

HEIDI LUISE SCHULTE

**Estudos químicos, biológicos e ecotoxicológicos de
Schinus terebinthifolia Raddi para o controle de *Aedes aegypti***

BRASÍLIA, 2020

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

HEIDI LUISE SCHULTE

**Estudos químicos, biológicos e ecotoxicológicos de
Schinus terebinthifolia Raddi para o controle de *Aedes aegypti***

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

Orientadora: Laila Salmen Espindola

**BRASÍLIA
2020**

HEIDI LUISE SCHULTE

**Estudos químicos, biológicos e ecotoxicológicos de
Schinus terebinthifolia Raddi para o controle de *Aedes aegypti***

**Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre em Ciências
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.**

Aprovado em 13 de agosto de 2020

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Laila Salmen Espindola - Presidente
Universidade de Brasília**

**Prof. Norberto Peporine Lopes
Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto**

**Profa. Aline Pic-Taylor
Universidade de Brasília**

**Profa. Graziella Anselmo Joanitti
Universidade de Brasília**

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Laila Salmen Espindola, que me guiou e motivou desde a Graduação. Obrigada por me inspirar com seu comprometimento e amor pela ciência e educação, a senhora é um exemplo que levarei para toda a vida.

Aos meus amigos do Laboratório de Farmacognosia por me apoiarem e incentivarem todos os dias, a presença de vocês deixou tudo mais leve.

À Profa. Lorena Albernaz, obrigada por seu empenho e constante dedicação aos alunos.

Ao Dr. João Paulo Barreto Sousa, por compartilhar seu conhecimento e tempo, os quais foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Daniel Demarque, por me apresentar à metabolômica e fornecer ensinamentos valiosos para estes e outros trabalhos. Obrigada por sempre se disponibilizar a me ajudar, mesmo de longe.

Ao Dr. Diego Sousa-Moura, Prof. Cesar Koppe Grisolia e equipe, que gentilmente me concederam acesso ao Departamento de Genética & Morfologia (Instituto de Biologia – UnB) e orientação para realização dos testes toxicológicos.

À Central Analítica do Instituto de Química, especialmente Dr. Luiz Eduardo Benedito, pelo auxílio com análises e interpretação de resultados.

Ao projeto de internacionalização CAPES PrInt, que me concedeu 4 meses de muito aprendizado na *Universität Basel* (Suíça). Este período foi essencial para minha formação pessoal e profissional.

I would also like to thank Prof. Matthias Hamburger and his team at the Universität Basel, especially Dr. Maria Teresa Faleschini and MSc. Nova Syafni, for the opportunity to learn so much with all of you.

Ao Projeto ArboControl (TED 74/2016 e TED 42/2017) - acordo de cooperação entre a UnB e o Ministério da Saúde, por viabilizar a execução deste trabalho.

Às minhas amigas, Camila Oliveira e Mariana Alcântara, pelo apoio e encorajamento e por estarem comigo em todos os momentos, bons e ruins.

E, finalmente, à minha família, minha mãe, Carla, meu irmão, Johannes, e meu namorado, Jorge. Obrigada por cuidarem de mim, e por todo o amor e suporte por todos estes anos. Sem vocês, nunca teria chegado aqui.

RESUMO

Aedes aegypti é o principal vetor transmissor de arboviroses como dengue, Zika e chikungunya. As estratégias de combate a este vetor são limitadas por resistência múltipla a inseticidas, impactos deletérios ao ambiente e toxicidade em organismos não-alvo. Na busca de alternativas para o combate do *Ae. aegypti*, o potencial de componentes da espécie de planta *Schinus terebinthifolia* foi estudado. Análises quimiométricas demonstraram que o perfil metabólico de amostras ativas é claramente diferente da composição metabólica de amostras inativas no mosquito. Adicionalmente, estas análises aceleraram o processo de purificação bioguiada, que resultou no isolamento do alquilresorcinol conhecido como bilobol, que demonstrou potente atividade larvicida em *Ae. aegypti* (CL₅₀ 7,67 mg/L em menos de 24 h). Para assegurar que o bilobol é um candidato viável como larvicida ecologicamente seguro, o processo de degradação e a toxicidade aguda deste alquilresorcinol em peixe-zebra, um organismo não-alvo, foram explorados. Um método de quantificação com parâmetros validados foi desenvolvido e utilizado para avaliar a degradação de bilobol em água ao longo de tempo. O teste *Fish Embryo Toxicity* (FET) foi aplicado para avaliar a toxicidade aguda de bilobol e seus produtos de degradação. Os resultados demonstraram que o bilobol degrada gradualmente com o passar do tempo e desaparece quase totalmente após 96 h, transformando-se em pequenas cadeias alifáticas. Quando submetido ao teste FET, bilobol apresentou CL₅₀ 6,00 mg/L em 96 horas pós-fertilização (hpf). Após 24 e 96 horas de degradação (hod), CL₅₀ diminuiu para 18,88 e > 40 mg/L, respectivamente. Estes resultados indicaram que os produtos de degradação são menos tóxicos que o bilobol em sua forma fundamental. Portanto, foi possível concluir que o bilobol não apresenta toxicidade significativa para embriões de peixe-zebra, e nem mostra sinais de persistência no ambiente. Adicionalmente, o bilobol pode ser encontrado em grandes quantidades não só em *S. terebinthifolia*, mas também no resíduo industrial da castanha de caju. Sendo assim, o bilobol é uma alternativa de larvicida ecologicamente sustentável, já que não é persistente, tem indicação de baixa toxicidade em organismos não-alvo e representa uma forma de aproveitar enormes quantidade de material descartado pela indústria alimentícia.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; bilobol; *Schinus terebinthifolia*; análises quimiométricas; zebrafish; ecotoxicidade.

ABSTRACT

Aedes aegypti is the main transmitting vector of arboviruses such as chikungunya, Zika and dengue. The current vector control strategies are limited due to multiple insecticide resistance, deleterious impacts on the environment, and toxicity to non-target organisms. In the search of new alternatives for *Ae. aegypti* combat, the potential of components from the plant species *Schinus terebinthifolia* was studied. Chemometric analyses demonstrated that the metabolic profile of active samples clearly differentiated from the metabolic composition of inactive samples in *Ae. aegypti*. Furthermore, these analyses helped speed the bioguided purification process that resulted in isolation an alkylresorcinol known as bilobol. Bilobol demonstrated potent larvicidal activity against *Ae. aegypti* (LC_{50} 7.67 mg/L in less than 24 h). To ensure that bilobol is a viable alternative as an eco-friendly larvicide, the degradation process and acute toxicity of this alkylresorcinol in zebrafish, a non-target organism, were explored. A quantification method with validated parameters was developed and used to evaluate bilobol degradation in water over time. The Fish Embryo Toxicity (FET) test was applied to evaluate the acute toxicity of bilobol along with its degradation derivatives. Results demonstrated that bilobol gradually degrades over time and almost completely disappears after 96 h, turning into small aliphatic chains. When submitted to the FET test, bilobol presented LC_{50} 6.00 mg/L at 96 hpf. After 24 and 96 h of degradation, LC_{50} dropped to 18.88 and > 40 mg/L, respectively. These results indicated that the degradation derivatives are less toxic than bilobol in its fundamental form. Therefore, it was possible to conclude that bilobol does not present significant toxicity to zebrafish embryos nor does it show signs of persistence in the environment. Additionally, bilobol can be found in high quantities not only in *S. terebinthifolia*, but also in cashew nut industry waste. Thus, bilobol constitutes an alternative environmentally friendly larvicide since it is not persistent, has indications of low toxicity to non-target organisms and presents a way to seize massive quantities of material discarded by the food industry.

Keywords: *Aedes aegypti*; bilobol; *Schinus terebinthifolia*; chemometric analysis; zebrafish, ecotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquematização das quatro etapas do ciclo de vida do vetor *Ae. aegypti*: ovo, larva (com estádios de desenvolvimento, L1 a L4), pupa e forma adulta. Após contato com a água, começa o processo de incubação e eclosão dos ovos; depois de 5 dias, as larvas se convertem em pupas; as pupas demoram por volta de 2 dias para se transformarem em mosquitos adultos. Acervo do Laboratório de Farmacognosia/UnB (elaborado por Flavia Masson).21
- Figura 2. Mapa global mostrando alertas para dengue registrados até 16 de julho de 2020. Retirado de ECDC, 2020 (37).25
- Figura 3. Distribuição por ano de casos reportados de dengue, chikungunya e Zika, na região das Américas, 2008 a 2020 (até semana epidemiológica 21 de 2020). Adaptado de OMS, 2020 (39).26
- Figura 4. Distribuição de casos de Zika reportados por semana epidemiológica, na região das Américas, 2015-2020 (até semana epidemiológica 21 de 2020). Adaptado de OMS, 2020 (39).28
- Figura 5. Países e territórios onde casos de chikungunya foram reportados (não inclui países e territórios onde foram documentados apenas casos importados). Adaptado de <https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html> (46).31
- Figura 6. Taxa de incidência cumulativa de casos de chikungunya a cada 100.000 habitantes, na região das Américas (semanas epidemiológicas 1 a 21 de 2020). Adaptado de OMS, 2020 (39).32
- Figura 7. Áreas onde é recomendada vacinação contra febre amarela nas Américas. Adaptado de OPAS/OMS, 2018 (48).35
- Figura 8. *Schinus terebinthifolia* Raddi (Anacardiaceae). Fotos: Acervo do Laboratório de Farmacognosia – UnB.42

Figura 9. Fotografias dos primeiros estágios de desenvolvimento do peixe-zebra: (A) embrião (48 hpf – horas pós-fertilização) e (B) larva (96 hpf). Acervo Laboratório de Farmacognosia/UnB (foto de Heidi L. Schulte).	47
Figura 10. Esquematização da metodologia de pré-fracionamento em SPE-sílica. Em cada cartucho, contendo um dos extratos previamente selecionados, foi realizada eluição utilizando: 6 mL de A (100% hexano), seguidos de 6 mL de B (100% acetato de etila), e, por fim, 6 mL de C (100% metanol), com auxílio de sistema a vácuo. Acervo do Laboratório de Farmacognosia – UnB (elaborado por Heidi L. Schulte).	54
Figura 11. Aparato utilizado para avaliação da atividade de repelente espacial.	60
Figura 12. Esquema dos testes de toxicidade com embriões de peixe-zebra. Da esquerda para a direita: 1) os ovos são recolhidos do aquário de reprodução; 2) triagem a olho nu dos ovos fertilizados; 3) seleção no estereomicroscópio dos ovos fertilizados com desenvolvimento normal e descarte dos ovos não fertilizados, os que apresentam danos, irregularidades na clivagem, ou injúrias no córion; 4) os ovos (1 ovo por poço) são distribuídos em placas de 96 poços. Adaptado de Lammer et al., 2009 (138).	66
Figura 13. Design experimental dos testes de embriotoxicidade aguda utilizando o peixe-zebra como organismo modelo.	68
Figura 14. Desenho experimental utilizado para avaliação do perfil de degradação de bilobol em placas de 96 poços e avaliação da embriotoxicidade aguda de bilobol e seus compostos de degradação. Alíquotas para quantificação foram coletadas em t = 0, 24 e 96 hod, destacados em vermelho.	70
Figura 15. Mortalidade (%) em larvas e pupas de <i>Ae. aegypti</i> gerada após 24 h de exposição por extratos de <i>Schinus terebinthifolia</i> testados a 250 µg/mL.	71
Figura 16. Análise de agrupamentos (<i>clustering</i>) apresentado no formato de <i>heatmap</i> obtido por meio do software online MetaboAnalyst® mostrando 50 íons mais importantes para diferenciação entre amostras ativas e inativas. O agrupamento hierárquico foi aplicado tanto para os sinais detectados quanto para as amostras. Similaridade foi calculada por distância euclidiana e algoritmo de aglomeração foi	

baseado no método de Ward. A escala de cor (à direita) mostra a abundância relativa de cada um dos sinais detectados nas respectivas amostras.....	73
Figura 17. Gráfico PLS-DA <i>scores plot</i> para as duas principais componentes (PCs). As variâncias explicadas estão inseridas entre parênteses. As áreas sombreadas indicam intervalo de confiança de 95%.	74
Figura 18. Gráfico mostrando os metabólitos mais importantes classificados por PLS-DA VIP <i>scores</i> . Os quadrados coloridos à direita indicam as concentrações relativas do metabólito correspondente em cada um dos grupos sob estudo.	75
Figura 19. Análise de componente principal (PCA) <i>scores plot</i> . As variâncias explicadas estão inseridas entre parênteses. As áreas sombreadas indicam intervalo de confiança de 95%.	76
Figura 20. PCA <i>loading plot</i> das duas primeiras componentes (PCs). Os círculos preenchidos de rosa indicam os sinais detectados. Os sinais que mais influenciam a plotagem do gráfico de scores são aqueles localizados nas extremidades dos eixos.	77
Figura 21. PCA <i>biplot</i> , resultante da combinação do gráfico de <i>scores</i> e do gráfico de <i>loading</i> . Eixo inferior: <i>score</i> de PC1; eixo esquerdo: <i>score</i> de PC2; eixo superior: <i>loadings</i> de PC1; eixo direito: <i>loadings</i> de PC2.....	78
Figura 22. Estrutura do bilobol, componente ativo isolado de <i>Schinus terebinthifolia</i>	79
Figura 23. Estudo de seletividade. Cromatogramas de: (A) bilobol em acetonitrila e (B) bilobol em água de cultivo; (C) espectro de massas e de UV adquiridos de A; (D) espectro de MS2 mostrando perfil de fragmentação obtido de MS1 – C; e (E) espectro de massas e de UV obtido de B.....	85
Figura 24. Estudo de linearidade para bilobol. (A) Curva analítica obedecendo faixa linear dinâmica em (B), com concentração variando entre 0,77 e 49,36 mg/L e com $r^2 = 0,9999$	86

Figura 25. Recuperação (%) de bilobol na avaliação de parâmetro de estabilidade (**A**) comparado com perfil de degradação: (**B**) usando garrafas de vidro com 50 mL de solução; (**C**) na ausência de embriões de peixe-zebra, utilizando placas de 96 poços; (**D**) na presença de embriões de peixe-zebra e usando placas de 96 poços. Concentrações avaliadas: Baixa = 4,36 mg/L; Média: 12,2 mg/L; Alta: 23,86 mg/L. .89

Figura 26. Espectros de ¹H RMN em clorofórmio deuterado. **A**: bilobol padrão; **B**: bilobol após processo de degradação.....91

Figura 27. Mecanismo de degradação proposto para bilobol.....92

Figura 28. Comparação entre mortalidade (%) em embriões de peixe-zebra (96 hpf) causada por soluções de bilobol após 0 hod, 24 hod e 96 hod (horas de degradação). CS = controle solvente (DMSO 1%).94

Figura 29. Principais efeitos subletais observados: 1 = edema no pericárdio; 2 = atraso na absorção do saco vitelínico; 3 = curvatura dorsal da cauda. **A**: controle solvente (DMSO 1%); **B**: organismo exposto a solução de bilobol 0 hod a 6,6 mg/L.95

Figura 30. Visão geral da ocorrência de curvatura da cauda, o efeito mais marcante observado no teste de toxicidade aguda em embriões de peixe-zebra, nos experimentos executados com: bilobol 0 hod (**A**), bilobol 24 hod (**B**) e bilobol 96 hod (**C**). CS: controle solvente (1% DMSO); C1: 2,0 mg/L; C2: 3,6 mg/L; C3: 6,6 mg/L; C4: 12,1 mg/L; C5: 22,0 mg/L; C6: 40,0 mg/L.....96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividades mais recorrentes reportadas para <i>S. terebinthifolia</i> e os extratos ou compostos relacionados a estas atividades.	43
Tabela 2 - Extratos da espécie <i>Schinus terebinthifolia</i> avaliados em relação ao seu potencial larvicida.....	51
Tabela 3 - Resultados para recuperação, precisão e efeito matriz obtidos durante validação do método de quantificação de bilobol em água de cultivo.	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AINES	Anti-Inflamatórios Não Esteroidais
Bti	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CHIKV	<i>Chikungunya virus</i>
CL ₅₀	Concentração Letal 50%
DEET	N,N-dimetil-meta-toluamida
DENV	<i>Dengue virus</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
FET	<i>Fish Embryo Toxicity</i>
FHD	Febre Hemorrágica da Dengue
FMN	Fator Matriz Normalizado
FTIR	<i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
hod	horas de degradação
hpf	horas pós-fertilização
IC95%	Intervalo de Confiança 95%
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
LCC	Líquido da Casca da Castanha de Caju
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MAYV	<i>Mayaro virus</i>
MeOH	Metanol
MS	<i>Mass spectrometry</i>
OECD	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>

OMS	Organização Mundial da Saúde
PC	<i>Principal Component</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PDA	<i>Photodiode array</i>
PLS-DA	<i>Partial Least Squares - Discriminant Analysis</i>
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
TFA	<i>Trifluoroacetic Acid</i>
TOF	<i>Time of Flight</i>
UBV	Ultra Baixo Volume
UPLC	<i>Ultra High Pressure Liquid Chromatography</i>
UV	Ultravioleta
VIP	<i>Variable Importance in Projection</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 O VETOR <i>Aedes aegypti</i>	19
2.1.1 Ciclo de vida do mosquito	20
2.2 ARBOVIROSES	23
2.2.1 Dengue	23
2.2.2 Zika	27
2.2.3 Chikungunya	30
2.2.4 Outras arboviroses	33
2.3 MÉTODOS PARA COMBATE DO VETOR	36
2.4 DANO AMBIENTAL CAUSADO POR INSETICIDAS	39
2.5 FAMÍLIA ANACARDIACEAE	41
2.5.1 <i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi	41
2.6 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS	45
2.7 O ORGANISMO NÃO-ALVO <i>ZEBRAFISH</i>	46
3. OBJETIVOS	49
3.1 OBJETIVO GERAL	49
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4. MÉTODOS	50
4.1 EXTRATOS DE <i>Schinus terebinthifolia</i>	50
4.2 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS	51
4.3 FRACIONAMENTO E ISOLAMENTO	53
4.3.1 Pré-fracionamento utilizando SPE-sílica	53
4.3.2 Isolamento do composto ativo	54
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE EM <i>Ae. aegypti</i>	55
4.4.1 Criação de mosquitos	55
4.4.2 Avaliação da atividade larvicida	56
4.4.3 Avaliação da atividade pupicida	58
4.4.4 Avaliação da atividade aduicida	58
4.4.5 Avaliação da atividade repelente espacial	59
4.5 MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO	62
4.5.1 Preparação analítica de bilobol	62

4.5.2	Condições de UPLC-PDA-MS/MS.....	62
4.5.3	Parâmetros analíticos para validação.....	63
4.5.4	Planejamento para avaliação da degradação de bilobol.....	65
4.6	TESTES TOXICOLÓGICOS	66
4.6.1	Criação de organismos-teste (<i>zebrafish</i>).....	66
4.6.2	Avaliação de toxicidade aguda em embriões de <i>zebrafish</i>	67
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.1	ATIVIDADE DE EXTRATO DE <i>S. terebinthifolia</i> EM <i>Ae. aegypti</i>	71
5.2	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO METABÓLICA.....	72
5.3	ISOLAMENTO E ATIVIDADE DE COMPONENTE DE <i>S. terebinthifolia</i>	79
5.3.1	Análises quimiométricas na busca do composto ativo bilobol.....	82
5.4	MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO	83
5.5	ESTABILIDADE E PERFIL DE DEGRADAÇÃO DO BILOBOL.....	88
5.6	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE	93
6.	CONCLUSÃO.....	99
7.	REFERÊNCIAS	101

1. INTRODUÇÃO

Aedes aegypti é o principal vetor transmissor de arboviroses como dengue, Zika e chikungunya (1), podendo transmitir também febre amarela, febre do Mayaro, febre do Nilo Ocidental, entre outras (2–4). Estas doenças são motivo de preocupação em escala global, já que são transmitidas para milhões de pessoas todos os anos e podem levar a complicações incapacitantes ou até mesmo fatais, causando prejuízo da ordem de bilhões de dólares (5).

Apesar do vasto esforço na pesquisa e desenvolvimento de vacinas para dengue, Zika e chikungunya, ainda não existe alternativa eficaz de prevenção e tampouco viável para imunização em massa da população (6–8). Além disso, as estratégias de tratamento existentes são apenas para manejo dos sintomas, não havendo medicamentos específicos para combater os vírus causadores destas infecções (6,9,10). Portanto, o combate a estas doenças é uma tarefa complexa e está atualmente centrada em estratégias de controle do vetor, visto que é a alternativa que previne, ao mesmo tempo, a transmissão de todas estas arboviroses.

O controle do *Aedes aegypti*, por sua vez, é dificultado por vários fatores, que incluem crescimento desordenado e falta de infraestrutura apropriada (11) e o desenvolvimento de resistência múltipla aos inseticidas comumente utilizados, como organofosforados, piretroides e carbamatos (12). Adicionalmente, estes inseticidas geram grande preocupação em relação ao risco ecológico associado a sua utilização, já que muitos deles apresentam indícios de persistência, principalmente na água e no solo (13).

A persistência destes inseticidas no ambiente levanta também questões sobre o impacto em organismos não-alvo. Resíduos de neonicotinoides já foram encontrados em amostras de néctar e pólen carregado por abelhas (14). Devido ao dano causado às abelhas, o uso de alguns inseticidas desta classe foi limitado pela União Europeia em 2013 (15,16).

A persistência de inseticidas na água também pode causar importante dano a organismos aquáticos. Muitos deles podem bioacumular-se ao longo da cadeia trófica,

sendo possível encontrar concentrações relevantes de inseticidas, como os organofosforados, em peixes silvestres (17). Além disso, compostos gerados a partir da degradação de inseticidas frequentemente utilizados também podem acumular-se no ambiente e causar de toxicidade aos organismos ali presentes (18). Sendo assim, os impactos deletérios causados pelos inseticidas convencionais ao meio ambiente e a organismos não alvo tem encorajado a busca por alternativas, como metabólitos secundários derivados de plantas (19).

