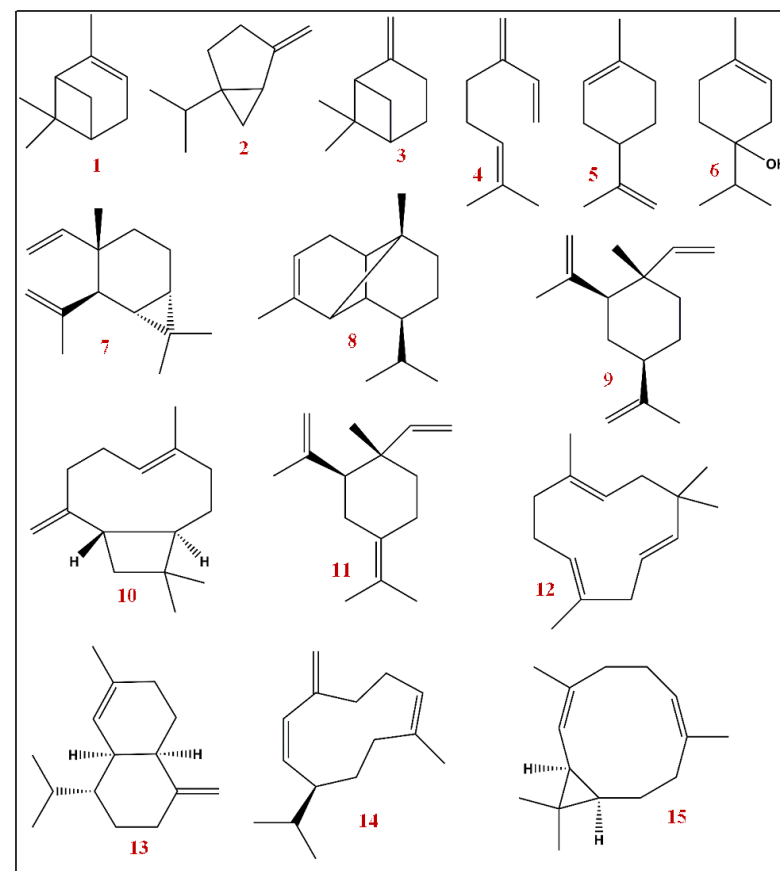


Figura AII-12: Estruturas químicas dos compostos identificados a partir da amostra Arbo 0848, óleo essencial de *P. ovatum*. A numeração segue conforme tabela de identificação.

Continua

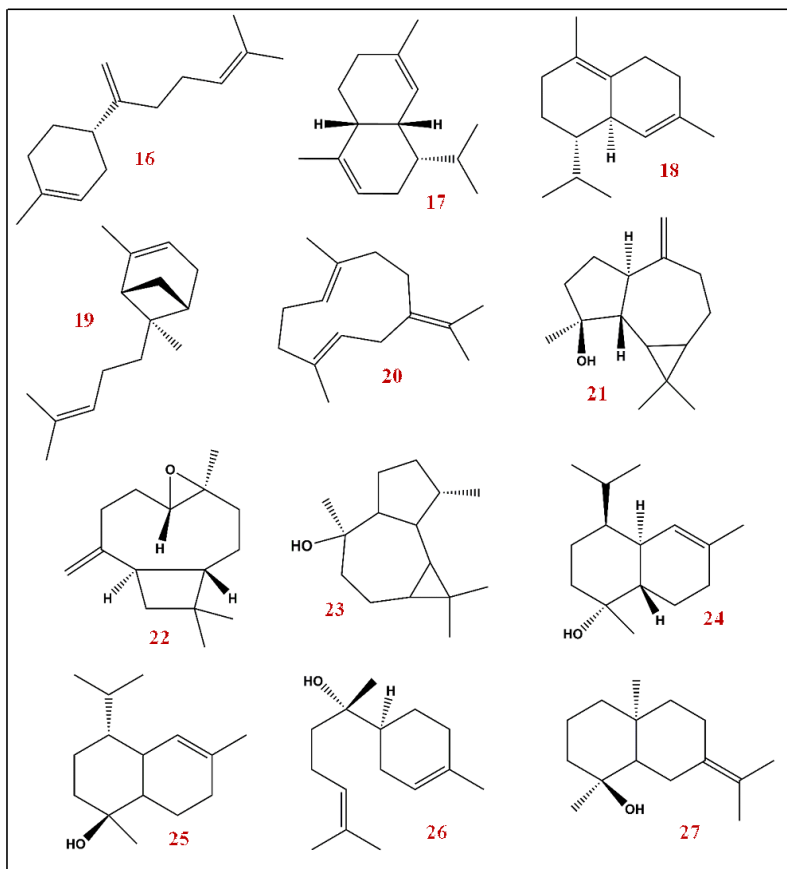


Figura AII-12: Estruturas químicas dos compostos identificados a partir da amostra Arbo 0848, óleo essencial de *P. ovatum*. A numeração segue conforme tabela de identificação

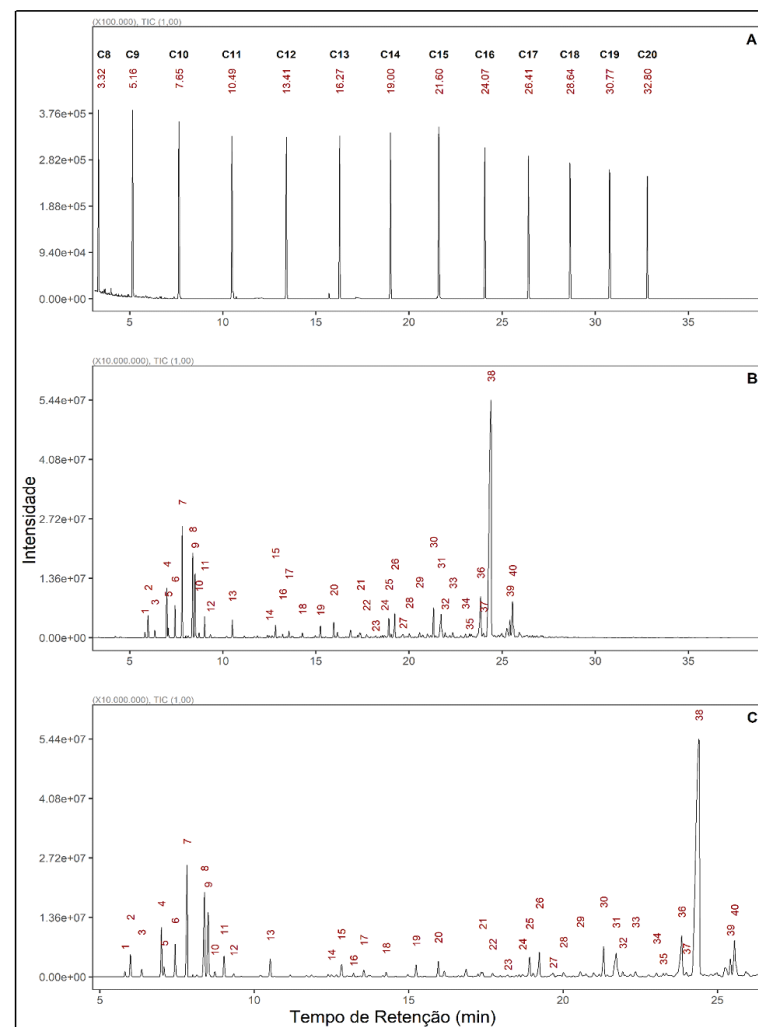


Figura AII-13: Perfis cromatográficos por CG-EM. **A)** Série homogênea de hidrocarbonetos C₈-C₂₀. **B)** Amostra Arbo0849A, óleo essencial de *Hedyosmum brasiliense*. **C)** Expansão de B. A numeração de cada pico corresponde ao estudo de identificação tabelado.

Tabela AII-7: Dados para identificação de voláteis por CG-EM a partir da amostra Arbo0849A, óleo essencial de *H. brasiliense*.

Nº	Compostos identificados	TR	IKc	IKp	IS (%)	PM	F. molecular	(%)
1	α -Tujeno	5,8	926	927	94	136	C ₁₀ H ₁₆	0,26
2	α -Pinoeno	6,0	933	935	97	136	C ₁₀ H ₁₆	1,08
3	Canfeno	6,4	948	948	97	136	C ₁₀ H ₁₆	0,4
4	Sabineno	7,0	974	974	96	136	C ₁₀ H ₁₆	2,56
5	β -Pinoeno	7,1	977	977	98	136	C ₁₀ H ₁₆	0,51
6	β -Mirceeno	7,4	992	992	97	136	C ₁₀ H ₁₆	1,75
7	α -Felandreno	7,8	1006	1006	97	136	C ₁₀ H ₁₆	5,47
8	<i>p</i> -Cimeno	8,4	1026	1026	96	134	C ₁₀ H ₁₄	4,98
9	Limonoeno	8,5	1030	1031	93	136	C ₁₀ H ₁₆	3,8
10	<i>cis</i> -Ocimeno	8,7	1038	1038	97	136	C ₁₀ H ₁₆	0,27
11	<i>trans</i> -Ocimeno	9,0	1048	1048	97	136	C ₁₀ H ₁₆	1,08
12	γ -Terpineno	9,3	1059	1059	97	136	C ₁₀ H ₁₆	0,18
13	Linalool	10,5	1101	1103	97	154	C ₁₀ H ₁₈ O	1,02
14	Borneol	12,5	1169	1173	95	154	C ₁₀ H ₁₈ O	0,18
15	4-Terpineol	12,8	1180	1180	97	154	C ₁₀ H ₁₈ O	0,81
16	<i>p</i> -Ment-1-en-8-ol	13,2	1193	1193	97	154	C ₁₀ H ₁₈ O	0,23
17	<i>cis</i> -Sabinol	13,6	1205	1170	94	152	C ₁₀ H ₁₈ O	0,44
18	β -Citronelol	14,3	1230	1230	96	156	C ₁₀ H ₂₀ O	0,31
19	<i>cis</i> -Acetato de Crisantenil	15,2	1264	1233	90	194	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0,73
20	Acetato de isobornil	16,0	1289	1290	96	196	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0,98
21	Bicicloelmeno	17,4	1341	1336	90	204	C ₁₃ H ₂₄	0,25
22	Acetato de α -Terpineol	17,7	1353	1353	91	196	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0,3
23	Ciclosativeno	18,2	1371	1370	94	204	C ₁₃ H ₂₄	0,17
24	1 <i>H</i> -Cicloprop-(<i>E</i>)-azuleno	18,7	1389	1419	91	204	C ₁₃ H ₂₄	0,23
25	β -Elemeno	18,9	1397	1397	94	204	C ₁₃ H ₂₄	1,36
26	Metil-Eugenol	19,2	1409	1409	91	178	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	1,79
27	β -Cariofileno	19,7	1426	1428	94	204	C ₁₃ H ₂₄	0,46
28	γ -Elemeno	20,0	1439	1437	96	204	C ₁₃ H ₂₄	0,4
29	β -Farneseno	20,6	1460	1460	93	204	C ₁₃ H ₂₄	0,54
30	Germacreno-D	21,3	1489	1488	92	204	C ₁₃ H ₂₄	2,05
31	Biciclogermacreno	21,7	1505	1500	96	204	C ₁₃ H ₂₄	3,03
32	β -Bisaboleno	21,9	1514	1514	93	204	C ₁₃ H ₂₄	0,38
33	?-Cadineno	22,3	1530	1530	90	204	C ₁₃ H ₂₄	0,5
34	Elemol	23,0	1558	1558	94	222	C ₁₃ H ₂₆ O	0,33
35	Germacreno-B	23,2	1567	1569	90	204	C ₁₃ H ₂₄	0,27
36	Espatuleno	23,8	1591	1585	94	220	C ₁₃ H ₂₄ O	4,73
37	Globulol	24,0	1597	1580	90	222	C ₁₃ H ₂₆ O	0,48
38	Carotol	24,4	1614	1600	95	222	C ₁₃ H ₂₆ O	41,19
39	Torreol	25,4	1658	1658	90	222	C ₁₃ H ₂₆ O	1,31
40	β -Eudesmol	25,6	1663	1662	93	222	C ₁₃ H ₂₆ O	3,71
Monoterpenos								22,34
Monoterpenos oxigenados								6,79
Sesquiterpenos								9,64
Sesquiterpenos oxigenados								51,75
Total de compostos identificados								90,52

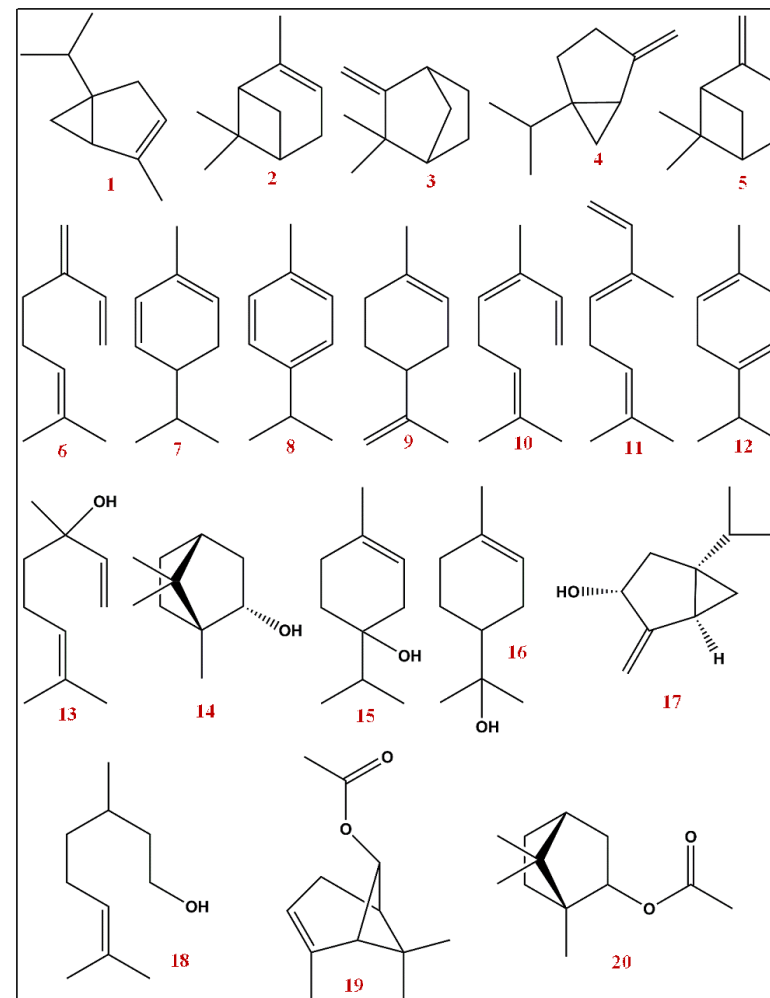


Figura AII-14: Estruturas químicas dos compostos identificados a partir da amostra Arbo0849A, óleo essencial de *H. brasiliense*. A numeração segue conforme tabela de identificação.