Schinus terebinthifolia Raddi (Anacardiaceae), popularmente conhecida como aroeira vermelha, é uma planta do Cerrado brasileiro que constitui uma fonte de diversas substâncias bioativas (20). Gel e óvulos para tratamento de afecções vaginais empregando *S. terebinthifolia* estão incluídos na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) (21), graças a sua ação cicatrizante, anti-inflamatória e antimicrobiana (22). Outros estudos relatam também atividade antireumática, anticancerígena e antialérgica, além de relatos de atividade de extratos brutos e óleo essencial em larvas de *Ae. aegypti* (23–25).

O presente estudo buscou encontrar, em extratos de *S. terebinthifolia*, componentes com atividade em *Ae. aegypti*, por meio da aplicação de análises quimiométricas e de isolamento bioguiado. Para garantir que os compostos encontrados são alternativas para o combate do vetor, serão estudados fatores essenciais para avaliar o potencial impacto no meio ambiente: indícios de persistência e toxicidade em organismos não alvo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O VETOR *Aedes aegypti*

O *Ae. aegypti* é um mosquito da família Culicidae capaz de transmitir diversas arboviroses, dentre elas dengue, Zika, chikungunya e febre amarela. Este pode ser classificado como um mosquito característico de ambiente doméstico, ou seja, que vive dentro ou ao redor de domicílios ou outros locais frequentados por pessoas, como, por exemplo, estabelecimento comerciais, escolas e igrejas (11).

Este mosquito possui hábitos preferencialmente diurnos e as fêmeas apresentam comportamento hematofágico, alimentando-se de sangue humano, principalmente no início da manhã e no final da tarde. Entretanto, é importante ressaltar que isso não exclui a possibilidade de alimentação noturna. Tanto machos quanto fêmeas de *Ae. aegypti* se alimentam de matéria açucarada, como néctar ou seiva, porém a fêmea realiza a hematofagia, já que o sangue é necessário para a maturação dos ovos. A busca por sangue é geralmente mais intensa a partir do segundo ou terceiro dia após a cópula com o macho (11), que pode iniciar 24 horas após emergir da pupa (26).

Por ser um mosquito dependente da presença humana, ele é comum em regiões com alta densidade populacional, principalmente em espaços urbanos resultantes de ocupação desordenada, com ausência de saneamento básico e o aumento do desmatamento (11,27,28). Estes fatores geram mais oportunidades para que as fêmeas se alimentem e encontrem mais criadouros para desovar, causando aumento da incidência de casos de arboviroses (27,28).

Estudos de campo revelaram que grandes reservatórios, como caixas d'água, galões e tonéis, muito utilizados para armazenamento de água em locais de infraestrutura precária, onde o sistema de abastecimento de água é ineficiente, são os principais criadouros de *Ae. aegypti*. Um estudo em bairros suburbanos do Estado do Rio de Janeiro constatou que grandes criadouros são responsáveis por quase 70%

do total de mosquitos adultos na região. Entretanto, isso não diminui a importância de combater focos menores, como vasos de planta, calhas entupidas, lixo a céu aberto, entre outros (11).

A infestação de *Ae. aegypti* é sempre mais intensa no verão, quando há elevação da temperatura e intensificação de chuvas, fatores que propiciam a eclosão dos ovos do mosquito. Para evitar tal situação, é necessária adoção de medidas para o controle do vetor durante o ano inteiro, utilizando ações preventivas de eliminação de focos do vetor em conjunto com controle químico. Por possuir hábitos domésticos, as ações preventivas dependem sobretudo do esclarecimento e empenho da população (11).

2.1.1 Ciclo de vida do mosquito

O *Aedes aegypti* passa por quatro estádios de desenvolvimento até chegar à forma de mosquito: ovo, larva, pupa e forma adulta (Figura 1) (29). A duração do ciclo de vida do *Ae. aegypti* varia de acordo com fatores como: temperatura, disponibilidade de alimentos e quantidade de larvas existentes no mesmo criadouro, já que a competição de larvas por alimento (em um mesmo criadouro com pouca água) consiste em um obstáculo ao amadurecimento do inseto para a fase adulta (11). Em condições favoráveis, o desenvolvimento do mosquito até a forma adulta leva em torno de 10 dias após a eclosão dos ovos (11,29). Por este motivo, o ideal seria buscar e eliminar criadouros pelo menos uma vez por semana, assim, o ciclo de vida do mosquito seria sempre interrompido (11).

Nos primeiros dias após a transformação para a forma adulta do mosquito, o *Ae. aegypti* já começa o processo de acasalamento, que geralmente ocorre dentro ou ao redor das habitações. Graças à habilidade da fêmea em guardar o esperma na espermateca, somente uma cópula é necessária para que a reprodução seja concretizada. Após a cópula, as fêmeas precisam realizar hematofagia (alimentação

com sangue) para que seja completada a maturação dos ovos. Por volta de 3 dias após a ingestão de sangue as fêmeas se encontram aptas para postura de ovos (11).

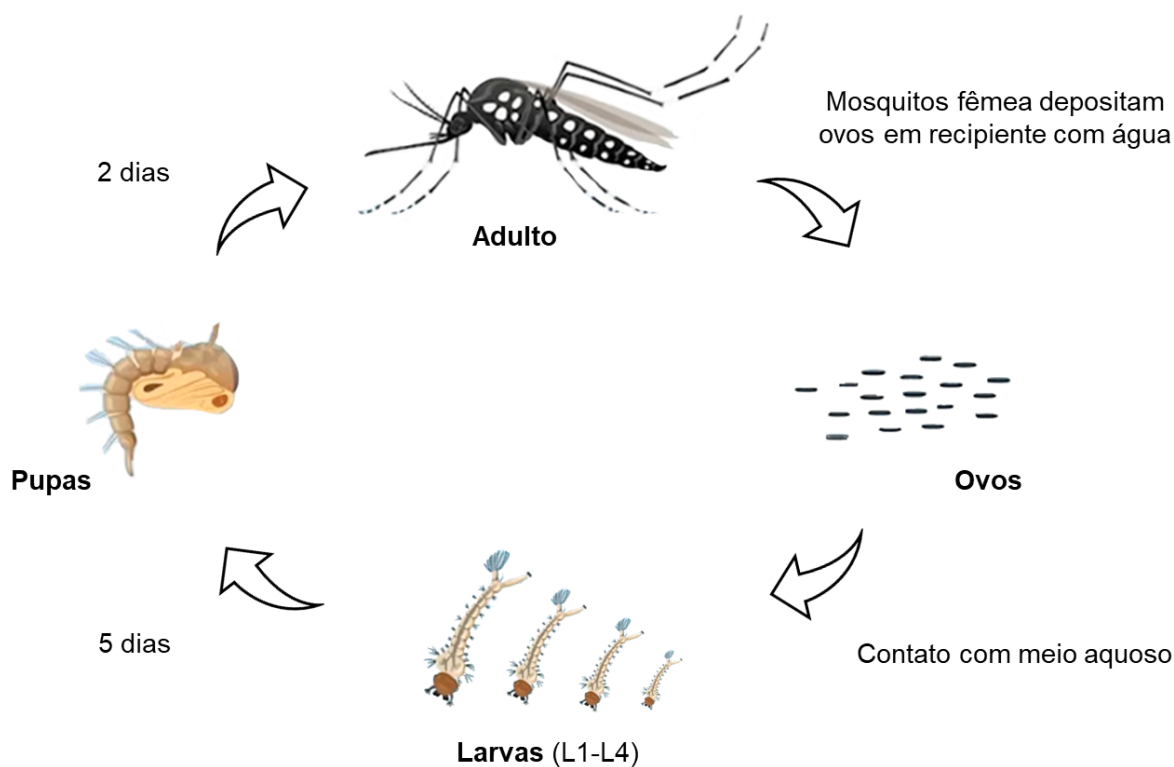


Figura 1. Esquemática das quatro etapas do ciclo de vida do vetor *Ae. aegypti*: ovo, larva (com estádios de desenvolvimento, L1 a L4), pupa e forma adulta. Após contato com a água, começa o processo de incubação e eclosão dos ovos; depois de 5 dias, as larvas se convertem em pupas; as pupas demoram por volta de 2 dias para se transformarem em mosquitos adultos. Acervo do Laboratório de Farmacognosia/UnB (elaborado por Flavia Masson).

A desova acontece, preferencialmente, em criadouros contendo água limpa e parada (11,30). Porém, o mosquito também tem a capacidade de adaptar-se a outros tipos de criadouro, incluindo ambientes com elevados graus de poluição e altas concentrações de material orgânico, como esgoto a céu aberto (30). Os ovos são depositados nas paredes do criadouro, bem próximo à superfície da água, onde permanecem aderidos até o momento da eclosão (11).

Uma fêmea vive por aproximadamente 30 dias (31), podendo originar até 1.500 mosquitos neste período. Para garantir a preservação e maior dispersão da espécie, os ovos são distribuídos por diferentes criadouros. Caso a fêmea esteja infectada pelo vírus da dengue quando realizar a postura de ovos, existe a possibilidade de que as larvas originadas destes ovos já sejam portadoras do vírus (transmissão vertical) (11).

Logo após a postura, os ovos apresentam coloração branca e, após contato com o oxigênio, escurecem devido ao processo de oxidação. Cada ovo de *Ae. aegypti* mede aproximadamente 0,4 mm de comprimento. Tanto a cor escura quanto o tamanho ajudam na camuflagem dos ovos no ambiente (11).

Em apenas 15 horas após a postura, os ovos adquirem resistência ao ressecamento. A partir de então, podem resistir a períodos de dessecação de até 450 dias. Esta característica permite que os ovos resistam por muitos meses em ambientes secos, sobrevivendo até que o próximo período chuvoso e quente propicie a eclosão. Esta resistência à dessecação permite que os ovos sejam transportados por grandes distâncias, em recipientes secos. Em condições ambientais favoráveis, o desenvolvimento do embrião é concluído em 48 horas (11).

Após a eclosão, as larvas passam por quatro estádios de desenvolvimento (L1, L2, L3 e L4). A fase larvária é o período de alimentação e crescimento. Por isso, as larvas passam a maior parte do tempo alimentando-se, principalmente de material orgânico acumulado nas paredes e fundo dos depósitos. Tendo em vista a maior vulnerabilidade nesta fase, é interessante que existam medidas de controle do vetor capazes de atuar na fase larvária (32).

Em condições ótimas, o período entre a eclosão e a pupação não excede cinco dias (29,32). Contudo, em temperaturas mais baixas e em escassez de alimento, o quarto estágio larvário pode prolongar-se por várias semanas. Pupas não se alimentam e são a forma intermediária entre as larvas e o estágio adulto. Após 2 a 3 dias, as pupas se transformam em mosquitos adultos e, assim, começa um novo ciclo (32).

2.2 ARBOVIROSES

2.2.1 Dengue

A dengue é uma das doenças tropicais mais comuns que afligem a população humana. Esta se trata de uma doença febril aguda causada por infecção pelo vírus dengue (DENV). Membros da família Flaviviridae e do gênero Flavivírus, vírus da dengue são constituídos de RNA de cadeia linear simples com polaridade positiva e apresentam quatro diferentes sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (6). Após recuperar-se de um episódio de dengue, acredita-se que seja adquirida imunidade contra aquele sorotipo. Entretanto, imunidade cruzada com outros sorotipos após recuperação é apenas parcial e temporária, desta forma, um indivíduo infectado com dengue ainda está sujeito a infecções subsequentes (5).

Humanos são infectados com dengue por picada de mosquito fêmea do gênero *Aedes* portador de DENV, o que inclui *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (6). A transmissão se faz no ciclo homem - *Aedes* - homem. Após 8 a 12 dias de um repasto de sangue infectado, o mosquito já fica apto a transmitir o vírus. Também é possível que ocorra transmissão mecânica, quando o repasto é interrompido e o mosquito, imediatamente, se alimenta num hospedeiro suscetível próximo. Mas, felizmente, não há transmissão de dengue por contato direto de um doente ou de suas secreções com uma pessoa sadia, nem de fontes de água ou alimento (33).

Pacientes infectados por dengue podem apresentar diferentes intensidades de manifestações clínicas, desde febre da dengue moderada até doença de desfecho potencialmente fatal, como febre hemorrágica da dengue (FHD) ou síndrome do choque associada ao dengue. A febre da dengue (duração de 5 a 7 dias) é uma enfermidade que gera sintomas como dores musculares e nas articulações, além de febre, cefaleia, dor retro-orbital, náuseas, leucopenia e erupções cutâneas (6,33).

Pacientes com FHD apresentam extravasamento de plasma, sangramentos, trombocitopenia, aumento do hematócrito, dor abdominal, vômitos e febre alta. O extravasamento do plasma sanguíneo é a principal característica fisiopatológica da FHD e ocorre quando o vírus altera a permeabilidade dos vasos sanguíneos, sendo esta considerado o principal fator associado ao grau de severidade da doença. Valores crescentes do hematócrito e da hemoconcentração são a manifestação desta efusão de plasma (6,33).

Infecções subsequentes por outros sorotipos aumentam o risco de desenvolver dengue grave (5,6). FHD é pelo menos 10 vezes mais frequente em infecções com um segundo sorotipo de DENV do que na primeira infecção. Crianças nascidas de mães que contraíram infecção por dengue previamente tem maior risco de desenvolver FHD quanto infectadas pelo vírus (34).

Nos casos graves de FHD, pode ocorrer síndrome de choque, geralmente entre o 3º e 7º dia de doença, precedido por um ou mais sinais de alerta. Este choque é decorrente do aumento da permeabilidade vascular seguido de hemoconcentração e falência circulatória. É de curta duração e pode levar ao óbito em 12 a 24 horas ou à recuperação rápida após terapia antichoque apropriada (33). Atualmente, casos de dengue severa afetam a maioria dos países asiáticos e latino-americanos, representando uma das principais causas de hospitalização e morte dentre crianças e adultos em certas regiões (5).

Além do alarmante impacto na saúde humana em escala global (Figura 2), a dengue tem grande impacto nas economias nacionais, causando prejuízo na escala de bilhões de dólares. A incidência de dengue cresceu globalmente e de forma dramática nas últimas décadas. A grande maioria dos casos são assintomáticos ou leves e são resolvidos sem necessidade de assistência médica. Por este motivo, juntamente com equívocos no diagnóstico e falha dos profissionais de saúde em realizar a notificação, o número de casos de dengue é marcadamente subestimado (5).

Um modelo probabilístico estimou que 390 milhões de infecções causadas pelo vírus da dengue ocorrem todo ano (intervalo de confiança 95%, 284-528 milhões), das quais 96 milhões (67-136 milhões) geram manifestações clínicas em diferentes

intensidades (35). Outro estudo, sobre prevalência dos casos de dengue, indicou que quase 4 bilhões de pessoas, em 129 países, estão em risco de contrair o vírus da dengue (36), estando 70% deste fardo concentrado na Ásia (35).

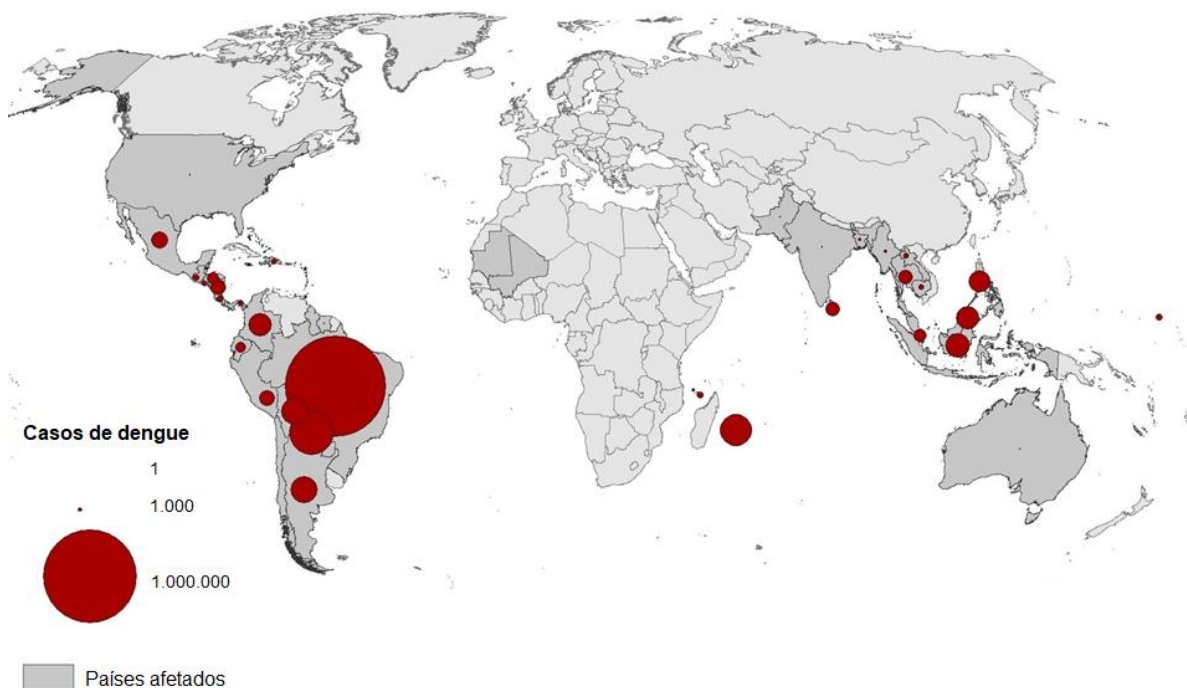


Figura 2. Mapa global mostrando alertas para dengue registrados até 16 de julho de 2020. Retirado de ECDC, 2020 (37).

O número de casos não só tem aumentado como também tem se expandido para novas áreas, incluindo o continente europeu. A ameaça de uma explosão de número de casos de dengue existe também na Europa. Transmissão local foi reportada pela primeira vez na França e Croácia em 2010 e casos importados foram detectados em três outros países europeus. Em 2012, mais de 2000 casos de dengue foram registrados nas Ilhas Madeira (Portugal) e casos importados foram detectados em Portugal continental e mais 10 outros países na Europa. Casos autóctones tem agora sido observados com frequência quase anual em muitos países europeus. Dentre viajantes retornando de países de baixa ou média renda, a dengue é a segunda doença mais diagnosticada, vindo depois da malária (5).

O maior número de casos de dengue já registrado ocorreu em 2019 (Figura 3). Todas as regiões monitoradas pela OMS (Américas, África, Europa, Sudeste da Ásia, Mediterrâneo Oriental e Pacífico Ocidental) foram afetadas e transmissão de dengue foi registrada pela primeira vez no Afeganistão (5). Em 2019, a região das Américas por si só registrou mais de 3,1 milhões de casos de dengue, com mais de 25 mil casos tendo sido classificados como severos (38). Números mais altos também foram reportados em Bangladesh (101.000), Malásia (131.000), Filipinas (420.000), e Vietnã (320.000) (5).

Até a semana epidemiológica 21 de 2020, um total de 1.600.847 casos de dengue foram reportados nas Américas, com taxa de incidência cumulativa de 164,18 casos a cada 100.000 habitantes. Até junho de 2020, o Brasil apresentou a maior proporção de casos de dengue dentre todos os países americanos, tendo registrado 1.040.481 casos, seguido do Paraguai, com 218.798 casos. Neste período, todos os quatro sorotipos foram identificados como circulantes (39).

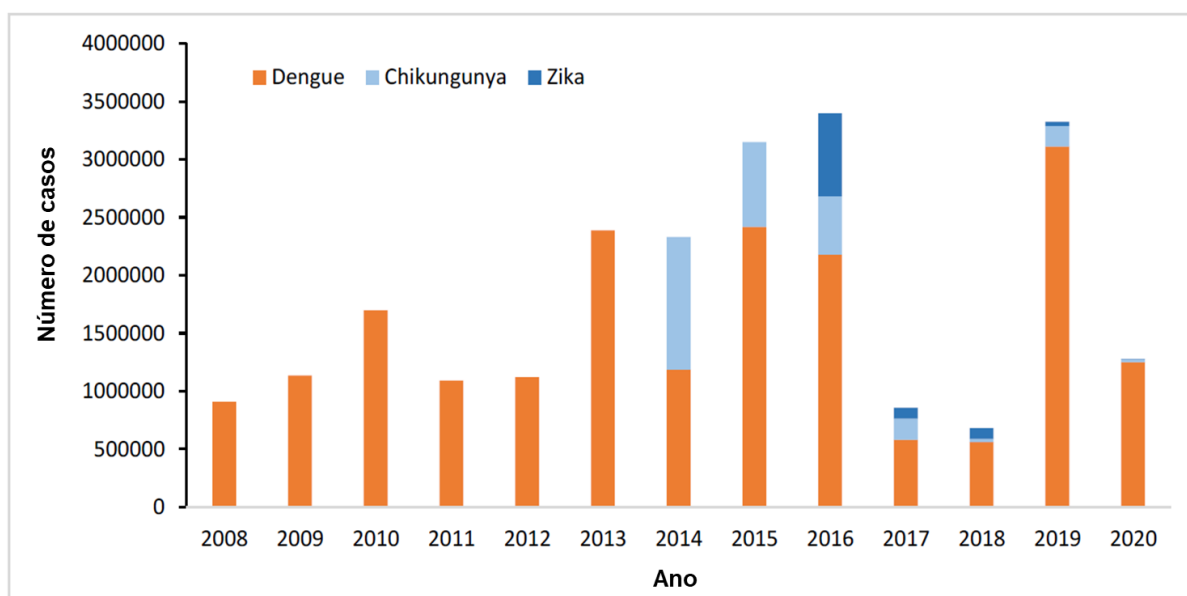


Figura 3. Distribuição por ano de casos reportados de dengue, chikungunya e Zika, na região das Américas, 2008 a 2020 (até semana epidemiológica 21 de 2020). Adaptado de OMS, 2020 (39).