Continua

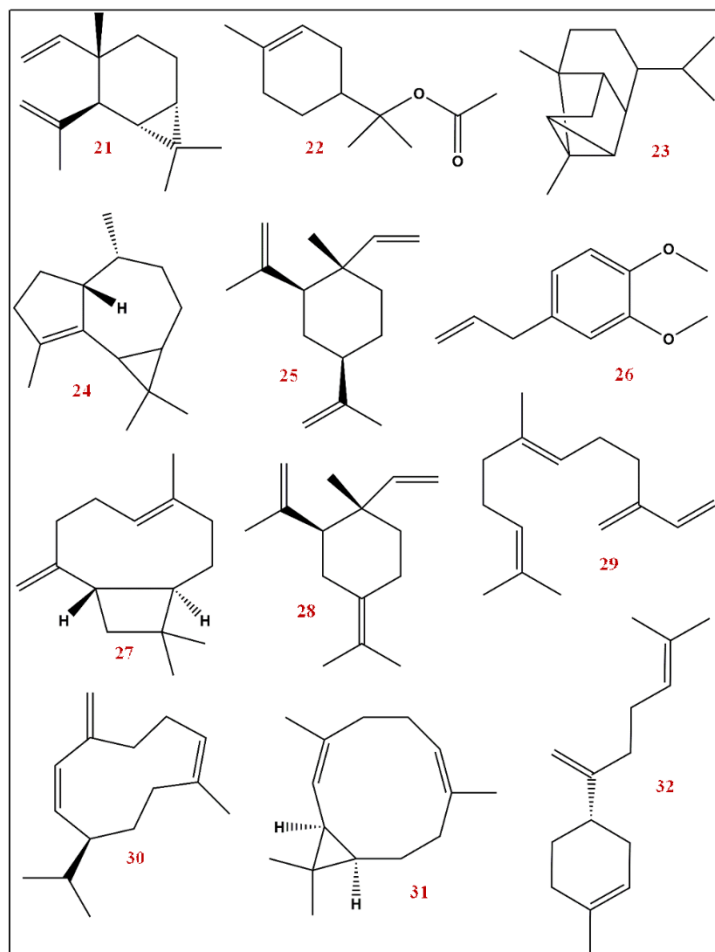


Figura AII-14: Estruturas químicas dos compostos identificados a partir da amostra Arbo0849A, óleo essencial de *H. brasiliense*. A numeração segue conforme tabela de identificação.

Continua

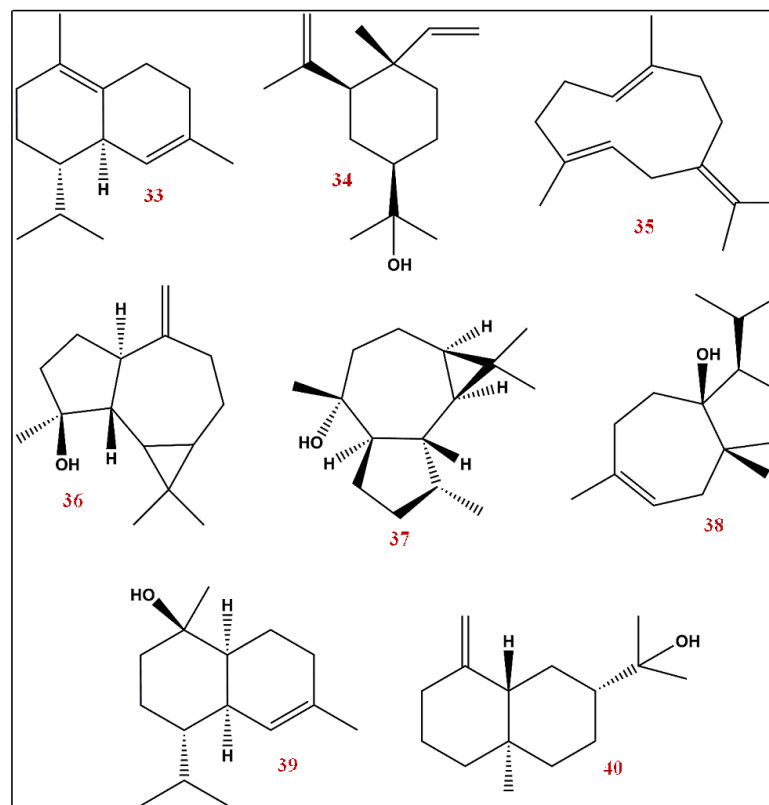


Figura AII-14: Estruturas químicas dos compostos identificados a partir da amostra Arbo0849A, óleo essencial de *H. brasiliense*. A numeração segue conforme tabela de identificação.

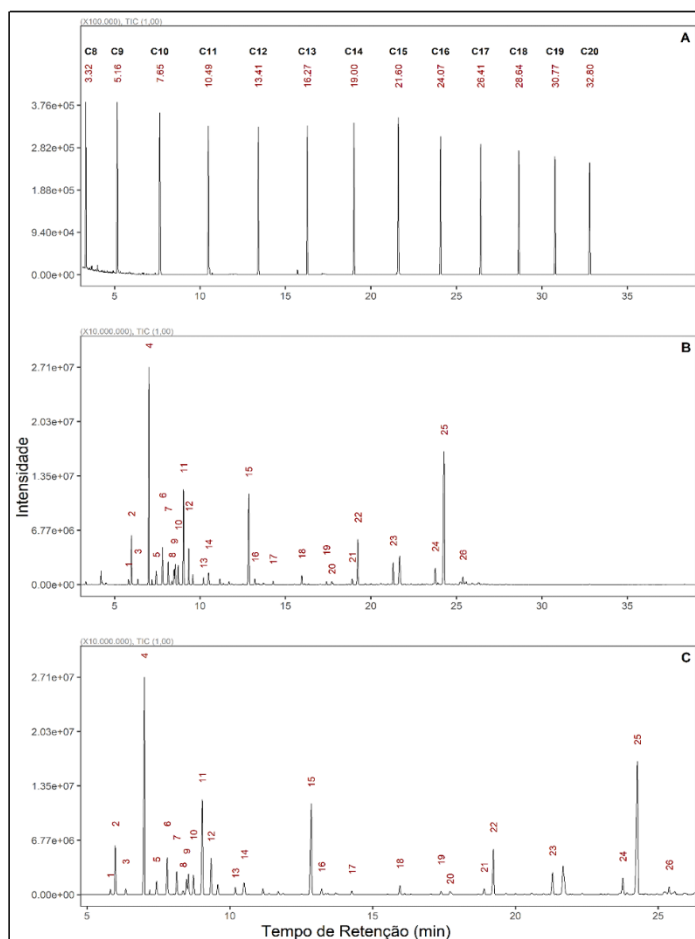


Figura AII-15: Perfis cromatográficos por CG-EM. **A)** Série homogênea de hidrocarbonetos C₈-C₂₀. **B)** Amostra Arbo0849B, óleo essencial de *Hedyosmum brasiliense*. **C)** Expansão de **B**. A numeração de cada pico corresponde ao estudo de identificação tabelado

Tabela AII-8: Dados para identificação de voláteis por CG-EM a partir da amostra Arbo0849B, óleo essencial de *H. brasiliense*.

Nº	Compostos identificados	TR	IKc	IKp	IS (%)	PM	F. molecular	(%)
1	α -Tujeno	5,8	926	927	94	136	C ₁₀ H ₁₆	0,42
2	α -Pinoeno	6,0	933	935	97	136	C ₁₀ H ₁₆	3,98
3	Canfeno	6,4	948	948	97	136	C ₁₀ H ₁₆	0,48
4	Sabineno	7,0	974	974	96	136	C ₁₀ H ₁₆	16,89
5	β -Mirceeno	7,4	991	991	97	136	C ₁₀ H ₁₆	1,15
6	α -Felandreno	7,8	1006	1006	98	136	C ₁₀ H ₁₆	3,33
7	α -Terpineno	8,1	1017	1018	96	136	C ₁₀ H ₁₆	2,07
8	<i>p</i> -Cimeno	8,4	1025	1025	97	134	C ₁₀ H ₁₄	0,35
9	Limoneno	8,5	1029	1031	95	136	C ₁₀ H ₁₆	1,54
10	<i>cis</i> -Ocimeno	8,7	1038	1038	96	136	C ₁₀ H ₁₆	1,74
11	<i>trans</i> -Ocimeno	9,0	1049	1048	97	136	C ₁₀ H ₁₆	8,75
12	γ -Terpineno	9,3	1060	1059	97	136	C ₁₀ H ₁₆	3,38
13	α -Terpinoleno	10,2	1090	1078	97	136	C ₁₀ H ₁₆	0,70
14	Linalol	10,5	1101	1103	95	154	C ₁₀ H ₁₈ O	1,69
15	4-Terpineol	12,8	1181	1180	97	154	C ₁₀ H ₁₈ O	10,24
16	<i>p</i> -Ment-1-en-8-ol	13,2	1193	1193	98	154	C ₁₀ H ₁₈ O	0,58
17	β -Citronelol	14,3	1230	1230	96	156	C ₁₀ H ₂₀ O	0,38
18	Acetato de isobornil	16,0	1289	1286	96	196	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0,94
19	Bicicloelemeno	17,4	1341	1336	93	204	C ₁₅ H ₂₄	0,32
20	Acetato de α -Terpineol	17,7	1353	1353	92	196	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0,48
21	β -Elemeno	18,9	1396	1397	92	204	C ₁₅ H ₂₄	0,61
22	Metil-eugenol	19,2	1409	1409	90	178	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	5,07
23	Germacreno-D	21,3	1489	1488	91	204	C ₁₅ H ₂₄	2,39
24	Espatuleno	23,8	1588	1585	93	220	C ₁₅ H ₂₄ O	2,04
25	Carotol	24,3	1609	1600	94	222	C ₁₅ H ₂₆ O	17,72
26	Torreol	25,4	1656	1658	92	222	C ₁₅ H ₂₆ O	1,01
Monoterpenos								44,78
Monoterpenos oxigenados								19,38
Sesquiterpenos								3,32
Sesquiterpenos oxigenados								20,77
Total de compostos identificados								88,25

Nº = Numeração de cada pico no cromatograma; **TR** = tempo de retenção, min.; **IKc** = Índice de Kovats calculado; **IKp** = Índice de Kovats publicado (1-Adams R. P. 2007; 2-*Pherobase*; 3-*NIST*; 4-*PubChem*); **IS** = Índice de similaridade espectral; **PM** = peso molecular; **F** = Fórmula; **(%)** = percentual relativo.

Continua

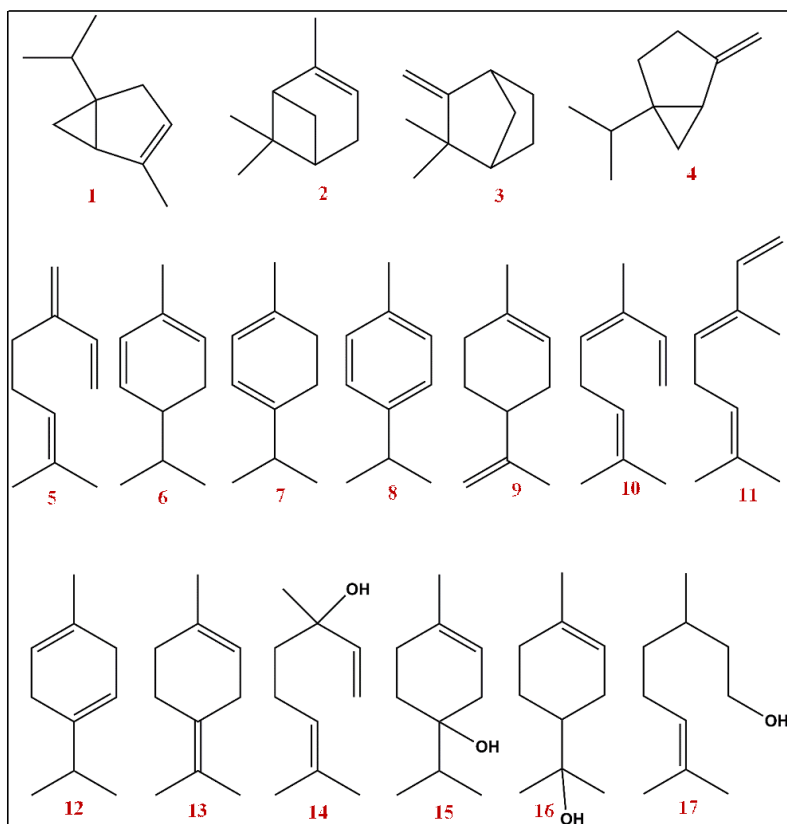


Figura AII-16: Estruturas químicas dos compostos identificados a partir da amostra Arbo0849B, óleo essencial de *H. brasiliense*. A numeração segue conforme tabela de identificação.