Atualmente, ainda não existem medicamentos específicos para tratamento ou prevenção de infecção por DENV. Em setembro de 2015, foi licenciada a primeira vacina contra dengue, a Dengvaxia® (CYD-TDV), desenvolvida por Sanofi Pasteur. A Dengvaxia® foi aprovada pelas autoridades regulatórias de aproximadamente 20 países até agora. Apesar disso, esta vacina possui uma importante limitação: quando a vacina é administrada em pacientes que eram soronegativos previamente à vacinação, estes pacientes têm risco aumentado de desenvolver a forma grave da doença ao serem infectados pelo vírus da dengue, quando comparados com pacientes não vacinados. Portanto, esta vacina somente deve ser utilizada por pessoas vivendo em áreas endêmicas, numa faixa de 9 a 45 anos, que já tiveram pelo menos um caso de infecção por dengue previamente documentado (5,6).

Portanto, a dengue permanece sendo um sério problema de saúde pública mundial. Além de incluir a vacinação como parte da estratégia de prevenção e controle integrado da dengue, existe a contínua necessidade de controle do vetor como parte de estratégias bem executadas e sustentáveis (6).

2.2.2 Zika

Também do gênero Flavivírus, o vírus Zika foi identificado pela primeira vez em macacos em Uganda (1947). Em humanos, este vírus foi identificado pela primeira vez em 1952, na Uganda e Tanzânia. Desde então, surtos de Zika vírus têm sido reportados na África, nas Américas, na Ásia e no Pacífico. O primeiro surto de doença provocada por Zika vírus foi reportado da Ilha de Yap (Estados Federados da Micronésia) em 2007. Este acontecimento foi seguido de um grande surto na Polinésia Francesa em 2013, juntamente com outros países e territórios no Pacífico (10).

Em março de 2015, o Brasil sofreu um grande surto de doença causadora de erupções cutâneas, doença esta que seria identificada posteriormente como infecção por Zika vírus. Em julho de 2015, foi descoberta a associação entre a infecção pelo vírus Zika e a síndrome de Guillain-Barré. Em outubro do mesmo ano, o Brasil reportou

a crítica informação de associação entre a infecção por vírus Zika e desenvolvimento de microcefalia. Mais surtos e evidência de transmissão logo apareceram por toda a América, África e outras regiões do mundo. Atualmente, aproximadamente 90 países e territórios tem reportado evidência de infecção por Zika transmitida por mosquitos (10).

O maior número de casos já registrado nas Américas foi em 2016, com mais de 650 mil casos reportados (Figura 4). Desde então, houve redução significativa no número de casos (39). Em 2019, foram registrados 10.768 casos prováveis (taxa de incidência 5,1 casos por 100 mil habitantes) no Brasil (40). Entre a semana epidemiológica 1 e 21 de 2020, foram reportados 7.452 de infecção por vírus Zika na região das Américas, destes 86% dos casos foram registrados no Brasil (6.387 casos), incluindo uma morte (39).

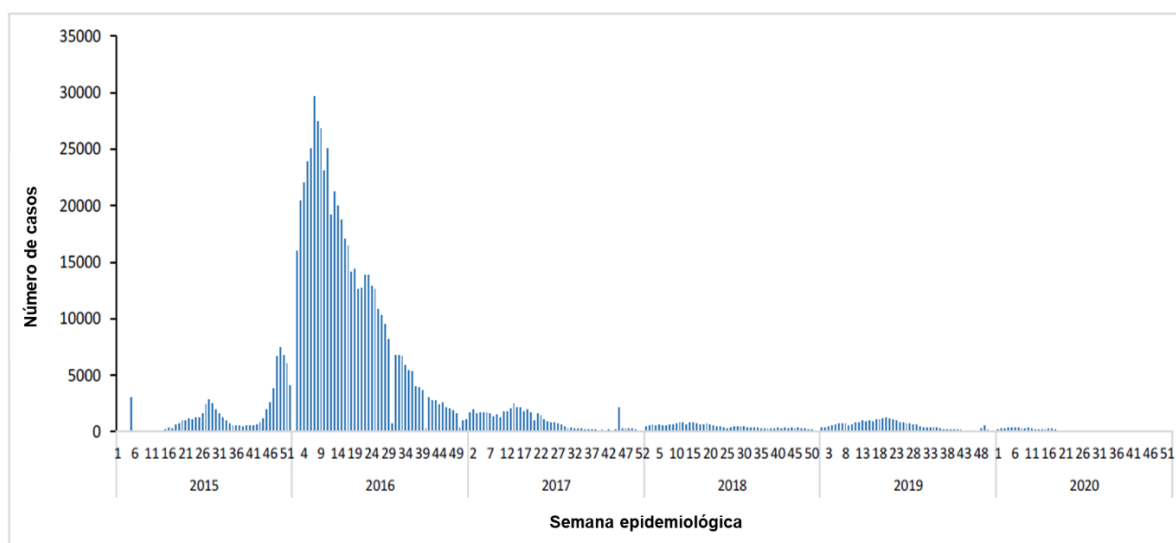


Figura 4. Distribuição de casos de Zika reportados por semana epidemiológica, na região das Américas, 2015-2020 (até semana epidemiológica 21 de 2020). Adaptado de OMS, 2020 (39).

A maior parte das pessoas infectadas pelo vírus Zika não manifestam nenhum sintoma. Os sintomas da infecção geralmente são moderados, duram de 2 a 7 dias e incluem febre, erupções cutâneas, conjuntivite, dor muscular e nas articulações, mal-estar e cefaleia (10). Portanto, a maior preocupação em relação a infecção pelo vírus

Zika é quando a infecção ocorre durante a gravidez, já que esta pode gerar microcefalia e outras anormalidades congênitas no feto em desenvolvimento (10,41,42). A infecção por Zika durante a gestação pode também gerar complicações como perda do feto, natimorto e parto prematuro (10).

A infecção por vírus Zika também pode desencadear síndrome de Guillain-Barré, neuropatia e mielite, particularmente em adultos e crianças mais velhas (10,41,42). Na síndrome de Guillain-Barré, o sistema imune ataca parte do sistema nervoso periférico. Esta síndrome pode afetar os nervos que controlam o movimento dos músculos assim como aqueles que transmitem o sinal de dor, temperatura e tato. Isto pode resultar em fraqueza muscular e perda da sensação nos membros superiores e inferiores. Por ser uma afecção potencialmente fatal, os pacientes afetados devem ser hospitalizados para que possam ser rigorosamente monitorados (43).

O vírus Zika é primariamente transmitido em regiões tropicais e subtropicais pela picada de mosquitos infectados do gênero *Aedes*, principalmente *Ae. aegypti*. Além da transmissão pelo vetor, o vírus também pode ser transmitido da mãe para o feto durante a gravidez, através de contato sexual e transfusão de sangue (10).

Desde que a OMS declarou vírus Zika e suas complicações associadas como Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII), em 2016, investiu-se muito em pesquisa e desenvolvimento de soluções terapêuticas e preventivas (10). Entretanto, até agora, nenhum medicamento, vacina ou qualquer outra modalidade de tratamento ou prevenção teve sucesso (44).

Desde 2016, aproximadamente 45 opções de vacinas foram investigadas, sendo que algumas delas chegaram a ensaios clínicos com humanos (10). Entretanto, o número limitado de casos ocorrendo globalmente, além da dificuldade de prever quando e onde os potenciais surtos de Zika poderão ocorrer, restringe a capacidade de avaliar o efeito protetivo das vacinas. Por isso, na ausência de população e ambiente adequado para testar um candidato a vacina, outras opções de prevenção e tratamento devem ser consideradas (44).

2.2.3 Chikungunya

Chikungunya é uma arbovirose causada por vírus de RNA (CHIKV) pertencente ao gênero *Alfavírus* da família *Togaviridae*. O nome “chikungunya” deriva de uma palavra da língua Kimakonde, um dos idiomas falados no sudeste da Tanzânia, que significa “curvar-se ou tornar-se contorcido”, referindo-se à postura adotada pelos indivíduos afetados pela artralgia severa que pode ocorrer em consequência de infecções por CHIKV. Este vírus foi isolado pela primeira vez durante surto de doença febril na Tanzânia em 1952 (9).

A chikungunya é caracterizada por febre de início abrupto frequentemente acompanhada de dor articular. Outros sinais e sintomas comuns incluem dor muscular, cefaleia, náuseas, fadiga e erupções cutâneas. A dor articular costuma ser muito debilitante e dura geralmente alguns dias, podendo ser prolongada por várias semanas. A maioria dos pacientes se recupera totalmente, mas, em alguns casos, a incapacitante dor nas articulações pode persistir por diversos meses, ou mesmo anos (9), podendo causar tamanha debilidade que alguns pacientes passam a depender de cadeira de rodas para locomoção (45). Complicações sérias não são comuns, porém, em idosos, neonatos e indivíduos com condições pré-existentes como diabetes e distúrbios cardiovasculares, a doença pode levar a complicações fatais (8,9).

O número de infecções por chikungunya registrados em humanos se manteve relativamente baixo por alguns anos, mas em 1999-2000 houve um grande surto da doença na República Democrática do Congo. Desde então, diversos surtos ocorreram ao redor do mundo, passando a afetar milhões de pessoas (9). Em 2019, casos de transmissão local de chikungunya já haviam sido registrados em mais de 100 países e territórios, distribuídos pelas Américas, África, Europa e Ásia (Figura 5), afetando milhões de pessoas (46).

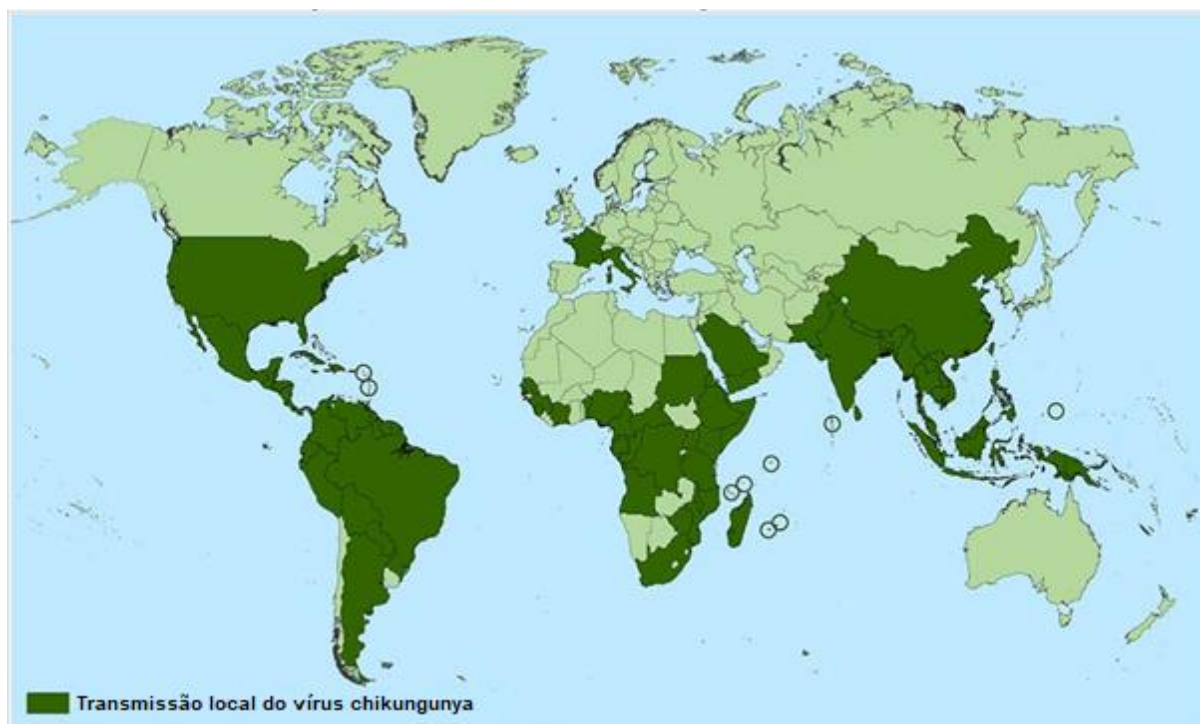


Figura 5. Países e territórios onde casos de chikungunya foram reportados (não inclui países e territórios onde foram documentados apenas casos importados). Adaptado de <https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html> (46).

Em dezembro de 2013, a França reportou dois casos autóctones confirmados em laboratório na parte francesa da ilha caribenha de St Martin. Desde então, transmissão local foi confirmada em mais de 43 países e territórios na região das Américas. Em 2014, mais de 1 milhão de casos foram reportados nas Américas. Na mesma região, em 2015, 693.489 casos suspeitos e 37.480 casos confirmados de chikungunya foram reportados para a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). Em 2016, um total de 349.936 casos suspeitos e 146.914 confirmados foram reportados nas Américas, metade da quantidade reportada no ano anterior. Os países responsáveis pela maior quantidade de casos foram Brasil (265 mil), seguido de Bolívia e Colômbia (9). Os anos de 2014, 2015 e 2016 foram os anos em que esta doença causou maior impacto nos países americanos, como evidenciado pela Figura 3.

O número de casos vem caindo desde então, porém ainda causam significativo impacto. Até a 21ª semana epidemiológica de 2020, um total de 37.279 casos de chikungunya foram reportados em 11 dos 24 países e territórios dentre da região das

Américas. A grande maioria dos casos (95%) foram reportados pelo Brasil, com 35.447 casos de chikungunya. Durante este período, a taxa de incidência cumulativa nas Américas foi de 3,82 casos por 100.000 habitantes. O país com maior taxa de incidência foi o Brasil com 17 casos a cada 100.000 habitantes, seguido pela Bolívia com 13,3 casos/100.000 habitantes, como salientado na Figura 6. Até junho de 2020, oito mortes atribuídas a chikungunya foram reportadas, todas no Brasil (39).

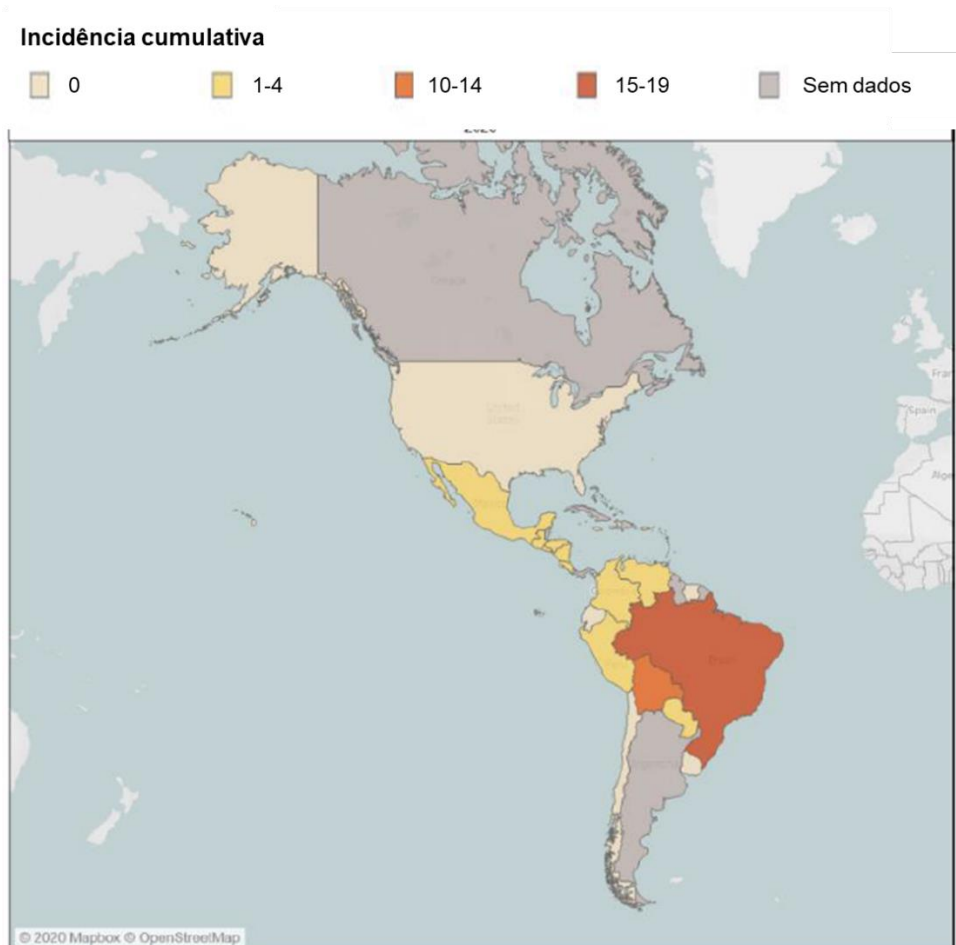


Figura 6. Taxa de incidência cumulativa de casos de chikungunya a cada 100.000 habitantes, na região das Américas (semanas epidemiológicas 1 a 21 de 2020). Adaptado de OMS, 2020 (39).

As alternativas terapêuticas atualmente disponíveis praticamente se resumem ao manejo da dor e inflamação nas articulações por meio do uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINES). Algumas opções de antivirais e de anticorpos neutralizantes tem se mostrado eficazes para tratamento de CHIKV, porém os altos custos de

manufatura, e os riscos de hipersensibilidade, imunossupressão, e de adquirir outras infecções constituem significativos obstáculos para implementar estas alternativas terapêuticas. Adicionalmente, embora algumas opções de vacinas tenham sido testadas, nenhuma delas foi ainda licenciada (8).

Com a elevação das temperaturas globais facilitando a propagação de mosquitos de gênero *Aedes*, o grande potencial de outras espécies de mosquito carregarem o CHIKV, a falta de controle do vetor e a ausência de vacinas ou terapias licenciadas, aumenta o risco de futuras epidemias estendendo-se além dos limites geográficos das áreas tropicais e em desenvolvimento (8).

2.2.4 Outras arboviroses

O *Ae. aegypti* também é responsável por transmitir febre amarela urbana. O vírus da febre amarela geralmente possui ciclo zoonótico envolvendo mosquitos silvestres do gênero *Haemagogus* e primatas em florestas tropicais. Pessoas expostas a esses mosquitos podem ser infectadas e levar o vírus para a área urbana, abundante em mosquitos *Ae. aegypti*, que podem transmitir o vírus para outros indivíduos, dando início a uma epidemia. O vírus da febre amarela também é mantido por transmissão vertical dos mosquitos fêmeas para seus ovos (47).

A febre amarela é uma doença hemorrágica viral. O termo “amarela” faz referência à icterícia manifestada por parte dos pacientes. Os sintomas desta doença incluem febre, dor de cabeça, icterícia, dores musculares, náuseas, vômitos e fadiga. Entre 15 e 25% dos pacientes evoluem para uma segunda fase mais grave, na qual o risco de morte é maior e os indivíduos apresentam pele e os olhos amarelados, urina escura, dores abdominais com vômitos e sangramentos (48).

A febre amarela pode ser prevenida por vacina, que é eficaz, segura e acessível e já está implementada no sistema de vacinação brasileiro (48). Esta vacina, constituída por vírus vivos atenuados cultivados em ovos de galinha, é produzida no Brasil desde 1937, pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos

(49). Uma dose é suficiente para garantir imunidade pelo resto da vida. Esta vacina confere imunidade dentro de 30 dias para 95% a 99% das pessoas vacinadas (48).

Entretanto, mesmo esta vacina possui limitações, representando risco para indivíduos idosos e qualquer pessoa com imunodeficiência grave, como indivíduos vivendo com HIV. Também são normalmente excluídas da vacinação mulheres grávidas, crianças com menos de 9 meses e pessoas com alergias graves à proteína do ovo (48).

Em 2016, dois surtos de febre amarela urbana relacionados entre si, um em Angola e o outro na República Democrática do Congo resultaram na exportação de casos para outros países (como China, por exemplo). Esta situação chamou atenção para a grave ameaça mundial que a febre amarela representa e alertou sobre a necessidade de novos planejamentos estratégicos (48).

Nas Américas, os países que mais notificam casos de febre amarela são Brasil, Bolívia, Colômbia, Peru e Guiana Francesa. No caso do Brasil, houve expansão da área de transmissão do vírus causador da febre amarela entre 2016 e 2018. Resultado disso foi o surto de casos no Estado de Minas Gerais entre dezembro de 2016 e agosto de 2017, período em que foram registrados 777 casos e 261 óbitos por febre amarela (48).

O padrão de transmissão de febre amarela é sazonal, tendo o maior número de casos concentrado entre dezembro e maio. Contudo, as epizootias notificadas ao longo de 2018 mostraram circulação do vírus durante o período de baixa transmissão, de junho a novembro. Este é considerado um fato preocupante pela OPAS, uma vez que indica que o risco de transmissão para humanos não vacinados no país persiste por todo o ano (48).

Além disso, a recusa da vacinação por parte da população tem favorecido infecção de indivíduos presentes em áreas com transmissão (Figura 7), colocando estas pessoas em risco de óbito, visto que a febre amarela apresenta elevada letalidade. Recentemente, durante o monitoramento 2019/2020, um total de 881 casos humanos foram notificados (50).



Figura 7. Áreas onde é recomendada vacinação contra febre amarela nas Américas. Adaptado de OPAS/OMS, 2018 (48).

Além de dengue, Zika, chikungunya e febre amarela urbana, o *Aedes aegypti* também é capaz de transmitir outras arboviroses, como a Febre do Mayaro (2) e a Febre do Nilo Ocidental (3,51).

A febre do Mayaro é uma doença infecciosa causada pelo vírus MAYV, transmitidas inicialmente pelo mosquito silvestre *Haemagogus*. MAYV foi identificado em humanos pela primeira vez, em 1954, em Mayaro (Trinidad e Tobago) e foi encontrado subsequentemente na Guiana Francesa, Suriname, Venezuela, Louisiana, Peru, Bolívia e Brasil. Casos esporádicos têm sido reportados regularmente

em diversos estados brasileiros, incluindo Norte, Nordeste e Centro Oeste. Os sintomas do Mayaro são semelhantes aos da dengue e chikungunya, e incluem febre alta, cefaleia, dor epigástrica, artralgia crônica, náuseas, entre outros. Estes sintomas podem ser incapacitantes e persistir por vários meses (52).