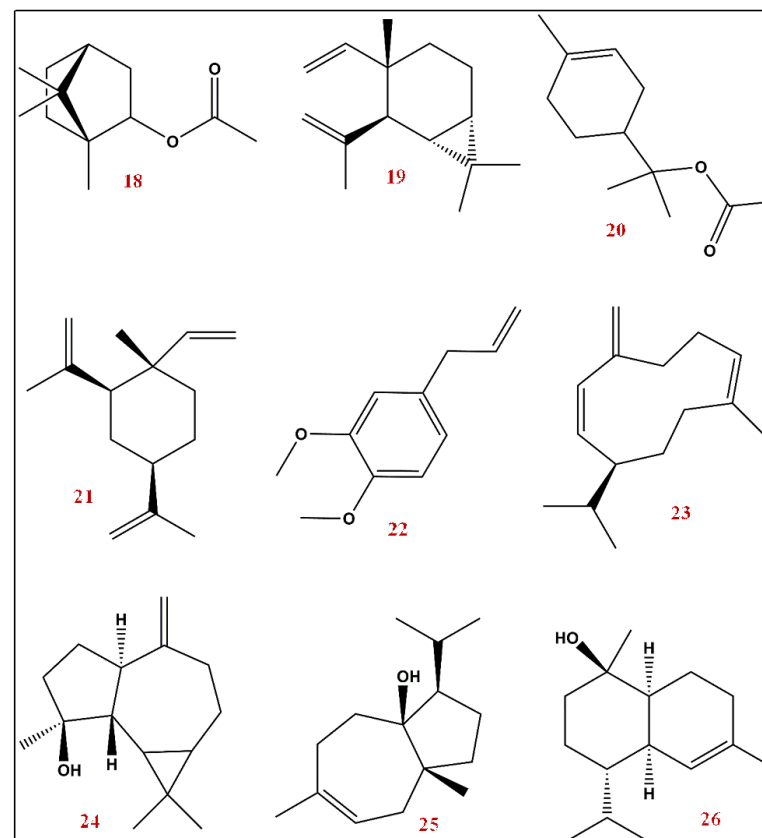


Figura AII-16: Estruturas químicas dos compostos identificados a partir da amostra Arbo0849B, óleo essencial de *H. brasiliense*. A numeração segue conforme tabela de identificação.

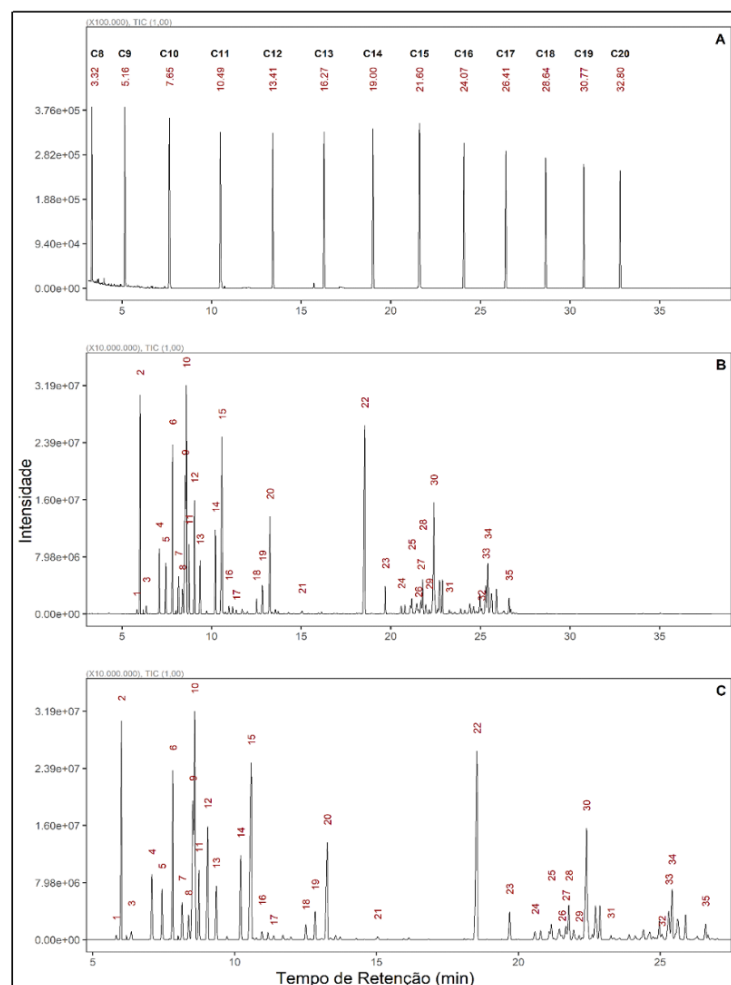


Figura AII-17: Perfis cromatográficos por CG-EM. A) Série homogênea de hidrocarbonetos C₈-C₂₀. B) Amostra Arbo0850, óleo essencial de *Psidium laruotteanum*. C) Expansão de B. A numeração de cada pico corresponde ao estudo de identificação tabelado.

Tabela AII-9: Dados para identificação de voláteis por CG-EM a partir da amostra Arbo0850, óleo essencial de *P. laruotteanum*.

Nº	Compostos identificados	RT	IKc	IKp	IS (%)	PM	F. molecular	(%)
1	α -Tujeno	5,8	927	927	95	136	C ₁₀ H ₁₆	0,15
2	α -Pinoeno	6,0	934	935	97	136	C ₁₀ H ₁₆	6,31
3	Canfeno	6,4	948	948	96	136	C ₁₀ H ₁₆	0,37
4	β -Pinoeno	7,1	977	977	98	136	C ₁₀ H ₁₆	2,14
5	β -Miraceno	7,4	992	991	97	136	C ₁₀ H ₁₆	1,75
6	α -Felandreno	7,8	1006	1006	98	136	C ₁₀ H ₁₆	5,07
7	α -Terpineno	8,2	1018	1018	96	136	C ₁₀ H ₁₆	1,24
8	<i>p</i> -Cimeno	8,4	1026	1026	97	134	C ₁₀ H ₁₄	1,00
9	Limoneno	8,5	1031	1031	92	136	C ₁₀ H ₁₆	7,27
10	1,8-Cineol	8,6	1033	1032	94	154	C ₁₀ H ₁₈ O	7,61
11	<i>cis</i> -Ocimeno	8,7	1039	1038	96	136	C ₁₀ H ₁₆	2,29
12	<i>trans</i> -Ocimeno	9,0	1049	1048	97	136	C ₁₀ H ₁₆	4,03
13	γ -Terpineno	9,4	1060	1059	97	136	C ₁₀ H ₁₆	1,87
14	α -Terpinoleno	10,2	1090	1078	96	136	C ₁₀ H ₁₆	3,05
15	Linalol	10,6	1103	1103	97	154	C ₁₀ H ₁₈ O	9,24
16	Fencol	11,0	1116	1117	96	154	C ₁₀ H ₁₈ O	0,30
17	neo-Alloocimeno	11,4	1130	1140	94	136	C ₁₀ H ₁₆	0,15
18	Borneol	12,5	1169	1173	97	154	C ₁₀ H ₁₈ O	0,65
19	4-Terpineol	12,8	1180	1180	97	154	C ₁₀ H ₁₈ O	1,44
20	<i>p</i> -Ment-1-en-8-ol	13,3	1195	1193	98	154	C ₁₀ H ₁₈ O	4,73
21	Nerol	15,0	1257	1251	90	154	C ₁₀ H ₁₈ O	0,17
22	α -Copaeno	18,5	1383	1381	95	204	C ₁₅ H ₂₄	9,59
23	β -Cariofileno	19,7	1427	1428	96	204	C ₁₅ H ₂₄	1,16
24	α -Humuleno	20,6	1461	1462	95	204	C ₁₅ H ₂₄	0,37
25	γ -Muuroloeno	21,2	1483	1485	92	204	C ₁₅ H ₂₄	0,73
26	Gurjuneno	21,5	1498	1475	90	204	C ₁₅ H ₂₄	0,23
27	β -Seleneno	21,7	1503	1509	90	204	C ₁₅ H ₂₄	0,73
28	β -Bisaboleno	21,8	1507	1507	91	204	C ₁₅ H ₂₄	1,55
29	α -Amorfeno	22,1	1522	1519	92	204	C ₁₅ H ₂₄	0,19
30	?-Cadineno	22,4	1532	1530	93	204	C ₁₅ H ₂₄	6,55
31	Nerolidol	23,3	1567	1563	95	222	C ₁₅ H ₂₆ O	0,18
32	Cubanol	25,1	1642	1642	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	0,28
33	<i>r</i> -Cadinol	25,3	1653	1646	91	222	C ₁₅ H ₂₆ O	1,77
34	Torreol	25,4	1657	1658	93	222	C ₁₅ H ₂₆ O	2,27
35	Juniper-Canfor	26,6	1708	1700	92	222	C ₁₅ H ₂₆ O	0,70
Monoterpenos								36,69
Monoterpenos oxigenados								24,14
Sesquiterpenos								21,10
Sesquiterpenos oxigenados								5,20
Total de compostos identificados								87,13

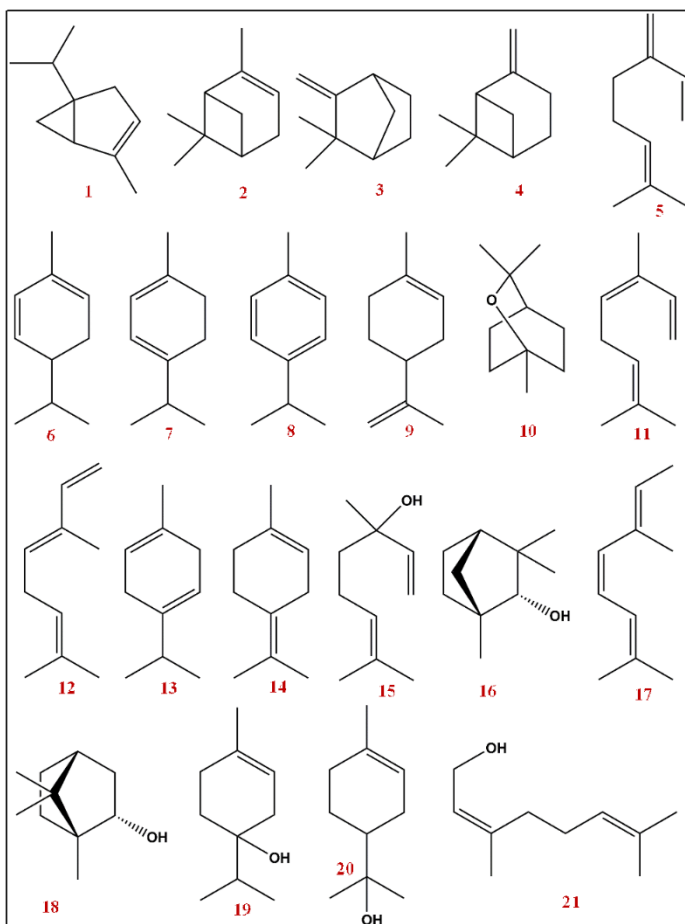


Figura AII-18: Estruturas químicas dos compostos identificados a partir da amostra Arbo0850, óleo essencial de *P. laruoiteanum*. A numeração segue conforme tabela de identificação.

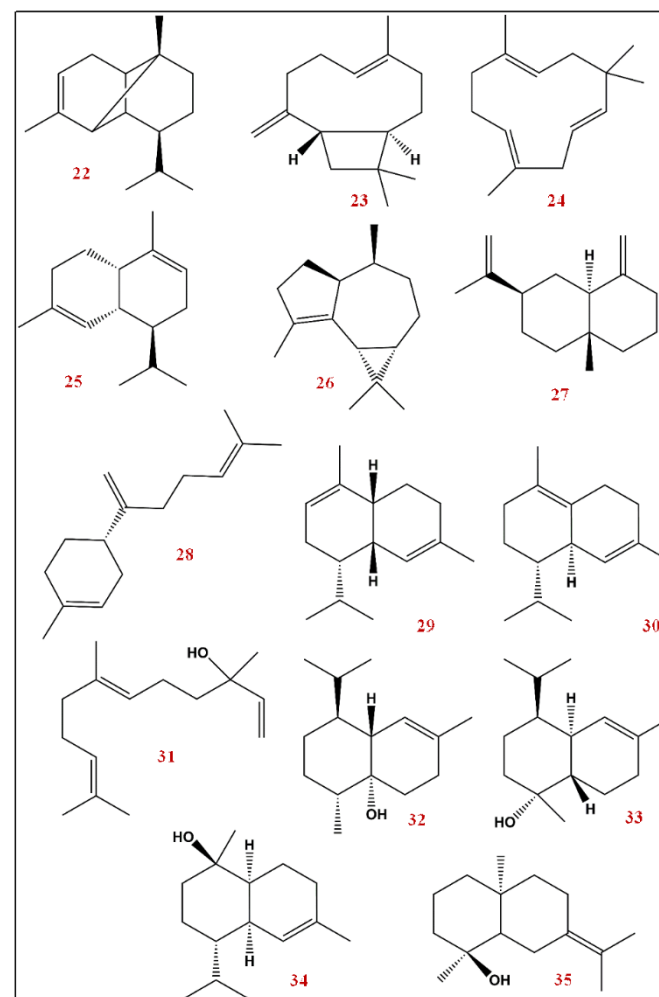


Figura AII-18: Estruturas químicas dos compostos identificados a partir da amostra Arbo0850, óleo essencial de *P. laruoiteanum*. A numeração segue conforme tabela de identificação.

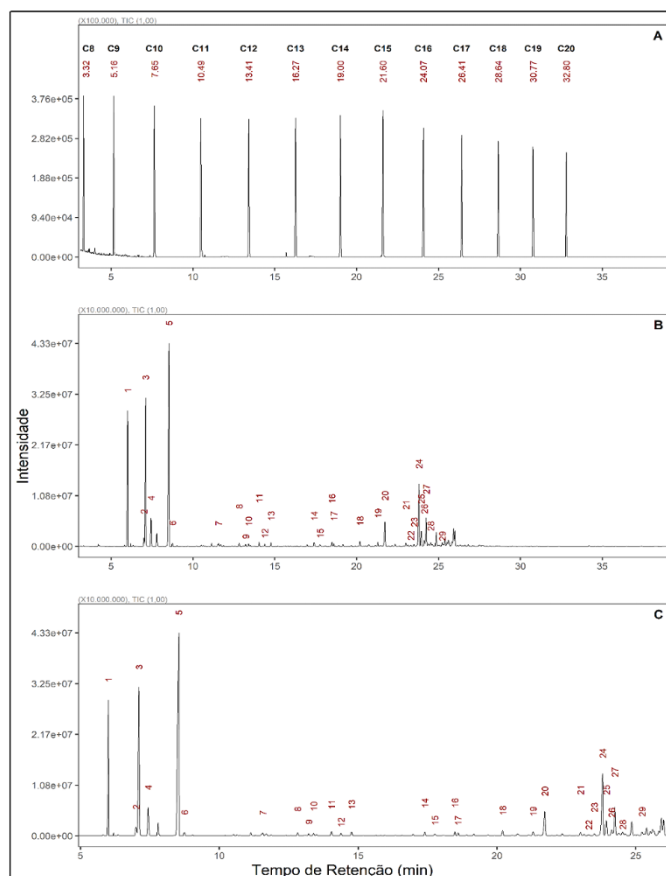


Figura AII-19: Perfis cromatográficos por CG-EM. **A)** Série homogênea de hidrocarbonetos C₈-C₂₀. **B)** Amostra Arbo0851, óleo essencial de *Xylopia aromatica*. **C)** Expansão de **B**. A numeração de cada pico corresponde ao estudo de identificação tabelado.