O vírus da Febre do Nilo Ocidental pode causar consequências sérias para humanos (53) e é transmitido especialmente por mosquitos do gênero *Culex* (54). Por volta de 1 a cada 5 pessoas infectadas desenvolvem sintomas como cefaleia, dor no corpo, artralgia, vômitos, diarreia e erupções cutâneas. A maior parte destas pessoas se recupera totalmente, porém fadiga e fraqueza podem perdurar por semanas ou até meses. Algumas pessoas podem desenvolver a forma grave da doença, afetando o sistema nervoso central e causando encefalite e meningite (53). É previsto que em um futuro próximo o vírus da Febre do Nilo seja endêmico na maior parte dos países da América do Sul e Estados Unidos (3).

2.3 MÉTODOS PARA COMBATE DO VETOR

Ao longo dos anos, diversos métodos para controle de arboviroses foram propostos, especialmente para controle do vetor. Programas de controle do vetor tem por objetivo reduzir as populações dos insetos transmissores dos agentes etiológicos por meio da eliminação de potenciais criadouros ou utilização de inseticidas. No Brasil, o controle das larvas de *Ae. aegypti* foi feito, por muitos anos, utilizando o larvicida organofosforado, temefós. Entretanto, hoje em dia, a maioria das populações de mosquitos avaliados no Brasil apresentam resistência ao temefós (4,55). A maioria dos mecanismos reportados para resistência do *Ae. aegypti* ao temefós são associados a mudanças no alvo dos organofosforados, a enzima acetilcolinesterase (55).

Por este motivo, o temefós começou a ser substituído, a partir de 2009, por inseticidas alternativos, como inseticidas biológicos e reguladores do crescimento, não sendo mais usado depois de 2013 (56). Após o temefós, foram usados primeiramente

inibidores da síntese de quitina, como diflubenzuron e novaluron, e, desde 2015, tem sido utilizado o piriproxifen, um análogo de hormônio juvenil. Inseticidas desta classe atuam sobre o desenvolvimento dos insetos, de modo a impedir a emergência dos adultos (57,58).

Infelizmente, também já existem relatos de resistência ao piriproxifen. Por isso, foi recomendado, por meio da Nota Informativa nº 103/2019, o uso do espinosade (59), um larvicida contendo dois metabólitos, espinosina A e D, produtos da fermentação aeróbica de *Saccharopolyspora spinosa*, uma actinobactéria do solo. O espinosade atua tanto em receptores nicotínicos de acetilcolina e em receptores de ácido γ -aminobutírico (GABA), causando excitação do sistema nervoso, levando a paralisia e morte (55).

Para controle dos mosquitos já na forma adulta, tem sido utilizado outro organofosforado, o malation (59). O malation é utilizado em aplicações espaciais a Ultra Baixo Volume (UBV), técnica conhecida como fumacê. Contudo, resistência ao malation foi relatada em todas as regiões do Brasil. Por isso, este está sendo substituído pelo inseticida CIELO-ULV para aplicação espacial para controle de mosquitos (59).

O CIELO-ULV é um produto desenvolvido pela empresa Clarke Brasil Produtos Para Controle De Mosquito LTDA para controle dos mosquitos. Este produto é constituído de praletrina a 0,75% (p/p) e imidacloprida a 3,00% (p/p). A praletrina é um piretroide, cujo mecanismo de ação é manter abertos os canais de sódio das membranas dos neurônios, afetando o sistema nervoso dos mosquitos, causando paralisia (efeito *knock-down*) (60,61). A imidacloprida é um neonicotinoide, que age como agonista (análogo) de acetilcolina. A ligação dos neonicotinóides com o receptor nicotínico é persistente, ao contrário da ligação da acetilcolina. A ativação dos receptores de acetilcolina é prolongada de modo anormal, causando hiperexcitabilidade do sistema nervoso central devido à transmissão contínua e descontrolada de impulsos nervosos (60).

Para uso como adulticida residual, foi recomendada a combinação de clotianidina (neonicotinoide) e deltametrina (piretroide) (59). Anteriormente era utilizado Bendiocarb PM 80, um inseticida residual da classe dos carbamatos, que,

assim como os organofosforados, também agem como inibidores de acetilcolinesterase (62).

O problema da resistência é ainda ressaltado à luz dos resultados de testes genéticos que comprovam a permanência disseminada de marcadores de resistência mesmo após anos sem a utilização de determinada classe de inseticida. Exemplo disso são os marcadores de resistência a piretroides, que foram encontrados em populações de mosquitos em 2019 mesmo estes não sendo preconizados pelos programas de controle do vetor desde 2012 (59). As evidências de resistência a diversas classes de inseticidas destacam a necessidade da busca contínua de outras opções para utilizar no controle do vetor.

Outra estratégia adotada pelo governo brasileiro inclui a *Wolbachia*, um agente biológico de controle (63). *Wolbachia* é uma bactéria que não ocorre naturalmente no *Ae. aegypti*, mas, quando introduzida neste vetor, tem a habilidade de reduzir significativamente a capacidade do vetor de abrigar e transmitir patógenos (52).

Esta bactéria é transmitida verticalmente para os ovos dos mosquitos. Portanto, fêmeas com *Wolbachia* sempre geram crias com *Wolbachia* no processo de reprodução, independentemente do macho ser portador ou não da bactéria. E, quando as fêmeas sem *Wolbachia* se acasalam com machos com a *Wolbachia*, os óvulos fertilizados resultantes não sobrevivem. Sendo assim, mosquitos com *Wolbachia* são liberados no ambiente e, após se estabelecerem nas populações nativas, a infecção por patógenos, assim como sua transmissão, são diminuídos (64).

Mais de cinco anos após introduzir mosquitos infectados com *Wolbachia* em populações nativas na Austrália, quase 100% das populações de *Ae. aegypti* ainda eram hospedeiras da bactéria e mantiveram a capacidade de bloquear infecção por patógenos (52). Os primeiros testes no Brasil foram realizados em Niterói (RJ) e, após os bons resultados, o Ministério da Saúde decidiu, em 2020, expandir a utilização da técnica para regiões de diferentes biomas, como Campo Grande (MS) (50,65).

Na categoria de inseticidas biológicos, se destacam os produtos produzidos a partir da bactéria *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti). Esta bactéria gera toxicidade à forma imatura dos mosquitos graças aos cristais produzidos durante o processo de esporulação. Depois de ingeridos, estes cristais se solubilizam no meio alcalino do intestino das larvas de *Ae. aegypti*, onde ocorre a ativação das pró-toxinas, levando a

perturbações no intestino do organismo que posteriormente levam à morte (66,67). Produtos à base de Bti já foram introduzidos pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) na rotina de tratamentos de programas de controle de vetores (68). Entretanto, o Bti apresenta algumas importantes limitações como baixo efeito residual e a intolerância à exposição direta da luz solar (69).

Outra alternativa promissora utilizada para o controle de mosquitos é a esterilização de insetos por irradiação. Este método consiste em submeter os insetos machos a uma dose mínima de raios gama ou raios X para induzir rearranjos cromossômicos aleatórios e provocar esterilização. Quando os machos estéreis liberados acasalam com as fêmeas selvagens, o potencial reprodutivo das fêmeas é reduzido, contribuindo, assim, para supressão da população local de vetores (70).

2.4 DANO AMBIENTAL CAUSADO POR INSETICIDAS

Ao redor do mundo, inseticidas são ferramentas importantes para prevenção de doenças transmitidas por vetores, especialmente em países com condições propícias para a propagação dessas doenças, onde há altos índices de crescimento desordenado, falta de infraestrutura apropriada e clima tropical, propício para a multiplicação de vetores como o *Ae. aegypti* (13). Entretanto, seu uso indispensável tem resultado em contaminação preocupante de água, solo e ar, sendo, assim, uma ameaça ao meio ambiente (71).

Diversos estudos apontam que muitos inseticidas comumente utilizados são persistentes no ambiente e causam danos a organismos não-alvo. Neonicotinoides, inseticidas amplamente utilizados no mundo todo, são causa de preocupação ambiental, já que estes podem persistir e acumular no solo. A presença de neonicotinoides no solo ameaça o equilíbrio de ecossistemas, já que pode impactar uma ampla gama de organismos não-alvo, incluindo polinizadores e organismos aquáticos (72).

Além de solo, resíduos de neonicotinoides já foram detectados em água, pólen fresco de plantas, pólen coletado por abelhas e néctar (17). Como consequência ao dano acarretado à população de abelhas, o uso de três inseticidas desta classe (clotianidina, imidacloprida e tiametoxam) foi restringido na União Europeia a partir de 2013 (15,16).

A presença de inseticidas na água também é motivo de grande apreensão, visto que o sistema hidrológico é uma das vias mais importantes para a distribuição de pesticidas, transportando-os da área de aplicação para outras áreas nas quais podem ocasionar severos danos ao meio ambiente (13). Mais além, peixes são importantes componentes das comunidades aquáticas, estando presente em uma grande variedade de habitats e posições tróficas (73).

Devido a lenta decomposição, longa meia-vida e alta estabilidade no ambiente, organoclorados são considerados a classe de pesticidas mais danosa ao meio ambiente, podendo bioacumular em níveis tróficos superiores das cadeias alimentares (71). Contudo, a presença de outras classes de inseticidas, como organofosforados (malation, paration, clorpirifós) e um organotiofosfato (quinalfós), já foram registradas em amostras de águas superficiais e subterrâneas, e em tecido muscular de peixes selvagens (13,73).

O organofosforado malation é considerado altamente tóxico tanto para organismos aquáticos quanto para polinizadores, como abelhas. Sendo assim, a detecção, mesmo em pequenas quantidades, de malation preocupa em relação ao impacto ambiental (71). Ademais, indícios da persistência do malation também foram encontrados em amostras de solo, mesmo após 1 ano da aplicação inicial (74).

O vasto uso de piretroides também levanta a questão do risco ecológico, assim como para a saúde humana, visto que estes podem causar toxicidade cumulativa, reprodutiva e neural, e resíduos deste tipo de inseticidas são frequentemente encontrados. Os metabólitos gerados a partir da degradação dos piretroides agravam a preocupação com o impacto ambiental, já que estes são tóxicos e persistentes (18,75).

Sendo assim, a presença de resíduos de inseticidas, principalmente, em água e solo, juntamente ao desenvolvimento de resistência a estes inseticidas e aplicação exagerada para combate de vetores e pestes, pode resultar em importantes

desequilíbrios ecológicos. Portanto, são encorajados métodos mais modernos e mais ecologicamente sustentáveis para o manejo de vetores, como métodos de controle mecânicos, biológicos e o uso preferencial de bioinseticidas (13).

2.5 FAMÍLIA ANACARDIACEAE

A família Anacardiaceae é constituída por cerca de 80 gêneros e 800 espécies de distribuição geográfica tropical e subtropical, sendo 77% das espécies endêmicas do continente americano (76,77). Os gêneros mais estudados do ponto de vista fitoquímico incluem *Mangifera*, da qual a *M. indica* (mangueira) faz parte; *Anacardium*, gênero do cajueiro (*A. occidentale*); *Pistacia*, que inclui *P. vera* (pistache); e *Schinus*, gênero de *S. terebinthifolia* (pimenta-rosa).

Os resultados destes estudos reportam a ocorrência de flavonoides, terpenos, esteroides, xantonas, mas, especialmente, lipídios fenólicos e derivados. Os lipídeos fenólicos são associados a dermatite de contato causada por cerca de 25% dos gêneros da família Anacardiaceae (77,78). Apesar disso, a diversidade de metabólitos secundários e atividades biológicas gera grande interesse em estudar espécies desta família (77).

2.5.1 *Schinus terebinthifolia* Raddi

Schinus terebinthifolia Raddi (Anacardiaceae), popularmente conhecida como aroeira-vermelha ou aroeira-pimenteira, é uma espécie nativa da América do Sul e Central. *S. terebinthifolia* tem sido usado de forma tradicional para tratar uma grande variedade de enfermidades: úlceras e feridas, problemas respiratórios, reumatismo,

diarreia, doenças de pele, artrite, infecções do trato urinário, candidíase oral em crianças, entre outras (20).



Figura 8. *Schinus terebinthifolia* Raddi (Anacardiaceae). Fotos: Acervo do Laboratório de Farmacognosia – UnB.

Atualmente, *S. terebinthifolia* consta na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais, RENAME, para uso no componente básico como opção de tratamento para afecções vaginais, nas formas farmacêuticas de gel e óvulo vaginal (21). *S. terebinthifolia* apresenta ação anti-inflamatória, cicatrizante, antisséptica local e antimicrobiana, sendo usado para tratamento de cervicites, vaginose bacteriana e cervicovaginites (22).

Ao longo dos anos, diversas atividades biológicas e compostos ativos têm sido relatados na literatura para *S. terebinthifolia*, como evidenciado na Tabela 1. As principais atividades incluem: antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica), anti-inflamatória, cicatrizante, antioxidante, citotóxica, antitumoral e antialérgica (20). Adicionalmente, *S. terebinthifolia* também tem atividade em outros patógenos, incluindo triterpenos ativos em parasitos da leishmaniose e doença de Chagas (79).

Tabela 1 - Atividades mais recorrentes reportadas para *S. terebinthifolia* e os extratos ou compostos relacionados a estas atividades.

Antimicrobiana	Antiaderente de biofilmes	Anti-inflamatória	Antioxidante	Citotóxica	Antitumoral	Antialérgica
- Óleo essencial (folhas) (80,81); - Extratos etanólico e diclorometânico (folhas), contendo fenóis, flavonas, flavononas, flavonoides, xantonas, antocianinas e esteroides (80,82); - Tintura casca do caule (83); - Lecitinas (folhas) (84);	- Extratos metanólicos, acetato de etila- metanólicos, hidroalcóolicos (85); <hr/> Cicatrizante - Extrato hidroalcóolico (casca) (100); - Pomada com óleo essencial (folhas) (101);	- Extrato hidroalcóolico (folhas) (86); - Extratos contendo catequinas, taninos, terpenos, flavonoides e saponinas (79); - Tintura de casca do caule (87);	- Óleo essencial (folhas e frutos), contendo polifenóis (88); - Extrato etanólico (89); - Compostos fenólicos (90,91) (ácido ferúlico, quercetina e ácido cafeico) (92);	- Óleo essencial (folhas), contendo principalmente α - e β -pinenos (93); - Terpenos (folhas) (94); - Terpenoides (folhas) (79); - Extrato hidroetanólico (20);	- Óleo essencial (frutos) (95); - Polifenóis (96); - Terpenos (antimetastáticos) (94);	- Extrato acetato de etila (folhas) (97); - Compostos aromáticos (98); - Extrato hidroalcóolico de casca da madeira (99).

Dentre as atividades biológicas, destaca-se também o potencial inseticida de *S. terebinthifolia*. Atividade larvicida contra *Ae. aegypti* já foi relatada para extratos de folhas e óleo essencial extraído dos frutos e sementes (23,25,102). Óleo essencial de *S. terebinthifolia* também apresentou atividade adulticida e repelente em *Ae. aegypti* (103). Procópio e colaboradores (2015) relataram que o ácido cinâmico e flavonoides extraídos de folhas de *S. terebinthifolia* interferem na sobrevivência e desenvolvimento de formas imaturas de *Ae. aegypti* (24).

Mais além, foi reportada atividade em outros insetos: terpenos presentes no óleo essencial de *S. terebinthifolia* inibiram ciclo de *Callosobruchus maculatus*, uma praga agrícola (104); óleo essencial de folhas também age como inseticida e repelente de outras pragas agrícolas, como *Sitophilus oryzae* L., *Trogoderma granarium* e *Tribolium castaneum* (20,105).

Em avaliação de toxicidade *in vitro*, extratos aquosos e hidroalcoólicos de *S. terebinthifolia* não demonstraram indícios de induzir alterações carcinogênicas (106). Entretanto, outro estudo mostrou o potencial de extrato da madeira do caule de causar dano oxidativo ao DNA, podendo levar a mutações (107). Além disso, alguns estudos relatam o desenvolvimento de lesões na pele após contato tópico com *S. terebinthifolia*, reação que é muitas vezes associada à presença de alquilfenóis (108–110). Por outro lado, a aplicação tópica de formulações contendo extrato de folhas de *S. terebinthifolia* não causou nenhuma mudança histológica na pele de ratos, indicando baixa toxicidade tópica (91).

Lima e colaboradores (2009) demonstraram que a administração oral de extratos secos de casca de *S. terebinthifolia* durante 45 dias em ratos não induziu nenhuma mudança significativa na bioquímica e nos índices hematológicos, assim como nas características anatômicas e histopatológicas dos animais. Não foram observados efeitos tóxicos agudos ou subagudos, apontando para a segurança da ingestão de extratos da planta por via oral (109,111). Adicionalmente, o consumo frequente dos frutos de *S. terebinthifolia* na culinária sugere que estes sejam inócuos, informação confirmada por administração oral e intraperitoneal de extratos dos frutos em camundongos (109,112).

2.6 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS

Análises quimiométricas usam métodos matemáticos e estatísticos para: (i) delinear e selecionar parâmetros experimentais ideais; (ii) extrair o máximo de informações possível a partir de dados de origem química. Aplicações típicas de métodos quimiométricos são: estabelecimento de relações estrutura-atividade e avaliação de dados químicos analíticos (113).

A grande quantidade de dados gerados por instrumentos analíticos, como cromatógrafos líquidos de alta eficiência ou cromatógrafos gasosos acoplados a espectrômetros de massas (HPLC-UV-DAD, HPLC-MS, GC-MS) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), é uma das razões que justificam aplicação de métodos quimiométricos. As análises quimiométricas permitem processar tais dados utilizando ferramentas simplificadas e práticas, que possibilitam aplicação de métodos matemáticos complexos sem necessidade de conhecimento aprofundado dos mesmos. Esta ferramenta permite, assim, maior acessibilidade da comunidade científica a análises matemáticas e estatísticas de maior nível de complexidade (113). Para isso, estão disponíveis gratuitamente *online* diversas plataformas, como MetaboAnalyst® e Cytoscape®, que podem ser utilizadas para aplicar análises quimiométricas e gerar representações gráficas referentes às análises, que facilitam a interpretação dos dados pelo pesquisador (114).

Modelos quimiométricos podem ser utilizados para avaliar conjuntos de dados referentes a metabólitos para delinear correlações e potenciais influências na diversidade fitoquímica das amostras analisadas, sendo comumente utilizados em análises metabolômicas (115). A análise da composição metabólica de amostras por meio de quimiometria tem sido aplicada em diversos contextos: no setor alimentício, sendo utilizada para detecção de adulteração de produtos como azeite extra virgem (116) e de leite em pó (117) e avaliação da qualidade de chás (118), por exemplo; análise da variação na composição de óleos essenciais utilizados na medicina tradicional (119,120); identificação de componentes de extratos vegetais relacionados com atividade de interesse (121); dentre outras aplicações.

Sendo assim, as análises quimiométricas possibilitam examinar grande quantidade de dados adquiridos a partir de matrizes biológicas utilizando métodos matemáticos e estatísticos de alta complexidade, sendo, portanto, de grande utilidade na investigação de produtos naturais (114).

2.7 O ORGANISMO NÃO-ALVO ZEBRAFISH

Para assegurar a proteção da saúde humana e do ambiente, é essencial avaliar o potencial dos produtos naturais em causar efeitos tóxicos. Neste sentido, testes toxicológicos podem fornecer informações importantes sobre os potenciais riscos de exposição a certos compostos (122).

A avaliação de toxicidade é um desafio no processo de descoberta e desenvolvimento de novos produtos. Aproximadamente um quarto dos problemas na descoberta de novas drogas está relacionado com sua toxicidade. Roedores, como ratos e camundongos, são o modelo convencional para ensaios de toxicidade, comportamento e farmacologia (122). Porém, ao longo dos anos, vem sendo realçada a necessidade da aplicação de modelos animais alternativos nos testes de toxicidade. Além de evitar o uso desnecessário de animais, modelos alternativos são, muitas vezes, financeiramente mais viáveis, aumentando o acesso de grupos de pesquisa a testes toxicológicos (123). Por isso, diversas metodologias em modelos não-mamíferos, como testes de embriotoxicidade, têm sido testadas para aprimorar o processo de avaliação de toxicidade (122).

Embriões de peixe-zebra (*zebrafish*) emergiram como uma interessante alternativa para realização de testes toxicológicos e farmacológicos, graças ao seu potencial para realização de testes rápidos e reprodutíveis, especialmente na aplicação em *high-throughput screening* para alterações no comportamento (122,124).

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um pequeno teleósteo (3 a 4 cm), pertencente à família de peixes de água fresca Cyprinidae. Esta espécie é frequentemente

empregada como modelo para avaliar a toxicidade de metais, pesticidas, fármacos e outras substâncias. Embriões e larvas de *zebrafish* (Figura 9) medem apenas de 1 a 4 mm e podem viver alguns dias após fecundação sem necessidade de alimentação externa. Pequenas moléculas diluídas na água circundante são absorvidas pela pele e brânquias das larvas e embriões, o que facilita a exposição destes organismos aos compostos-teste. Os compostos podem também ser ingeridos oralmente a partir de 72 horas pós-fertilização (72 hpf) (125).

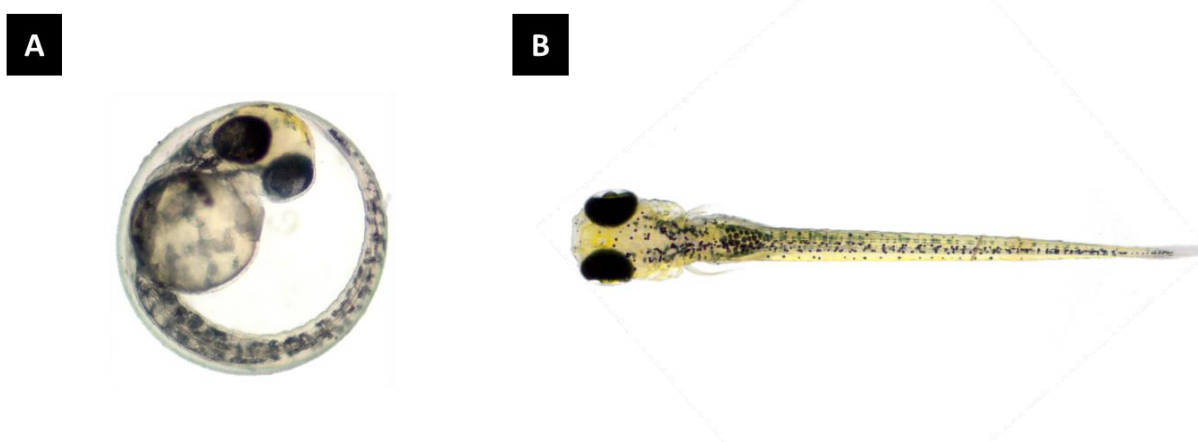


Figura 9. Fotografias dos primeiros estágios de desenvolvimento do peixe-zebra: (A) embrião (48 hpf – horas pós-fertilização) e (B) larva (96 hpf). Acervo Laboratório de Farmacognosia/UnB (foto de Heidi L. Schulte).

A transparência apresentada pelos primeiros estágios de desenvolvimento do peixe-zebra permite fácil observação de diferentes estruturas durante os experimentos *in vivo* sem necessidade de aplicar técnicas invasivas. Embora larvas e adultos sejam usados em testes farmacológicos e toxicológicos, maiores vantagens estão concentradas nos primeiros estágios de desenvolvimento, já que estes possibilitam testes de grande número de amostras em curto período de tempo, graças a modelos de *screening* em microplacas (125).

A partir do estágio de fertilização, os embriões do peixe-zebra podem sobreviver individualmente por dias em microplacas (125); além disso, o acelerado desenvolvimento externo permite observação de diversas transformações

morfológicas em poucos dias, ao contrário de outros modelos animais, que demandam quantidade muito maior de tempo (122).

Para realização dos testes, pequenas quantidades de amostra são necessárias, já que uma larva consegue viver em apenas 50 µL de água. Ademais, estes organismos são tolerantes a baixas concentração de dimetilsulfóxido (DMSO), geralmente utilizado como veículo para muitos compostos-teste (125). Outras vantagens do uso de *zebrafish* como modelo experimental incluem economia de espaço, e simples manipulação, quando comparados a outros modelos animais (122)

Adicionalmente, o genoma do peixe-zebra possui aproximadamente 70% de homologia com o genoma humano, sendo que 84% destes parecem estar associados com doenças humanas (126). Estudos recentes têm usado testes nas fases iniciais da vida do peixe-zebra como um meio-termo entre estudo *in vitro* baseados em células e estudos *in vivo* em mamíferos (122).

O peixe-zebra também tem sido utilizado para avaliar a toxicidade de produtos que tem potencial risco ambiental (125). Dentre eles, já foram testados inseticidas da classe dos piretroides como cifenotrina, tetrametrina, e cipermetrina, e dos organofosforados, como malation (127,128). Ademais, embriões de peixe-zebra têm sido utilizados para avaliar a toxicidade de produtos naturais (122), incluindo inseticidas de origem natural como o espinosade (129).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Aplicar análises quimiométricas e de isolamento bioguiado para encontrar o composto presente em *S. terebinthifolia* responsável pela atividade em *Ae. aegypti*; e avaliar o impacto deste composto para o ambiente, por meio de avaliação do perfil de degradação e toxicidade em organismo não alvo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicar análises quimiométricas para investigar o perfil de metabólitos presentes em amostras ativas e inativas extraídas de *S. terebinthifolia*;
- Isolar substância responsável pela atividade observada;
- Testar a substância em larvas, pupas, e forma adulta do mosquito (como adulticida e repelente espacial);
- Desenvolver método para quantificar a substância ativa em água;
- Avaliar perfil de degradação da substância ativa;
- Estudar a identidade dos compostos gerados durante o processo de degradação;
- Avaliar toxicidade da substância ativa e de seus compostos de degradação no organismo não alvo peixe-zebra (*Danio rerio*).

4. MÉTODOS

4.1 EXTRATOS DE *Schinus terebinthifolia*

Schinus terebinthifolia Raddi, Anacardiaceae, identificada pelo botânico Prof. José Elias de Paula (*in memoriam*), foi coletada em junho de 2008 no bioma Cerrado, em mata ciliar úmida perto do Córrego do Bananal, Parque Nacional de Brasília, Distrito Federal. Uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Brasília sob número de acesso (UB) 3753. As partes da planta coletadas foram deixadas em temperatura ambiente por 72 horas para retirada da umidade e depois pulverizadas com auxílio de moinho de facas. Os extratos foram produzidos utilizando solventes de diferentes polaridades, com o objetivo de gerar extratos de composições químicas distintas. Para isso, o material vegetal pulverizado foi submerso em solvente e submetido a extração por maceração auxiliada por ultrassom em 4 ciclos de 2 horas, com renovação do solvente ao final de cada ciclo. As soluções extrativas foram concentradas em evaporador rotativo e transferidas para frascos de vidro tarados e identificados. Após dessecação sob pressão reduzida, os frascos contendo os extratos foram armazenados em freezer. Foram produzidos, ao todo, 14 diferentes extratos, descritos na Tabela 2. Estes extratos fazem parte da coleção de extratos e substâncias do Laboratório de Farmacognosia (UnB), autorizada pelo CGEN/IBAMA (n. 06/2012 – processo n. 02000.002272/2006-73), intitulada Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado.

Tabela 2 - Extratos da espécie *Schinus terebinthifolia* avaliados em relação ao seu potencial larvicida.

Código da amostra	Parte da planta	Solvente
Arbo0023	Madeira do caule	Hidroalcoólica
Arbo0024	Madeira do caule	Hexano
Arbo0025	Madeira do caule	Hexano
Arbo0026	Madeira do caule	Acetado de etila
Arbo0027	Madeira do caule	Diclorometano
Arbo0028	Casca do caule	Hidroalcoólica
Arbo0029	Casca do caule	Diclorometano
Arbo0030	Casca do caule	Hexano
Arbo0031	Casca da raiz	Hexano
Arbo0032	Madeira da raiz	Hidroalcoólica
Arbo0033	Madeira da raiz	Acetato de etila
Arbo0034	Folha	Hidroalcoólica
Arbo0035	Folha	Diclorometano
Arbo0036	Folha	Hexano

4.2 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS

Para realização das análises quimiométricas, pré-frações ativas e inativas em larvas de *Ae. aegypti*, provenientes de diferentes extratos de *S. terebinthifolia*, foram analisadas por meio de Cromatógrafo Líquido de Ultra Alta Eficiência (UPLC – *Ultra High Pressure Liquid Chromatography*) com fotodiodo (PDA) acoplado com Espectrômetro de Massas de alta resolução (Bruker compact ESI-QqTOF) - UPLC-PDA-MS/MS.

Para isso, três extratos ativos e três extratos inativos foram selecionados para pré-fractionamento. As pré-frações foram obtidas por pré-fractionamento em extração em fase sólida (SPE-sílica). As pré-frações resultantes foram submetidas a ensaio em larvas de *Ae. aegypti* para confirmação da atividade, e diluídas em metanol e filtradas por uma membrana de 0,22 µm para análise em UPLC-PDA-MS/MS.

Para aquisição dos dados, foi usada coluna Intensity solo C18-2 column (100 x 1.5 mm, tamanho de partícula 2.0 µm) e fase móvel constituída de: água ultrapura (Milli-Q® Direct) e metanol (J. T. Baker), com 0,1% de ácido fórmico. A eluição analítica de metanol começou com 5% e aumentou até 100% em 10 minutos, com mais 6 minutos para limpeza e estabilização da coluna (tempo total da corrida de 16 min). O fluxo utilizado foi de 0,5 mL/min, volume de injeção 5 µL e temperatura do forno a 40 °C. Os parâmetros utilizados na fonte de ionização foram: voltagem do capilar a 4500 V, nebulizador 4,0 bar, gás nebulizador a 9 L/min e temperatura da fonte a 200 °C.

Os dados obtidos a partir da análise em UPLC-PDA-MS/MS, em formato mzXML, foram pré-processados utilizando o software MZmine 2.38. A metodologia utilizada para pré-processamento dos dados foi baseada no protocolo desenvolvido por Wolfender, Houriet e Allard (130). As funções de pré-processamento aplicadas estão descritas a seguir: determinação automática de sinais de interesse - *mass detection* (detecção à nível de MS1; tempo de retenção (TR) = 0,30 – 14,1 min; detecção de massa: centroide, com ruído até $1,0 \times 10^3$); construção de cromatogramas - *chromatogram builder* (TR = 0,30 – 14,1 min; tempo mínimo de *span* = 0,05 min; altura mínima = $1,0 \times 10^4$; tolerância para *m/z* = 0,006 *m/z* ou 20 ppm); deconvolução (algoritmo Wavelets (XCMS)); limite relação sinal-ruído (S/N) = 2; escala de Wavelet: 0,10 – 10,00; limite de duração do pico = 0,10 – 2,00 min); identificação dos sinais isotópicos - *isotopic peaks grouper* (tolerância para *m/z* = 0,006 *m/z* ou 20 ppm; tolerância para TR = 0,10 min; carga máxima = 2); alinhamento - *data alignment* (tolerância para *m/z* = 0,006 *m/z* ou 20 ppm; peso para *m/z*: 1; tolerância para TR = 0,8 min; peso para TR = 0,05); e recuperação de sinais fracos - *gap filling* (tolerância para intensidade = 5,0%; tolerância para *m/z* = 0,006 *m/z* ou 20 ppm; tolerância para TR = 0,8 min; correção de TR: selecionado).

Os dados provenientes do pré-processamento foram exportados e transferidos para a plataforma online MetaboAnalyst®, onde foram realizados normalização dos

dados, escalonamento e análises quimiométricas. Segue descrição dos parâmetros utilizados: filtração por valor de mediana da intensidade; normalização pela soma; transformação dos dados: nenhuma; escalonamento: *Pareto scaling*.

4.3 FRACIONAMENTO E ISOLAMENTO

4.3.1 Pré-fracionamento utilizando SPE-sílica

O pré-fracionamento dos extratos ativos e inativos foi realizado por extração em fase sólida utilizando sílica (SPE-sílica), conforme o seguinte protocolo:

- Foram usados cartuchos com 2 g de sílica, preparados manualmente;
- 100 mg de cada extrato selecionado foram dissolvidos em 1,6 mL de solução com diclorometano:metanol (1:1) e aplicados sobre a sílica;
- Os cartuchos com os extratos aplicados foram deixados em capela de fluxo para secagem *overnight*;
- 6 mL de solvente de três solventes em polaridades crescentes foram aplicados a cada cartucho para realizar a separação em três pré-frações:
 - A. Hexano 100% (6 mL) – pré-fração **A**;
 - B. Acetato de Etila 100% (6 mL) – pré-fração **B**;
 - C. Metanol 100% (6 mL) – pré-fração **C**.

Sistema a vácuo foi aplicado para aumentar a eficiência na eluição dos solventes (Figura 10).

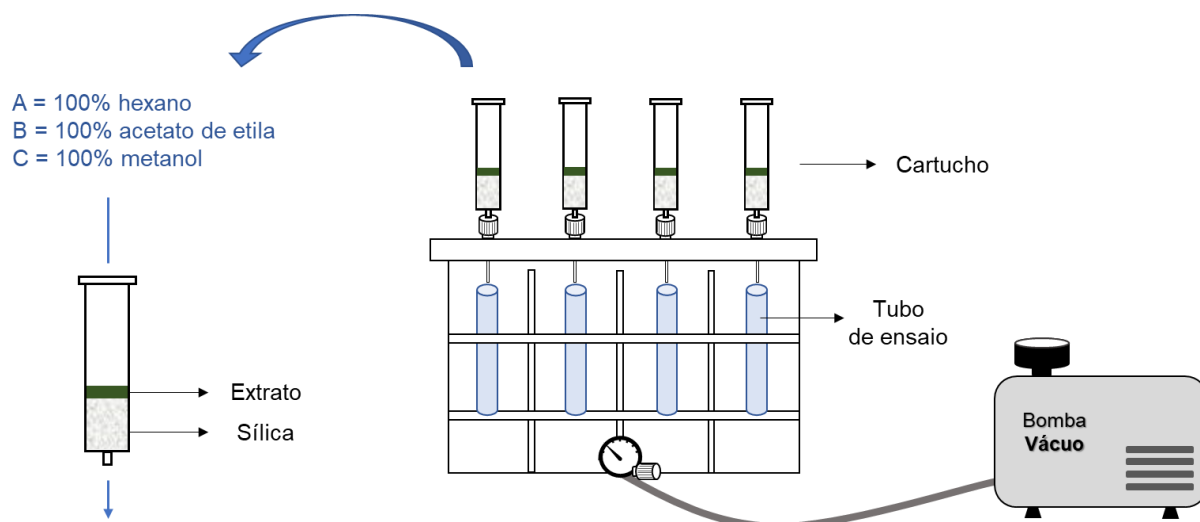


Figura 10. Esquematização da metodologia de pré-fractionamento em SPE-silica. Em cada cartucho, contendo um dos extratos previamente selecionados, foi realizada eluição utilizando: 6 mL de A (100% hexano), seguidos de 6 mL de B (100% acetato de etila), e, por fim, 6 mL de C (100% metanol), com auxílio de sistema a vácuo. Acervo do Laboratório de Farmacognosia – UnB (elaborado por Heidi L. Schulte).

As pré-frações obtidas por este procedimento foram submetidas à teste larvicida (conforme metodologia descrita no item 4.4.2) e análise por HPLC.

4.3.2 Isolamento do composto ativo

Para o isolamento do composto ativo em larvas de *Ae. aegypti*, uma alíquota de 2 g do extrato Arbo0036 passou por processo de separação por SPE-silica, conforme descrito no item 4.3.1. Por meio deste procedimento foram obtidos: 430 mg de pré-fração **A**, 840 mg da pré-fração **B** e 310 mg da pré-fração **C**. As pré-frações secas foram testadas em larvas de *Ae. aegypti* (de acordo com protocolo descrito no item 4.4.2).

A pré-fração **B** foi 100% ativa a 125 µg/mL após menos de 6 horas de exposição. Esta pré-fração em sua totalidade foi purificada em coluna com Sephadex

LH-20 usando fase móvel isocrática constituída de mistura de CH₂Cl₂:MeOH (1:1). A partir desta coluna, foram coletadas 40 frações, posteriormente combinadas em 8 frações (Arbo10A036A a Arbo10A036H) de acordo com perfil apresentado em Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

A fração Arbo10A036G (470 mg) apresentou aproximadamente 97% de pureza cromatográfica e foi submetida a análise por Ressonância Magnética Nuclear uni e bidimensional. Adicionalmente, foram obtidos: perfil de fragmentação e comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{máx}$) por UHPLC-PDA-MS/MS; e análise por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Combinando os resultados obtidos por estas análises com informação disponível da literatura (131), foi possível elucidar a estrutura da substância isolada e identificá-la como o lipídeo fenólico 5-[(Z)-pentadec-8'-enil]benzeno-1,3-diol, conhecido como bilobol.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE EM *Ae. aegypti*

4.4.1 Criação de mosquitos

A colônia de mosquitos *Ae. aegypti* (cepa Rockefeller) é mantida no Insetário ArboControl - Laboratório José Elias de Paula/Anexo do Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília (UnB). O Insetário ArboControl dispõe de salas devidamente estruturadas para manutenção da umidade e temperatura nos padrões adequados, assim como antessala para preparação de amostras. As salas contendo as gaiolas de mosquitos são mantidas a 27 °C ± 2 °C, com umidade relativa de 80% ± 10% e fotoperíodo de 12 horas (claro/escuro). Ovos de *Ae. aegypti* são eclodidos com auxílio de câmara de vácuo (0,050 g de ovos são colocados em contato com 200 mL de água e submetidos a 550 mmHg – 5 min com a bomba funcionando, mais 1 hora com a válvula fechada para manter o vácuo). As larvas eclodidas são

transferidas para bandejas contendo 2 L de água da torneira e alimentadas diariamente com 0,50 g de ração de peixe a partir do terceiro dia após a eclosão (dia 1 – alimentação com 0,03 g; dia 2 – sem alimentação). Após transformação em pupas, estas são separadas entre machos e fêmeas em estereomicroscópio e inseridas nas gaiolas na proporção de 1350 fêmeas e 450 machos para cada gaiola. Os mosquitos são alimentados com solução de açúcar a 10% (v/v). Fêmeas são alimentadas com sangue de égua duas vezes por semana, para a produção de ovos.

4.4.2 Avaliação da atividade larvicida

Para o ensaio larvicida, dez larvas do terceiro estágio de desenvolvimento foram transferidas para cada poço de uma placa de 12 poços. As larvas foram selecionadas de forma que todas tivessem tamanho homogêneo e aparência sadia. Em seguida, o excesso de água foi removido e 2,950 mL de água da torneira foram adicionados a cada poço. Alíquotas de 0,050 mL das soluções estoque contendo as respectivas amostras diluídas em DMSO (dimetilsulfóxido) foram adicionadas para atingir a concentração teste. Extratos foram testados a 250 µg/mL; pré-frações (resultantes de pré-fracionamento por extração em fase sólida – SPE) foram testadas a 125 µg/mL; frações foram testadas a 100 µg/mL; e substâncias isoladas, a 25 µg/mL. Todas as amostras foram testadas em quadruplicata e em três lotes diferentes de larvas.

A temperatura ambiente das salas de teste foi mantida nas mesmas condições das salas onde é mantida a colônia de mosquitos (27 °C ± 2 °C, com umidade relativa de 80% ± 10% e fotoperíodo de 12 horas claro/escuro). DMSO foi utilizado como controle negativo (solvente); e Bti (*Bacillus thuringiensis israelensis*), um inseticida biológico desenvolvido para controlar as larvas de *Ae. aegypti*, foi utilizado como controle positivo.

Passadas 24 horas da adição das amostras, o número de larvas mortas foi registrado. Foram consideradas mortas as larvas que não se movimentavam e que

não reagem ao serem estimuladas. Se mais de 10% das larvas se transformassem em pupa durante as primeiras 24 horas, o experimento seria descartado e repetido. Se a mortalidade do controle negativo estivesse entre 5% e 20%, a mortalidade dos grupos tratados seria corrigida segundo a fórmula de Abbott:

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

em que X é a porcentagem de sobreviventes no controle e Y é a porcentagem de sobreviventes tratados.

4.4.2.1 Determinação de CL₅₀ em larvas de *Ae. aegypti*

Com o objetivo de avaliar a concentração necessária de substância isolada para causar a mortalidade da metade dos indivíduos expostos (CL₅₀), foi realizado ensaio protocolado pelo Laboratório de Farmacognosia (FS/UnB), baseado naquele definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (132).

Os testes foram realizados em recipientes descartáveis transparentes contendo 120 mL de água, de forma a obter uma coluna de água de no mínimo 5 cm. Cinco concentrações-teste foram definidas a partir da concentração testada previamente (25 µg/mL), com o objetivo de obter uma curva dose-resposta. As concentrações foram escolhidas de forma que a mais alta das concentrações tenha atividade larvicida de pelo menos 95% e a mais baixa, atividade de até 10%, as outras concentrações devem variar de maneira decrescente dentro deste intervalo. Todas as concentrações foram testadas em quadruplicata, com 25 larvas em cada recipiente. O cálculo da CL₅₀ foi realizado por aplicação de *script* de probit para análise de ensaios biológicos no software R (133).

4.4.3 Avaliação da atividade pupicida

Screening para atividade pupicida também foi avaliada em placas de 12 poços. Para isso, 5 pupas foram adicionadas em cada poço; em seguida, o excesso de água foi removido e 2,950 mL de água da torneira foram adicionados em cada poço. Alíquotas de 0,050 mL de solução estoque contendo as amostras dissolvidas em DMSO foram adicionadas a cada poço. Pupas recém-transformadas foram selecionadas para realização do teste, com o objetivo de deixá-las expostas a amostra pela maior quantidade de tempo possível antes que emergissem para a fase adulta. Todas as amostras foram testadas em quadruplicata. O número de pupas mortas foi registrado a cada 24 horas até que todos os indivíduos do controle se transformassem em mosquitos. As concentrações-teste foram as mesmas definidas para o teste larvicida (extratos, 250 µg/mL; pré-frações, 125 µg/mL; frações, 100 µg/mL; e substâncias, 25 µg/mL).

4.4.4 Avaliação da atividade adulticida

A metodologia utilizada para avaliação da atividade adulticida foi baseada na Diretriz para Avaliar a Resistência a Inseticida em Vetores Usando o Bioensaio com Garrafa dos Centros para o Controle e Prevenção de Doenças (CDC, *Centers for Disease Control and Prevention*). A partir deste protocolo, é possível determinar o tempo e a dose diagnóstica, sendo a dose diagnóstica definida como a dose de inseticida que mata 100% dos mosquitos suscetíveis dentro de um tempo específico, o tempo diagnóstico (134).