Tabela AII-10: Dados para identificação de voláteis por CG-EM a partir da amostra Arbo0851, óleo essencial de *X. aromatica*.

Nº	Compostos identificados	TR	IKc	IKp	IS (%)	PM	F. molecular	(%)
1	α -Pineno	6,0	934	935	97	136	C ₁₀ H ₁₆	10,52
2	Sabineno	7,0	974	974	96	136	C ₁₀ H ₁₆	0,98
3	β -Pineno	7,1	978	977	98	136	C ₁₀ H ₁₆	15,68
4	β -Miraceno	7,4	992	991	97	136	C ₁₀ H ₁₆	2,65
5	Limoneno	8,5	1031	1031	97	136	C ₁₀ H ₁₆	26,3
6	<i>Cis</i> -Ocimeno	8,8	1039	1038	96	136	C ₁₀ H ₁₆	0,39
7	<i>p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	11,6	1137	1138	95	152	C ₁₀ H ₁₆ O	0,49
8	4-Terpineol	12,8	1180	1180	91	154	C ₁₀ H ₁₈ O	0,37
9	<i>p</i> -Ment-1-en-8-ol	13,2	1193	1193	97	154	C ₁₀ H ₁₈ O	0,25
10	Mirtenol	13,4	1199	1198	94	152	C ₁₀ H ₁₆ O	0,30
11	<i>trans</i> -Carveol	14,0	1222	1219	94	152	C ₁₀ H ₁₆ O	0,49
12	<i>cis</i> -Carveol	14,4	1234	1236	97	152	C ₁₀ H ₁₆ O	0,29
13	Carvona	14,8	1247	1243	97	150	C ₁₀ H ₁₄ O	0,46
14	Bicicloelemeno	17,4	1341	1336	91	204	C ₁₅ H ₂₄	0,45
15	Acetato de Citronelil	17,8	1355	1355	90	198	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	0,28
16	α -Copaeno	18,5	1381	1381	96	204	C ₁₅ H ₂₄	0,51
17	Acetato de Geraniil	18,6	1385	1385	98	196	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0,32
18	Aromadendreno	20,2	1446	1447	95	204	C ₁₅ H ₂₄	0,62
19	Germacreno-D	21,3	1488	1488	90	204	C ₁₅ H ₂₄	0,54
20	Biciclogermacreno	21,7	1505	1500	96	204	C ₁₅ H ₂₄	3,33
21	Elemol	23,0	1557	1558	94	222	C ₁₅ H ₂₆ O	0,47
22	Viridiflorol	23,3	1569	1580	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	0,24
23	Epiglobulol	23,5	1577	1576	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	0,30
24	Espatuleno	23,8	1589	1585	94	220	C ₁₅ H ₂₄ O	9,12
25	Globulol	23,9	1595	1580	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	2,02
26	1 <i>H</i> -Cicloprop(<i>E</i>)Azulenol-4	24,1	1602	1600	91	222	C ₁₅ H ₂₆ O	0,91
27	Guaiol	24,2	1607	1602	93	222	C ₁₅ H ₂₆ O	3,56
28	β -Copaen-4- α -ol	24,5	1619	1589	90	220	C ₁₅ H ₂₄ O	0,70
29	Isoespatuleno	25,2	1649	1656	90	220	C ₁₅ H ₂₄ O	0,56
Monoterpenos								56,52
Monoterpenos oxigenados								3,25
Sesquiterpenos								5,45
Sesquiterpenos oxigenados								17,88
Total de compostos identificados								83,10

Nº = Numeração de cada pico no cromatograma; TR = tempo de retenção, min.; IKc = Índice de Kovats calculado; IKp = Índice de Kovats publicado (1-Adams R. P. 2007; 2-*Pherobase*; 3-*NIST*; 4-*PubChem*); IS = Índice de similaridade espectral; PM = peso molecular; F = Fórmula; (%) = percentual relativo.

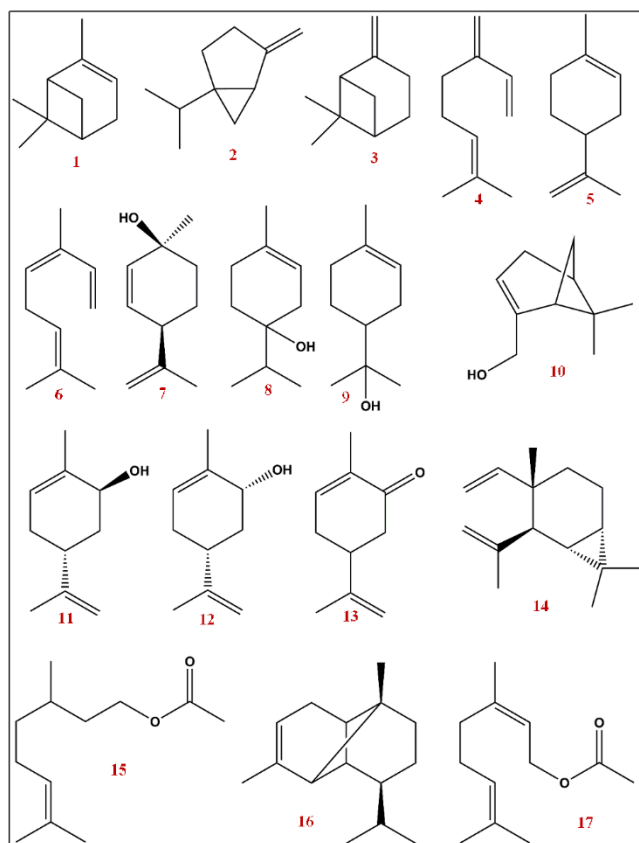


Figura AII-20: Estruturas químicas dos compostos identificados a partir da amostra Arbo0851, óleo essencial de *X. aromática*. A numeração segue conforme a tabela de identificação.

Continua

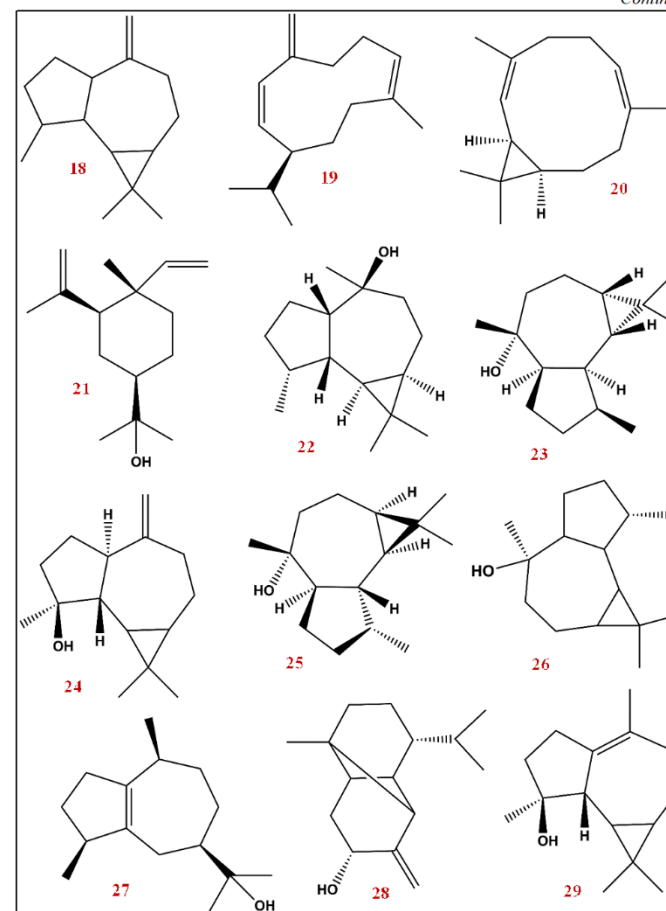


Figura AII-20: Estruturas químicas dos compostos identificados a partir da amostra Arbo0851, óleo essencial de *X. aromática*. A numeração segue conforme a tabela de identificação.

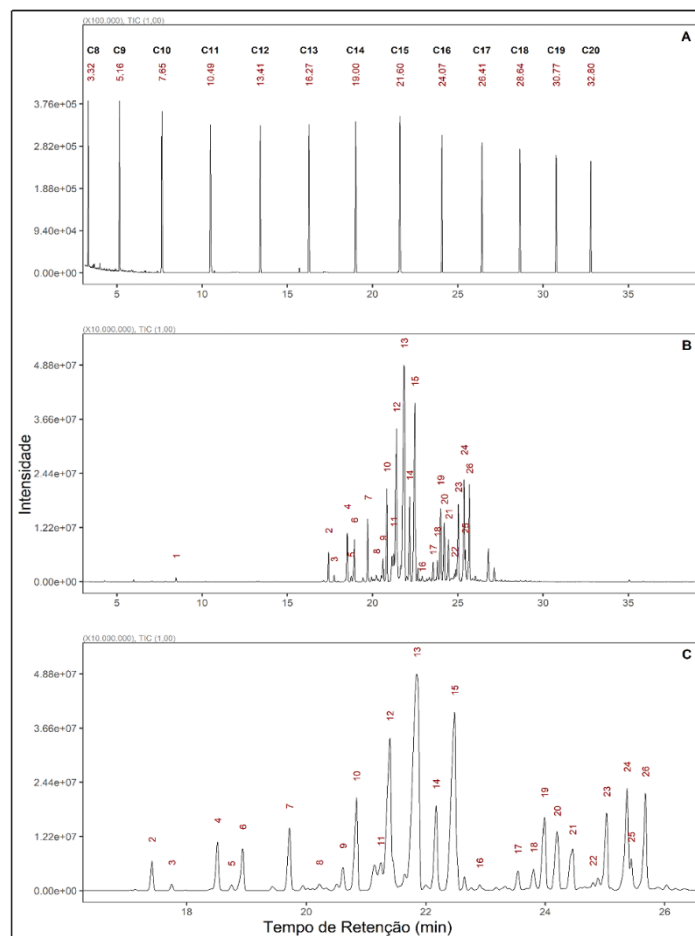


Figura AII-21: Perfis cromatográficos por CG-EM. **A)** Série homogênea de hidrocarbonetos C₈-C₂₀. **B)** Amostra Arbo0852, óleo essencial de *Myrcia torta*. **C)** Expansão de **B**. A numeração de cada pico corresponde ao estudo de identificação tabelado.

Tabela AII-11: Dados para identificação de voláteis por CG-EM a partir da amostra Arbo0852, óleo essencial de *M. torta*.

Nº	Compostos identificados	TR	IKc	IKp	IS (%)	PM	F.molecular	(%)
1	Limono	8,5	1029	1031	97	136	C ₁₀ H ₁₆	0,13
2	Bicicloelmeno	17,4	1342	1336	93	204	C ₁₅ H ₂₄	1,06
3	α -Cubebeno	17,7	1354	1354	94	204	C ₁₅ H ₂₄	0,23
4	α -Copaeno	18,5	1382	1381	95	204	C ₁₅ H ₂₄	1,98
5	α -Bourboneno	18,7	1391	1384	92	204	C ₁₅ H ₂₄	0,24
6	β -Elemeno	18,9	1398	1397	94	204	C ₁₅ H ₂₄	1,81
7	β -Cariofileno	19,7	1428	1428	97	204	C ₁₅ H ₂₄	2,75
8	Aromadendreno	20,2	1447	1447	95	204	C ₁₅ H ₂₄	0,39
9	α -Humuleno	20,6	1462	1462	95	204	C ₁₅ H ₂₄	1,01
10	Alo-Aromadendreno	20,8	1471	1468	95	204	C ₁₅ H ₂₄	4,36
11	γ -Muurolo	21,2	1486	1485	92	204	C ₁₅ H ₂₄	1,50
12	Germacreno-D	21,4	1492	1488	93	204	C ₁₅ H ₂₄	10,32
13	α -Amorfen	21,9	1510	1519	92	204	C ₁₅ H ₂₄	19,76
14	Germacra-1(10),4(15),5-trieno	22,2	1523	1527	94	204	C ₁₅ H ₂₄	3,93
15	?-Cadineno	22,5	1536	1530	92	204	C ₁₅ H ₂₄	12,45
16	α -Calacoreno	22,9	1553	1553	92	200	C ₁₅ H ₂₀	0,32
17	Epiglobulol	23,5	1579	1576	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	0,90
18	Espatuleno	23,8	1589	1585	93	220	C ₁₅ H ₂₄ O	1,10
19	Globulol	24,0	1597	1580	94	222	C ₁₅ H ₂₆ O	3,96
20	1 <i>H</i> -Cicloprop(<i>E</i>)Azulenol-4	24,2	1606	1600	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	3,40
21	Ledol	24,5	1617	1608	95	222	C ₁₅ H ₂₆ O	2,58
22	Humulano-1,6-dien-3-ol	24,8	1631	1619	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	0,36
23	α -Cedrol	25,0	1641	1615	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	3,68
24	τ -Muurolo	25,4	1656	1647	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	5,48
25	Torreiol	25,4	1658	1658	92	222	C ₁₅ H ₂₆ O	1,15
26	α -Cadinol	25,7	1669	1662	92	222	C ₁₅ H ₂₆ O	4,55
Monoterpenos								0,13
Monoterpenos oxigenados								0
Sesquiterpenos								62,16
Sesquiterpenos oxigenados								27,16
Total de compostos identificados								89,42

Nº = Numeração de cada pico no cromatograma; **TR** = tempo de retenção, min.; **IKc** = Índice de Kovats calculado; **IKp** = Índice de Kovats publicado (1-Adams R. P. 2007; 2-*Pherobase*; 3-*NIST*; 4-*PubChem*); **IS** = Índice de similaridade espectral; **PM** = peso molecular; **F** = Fórmula; **(%)** = percentual relativo.