Para realização deste teste, mosquitos fêmeas foram alimentados apenas com solução açucarada a 10% até o momento do teste. Foram usadas fêmeas de 5 a 8 dias de idade. Amostras foram testadas a 50 µg/garrafa. Para isso, soluções de 50 µg/mL em acetona foram preparadas. Desta solução, uma alíquota de 1 mL foi

aplicada no interior das garrafas. Para que a amostra testada fosse homoganeamente impregnada por toda a superfície interior da garrafa, as garrafas foram rotacionadas até que os sinais visíveis do solvente tenham desaparecido. O papel alumínio utilizado para tampar as garrafas também foi impregnado com a amostra a ser testada. As garrafas foram posicionadas dentro da capela com fluxo acionado para assegurar secagem completa do solvente. Cada amostra foi testada em quadruplicata. Malation a 50 µg/garrafa, capaz de matar todos os mosquitos em 30 minutos, foi usado como controle positivo. Acetona foi usada como controle negativo.

As fêmeas de mosquito foram retiradas de gaiola contendo apenas fêmeas com auxílio de aparato de sucção e transferidas para o interior das garrafas, de forma a obter 10 a 25 fêmeas por garrafa. Após fechar as garrafas com papel alumínio, um pedaço de tela mosquiteira foi fixado por cima de cada garrafa. Em seguida, foram feitos pequenos furos no papel alumínio para permitir circulação de ar.

Após o fechamento das garrafas, o número de mosquitos vivos dentro de cada garrafa foi registrado (número de mosquitos vivos em $t = 0$). O número de mosquitos vivos e mortos foram registrados a cada 15 minutos nas duas primeiras horas. O registro foi feito novamente após 4, 6 e 24 horas. Mortalidade de até 10% no controle negativo foi considerada aceitável. Em caso de mortalidade entre 3 e 10%, os resultados foram corrigidos utilizando a fórmula de Abbott. Mortalidade de até 3% pode ser ignorada.

4.4.5 Avaliação da atividade repelente espacial

Repelência espacial se refere à capacidade de uma substância química presente no ar alterar o comportamento dos mosquitos fêmeas, de forma a reduzir o contato entre humano e vetor, conferindo uma forma de proteção pessoal contra o vetor *Ae. aegypti*. Um dos comportamentos que pode ser estudado é o movimento para longe de um estímulo químico. Com o objetivo de avaliar a capacidade de uma amostra de gerar este comportamento, foram realizados testes baseados em

protocolo preconizado pela OMS (135). Para isso, foi construído aparato de vidro constituído de cilindro central transparente conectado a dois cilindros-teste de vidro vazados (um para o controle e um para o tratamento), como mostrado na Figura 11. Para separar o cilindro central dos cilindros-teste, foram usadas válvulas borboleta. A porção mais externa dos cilindros-teste foi pintada com tinta preta para evitar a passagem de luz. A extremidade lateral de cada um dos cilindros-teste foi mantida translúcida para permitir entrada de luz. Um pedaço de feltro foi utilizado para cobrir toda a extensão do aparato, permitindo que a luz entre apenas pelas extremidades.

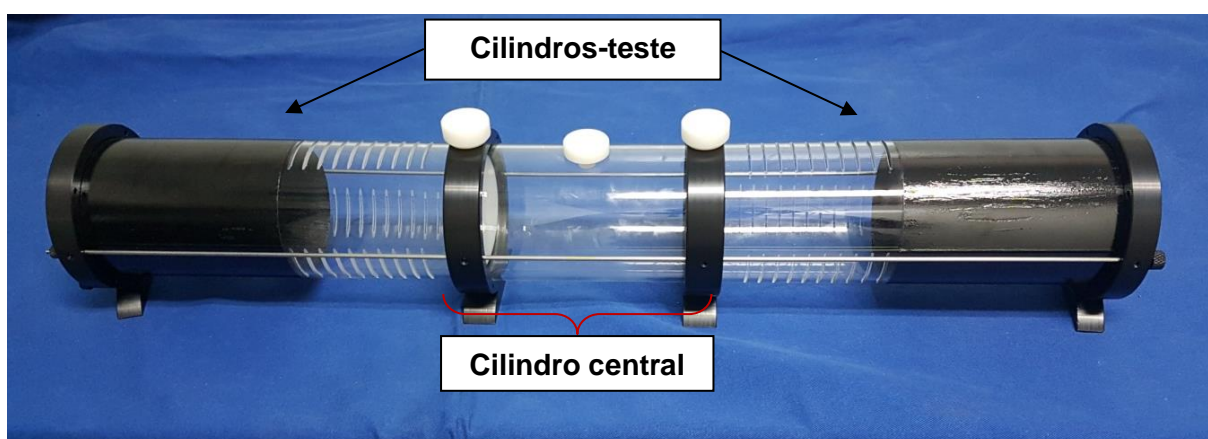


Figura 11. Aparato utilizado para avaliação da atividade de repelente espacial.

Para terem atividade de repelência espacial testada, amostras foram dissolvidas em acetona de forma a obter concentração final de 250 nmol/cm^2 . Alíquotas de 1,5 mL foram retiradas desta solução e aplicadas de forma uniforme sobre pedaços de papel-filtro de $11 \times 25 \text{ cm}$ (275 cm^2). Como controle, 1,5 mL de acetona foram aplicados em papel filtro de mesma proporção. Os pedaços de papel-filtro foram deixados secando por 30 min, para garantir completa evaporação do solvente. Para controle positivo, foi usado DEET (N,N-dimetil-meta-toluamida) a 25 nmol/cm^2 .

Para realização do teste, papel-filtro com a amostra impregnada foi colocado em um dos cilindros-teste e papel-filtro controle foi posicionado na extremidade oposta. Com ambas as válvulas fechadas, 20 fêmeas foram inseridas no cilindro central usando dispositivo de sucção. Após tempo de aclimatação de 30 segundos, o

comportamento dos mosquitos foi observado. O número de mosquitos fisicamente danificados ou incapazes de voar foi registrado e descontado do tamanho da amostra. Em seguida, o feltro foi colocado sobre o aparato e as válvulas foram abertas simultaneamente. Após 10 minutos, as válvulas foram fechadas e o número de mosquitos em cada câmara foi contabilizado.

A seguir, os mosquitos foram retirados por meio de aspiração mecânica e os compartimentos foram desacoplados para permitir ventilação passiva por 3 min, eliminando, assim, resíduos de voláteis remanescentes nos cilindros. Este procedimento foi repetido entre as replicatas. Nove replicatas para uma mesma concentração foram realizadas para avaliar o potencial de repelência espacial. Antes de iniciar o teste de uma amostra, um papel-filtro controle foi posicionado dentro de cada extremidade (sob a porção vazada do vidro) para garantir que não haja preferência dos mosquitos por uma das extremidades do aparato.

Para avaliar a proporção de mosquitos repelidos, foi usada a seguinte fórmula:

$$SAI = \left[\frac{(Nc - Nt)}{Nc + Nt} \right] \times \left(\frac{Nm}{N} \right)$$

- SAI: *Spatial Actitivity Index*
- Nc: número de mosquitos na câmara controle
- Nt: número de mosquitos na câmara com tratamento
- Nm: número total de mosquitos nas duas câmaras
- N: número total de mosquitos na unidade teste
- SAI varia de -1 a 1:
 - 0: indica que não houve resposta
 - -1: indica que todos os mosquitos se moveram em direção à câmara com o tratamento, resultando em resposta atrativa
 - 1: indica que todos os mosquitos se moveram em direção à câmara controle, resultando em resposta repelente espacial
 - Se Nc ou Nt = 0, o teste é válido, mas SAI = 0.
 - O SAI é calculado para cada replicata e o índice médio é analisado estatisticamente.

4.5 MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO

4.5.1 Preparação analítica de bilobol

Solução estoque contendo bilobol (isolado por meio do procedimento descrito no item 4.3.2.) a 250 mg/L em DMSO foi analiticamente preparada em balão volumétrico. Para análise envolvendo bilobol padrão, a solução estoque foi dissolvida 10 vezes usando acetonitrila. Para experimentos gerais, 1 mL desta solução estoque foi adicionado em 9 mL de água proveniente do sistema aquático no qual os peixes-zebra foram criados, aqui chamada de água de cultivo. Ao fim de cada experimento envolvendo amostras em água de cultivo, 1 mL das soluções em água de cultivo foram solubilizadas em 1 mL de acetonitrila, para promover detecção cromatográfica adequada. Todas estas amostras foram filtradas utilizando filtros de PRFE 0,22 µg x 13 mm e transferidas para frascos apropriados para injeção automática.

4.5.2 Condições de UPLC-PDA-MS/MS

UPLC-PDA-MS/MS consistido de sistema de bombeamento de solvente binário Bruker HPG 1300, injetor automático e forno para coluna, juntamente com os *softwares* CompassHyStar e OtofControl, foram utilizados para realizar os experimentos analíticos. Os perfis cromatográficos das amostras de bilobol foram adquiridos usando coluna de fase reversa Intensity solo 2.0 C₁₈ (100 x 2.1 mm, 2.0 µm), protegida por pré-coluna. A fase móvel consistiu de sistema isocrático composto de 13% água ultrapura (A) e 87% acetonitrila (B); A e B contendo 0,1% ácido trifluoroacético (TFA). Durante todo o tempo de corrida (8 minutos por corrida), fluxo foi mantido a 0,5 mL/min e temperatura, a 40 °C. Alíquotas de 2 µL de cada amostra

foram injetadas no sistema de UPLC e os cromatogramas foram registrados a 210 nm. Detecção de PDA foi utilizada nas análises qualitativas e quantitativas, enquanto análises de MS e perfil de UV foram usadas para análises qualitativas. Os solventes grau HPLC ou MS utilizados nestas análises foram fornecidos pela empresa Merck e a água ultrapura foi obtida por meio de sistema de purificação de água Direct-Q®.

4.5.3 Parâmetros analíticos para validação

A validação do método de quantificação de bilobol em água foi realizada em conformidade com protocolos estabelecidos por agências regulatórias (136,137). Todos os dados foram baseados nos valores de média \pm desvio padrão (DP) e as variações foram expressas em valores de desvio padrão relativo (DPR). Para validação, os seguintes parâmetros analíticos foram avaliados: seletividade, estabilidade, linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), precisão, exatidão e efeito matriz normalizado.

A seletividade foi avaliada a partir dos valores obtidos para: tempo de retenção, área do pico e fator cauda. Perfis cromatográficos, assim como espectros de UV e massas, de soluções de bilobol em acetonitrila foram comparadas com aqueles obtidos para as amostras experimentais, as quais foram preparadas com água de cultivo.

Estabilidade do bilobol foi avaliada baseada na comparação entre concentração teórica e concentração experimental, expressada como recuperação (%), utilizando soluções de bilobol 1:1 água de cultivo:acetonitrila a 25,73 mg/L logo após a preparação da amostra e após 24, 48, 72 e 96 horas. Durante estes períodos, estas soluções foram submetidas a congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ *overnight* e mantidas em temperatura ambiente durante o dia (por volta de $22\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Para a linearidade, a curva de calibração foi preparada em triplicada, avaliando sete concentrações: 0,77; 1,54; 3,08; 6,17; 12,34; 24,68 e 49,36 mg/L. Este parâmetro foi analisado por cálculo de regressão por método de mínimos quadrados e

expressado por coeficiente de correlação linear r^2 . Concentrações de bilobol nas amostras foram calculadas baseando-se na área do pico. A faixa linear dinâmica foi definida a partir da razão entre área e respectiva concentração, plotada em relação ao log da concentração, considerando erro de 6%. Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados a partir da inclinação da curva de calibração (a) e do desvio padrão da interseção da reta (S_b).

A precisão foi estimada pela avaliação da repetibilidade e precisão intermediária. Para isso, soluções de bilobol a 25 mg/L em água de cultivo foram utilizadas. A repetibilidade foi determinada por análises de 6 réplicas da concentração-teste individualmente preparadas. Três repetições foram executadas para cada réplica, sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica. Precisão intermediária foi obtida a partir da análise de mesma amostra, no mesmo laboratório, em 3 dias diferentes, realizada por operadores distintos, considerando a mesma concentração e o mesmo número de determinações descritas na avaliação da repetibilidade.

Exatidão e recuperação de bilobol foram determinadas considerando os resultados obtidos por cinco experimentos analisados três vezes cada. Soluções de concentrações teóricas a 5,12 mg/L (baixa), 12,28 mg/L (média) e 25,73 (alta) mg/L foram preparadas de acordo com procedimento de preparação analítica de bilobol, descrito no item 4.5.1. Em seguida, estas amostras foram analisadas em UPLC-PDA para quantificação real de bilobol em cada experimento.

Fator de matriz normalizado (FMN) foi adquirido considerando razão das áreas do pico de bilobol na presença da matriz pelas áreas na ausência de matriz, no qual, $FMN = \text{analito na presença de matriz} / \text{analito na ausência da matriz}$. Parâmetros de recuperação e DPR foram calculados para todos os valores de FMN.

4.5.4 Planejamento para avaliação da degradação de bilobol

O método analítico descrito anteriormente foi aplicado para determinação da taxa de degradação de bilobol em $t = 0$ h e após 24, 48, 72 e 96 horas. Para cada período, foram analisadas três diferentes concentrações: baixa = 4,36 mg/L; média = 12,2 mg/L e alta = 23,86 mg/L, por meio de experimentos executados em triplicata. Estas concentrações foram atingidas por meio da dissolução de solução padrão de bilobol (em DMSO), em água de cultivo. As características físico-químicas da água foram rigorosamente controladas: 27 ± 1 °C, 720 ± 50 μ S/cm (condutividade), pH 7,0 \pm 0.5 e saturação de oxigênio dissolvido $\geq 95\%$.

Todas as soluções-teste de bilobol preparadas em água de cultivo foram distribuídas em placas de 96 poços, que foram mantidas em câmara climática apropriada (SL-24 Solab Científica) a 27 °C. A cada 24 horas, uma alíquota de 1 mL de cada concentração foi dissolvida em 1 mL de acetonitrila, filtrada e transferida para frasco apropriado para avaliação no método analítico.

Este procedimento também foi realizado em garrafas de vidro hermeticamente fechadas contendo 50 mL das soluções-teste de bilobol em água de cultivo nas mesmas concentrações anteriormente citadas. Inicialmente, ambos desenhos experimentais, usando placas e garrafas, envolveram apenas bilobol e água de cultivo, sem presença de embriões de peixe-zebra. Posteriormente, o procedimento foi repetido de acordo com protocolo de teste de embriotoxicidade em peixe (FET), em placas de 96 poços para determinar a influência da degradação na toxicidade aguda, coletando alíquotas das soluções teste na presença dos organismos vivos para avaliar a influência destes organismos no perfil de degradação.

4.6 TESTES TOXICOLÓGICOS

4.6.1 Criação de organismos-teste (*zebrafish*)

Os peixes-zebra (*zebrafish*) foram mantidos em aquários contendo água filtrada por osmose reversa e carvão ativado. Os peixes foram criados em sistema aquático (ZebTec - Tecniplast, Itália) localizado em sala climatizada do Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília (UnB), como fotoperíodo de 12:12 h (claro:escuro). Neste sistema, os parâmetros físico-químicos da água foram estritamente controlados: $27,0 \pm 1$ °C, condutividade a 720 ± 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$, pH $7,0 \pm 0,5$ e saturação de oxigênio dissolvido $\geq 95\%$. Estas condições foram mantidas para os organismos utilizados em todos os testes de toxicidade.

Ovos de peixe-zebra foram coletados imediatamente após acasalamento natural, lavados em água e analisados sob estereomicroscópio (Stereoscopic Zoom Microscope – Stemi 2000, Zeiss, Alemanha). Ovos não fertilizados, mostrando sinais de clivagem irregular ou outros sinais de danos foram descartados (Figura 12).

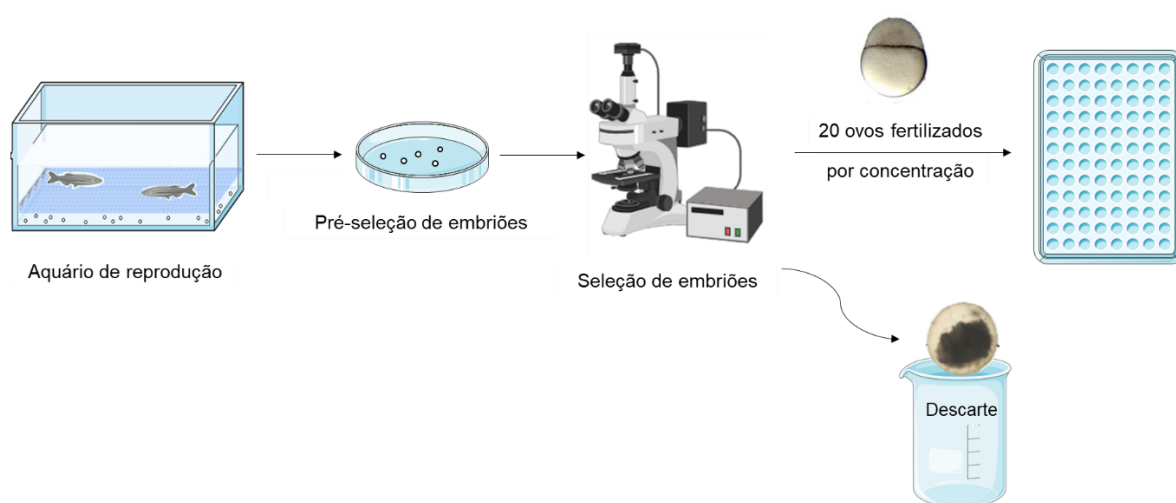


Figura 12. Esquema dos testes de toxicidade com embriões de peixe-zebra. Da esquerda para a direita: 1) os ovos são recolhidos do aquário de reprodução; 2)

triagem a olho nu dos ovos fertilizados; 3) seleção no estereomicroscópio dos ovos fertilizados com desenvolvimento normal e descarte dos ovos não fertilizados, os que apresentam danos, irregularidades na clivagem, ou injúrias no córion; 4) os ovos (1 ovo por poço) são distribuídos em placas de 96 poços. Adaptado de Lammer et al., 2009 (138).

4.6.2 Avaliação de toxicidade aguda em embriões de *zebrafish*

Os testes de embriotoxicidade foram baseados no protocolo n° 236 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (*Organization for Economic Co-operation and Development - OECD*), "*Fish Embryo Toxicity (FET) test*" (139). Os testes foram realizados em placas de 96 poços, onde cada poço continha 1 embrião e 200 µL da solução teste, seguindo desenho experimental mostrado na Figura 13. No total, foram utilizados 60 ovos por tratamento, divididos em três replicatas (20 ovos/tratamento/replicata). Em cada placa, 10 poços contendo apenas água de cultivo e embrião foram designados como controle interno da placa, conforme requerido pelo protocolo da OECD. Controle com solvente foi executado preenchendo 20 poços com solução com DMSO a 1%, a maior concentração de DMSO utilizada nas soluções-teste. As microplacas foram mantidas em câmara climática (SL-24 Solab Científica, Brasil) com condições idênticas a sala de cultivo. Os testes foram iniciados imediatamente após a fertilização e tiveram duração total de 96 h cada.

Embriões de *zebrafish* foram expostos a seis concentrações diferentes de soluções-teste (2,0; 3,6; 6,6; 12,1; 22; 40 mg/L). Estas concentrações foram definidas baseando-se, inicialmente, no valor de CL₅₀ obtido no teste em larvas de *Ae. aegypti*. Um teste FET piloto foi realizado para verificar a adequabilidade das concentrações escolhidas e, a partir destes resultados foram definidas as concentrações máxima e mínima. Em seguida, função logarítmica foi aplicada às concentrações máxima e mínima, e, com base nos valores de log, foi estabelecido o fator de diluição (*range*), que foi aplicado para determinação das concentrações intermediárias.

As soluções-teste foram preparadas com a água de cultivo de peixe-zebra (características físicas e químicas previamente descritas). Para isso, uma solução de trabalho em água de cultivo a 100 mg/mL foi preparada a partir de solução estoque a 10 mg/mL em DMSO.

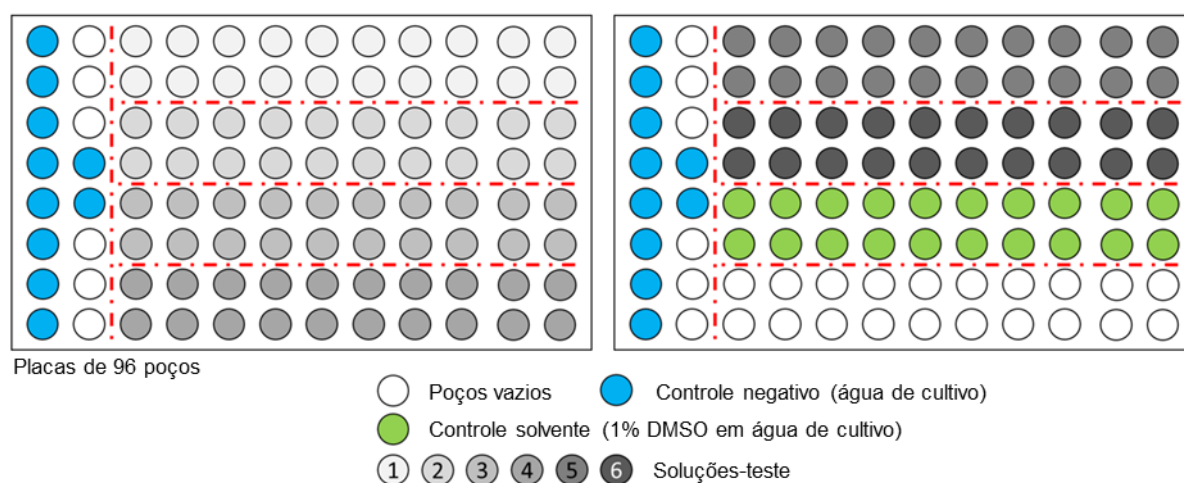


Figura 13. Design experimental dos testes de embriotoxicidade aguda utilizando o peixe-zebra como organismo modelo.