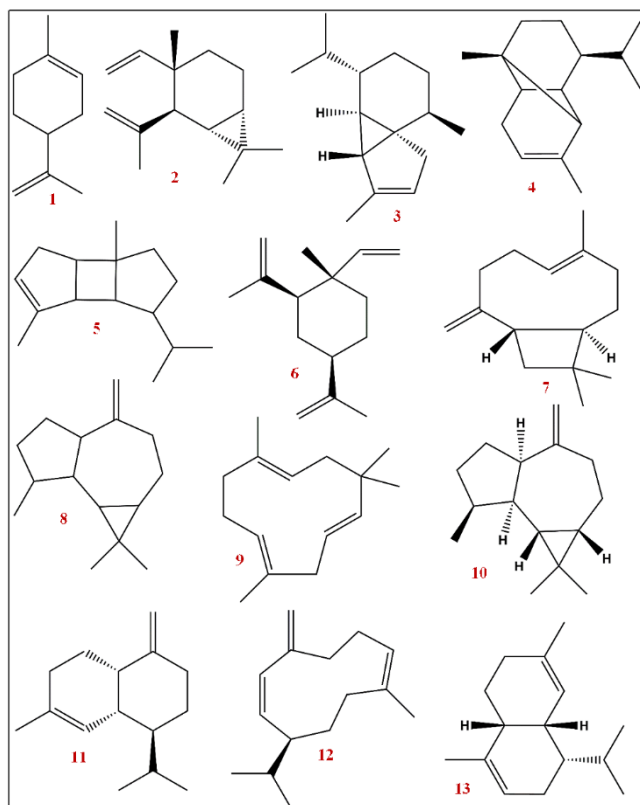


Figura AII-22: Estruturas químicas dos compostos identificados a partir da amostra Arbo0852, óleo essencial das folhas frescas de *M. torta*. A numeração segue conforme tabela de identificação.

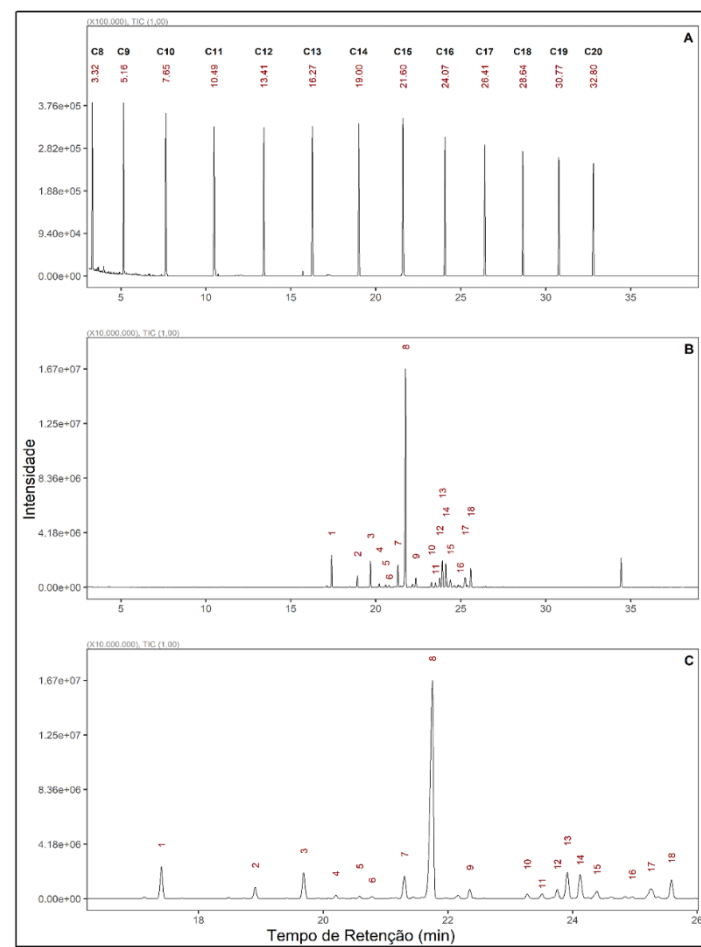


Figura AII-23: Perfis cromatográficos por CG-EM. A) Série homogênea de hidrocarbonetos C₈-C₂₀. B) Amostra Arbo0854, óleo essencial de *Casearia sylvestris*. C) Expansão de B. A numeração de cada pico corresponde ao estudo de identificação tabelado

Tabela AII-12: Dados para identificação de voláteis por CG-EM a partir da amostra Arbo0854, óleo essencial de *C. sylvestris*.

N°	Compostos identificados	TR	IKc	IKp	IS (%)	PM	F. molecular	(%)
1	Bicicloelemeno	17,4	1342	1336	91	204	C ₁₅ H ₂₄	5,46
2	β -Elemeno	18,9	1397	1397	94	204	C ₁₅ H ₂₄	2,07
3	β -Cariofileno	19,7	1426	1428	96	204	C ₁₅ H ₂₄	4,82
4	Aromadendreno	20,2	1446	1447	95	204	C ₁₅ H ₂₄	0,64
5	α -Humuleno	20,6	1461	1462	94	204	C ₁₅ H ₂₄	0,46
6	Alo-Aromadendreno	20,8	1469	1468	92	204	C ₁₅ H ₂₄	0,47
7	Germacreno-D	21,3	1489	1488	90	204	C ₁₅ H ₂₄	4,32
8	Biciclogermacreno	21,8	1506	1500	96	204	C ₁₅ H ₂₄	47,44
9	?-Cadineno	22,4	1530	1530	91	204	C ₁₅ H ₂₄	1,79
10	Nerolidol	23,3	1568	1563	95	222	C ₁₅ H ₂₆ O	0,98
11	Palustrol	23,5	1577	1579	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	1,01
12	Espatuleno	23,8	1587	1585	92	220	C ₁₅ H ₂₄ O	1,8
13	Globulol	23,9	1594	1580	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	5,39
14	1 <i>H</i> -Cicloprop(<i>E</i>)Azulenol-4	24,1	1602	1600	94	222	C ₁₅ H ₂₆ O	5,05
15	Ledol	24,4	1614	1608	91	222	C ₁₅ H ₂₆ O	2,03
16	Cubenol	25,0	1638	1638	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	0,37
17	τ -Cadinol	25,3	1651	1646	93	222	C ₁₅ H ₂₆ O	3,39
18	α -Cadinol	25,6	1665	1662	94	222	C ₁₅ H ₂₆ O	3,83
	Monoterpenos							0
	Monoterpenos oxigenados							0
	Sesquiterpenos							67,47
	Sesquiterpenos oxigenados							23,85
	Total de compostos identificados							91,32

N° = Numeração de cada pico no cromatograma; TR = tempo de retenção, min.; IKc = Índice de Kovats calculado; IKp = Índice de Kovats publicado (1-Adams R. P. 2007; 2-*Pherobase*; 3-*NIST*; 4-*PubChem*); IS = Índice de similaridade espectral; PM = peso molecular; F = Fórmula; (%) = percentual relativo.

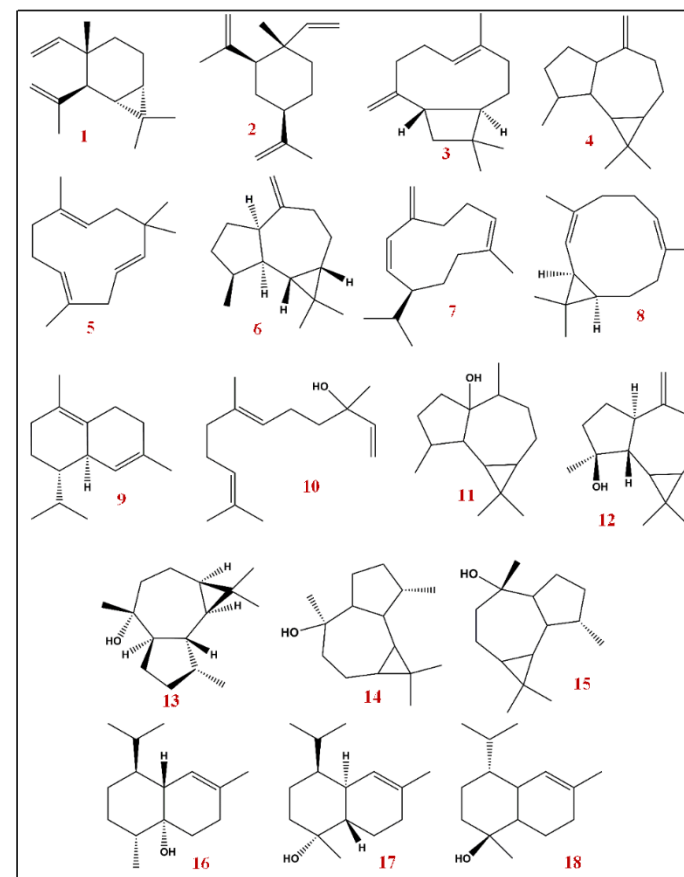


Figura AII-24: Estruturas químicas dos compostos identificados a partir da amostra Arbo0854, óleo essencial das folhas frescas de *C. sylvestris*. A numeração segue conforme tabela de identificação.

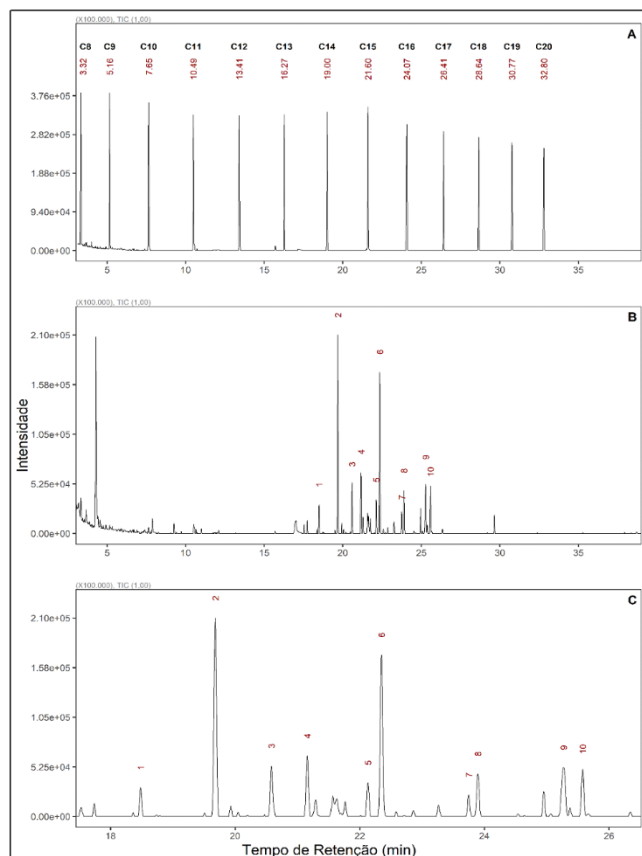


Figura AII-25: Perfis cromatográficos por CG-EM. **A)** Série homogênea de hidrocarbonetos C₈-C₂₀. **B)** Amostra Arbo0856, óleo essencial de *Myrsine guianensis*. **C)** Expansão de **B**. A numeração de cada pico corresponde ao estudo de identificação tabelado.

Tabela AII-13: Dados para identificação de voláteis por CG-EM a partir da amostra Arbo0856, óleo essencial de *M. guianensis*.

Nº	Compostos identificados	TR	IKc	IKp	IS (%)	PM	F. molecular	(%)
1	α -Copaeno	18,5	1381	1381	90	204	C ₁₅ H ₂₄	2,22
2	β -Cariofileno	19,7	1426	1428	96	204	C ₁₅ H ₂₄	18,22
3	α -Humuleno	20,6	1461	1462	92	204	C ₁₅ H ₂₄	4,65
4	γ -Cadineno	21,2	1483	1483	90	204	C ₁₅ H ₂₄	5,13
5	α -Amorfenol	22,1	1521	1519	90	204	C ₁₅ H ₂₄	2,86
6	β -Cadineno	22,3	1530	1530	90	204	C ₁₅ H ₂₄	14,28
7	Bergamotol	23,7	1587	1694	90	220	C ₁₅ H ₂₄ O	1,65
8	Globulol	23,9	1593	1580	90	220	C ₁₅ H ₂₄ O	3,90
9	τ -Muurolol	25,3	1651	1647	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	6,65
10	α -Cadinol	25,6	1664	1662	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	4,19
Monoterpenos								0
Monoterpenos oxigenados								0
Sesquiterpenos								47,36
Sesquiterpenos oxigenados								16,39
Total de compostos identificados								63,75

Nº= Numeração de cada pico no cromatograma; **TR**= tempo de retenção, min.; **IKc**= Índice de Kovats calculado; **IKp**= Índice de Kovats publicado (1-Adams R. P. 2007; 2-*Pherobase*; 3-*NIST*; 4-*PubChem*); **IS** = Índice de similaridade espectral; **PM** = peso molecular; **F** = Fórmula; **(%)** = percentual relativo.

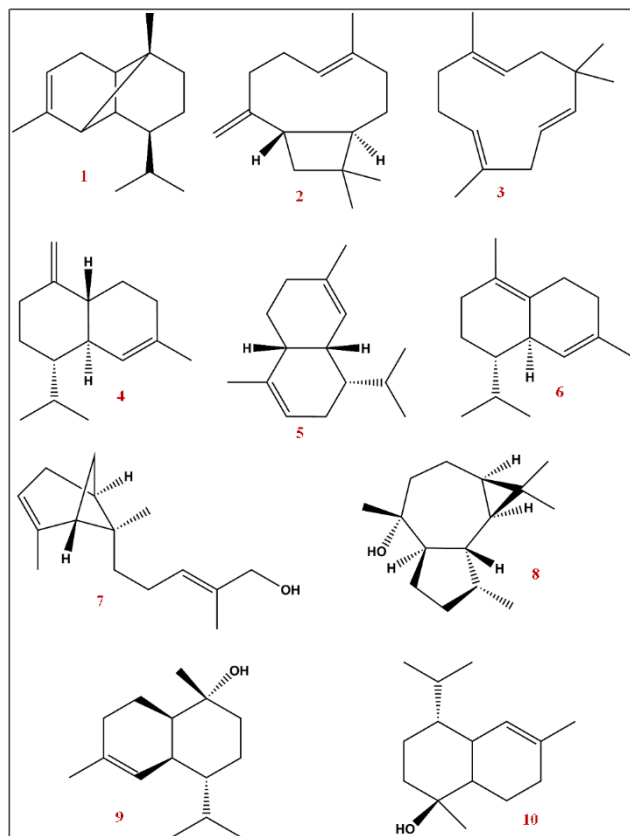


Figura AII-26: Estruturas químicas dos compostos identificados a partir da amostra Arbo0856, óleo essencial de *M. gutanensis*. A numeração segue conforme listada na tabela de identificação.

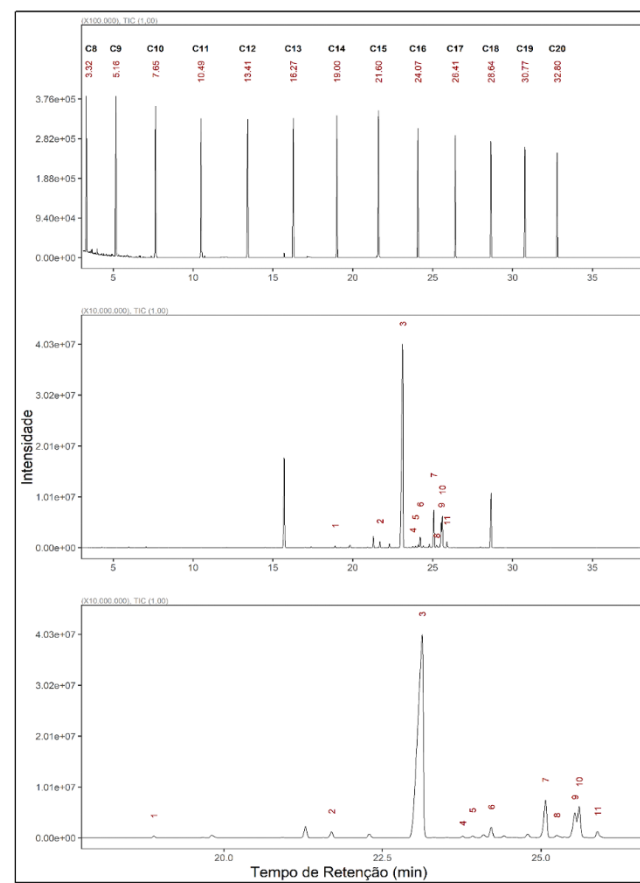


Figura AII-27: Perfis cromatográficos por CG-EM. **A)** Série homogênea de hidrocarbonetos C₈-C₂₀. **B)** Amostra Arbo0859, óleo essencial de *Duguetia furfuracea*. **C)** Expansão de **B**. A numeração de cada pico corresponde ao estudo de identificação tabelado.

Tabela AII-14: Dados para identificação de voláteis por CG-EM a partir da amostra Arbo0859, óleo essencial de *D. furfuracea*.

N°	Compostos identificados	TR	IKc	IKp	IS (%)	PM	F. molecular	(%)
1	β -Elemeno	18,9	1396	1397	91	204	C ₁₅ H ₂₄	0,23
2	Biciclogermacreno	21,7	1504	1500	96	204	C ₁₅ H ₂₄	0,88
3	Elemol	23,1	1562	1558	95	222	C ₁₅ H ₂₆ O	53,81
4	Espatuleno	23,8	1588	1585	93	220	C ₁₅ H ₂₄ O	0,28
5	Globulol	23,9	1594	1580	91	222	C ₁₅ H ₂₆ O	0,33
6	Guaiol	24,2	1606	1602	93	222	C ₁₅ H ₂₆ O	1,49
7	10-Epi- γ -Eudesmol	25,1	1643	1632	91	222	C ₁₅ H ₂₆ O	5,77
8	Agarospírol	25,2	1650	1643	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	0,53
9	β -Eudesmol	25,5	1662	1662	91	222	C ₁₅ H ₂₆ O	4,43
10	α -Eudesmol	25,6	1665	1667	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	4,15
11	5-Azuleno-Metanol	25,9	1678	1576	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	1,07
Monoterpenos								0
Monoterpenos oxigenados								0
Sesquiterpenos								1,11
Sesquiterpenos oxigenados								71,86
Total de compostos identificados								72,97

N° = Numeração de cada pico no cromatograma; TR = tempo de retenção, min.; IKc = Índice de Kovats calculado; IKp = Índice de Kovats publicado (1-Adams R. P. 2007; 2-*Pherobase*; 3-NIST; 4-*PubChem*); IS = Índice de similaridade espectral; PM = peso molecular; F = Fórmula; (%) = percentual relativo.

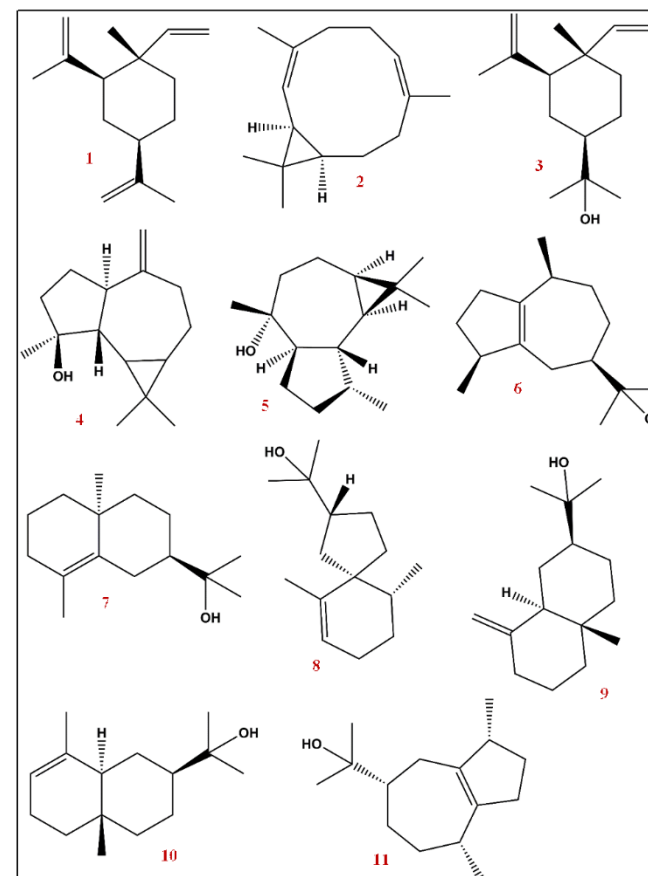


Figura AII-28: Estruturas químicas dos compostos identificados a partir da amostra Arbo0859, óleo essencial das folhas frescas de *D. furfuracea*. A numeração segue conforme tabela de identificação.

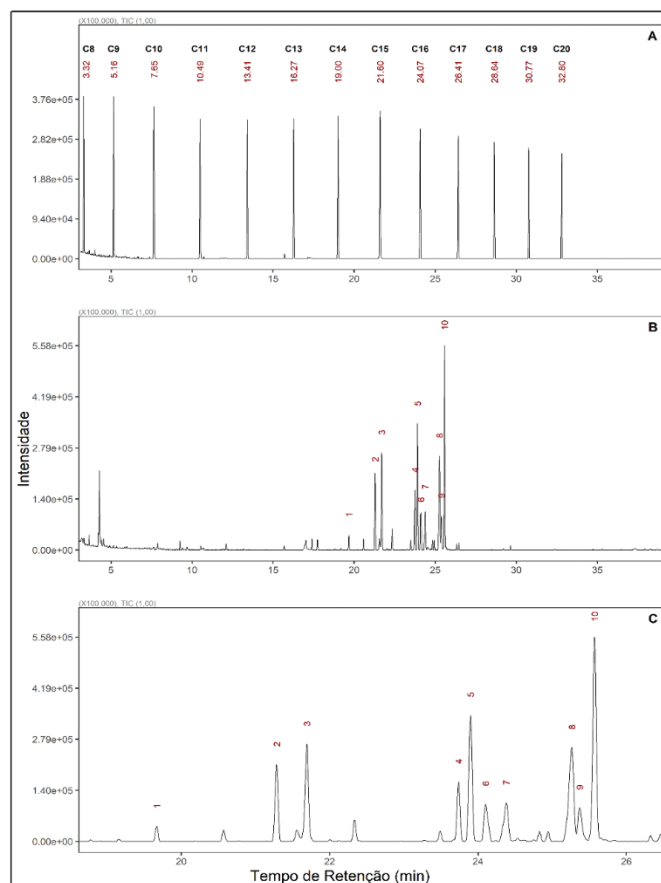


Figura AII-29: Perfis cromatográficos por CG-EM. A) Série homogênea de hidrocarbonetos C₈-C₂₀. B) Amostra Arbo0861, óleo essencial de *Eugenia klotzschiana*. C) Expansão de B. A numeração de cada pico corresponde ao estudo de identificação tabelado.

Tabela AII-15: Estudo de identificação por CG-EM a partir da amostra Arbo0861, óleo essencial de *E. klotzschiana*.

Nº	Compostos identificados	TR	IKc	IKp	IS (%)	PM	F. molecular	(%)
1	β -Cariofileno	19,7	1426	1428	90	204	C ₁₅ H ₂₄	1,26
2	Germacreno-D	21,3	1488	1488	91	204	C ₁₅ H ₂₄	7,26
3	Biciclogermacreno	21,7	1504	1500	95	204	C ₁₅ H ₂₄	10,18
4	Espatuleno	23,7	1587	1585	93	220	C ₁₅ H ₂₄ O	5,56
5	Globulol	23,9	1593	1580	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	12,91
6	1H-Cicloprop(E)Azulenol-4	24,1	1601	1600	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	4,72
7	Ledol	24,4	1613	1608	91	222	C ₁₅ H ₂₆ O	5,38
8	τ -Muurolo	25,3	1651	1647	93	222	C ₁₅ H ₂₆ O	14,35
9	Torreol	25,4	1655	1658	90	222	C ₁₅ H ₂₆ O	4,30
10	α -Cadinol	25,6	1664	1662	93	222	C ₁₅ H ₂₆ O	22,01
	Monoterpenos							0
	Monoterpenos oxigenados							0
	Sesquiterpenos							18,70
	Sesquiterpenos oxigenados							69,23
	Total de compostos identificados							87,93

Nº= Numeração de cada pico no cromatograma; TR= tempo de retenção, min.; IKc= Índice de Kovats calculado; IKp= Índice de Kovats publicado (1-Adams R. P. 2007; 2-*Pherobase*; 3-*NIST*; 4-*PubChem*); IS = Índice de similaridade espectral; PM = peso molecular; F = Fórmula; (%) = percentual relativo.

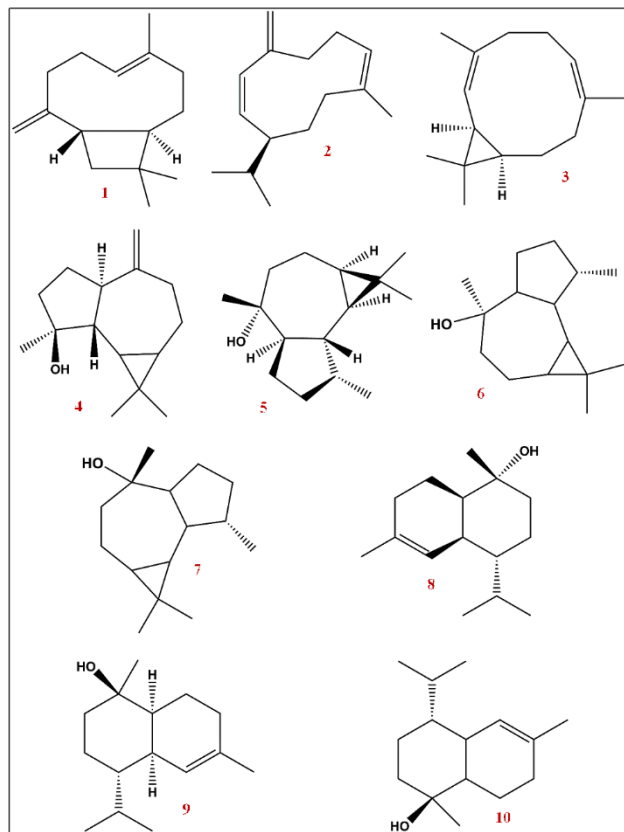


Figura AII-30: Estruturas químicas dos compostos identificados a partir da amostra Arbo0861, óleo essencial de *E. klotzschiana*. A numeração segue conforme tabela de identificação.

REFERÊNCIAS

1. Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet* [Internet]. 1997 May 3 [cited 2020 May 18];349(9061):1269–76. Available from: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(96\)07493-4/fulltext#](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(96)07493-4/fulltext#)
2. Cooper CL. Pandemic H1N12009 influenza and HIV: A review of natural history, management and vaccine immunogenicity. *Curr Opin Infect Dis*. 2012;25(1):26–35.
3. Hennessey M, Fischer M, Staples JE. Zika Virus Spreads to New Areas — Region of the Americas, May 2015–January 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65(3):1–4.
4. Hazin AN, Poretti A, Di Cavalcante Souza Crru D, Tenóri M, van der Linden A, Pena LJ, *et al*. Computed Tomographic Findings in Microcephaly Associated with Zika Virus. *N Engl J Med* [Internet]. 2016;374(22):2193–5. Available from: <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMc1603617?articleTools=true>
5. Bogoch II, Brady OJ, Kraemer MUG, German M, Creatore MI, Kulkarni MA, *et al*. Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil. *Lancet* [Internet]. 2016;387(10016):335–6. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00080-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00080-5)
6. La Montagne JR, Noble GR, Quinnan G V., Curlin GT, Blackwelder WC, Smith JI, *et al*. Summary of clinical trials of inactivated influenza vaccine - 1978. *Rev Infect Dis*. 1983;5(4):723–36.
7. Londono-Renteria B, Troupin A, Colpitts TM. Arbovirosis and potential transmission blocking vaccines. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2016;9(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1802-0>
8. Lopes N, Nozawa C, Linhares REC. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Rev Pan-Amazônica Saúde*. 2014;5(3):55–64.