Para avaliar a toxicidade de diferentes estágios do processo de degradação do bilobol, 3 ensaios foram propostos: **(i)** a 0 horas de degradação ($t = 0$ horas de degradação - hod), onde embriões foram adicionados aos poços imediatamente após as soluções de bilobol em água de cultivo serem transferidas para placas de 96 poços; **(ii)** após degradação por 24 h ($t = 24$ hod), onde os embriões só foram adicionados 24 h após soluções de bilobol terem sido transferidas para as placas; **(iii)** após degradação por 96 h ($t = 96$ hod), onde embriões foram adicionados às placas após soluções de bilobol terem degradado por 96 h. Esquematização do desenho experimental aplicado para avaliar perfil de degradação e toxicidade aguda de bilobol e seus compostos de degradação está representada na Figura 14.

Mortalidade e alterações morfológicas foram observadas e registradas a cada 24 h (24, 48, 72 e 96 horas pós-fertilização - hpf). Foram avaliadas alterações em parâmetros de desenvolvimento embrionário como: formação do otólito, pigmentação de corpo e olhos, formação dos somitos, presença de batimento cardíaco, separação

da cauda do saco vitelino, edema, acúmulo de hemácias, líquido amniótico, absorção do saco vitelino, eclosão, dentre outros. Parâmetros complementares foram adicionalmente avaliados após a eclosão: inflação da bexiga natatória, malformações da cauda e equilíbrio (definido como o embrião deitado lateralmente no fundo do poço da microplaca). Os parâmetros de desenvolvimento foram avaliados em estereomicroscópio (Stereoscopic Zoom Microscope – Stemi 2000, Zeiss, Alemanha) usando amplificação de $\times 70$ para ovos e $\times 40$ para larvas.

O cálculo da CL_{50} foi realizado a partir dos dados obtidos 96 hpf por aplicação de *script* de probit para análise de ensaios biológicos no software R (133). Gráfico integrado de mortalidade foi traçado utilizando o software SigmaPlot 12.5. Os ensaios de toxicidade foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, sob número de protocolo n.100226/2014.

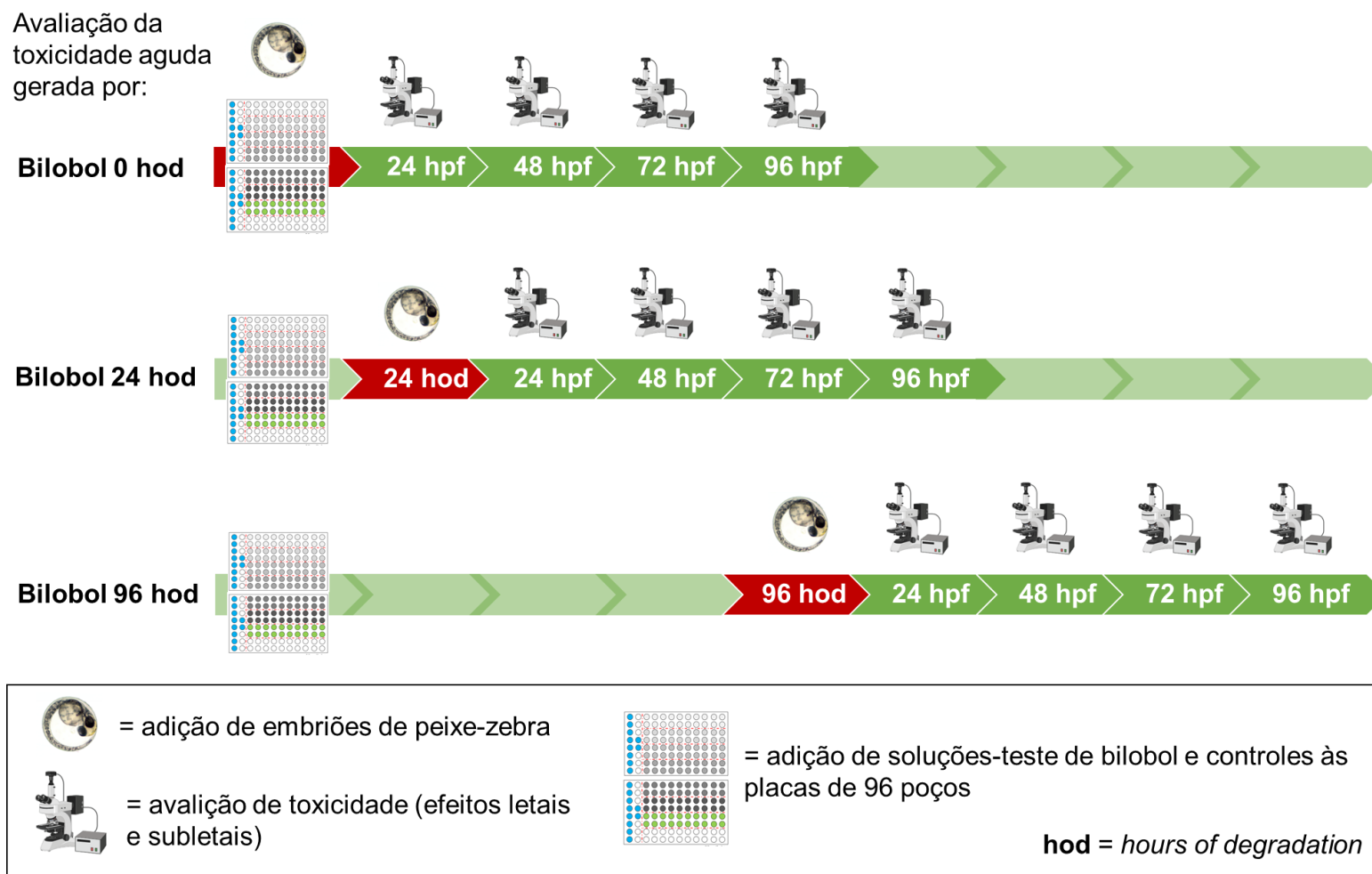


Figura 14. Desenho experimental utilizado para avaliação do perfil de degradação de bilobol em placas de 96 poços e avaliação da embriotoxicidade aguda de bilobol e seus compostos de degradação. Alíquotas para quantificação foram coletadas em $t = 0$, 24 e 96 hod, destacados em vermelho.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ATIVIDADE DE EXTRATO DE *S. terebinthifolia* EM *Ae. aegypti*

Um total de 14 extratos da espécie *S. terebinthifolia* (descritos na Tabela 2) foi testado à concentração de 250 µg/mL em larvas e pupas de *Ae. aegypti*. Destes, três extratos mostraram atividade acima de 80% (Arbo0031, Arbo0035 e Arbo0036) (Figura 15). Tais extratos foram obtidos por meio de extração com solventes apolares: extrato hexânico da casca da raiz (Arbo0031); extrato hexânico da folha (Arbo0036); e extrato diclorometânico da folha (Arbo0035), indicando que a lipofilicidade é relevante para atividade larvicida.

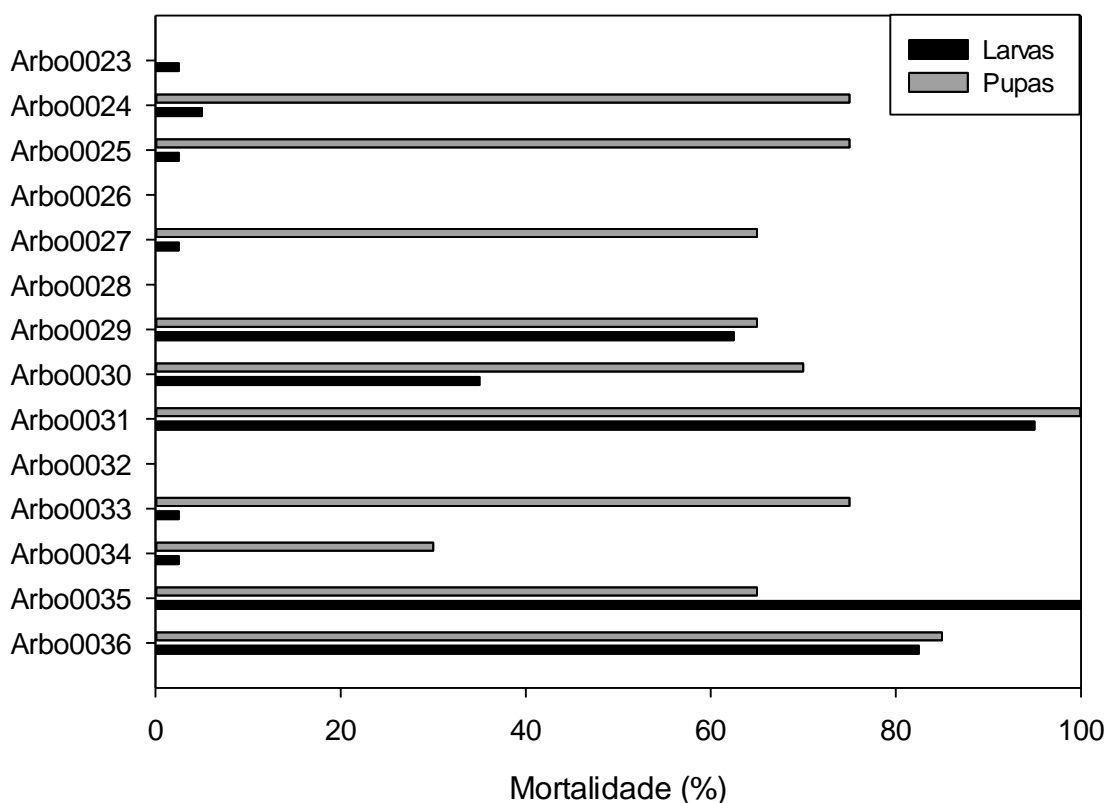


Figura 15. Mortalidade (%) em larvas e pupas de *Ae. aegypti* gerada após 24 h de exposição por extratos de *Schinus terebinthifolia* testados a 250 µg/mL.

O papel da lipofilicidade para modulação de atividade em larvas de *Ae. aegypti* já foi relatada previamente na literatura, tendo sido relacionada com mecanismo de inibição enzimática causada por compostos lipofílicos (140,141). Os resultados do *screening* também estão em concordância com atividade larvicida previamente relatada para extratos de folhas de *S. terebinthifolia* (23,24).

Em pupas de *Ae. aegypti*, apenas dois extratos geraram mortalidade superior a 80% (Arbo0031 e Arbo0036), sendo que também apresentaram atividade larvicida (Figura 15). Atividade em pupas de *Ae. aegypti* foi previamente reportada para frações de óleo essencial de frutos e folhas de *S. terebinthifolia* (142). Atividade pupicida de extratos de folha também foi reportada para pupas de *Plutella xylostella*, uma importante praga agropecuária (143). Porém, até o momento, há escassez de relatos de atividade pupicida em *Ae. aegypti* de extratos brutos de *S. terebinthifolia*.

5.2 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO METABÓLICA

Para investigação do perfil de metabólitos, os três extratos ativos em larvas (Arbo0031, Arbo0035 e Arbo0036), juntamente com três extratos inativos (Arbo0026, Arbo0028 e Arbo0032) foram pré-fracionados utilizando técnica de Extração em Fase Sólida, conforme procedimento descrito no item 4.3.1. As pré-frações resultantes foram testadas em larvas para confirmação da atividade. Com o objetivo de avaliar a diferença entre a composição metabólica de amostras ativas e inativas, estas pré-frações foram submetidas a análise em UPLC-PDA-MS/MS para aquisição dos dados necessários.

Após pré-processamento dos dados e aplicação de análises quimiométricas disponíveis na plataforma online MetaboAnalyst®, foi possível observar clara diferenciação entre o perfil de metabólitos presentes em amostras ativas e inativas. Uma das análises que permite observar claramente esta diferenciação é a representação gráfica denominada *heatmap* (Figura 16).

O *heatmap* permite melhor visualização da grande quantidade de dados adquiridos, mostrando a abundância relativa dos íons detectados em cada amostra por meio de uma escala de intensidade de cor. Graças à análise de agrupamentos (*clustering*), os íons detectados e as amostras são agrupados por similaridade, facilitando a visualização e interpretação dos dados (144).

O *heatmap* mostrado na Figura 16 exibe a lista dos 50 íons considerados mais importantes para diferenciação entre amostras ativas e inativas. Este gráfico indica que existe uma marcante diferença entre o perfil de metabólitos dos dois grupos, já que foi possível observar blocos bem definidos de metabólitos mais presentes em amostras ativas e menos presentes em amostras inativas, sendo o contrário também verdadeiro.

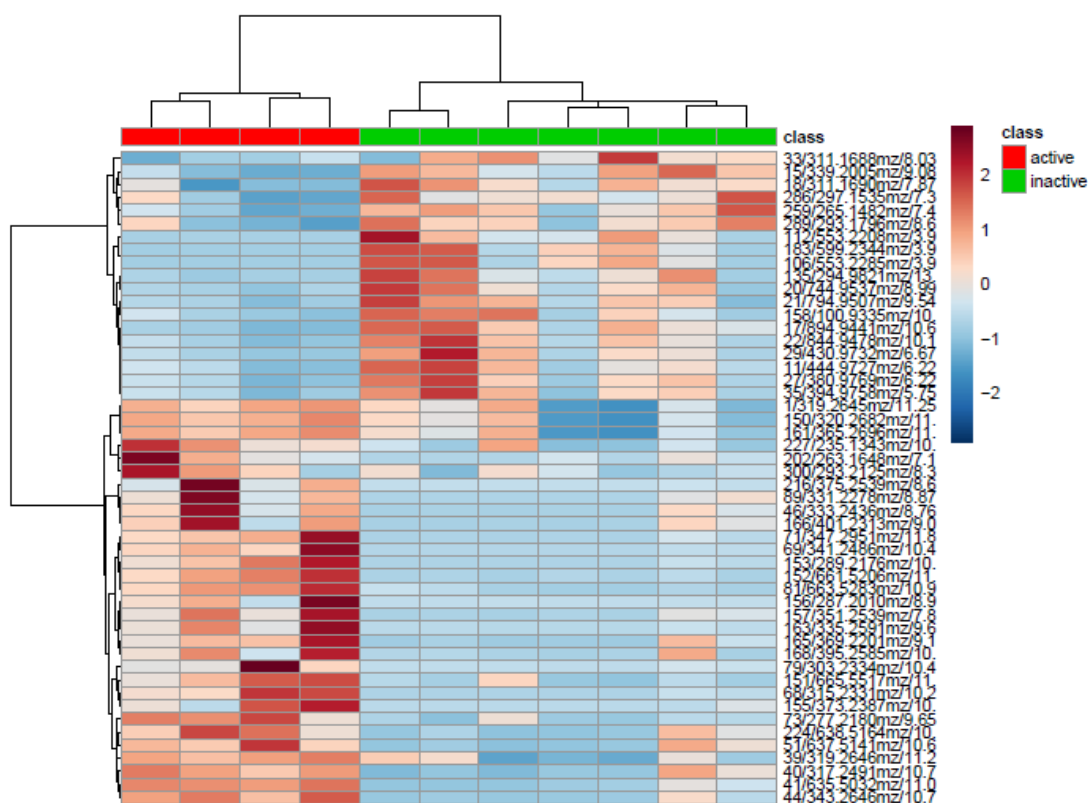


Figura 16. Análise de agrupamentos (*clustering*) apresentado no formato de *heatmap* obtido por meio do software online MetaboAnalyst® mostrando 50 íons mais importantes para diferenciação entre amostras ativas e inativas. O agrupamento hierárquico foi aplicado tanto para os sinais detectados quanto para as amostras. Similaridade foi calculada por distância euclidiana e algoritmo de aglomeração foi

baseado no método de Ward. A escala de cor (à direita) mostra a abundância relativa de cada um dos sinais detectados nas respectivas amostras.

Esta diferença também é evidenciada pelo gráfico de PLS-DA (*Partial Least Squares - Discriminant Analysis*) (Figura 17), um modelo quimiométrico comumente utilizado para análise de produtos naturais para prever Y (bioatividade) a partir de X (sinais detectados, que correspondem a diferentes metabólitos) (145). Este modelo foi capaz de separar amostras ativas e inativas em dois grupos bem definidos, baseando-se em sua composição metabólica.

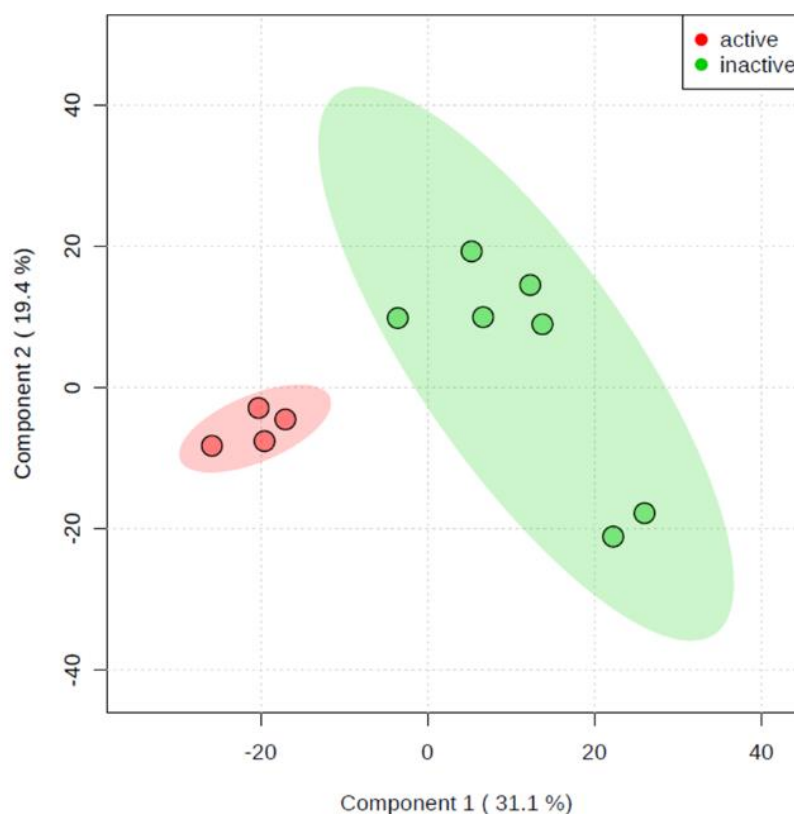


Figura 17. Gráfico *PLS-DA scores plot* para as duas principais componentes (PCs). As variâncias explicadas estão inseridas entre parênteses. As áreas sombreadas indicam intervalo de confiança de 95%.

A análise de PLS-DA também fornece uma representação gráfica dos sinais detectados (*features*) com maior relevância para a projeção das amostras no gráfico

de scores, e, portanto, para a separação entre amostras ativas e inativas, o gráfico de *VIP scores* (*Variable Importance in Projection - VIP*) (Figura 18). No topo da lista fornecida pelo *VIP scores* está o íon m/z 317,2491 [M-H]⁻, constando como mais abundante em amostras ativas. Portanto, o gráfico de *VIP scores* indica que o íon m/z 317,2491 [M-H]⁻ foi o mais relevante para plotagem das amostras ativas separadamente das inativas. Este mesmo íon consta no *heatmap* como um dos íons importantes para a diferenciação dos grupos e possui abundância relativa elevada em todas as amostras ativas.

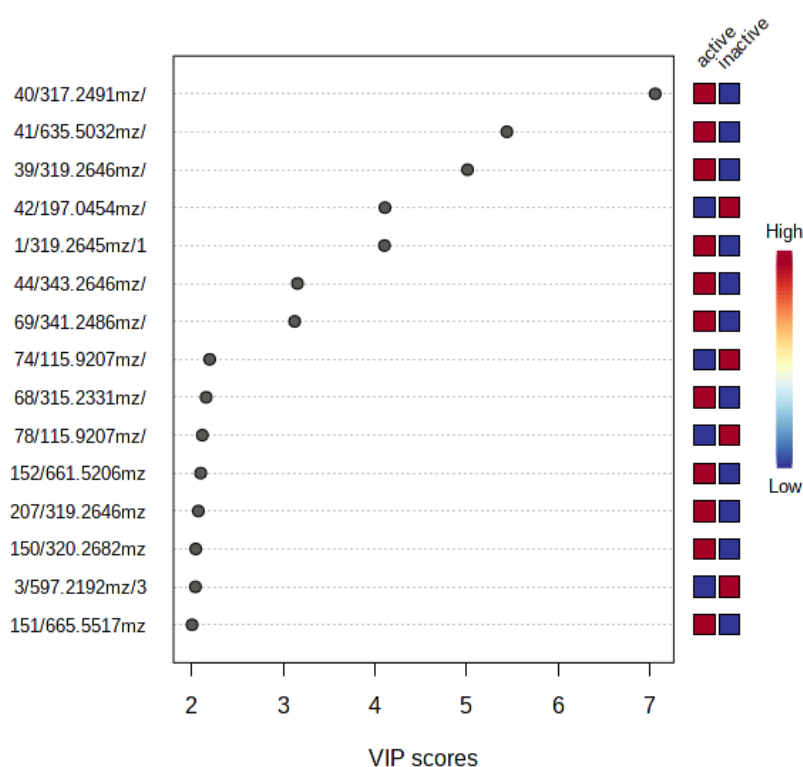


Figura 18. Gráfico mostrando os metabólitos mais importantes classificados por PLS-DA *VIP scores*. Os quadrados coloridos à direita indicam as concentrações relativas do metabólito correspondente em cada um dos grupos sob estudo.

Ao realizar a análise de componentes principais (PCA – *Principal Component Analysis*), a diferença entre os grupos não foi tão evidenciada (Figura 19), porém, as amostras ativas foram plotadas com grande proximidade entre si, ao contrário das amostras inativas, que ficaram espalhadas pelo gráfico, demonstrando alta similaridade entre o perfil metabólico das amostras ativas.