9. Huang YJS, Higgs S, Vanlandingham DL. Arbovirus-mosquito vector-host interactions and the impact on transmission and disease pathogenesis of arboviruses. *Front Microbiol.* 2019;10(JAN):1–14.
10. Sukhralia S, Verma M, Gopirajan S, Dhanaraj PS, Lal R, Mehla N, *et al.* From dengue to Zika: the wide spread of mosquito-borne arboviruses. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019;38(1):3–14.
11. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Mosquito-borne diseases [Internet]. [cited 2019 Jul 30]. Available from:
https://www.who.int/neglected_diseases/vector_ecology/mosquito-borne-diseases/en/
12. Lindsay SW, Wilson A, Golding N, Scott TW, Takken W. Improving the built environment in urban areas to control *Aedes aegypti*-borne diseases. *Bull World Health Organ.* 2017;95(8):607–8.
13. Caputo AT, Alonzi DS, Kiappes JL, Struwe WB, Cross A, Basu S, *et al.* Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies. 2018;1062:265–76. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-8727-1>
14. Dick GWA. Zika Virus I. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952;34(4):282.
15. Amraoui F, Ayed W Ben, Madec Y, Faraj C, Himmi O, Btissam A, *et al.* Potential of aedes albopictus to cause the emergence of arboviruses in Morocco. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(2):1–12.
16. Guedes DRD, Paiva MHS, Donato MMA, Barbosa PP, Krokovsky L, Rocha SWS, *et al.* Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. *Emerg Microbes Infect.* 2017;6(8).
17. Negi C, Verma P. Review on *Culex quinquefasciatus*: Southern House Mosquito. *Int J Life-Sciences Sci Res.* 2018;4(1).
18. Garcia M. Pesquisador aponta diferenças entre *A. aegypti* e pernilongo doméstico [Internet]. Rio de Janeiro; 2009. Available from:
<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=599&sid=32>
19. Villar L, Dayan GH, Arredondo-García JL, Rivera DM, Cunha R. Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Children in Latin America. *N Engl J Med.*

- 2015;372(2):113–23.
20. Rudd PA, Mahalingam S. Fighting back against chikungunya. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2015;15(5):488–9. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)70079-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)70079-4)
 21. WHO. Dengue and severe dengue [Internet]. 2020 [cited 2020 Sep 12]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
 22. Brasil S de V em S– M da S do B. Boletim epidemiológico. Monitoramento dos casos de Arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika), semanas epidemiológicas 1 a 50, 2020. *Bol Epidemiológico Arboviroses*. 2020;51(24):1–13.
 23. Dengue Virus Net.com. Life Cycle of *Aedes aegypti* [Internet]. [cited 2020 Sep 12]. Available from: <http://www.denguevirusnet.com/life-cycle-of-aedes-aegypti.html>
 24. CDC. Mosquito Life-Cycle. *Culex pipiens*, *Cx. quinquefasciatus* and *Cx.tarsalis*. US Dep Heal Hum Serv [Internet]. 2020;1–2. Available from: http://www.cdc.gov/dengue/entomologyecology/m_lifecycle.html
 25. Kraemer MUG, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQN, Shearer FM, Barker CM, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *Elife*. 2015;4(JUNE2015):1–18.
 26. Kazmi SS, Ali W, Bibi N, Nouroz F. A review on Zika virus outbreak, epidemiology, transmission and infection dynamics. *J Biol Res* [Internet]. 2020;27(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40709-020-00115-4>
 27. Pavela R. History, presence and perspective of using plant extracts as commercial botanical insecticides and farm products for protection against insects - A review. *Plant Prot Sci*. 2016;52(4):229–41.
 28. Kamaraj C, Rahuman AA, Bagavan A. Antifeedant and larvicidal effects of plant extracts against *Spodoptera litura* (F.), *Aedes aegypti* L. and *Culex quinquefasciatus* Say. *Parasitol Res*. 2008;103(2):325–31.
 29. Kim S II, Ahn YJ. Larvicidal activity of lignans and alkaloid identified in *Zanthoxylum piperitum* bark toward insecticide-susceptible and wild *Culex*

- pipiens pallens* and *Aedes aegypti*. *Parasites and Vectors*. 2017;10(1):1–10.
30. Bisset JA, Marín R, Rodríguez MM, Severson DW, Ricardo Y, French L, *et al.* Insecticide resistance in two *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) strains from Costa Rica. *J Med Entomol*. 2013;50(2):352–61.
 31. Leandro A de S, Rios JA, Britto A da S, Galvão SR, Lopes RD, Rivas AV, *et al.* Malathion insecticide resistance in *Aedes aegypti*: laboratory conditions and in situ experimental approach through adult entomological surveillance. *Trop Med Int Heal*. 2020;25(10):1271–82.
 32. Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *Int J Microbiol*. 2012. doi:10.1155/2012/713687
 33. Albernaz LC, de Paula JE, Romero GAS, Silva M do RR, Grellier P, Mambu L, *et al.* Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. *J Ethnopharmacol [Internet]*. 2010;131(1):116–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.06.011>
 34. Walia S, Saha S, Tripathi V, Sharma KK. Phytochemical biopesticides: some recent developments. *Phytochem Rev*. 2017;16(5):989–1007.
 35. Chaithong U, Choochote W, Kamsuk K, Jitpakdi A, Tippawangkosol P, Chaiyasit D, *et al.* Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *J Vector Ecol*. 2006;31(1):138–44.
 36. Silvério MRS, Espindola LS, Lopes NP, Vieira PC. Plant Natural Products for the Control of *Aedes aegypti* : The Main Vector of Important Arboviruses. 2020;25(15):1–45.
 37. Moore SJ, Debboun M. Chapter 3: history of insect repellents. In: *Insect Repellents: Principles, Methods, and Uses [Internet]*. 2006. p. 3–29. Available from: https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=l2DLBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=FDR8nKeNjc&sig=G_GEj_LnOKMM723g9LndEVB-ftI&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
 38. Gouck H, McGovern TP, Beroza M. Chemicals tested as space repellents against yellow-fever mosquitoes. I. Esters. *J Econ Entomol*. 1967;60(6):1587–

- 90.
39. Grieco JP, Achee NL, Chareonviriyaphap T, Suwonkerd W, Chauhan K, Sardelis MR, *et al.* A new classification system for the actions of IRS chemicals traditionally used for malaria control. *PLoS One*. 2007;2(8).
 40. Syed Z, Leal WS. Mosquitoes smell and avoid the insect repellent DEET. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(36):13598–603.
 41. Dennis EJ, Goldman O V., Vosshall LB. *Aedes aegypti* mosquitoes Use Their Legs to Sense DEET on Contact. *Curr Biol* [Internet]. 2019;29(9):1551-1556.e5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.04.004>
 42. Tan K, Faienstein GB, Xu P, Barbosa RMR, Buss GK, Leal WS. A popular Indian clove-based mosquito repellent is less effective against *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* than DEET. *PLoS One*. 2019;14(11):1–13.
 43. Klink CA, Machado RB. A conservação do Cerrado brasileiro. In: *Megadiversidade*. 2005. p. 147–55.
 44. Gomes L, Miranda HS, Bustamante MM da C. How can we advance the knowledge on the behavior and effects of fire in the Cerrado biome? *For Ecol Manage* [Internet]. 2018;417(December 2017):281–90. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.02.032>
 45. Strassburg BBN, Brooks T, Feltran-Barbieri R, Iribarrem A, Crouzeilles R, Loyola R, *et al.* Moment of truth for the Cerrado hotspot. *Nat Ecol Evol* [Internet]. 2017;1(4):1–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41559-017-0099>
 46. Pacheco AA, Neves ACO, Fernandes GW. Uneven conservation efforts compromise Brazil to meet the Target 11 of Convention on Biological Diversity. *Perspect Ecol Conserv* [Internet]. 2018;16(1):43–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pecon.2017.12.001>
 47. Menegasi D. Cerrado responde por quase um terço de toda área desmatada no Brasil em 2020. *O Eco* [Internet]. 2021 Jul 26; Available from: <https://www.oeco.org.br/reportagens/cerrado-responde-por-quase-um-terco->

- de-toda-area-desmatada-no-brasil-em-2020/?utm_source=mailpoet&utm_medium=email&utm_campaign=hoje-em-o-eco-newsletter-e-mais
48. Valli M, Atanázio LCV, Monteiro GC, Coelho RR, Demarque DP, Andricopulo AD, *et al.* The Potential of Biologically Active Brazilian Plant Species as a Strategy to Search for Molecular Models for Mosquito Control. *Planta Med.* 2021;87(1–2):6–23.
 49. Bridi H, de Carvalho Meirelles G, Lino von Poser G. Subtribe Hyptidinae (Lamiaceae): A promising source of bioactive metabolites. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2021;264(June 2020):113225. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113225>
 50. Imatomi M, Novaes P, Matos AP, Gualtieri SCJ, Molinillo JMG, Lacroet R, *et al.* Phytotoxic effect of bioactive compounds isolated from *Myrcia tomentosa* (Myrtaceae) leaves. *Biochem Syst Ecol.* 2013;46:29–35.
 51. Sedaghat Doost A, Nikbakht Nasrabadi M, Kassozi V, Nakisozi H, Van der Meeren P. Recent advances in food colloidal delivery systems for essential oils and their main components. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2020;99(August 2019):474–86. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.037>
 52. Pavela R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2015;76:174–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.050>
 53. Santos SM dos, de Oliveira Junior PC, de Matos Balsalobre N, Kassuya CAL, Cardoso CAL, Pereira ZV, *et al.* Variation in essential oil components and anti-inflammatory activity of *Allophylus edulis* leaves collected in central-western Brazil. *J Ethnopharmacol.* 2021;267(July 2020).
 54. Mendes NGM, Silva RL, Espindola LS. Registro e perfil ecotoxicológico de produtos para controle de *Aedes aegypti*. *Vigilância Sanitária em Debate Soc Ciência Technol.* 2021;9(1):71–81.
 55. BRASIL. DECRETO Nº 4.074, DE 4 DE JANEIRO DE 2002 [Internet]. Presidência da República; 2002. Available from:

- https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm
56. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). RESOLUÇÃO - RDC Nº 19, DE 10 DE ABRIL DE 2013 [Internet]. 2013. Available from: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0019_10_04_2013.
 57. WHO. WHO recommended insecticides for space spraying against mosquitoes. [Internet]. 2012. Available from: <https://visaemdebate.incqs.fiocruz.br/index.php/visaemdebate/article/view/1453/1292>
 58. BRASIL. Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue. 2009.
 59. IOC-FIOCRUZ. Ministério da Saúde. Nota Técnica Nº2/2011/IOC-FIOCRUZ/DIRETORIA. Assunto : Recomendação técnica sobre a interrupção do uso de inseticidas piretróides no controle do *Aedes aegypti* no Brasil Recomendação geral Justificativa técnica. NT IOC 2/2011-v1/06092011. 2011;2560–3.
 60. ANVISA. (2016) ANVISA. Recomendações técnicas ao SNVS para colaborar no combate ao *Aedes aegypti*. 2016.
 61. ANVISA. Monografias de agrotóxicos autorizadas [Internet]. 2019. Available from: <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>
 62. Ministério da Saúde. Recomendações para uso do larvicida Novaluron para controle de *Aedes aegypti*. 2019.
 63. Prefeitura de Macaé. Prefeitura utiliza novo larvicida contra mosquito. 2019.
 64. ANVISA. Produtos saneantes para o combate ao *Aedes aegypti* [Internet]. 2020. Available from: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/saneantes/aedes-aegypti>
 65. Wiart C. Medicinal plants of Asia and Pacific: drugs for the future? Toh Tuck Link, Singapore: World Sicientific Publishing Co. Pte. Ltd.; 2006.
 66. Lenza E, Ferreira JN, Consolaro H, Aquino FDG. Biologia reprodutiva de

- Rourea induta* Planch. (Connaraceae), uma espécie heterostílica de cerrado do Brasil Central. Rev Bras Bot. 2008;31(3):389–98.
67. Forero E. Connaraceae. In: Flora Neotropica [Internet]. 1983. p. 1–207. Available from: www.jstor.org/stable/4393772
68. Garelli FM, Espinosa MO, Weinberg D, Trinelli MA, Gürtler RE. Water use practices limit the effectiveness of a temephos-based *Aedes aegypti* larval control program in Northern Argentina. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5(3):1–9.
69. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. WHO [Internet]. 2005;1–41. Available from: http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf?ua=1
70. Da Costa RC, Santana DB, Araújo RM, De Paula JE, Do Nascimento PC, Lopes NP, *et al.* Discovery of the rapanone and suberonone mixture as a motif for leishmanicidal and antifungal applications. Bioorganic Med Chem [Internet]. 2014;22(1):135–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.11.044>
71. Midiwo JO, Arot LM, Mbakaya CL. Distribution of benzoquinone pigments in Kenyan Myrsinaceae. Bull Chem Soc Ethiop. 1988;2:83–5.
72. Patel DK, Patel K, Kumar R, Gadewar M, Tahilyani V. Pharmacological and analytical aspects of bergenin: A concise report. Asian Pacific J Trop Dis [Internet]. 2012;2(2):163–7. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2222-1808\(12\)60037-1](http://dx.doi.org/10.1016/S2222-1808(12)60037-1)
73. Midiwo JO, Arot LM. New dialkyl benzoquinones from fruits of *Myrsine africana* L and *Maesa lanceolata*, Forsk. Nat Prod Lett. 1996;8(1):11–4.
74. Mahendran S, Badami S, Ravi S, Thippeswamy BS, Veerapur VP. Synthesis and evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of most active free radical scavenging derivatives of embelin - A Structure-activity relationship. Chem Pharm Bull. 2011;59(8):913–9.
75. Aiyar SN, Jain MK, Krishnamurti M, Seshadri TR. Chemical components of the roots of *Connarus monocarpus*. Phytochemistry. 1964;3:335–9.

76. Midiwo JO, Mwangi RW, Ghebremeskel Y. Insect antifeedant, growth-inhibiting and larvicidal compounds from *Rapanea melanphloes* (Myrsinaceae). *Int J Trop Insect Sci.* 1995;16(02):163–6.
77. Egly G, Tapia A, Sortino M, Zacchino S, Rojas A, Arias D, *et al.* Bioactive alkyl phenols and embelin from *Oxalis erythrorhiza*. 2003;88:241–7.
78. De Sousa DP, Vieira YW, Uliana MP, Melo MA, Brocksom TJ, Cavalcanti SCH. Larvicidal activity of para-Benzoquinones. *Parasitol Res.* 2010;107(3):741–5.
79. Cheng SS, Huang CG, Chen WJ, Kuo YH, Chang ST. Larvicidal activity of tectoquinone isolated from red heartwood-type *Cryptomeria japonica* against two mosquito species. *Bioresour Technol.* 2008;99(9):3617–22.
80. Momin RA, Nair MG. Mosquitocidal, nematocidal, and antifungal compounds from *Apium graveolens* L. seeds. *J Agric Food Chem.* 2001;49(1):142–5.
81. Sreelatha T, Hymavathi A, Murthy JM, Rani PU, Rao JM, Babu KS. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Bioactivity-guided isolation of mosquitocidal constituents from the rhizomes of *Plumbago capensis* Thunb. *Bioorg Med Chem Lett [Internet]*. 2010;20(9):2974–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.02.107>
82. Dong X, Fu J, Yin X, Cao S, Li X, Lin L. Emodin : A Review of its Pharmacology, Toxicity and Pharmacokinetics. 2016;1218(January):1207–18.
83. Yang YC, Lim MY, Lee HS. Emodin Isolated from *Cassia obtusifolia* (Leguminosae) Seed Shows Larvicidal Activity against Three Mosquito Species. *J Agric Food Chem.* 2003;51(26):7629–31.
84. Bolton JL, Dunlap T. Formation and biological targets of quinones: Cytotoxic versus cytoprotective effects. *Chem Res Toxicol.* 2017;30(1):13–37.
85. Keywan L. Glutathione S-transferase activities in phytophagous insects: induction and inhibition by plant phototoxins and phenols. *Insect Biochemistry*; 1991. p. 353–36.
86. DeLiberto ST, Werner SJ. Review of anthraquinone applications for pest management and agricultural crop protection. *Pest Manag Sci.* 2016;72(10):1813–25.

87. Ishaaya I, Nauen R, Horowitz AR. Insecticides design using advanced technologies. Ishaaya I, Nauen R, Horowitz AR, editors. Springer. Springer; 2007. 1–320 p.
88. ECHA. 2-methylantraquinone [Internet]. [cited 2019 Nov 19]. Available from: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/17757/5/1>
89. Guidelines O, The FOR, Of T. OECD guidelines for testing of chemicals. Dermatotoxicology. 2013;(July):509–11.
90. Piau TB. Avaliação dos efeitos embriotóxicos, genotóxicos e bioquímicos de larvicidas alternativos da classe das quinonas para o controle do *Aedes aegypti* usando o peixe-zebra (*Danio rerio*) como espécie modelo. Universidade de Brasília; 2021.
91. Henrique JS, Falcare RS, Lopes PS. Sistemas de liberação controlada. Pharm Bras. 2006;56:22.
92. de Paulo Farias D, Neri-Numa IA, de Araújo FF, Pastore GM. A critical review of some fruit trees from the Myrtaceae family as promising sources for food applications with functional claims. Food Chem [Internet]. 2020;306(April 2019):125630. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125630>
93. Xia L, Guo Q, Tu P, Chai X. The genus *Casearia*: a phytochemical and pharmacological overview. Phytochem Rev. 2015;14(1):99–135.
94. Ferreira PMP, Costa-Lotufo L V., Moraes MO, Barros FWA, Martins AMA, Cavalheiro AJ, *et al.* Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: A medicinal review. An Acad Bras Cienc. 2011;83(4):1373–84.
95. van Tamelen EE. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Vol. 78, Journal of the American Chemical Society. 2016. 1266–1266 p.
96. Eklund H, Doyle JA, Herendeen PS. Morphological phylogenetic analysis of living and fossil Chloranthaceae. Int J Plant Sci. 2004;165(1):107–51.
97. Cao CM, Peng Y, Shi QW, Xiao PG. Chemical constituents and bioactivities of plants of chloranthaceae. Chem Biodivers. 2008;5(2):219–38.
98. Boucher FC, Zimmermann NE, Conti E. Allopatric speciation with little niche

- divergence is common among alpine Primulaceae. *J Biogeogr.* 2016;43(3):591–602.
99. Turan Z, Toker E, Sönmez MO, Kutlar F. Plant use as a traditional method by women against vaginal discharge in western Anatolia, Turkey: A qualitative research study. *J Herb Med [Internet]*. 2019;17–18(April 2018):100272. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2019.100272>
 100. Kubitzki K. The families and genera of vascular plants. Vol. 11, Flowering Plants. Eudicots: Malpighiales. 2014. 1–332 p.
 101. Sri Rama Murthy K, Chandrasekhara Reddy M, Sandhya Rani S, Sri Rama Murthy CK, Pullaiah T. Bioactive principles and biological properties of essential oils of Burseraceae: A review. *J Pharmacogn Phytochem.* 2016;5(2):247–58.
 102. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(2):446–75.
 103. Adams RP. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th Edition. Illinois USA Allured Publ Corp Carol Stream. 2007;4:804–6.
 104. Silva RL, Demarque DP, Dusi RG, Albernaz LC, Espindola LS. Residual Larvicidal Activity of Quinones against *Aedes aegypti*. *Molecules.* 2020 Aug 31;25(17):3978. doi: 10.3390/molecules25173978.
 105. Moreira IM. Avaliação da suscetibilidade de populações de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) do Distrito Federal à inseticidas e seu controle de qualidade químico. 2018;32–4. Available from: https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/34879/1/2018_IsraelMartinsMoreira.pdf
 106. Resistance EI, Using V, Bioassay CDCB. Guideline for Evaluating Insecticide Resistance in Vectors Using the CDC Bottle Bioassay. :1–28.
 107. Estrada JLT, Moscoso KEP, Salas IF, Achee NL, Grieco JP. Spatial repellency and other effects of transfluthrin and linalool on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *J Vector Ecol.* 2019;44(1):89–93.

108. Leal WS, Barbosa RMR, Zeng F, Faierstein GB, Tan K, Paiva MHS, *et al.* Does Zika virus infection affect mosquito response to repellents? *Sci Rep.* 2017;7(December 2016):1–9.
109. Kramer WL, Mulla MS. Oviposition attractants and repellents of mosquitoes: Oviposition responses of *Culex* mosquitoes to organic infusions. *Environ Entomol.* 1979;8(6):1111–7.
110. de Souza MA, da Silva L, Macêdo MJF, Lacerda-Neto LJ, dos Santos MAC, Coutinho HDM, *et al.* Adulticide and repellent activity of essential oils against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) – A review. *South African J Bot.* 2019;124:160–5.
111. Azeem M, Zaman T, Tahir M, Haris A, Iqbal Z, Binyameen M, *et al.* Chemical composition and repellent activity of native plants essential oils against dengue mosquito, *Aedes aegypti*. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2019;140(January):111609. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111609>
112. Silva MVSG, Silva SA, Teixeira TL, De Oliveira A, Morais SAL, Da Silva CV, *et al.* Essential oil from leaves of *Eugenia calycina* Cambes: Natural larvicidal against *Aedes aegypti*. *J Sci Food Agric.* 2021;101(3):1202–8.
113. Suwansirisilp K, Visetson S, Prabaripai A, Tanasinchayakul S, Grieco JP, Bangs MJ, *et al.* Behavioral responses of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to four essential oils in Thailand. *J Pest Sci* 2013;86(2):309–20.
114. Costa TR, Fernandes OFL, Santos SC, Oliveira CMA, Lião LM, Ferri PH, *et al.* Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. *J Ethnopharmacol.* 2000;72(1–2):111–7.
115. Do Nascimento MNG, Junqueira JGM, Terezan AP, Severino RP, De Souza Silva T, Martins CHG, *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Xylopia aromatica* (Annonaceae) flowers and leaves. *Rev Virtual Quim.* 10(5):1578–90.
116. Estevam EBB, De Deus IPB, Da Silva VP, Da Silva EAJ, Alves CCF, Alves JM, *et al.* In vitro antiparasitic activity and chemical composition of the essential oil

- from *Protium ovatum* leaves (Burceraceae). An Acad Bras Cienc. 2017;89(4):3005–13.
117. Hernández JJ, Ragone MI, Bonazzola P, Bandoni AL, Consolini AE. Antitussive, antispasmodic, bronchodilating and cardiac inotropic effects of the essential oil from *Blepharocalyx salicifolius* leaves. J Ethnopharmacol [Internet]. 2018;210(August 2017):107–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.08.013>
118. Ertl F. Procedure Modification of AOAC Official Method 962.17, Volatile Oil in Spices. J AOAC Int. 1997;80(4):901–6.
119. Sousa JPB, Brancalion APS, Souza AB, Turatti ICC, Ambrósio SR, Furtado NAJC, et al. Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. J Pharm Biomed Anal. 2011;54(4):653–9.
120. Coutinho ID, Cardoso CAL, Ré-Poppi N, Melo AM, Vieira MDC, Honda NK, et al. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Guavira). Brazilian J Pharm Sci. 2009;45(4):767–76.
121. Chistiane MF, Alisson dos RB, Cassio HS de M, Rivellilson MF, Jose E do NF, Emmanoel VC, et al. Antioxidant and anticholinesterase activities of the essential oil of *Eugenia dysenterica* DC. African J Pharm Pharmacol. 2017;11(19):241–9.
122. Furtado FB, Borges BC, Teixeira TL, Garces HG, De Almeida Junior LD, Alves FCB, et al. Chemical composition and bioactivity of essential oil from *Blepharocalyx salicifolius*. Int J Mol Sci. 2018;19(1):1–13.
123. Limberger RP, Sobral MEG, Zuanazzi JAS, Moreno PRH, Schapoval EES, Henriques AT. Biological activities and essential oil composition of leaves of *Blepharocalyx salicifolius*. Pharm Biol. 2001;39(4):308–11.
124. Kirchner K, Wisniewski A, Cruz AB, Biavatti MW, Netz DJA. Chemical composition and antimicrobial activity of *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae, essential oil. Rev Bras Farmacogn. 2010;20(5):692–9.

125. Takao LK, Imatomi M, Gualtieri SCJ. Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna). *Braz J Biol.* 2015;75(4):948–52.
126. Peres MC, de Souza Costa GC, dos Reis LEL, da Silva LD, Peixoto MF, Alves CCF, *et al.* In natura and nanoencapsulated essential oils from *Xylopiya aromatica* reduce oviposition of *Bemisia tabaci* in *Phaseolus vulgaris*. *J Pest Sci* (2004) [Internet]. 93(2):807–21. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10340-019-01186-6>
127. Werle ALB, Zanetti GD, Ceron CS, Manfron MP. Avaliação da atividade de *Casearia sylvestris* Swartz (Flacourtiaceae) sobre os níveis séricos de triglicerídeos em ratos. *Rev Bras Farmacogn.* 2009;19(2a):400–2.
128. Carvalho PER. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília - DF: Embrapa Florestas; 2014. 634 p.
129. Saldanha AA, Vieira L, Ribeiro RIM de A, Thomé RG, Santos HB dos, Silva DB, *et al.* Chemical composition and evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Duguetia furfuracea* essential oil: Effect on edema, leukocyte recruitment, tumor necrosis factor alpha production, iNOS expression, and adenosinergic and opioid. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2019;231:325–36. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.11.017>
130. Carneiro NS. Atividade antioxidante da polpa e óleo essencial da Pera do Cerrado (*Eugenia klotzschiana* Berg.) 2016.
131. Pandiyan GN, Mathew N, Munusamy S. Larvicidal activity of selected essential oil in synergized combinations against *Aedes aegypti*. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2019;174(March):549–56. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.019>
132. Manh HD, Hue DT, Hieu NTT, Tuyen DTT, Tuyet OT. The mosquito larvicidal activity of essential oils from *Cymbopogon* and *Eucalyptus* species in Vietnam. *Insects.* 2020;11(2):1–7.
133. Santos SRL, Melo MA, Valença A, Santos RLC, Sousa DP De, Cavalcanti SCH. Chemosphere Structure – activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. *Chemosphere*

- [Internet]. 2011;84(1):150–3. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.018>
134. Cheng SS, Lin CY, Chung MJ, Liu YH, Huang CG, Chang ST. Larvicidal activities of wood and leaf essential oils and ethanolic extracts from *Cunninghamia konishii* Hayata against the dengue mosquitoes. *Ind Crop Prod* [Internet]. 2013;47:310–5. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.03.016>
 135. Baser KHCAN. Chemical Composition, Larvicidal, and Biting Deterrent Activity of Essential Oils of Two Subspecies of *Tanacetum argenteum* (Asterales : Asteraceae) and Individual Constituents Against *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae). 2014;824–30.
 136. Chavan P, Singh AK, Kaur G. Recent progress in the utilization of industrial waste and by-products of citrus fruits: A review. *J Food Process Eng*. 2018;41(8):1–10.
 137. de Oliveira AA, França LP, Ramos A de S, Ferreira JLP, Maria ACB, Oliveira KMT, *et al.* Larvicidal, adulticidal and repellent activities against *Aedes aegypti* L. of two commonly used spices, *Origanum vulgare* L. and *Thymus vulgaris* L. *South African J Bot*. 2021;140:17–24.
 138. Li MX, Ma YP, Zhang HX, Sun HZ, Su HH, Pei SJ, *et al.* Repellent, larvicidal and adulticidal activities of essential oil from Dai medicinal plant *Zingiber cassumunar* against *Aedes albopictus*. *Plant Divers* [Internet]. 2020;(Article in press). Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pld.2020.11.008>
 139. Cruz RCD, Silva SLCE, Souza IA, Gualberto SA, Carvalho KS, Santos FR, *et al.* Toxicological evaluation of essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus* (Euphorbiaceae) on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Mus musculus* (Rodentia: Muridae). *J Med Entomol*. 2017;54(4):985–93.
 140. Aguiar RWS, Dos Santos SF, Da Silva Morgado F, Ascencio SD, De Mendonça Lopes M, Viana KF, *et al.* Insecticidal and repellent activity of *Siparuna guianensis* Aubl. (Negramina) against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *PLoS One*. 2015;10(2):1–14.
 141. Cerratinga. Cerratinga Produção Sustentável e Consumo Consciente

[Internet]. [cited 2021 Aug 2]. Available from:
<http://www.cerratinga.org.br/cagaita/>