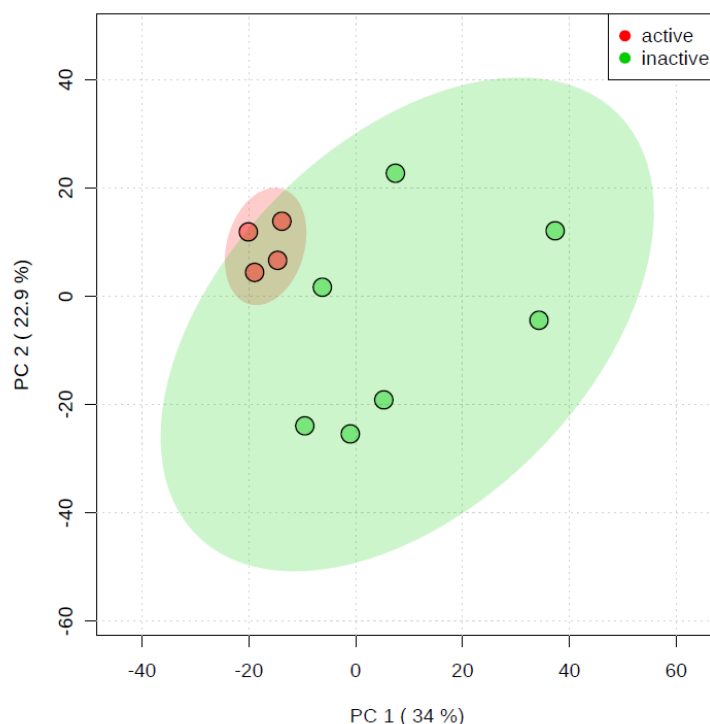


Figura 19. Análise de componente principal (PCA) *scores plot*. As variâncias explicadas estão inseridas entre parênteses. As áreas sombreadas indicam intervalo de confiança de 95%.

A diferença na capacidade de PLS-DA e PCA em separar as amostras em grupos é explicada pelo fato de que PCA é uma análise não supervisionada, ou seja, que não leva em consideração a informação de Y, permitindo exploração não-tendenciosa dos dados. O PLS-DA, por outro lado, é uma análise supervisionada, onde os rótulos definidos em Y (amostras ativas ou inativas) são utilizados para maximizar a separação entre os diferentes grupos e aumentar a homogeneidade entre amostras de um mesmo grupo. Por isso, na análise de PLS-DA, a diferenciação entre os grupos fica mais evidente, quando em comparação ao PCA (144). Embora haja diferenças na composição das amostras, ainda há muita similaridade, já que são amostras provenientes de uma mesma planta, e isto se reflete na análise de PCA, dificultando a separação dos grupos.

Por outro lado, a análise de agrupamentos usada no *heatmap* também é não supervisionada (144) e mesmo assim foi capaz de identificar clara diferenciação entre a composição metabólica de amostras ativas e inativas. O fato de esta diferença não

estar tão clara na análise de PCA pode estar relacionada aos métodos matemáticos aplicados em cada análise.

Dentro da análise de PCA, destacam-se também as informações fornecidas por: *loading plot* (Figura 20) e *PCA biplot* (Figura 21). Ao analisar perfis metabólicos, a composição química de cada amostra influencia as componentes principais (PCs), possibilitando separação destas amostras em um espaço multidimensional, ilustrado no gráfico de *scores* (Figura 19), sendo a razão química dessa separação evidenciada no gráfico de *loadings* (114). Sendo assim, o *loadings plot* mostra a proporção com que os sinais detectados influenciam as componentes principais, PC1 e PC2. Neste gráfico, é possível observar que o íon m/z 317,2491 [M-H]⁻ está plotado em porções extremas de ambos os eixos, indicando que este íon teve grande influência nas PC1 e PC2, que explicam juntas mais de 50% da variação na composição de metabólitos nas pré-frações estudadas. Portanto, este íon tem grande influência na diferenciação entre amostras ativas e inativas, sendo o íon mais relevante para a plotagem das ativas no espaço.

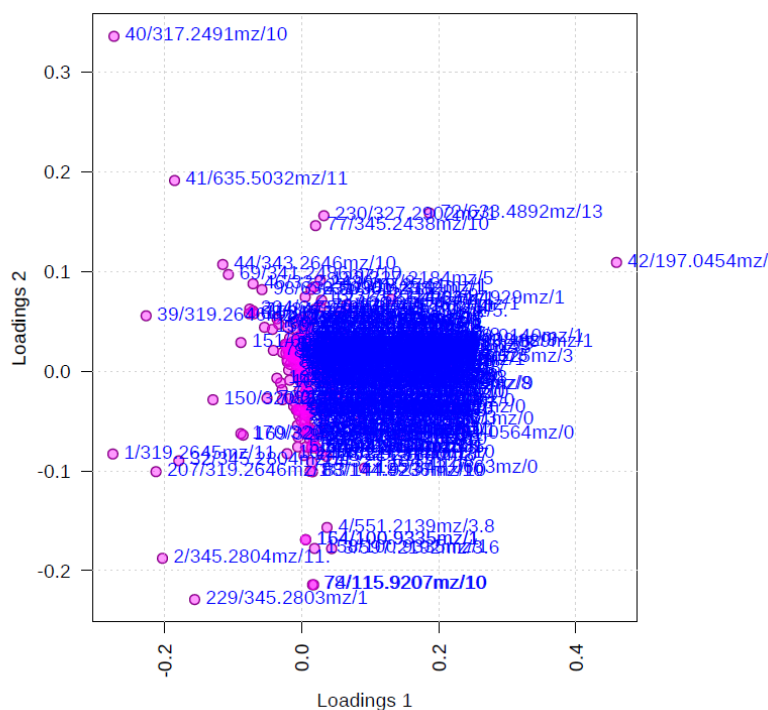


Figura 20. PCA *loading plot* das duas primeiras componentes (PCs). Os círculos preenchidos de rosa indicam os sinais detectados. Os sinais que mais influenciam a plotagem do gráfico de *scores* são aqueles localizados nas extremidades dos eixos.

Na representação gráfica de PCA *biplot*, o gráfico de *scores* é combinado com o gráfico de *loadings*. Os *scores* representam as coordenadas das amostras após análise de componentes principais. Já o PCA *loading plot*, como mencionado anteriormente, descreve a maneira como as variáveis dos dados originais estão combinadas nas PCs, indicando quais possuem maior contribuição para a formação de determinada PC. Portanto, o PCA *biplot* ressalta como os dados originais influenciam na plotagem das amostras (114). O gráfico *biplot* mostrado na Figura 21 destaca como o íon m/z 317,2491 $[M-H]^-$ influencia na disposição das amostras ativas no gráfico de *scores*.

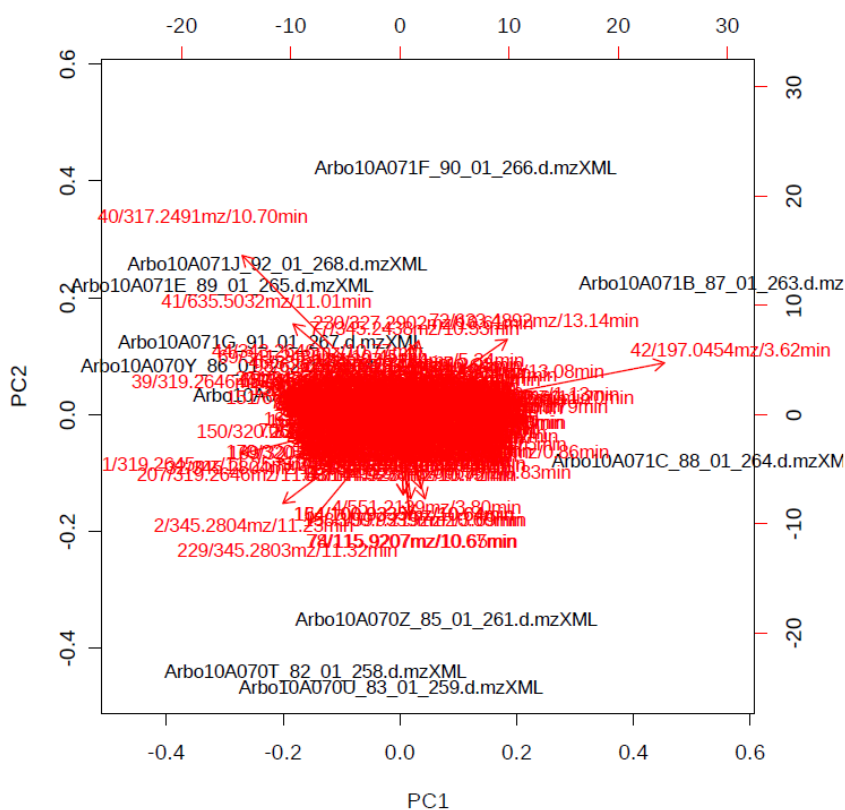


Figura 21. PCA *biplot*, resultante da combinação do gráfico de *scores* e do gráfico de *loading*. Eixo inferior: *score* de PC1; eixo esquerdo: *score* de PC2; eixo superior: *loadings* de PC1; eixo direito: *loadings* de PC2.

5.3 ISOLAMENTO E ATIVIDADE DE COMPONENTE DE *S. terebinthifolia*

Embora não seja o extrato que demonstrou maior atividade, o extrato Arbo0036 foi escolhido para prosseguir com investigação da atividade por ser um extrato de folha, um órgão renovável da planta; por ser obtido por meio de extração com um solvente não clorado, já que solventes clorados são prejudiciais ao meio ambiente; e possuir maior quantidade de extrato disponível. Adicionalmente, a pré-fração **B** de Arbo0036 apresentou 100% de atividade a 100 mg/L em 24 h, 80% de rendimento após pré-fracionamento, perfil cromatográfico não muito complexo após análise em UPLC e grande abundância relativa do íon m/z 317,2491 [M-H]⁻, indicado pelas análises quimiométricas como relevante para a atividade observada.

A pré-fração **B** foi submetida a fracionamento em coluna de Sephadex® LH-20, conforme método descrito no item 4.3.2. Após análise das frações resultantes em UPLC-MS, a fração Arbo10A036G se destacou por apresentar pureza cromatográfica de aproximadamente 95% e m/z 317,2485 [M-H]⁻. Esta amostra foi então analisada em RMN uni e bidimensional. A estrutura da substância presente nesta amostra foi então elucidada e identificada como sendo um alquilresorcinol chamado 5-[(Z)-pentadec-8'-enil]benzeno-1,3-diol, comercialmente conhecido como bilobol (Figura 22).

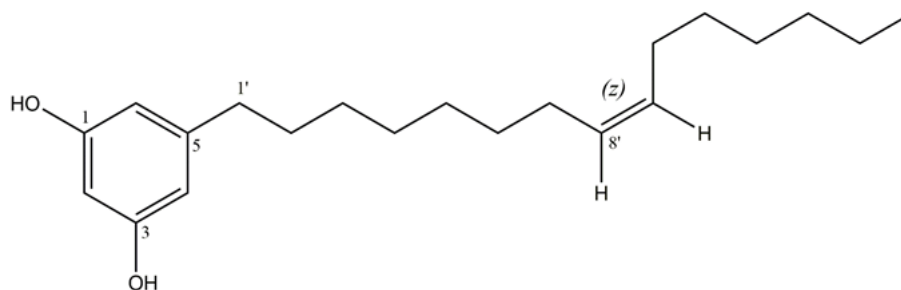


Figura 22. Estrutura do bilobol, componente ativo isolado de *Schinus terebinthifolia*.

Bilobol foi isolado pela primeira vez de *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae) (146) e já foi previamente isolado a partir de frutos e sementes de *S. terebinthifolia* (110). Bilobol faz parte do grupo dos lipídeos resorcinólicos do tipo cardol. Lipídeos resorcinólicos são vastamente utilizados no ramo de biotecnologia, além de serem de grande interesse para a indústria farmacêutica e biomédica, já que podem atuar como antimicrobianos, antitumorais, moluscidas e inibidores de prostaglandina sintase (147).

Após elucidação estrutural, bilobol foi testado em *Ae. aegypti* para verificar sua atividade. A CL₅₀ em larvas após 24 h foi de 7,67 mg/L (IC95% 7,31 – 8,05 mg/L). Em pupas, a atividade foi de 48% a 25 mg/L; devido à baixa atividade não foi executado experimento para avaliação da CL₅₀. Não foi observada atividade adulticida (50 µg/garrafa) ou repelente (250 nmol/cm²).

Atividade de alquilresorcinois provenientes de Líquido da Casca da Castanha de Caju (LCC) já foi relatada para larvas e pupas de *Ae. aegypti* (19,148). Para larvas, ácido anacárdico apresentou CL₅₀ 12,40 ppm; cardois CL₅₀ 5,55 ppm; e cardanois CL₅₀ 8,20 ppm (148). Para pupas, os valores de CL₅₀ foram mais altos, variando entre 90.8 e 400.4 mg/L (19). Apesar de fazer parte dos cardois, a atividade de bilobol em *Ae. aegypti* como substância isolada, até o momento, ainda não havia sido reportada.

Contudo, atividade de bilobol isolado de *Ginkgo biloba* já foi reportada para larvas de *Plutella xylostella*, com CL₅₀ 2,06 mg/mL (101), assim como para a forma adulta desta peste agrícola (149). Bilobol também teve atividade adulticida relatada em fêmeas de *Lipaphis erysimi* (149), inseto que impacta negativamente culturas vegetais; porém, no estudo aqui apresentado, não foi observada atividade adulticida em *Ae. aegypti*, a 50 µg/garrafa.

LCC, cardois e cardanois também já foram testados em relação a sua capacidade de repelir fêmeas de *Ae. aegypti* no contexto de uma formulação hidratante com ação repelente corporal. Nos ensaios realizados em ratos e em humanos, tanto o LCC quanto a fração de cardois geraram repelência maior que 90%, valor equivalente à porcentagem de repelência causada pelo repelente comercial DEET, usado como controle positivo (150). Por outro lado, os resultados de repelência apresentados no presente estudo, indicam que bilobol isoladamente não atua como repelente espacial, não tendo sido testado ainda como repelente corporal.

O LCC é um subproduto do agronegócio com baixo valor agregado derivado da casca da castanha do caju, obtido a partir do cajueiro *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae). A produção anual de caju no mundo ultrapassa 2,5 milhões de toneladas, sendo que as empresas brasileiras juntas produzem anualmente 70 mil toneladas de castanha de caju, gerando aproximadamente 45 mil toneladas de Líquido da Casca de Castanha do caju (LCC) por ano. Este LCC muitas vezes é descartado no processo de beneficiamento da castanha, gerando grande quantidade de resíduo não aproveitado. Portanto, a partir do LCC é possível obter alquilresorcinois, incluindo bilobol, em grandes quantidades com baixo custo utilizando alguns simples processos de extração (150).

Além de estar altamente disponível no resíduo proveniente do agronegócio do caju, bilobol também está presente em grande quantidade em *Schinus terebinthifolia*, como demonstrado no estudo aqui apresentado. *S. terebinthifolia* é uma espécie nativa do Brasil, mas que está espalhada ao redor do mundo, especialmente em regiões subtropicais, sendo muito utilizada para ornamentação. Além disso, *S. terebinthifolia* é considerada uma espécie invasora muito agressiva, devido ao seu rápido crescimento e capacidade de adaptação a diferentes ecossistemas (20). Sendo assim, esta é uma espécie que está disponível para fácil acesso em grandes quantidades.

Adicionalmente, os frutos de *S. terebinthifolia* são usados como condimento e tem alta demanda no mercado internacional. No Brasil, uma grande parte da produção destes frutos vem da exploração extrativista. Durante o processo de seleção e limpeza, caules e folhas são removidos, gerando grande quantidade de resíduo de produção (151,152). Portanto, bilobol também está abundantemente disponível no resíduo do agronegócio da pimenta rosa.

A alta disponibilidade de bilobol em resíduos industriais confere grande vantagem competitiva ao bilobol como candidato ao desenvolvimento de protótipo para um produto larvicida, já que este poderia ser obtido facilmente em grandes quantidades com vantajoso custo-benefício, além de ser uma forma de dar destino a toneladas de resíduo industrial, contribuindo no ponto de vista da sustentabilidade.

Em adição à esta vantagem, cardois e cardanois são apontados como boa alternativa para desenvolvimento de um larvicida ecologicamente sustentável

(19,153), já que se espera que estes sejam biodegradáveis (19). Entretanto, não há estudos específicos mostrando o perfil de biodegradação de bilobol ou a identidade e impacto de seus produtos de degradação.

Adicionalmente, estudos de avaliação de ecotoxicidade de frações de LCC em *Artemia salina* levantaram preocupação em relação a toxicidade destes alquilresorcinois em organismos não-alvo (148,154). Contudo, não existem ainda dados sobre a toxicidade gerada por bilobol isoladamente. Por este motivo, mais testes são necessários para avaliar sua ecotoxicidade (154).

Mais além, alquilresorcinois, incluindo bilobol, são apontados como responsáveis pela ação irritante de pimenta-rosa em algumas pessoas (110), e pela dermatite de contato causada por produtos derivados do cajueiro (148), embora alguns estudos de aplicação tópica de frações de LCC não tenham relatado sinais de irritação dérmica (150). Sendo assim, existe demanda de mais informações sobre a toxicidade de bilobol em organismos não-alvo.

5.3.1 Análises quimiométricas na busca do composto ativo bilobol

A atividade de bilobol em larvas de *Ae. aegypti* confirma a informação previamente obtida através das análises quimiométricas, que indicaram o íon m/z 317,2491 [M-H]⁻, correspondente ao bilobol, como principal diferenciador entre as amostras ativas e inativas, sendo o sinal detectado mais relevante para reunir amostras no grupo com atividade.

Obter substâncias de interesse utilizando metodologia clássica é, muitas vezes, um processo demorado e complexo, sendo necessária estrutura que permita a condução de procedimentos fitoquímicos para a extração, fracionamento (em pequena ou larga escala), isolamento, purificação e determinação estrutural dos componentes isolados (114).

Neste sentido, as análises quimiométricas são uma estratégia valiosa e eficiente que fornece informações importantes sobre o perfil metabólico das amostras de interesse, sem a necessidade de aplicação de uma sequência demorada de diferentes metodologias. Estas análises também podem acelerar o processo de isolamento bioguiado a partir da matriz vegetal, oferecendo informações para direcionamento dos procedimentos fitoquímicos (114), como foi o caso do isolamento do composto ativo bilobol. Além disso, as análises quimiométricas ajudam a assegurar que o bilobol é de fato o componente responsável pela atividade observada nos extratos, sem necessidade de processos de isolamento adicionais para verificar a atividade de outros componentes.

Todavia, ainda é importante realizar o processo de isolamento da substância ativa, visto que estudos posteriores envolvendo ensaios biológicos ou análise quantitativa só são possíveis após obtenção das substâncias de interesse ou utilização de padrões (114). Além disso, diversos fatores podem influenciar nos resultados obtidos por análises quimiométricas (155), por isso é essencial comprovar que o componente apontado como relevante para atividade biológica realmente é ativo no organismo alvo.

Neste contexto, os processos de isolamento, purificação, análise e elucidação estrutural de compostos orgânicos são indispensáveis. Mais além, as informações químicas e estruturais obtidas a partir do isolamento e caracterização de substâncias são importantes, tanto para identificação inequívoca da substância, quanto para contribuir para estudos futuros. Portanto, existe a necessidade de se obter a substância isolada em questão, para que estudos envolvendo produtos de origem natural sejam completados e validados (114).

5.4 MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO

Um método cromatográfico sensível e seletivo é crítico para o sucesso de uma análise de degradação. Por isso, as condições utilizadas no método foram

cuidadosamente estudadas para garantir apropriada detecção e separação do bilobol, assegurando, assim, que não haveria interferências causadas pela matriz (água de cultivo). A escolha da coluna, da composição da fase móvel, temperatura do forno, fluxo e modificadores orgânicos foi avaliada e otimizada para atingir alta resolução, seletividade e formato adequado do pico cromatográfico.

Ao longo do desenvolvimento do método, foram testadas duas colunas cromatográficas de diferentes lotes. Distintas combinações de solventes também foram avaliadas para compor a fase móvel, dentre eles: MeOH-H₂O, ACN-H₂O, MeOH-H₂O-ácido fórmico, ACN-H₂O-ácido fórmico, MeOH-H₂O-ácido acético e ACN-H₂O-ácido trifluoroacético, envolvendo diferentes proporções. O fluxo da fase móvel variou entre 0,3 e 0,5 mL/min; e a temperatura do forno, entre 35 e 45 °C. As condições mais adequadas e reprodutíveis encontradas para realização estão descritas no item “Condições de UPLC-PDA-MS/MS” da metodologia.

Para possibilitar a detecção de bilobol em água de cultivo por meio de PDA, foi desenvolvido um método rápido, simples e com boa relação custo-benefício para processamento das amostras. Durante desenvolvimento do método de quantificação, percebeu-se que não era possível obter pico cromatográfico referente ao bilobol quando este estava dissolvido em água de cultivo. Por este motivo, todas as amostras de bilobol em água de cultivo foram diluídas com acetonitrila na proporção de 1:1. A adição de acetonitrila possibilitou a “extração” de bilobol e, conseqüentemente, a detecção adequada do mesmo.

O parâmetro de seletividade foi avaliado por meio da comparação entre perfil cromatográfico de padrão de bilobol (Figura 23A) e perfil obtido para amostra de bilobol em água de cultivo (Figura 23B). Além da avaliação cromatográfica, bilobol também foi submetido a espectrometria de massas de alta resolução e teve seu espectro de UV examinado.

Os espectros de UV e de MS1 obtidos a partir de amostras em acetonitrila e água de cultivo podem ser encontrados nas Figuras 23C e 22E, respectivamente. Espectro de MS2 de m/z 317,2536 [M - H]⁻ com seu perfil de fragmentação a m/z 273, 219, 177 e 122 é mostrado na Figura 23D. Valores de lambda máximo, espectro de UV e perfil de fragmentação em espectrometria de massas em alta resolução também exibiram similaridade adequada. Além disso, foi realizado estudo quantitativo das

variáveis: tempo de retenção, área do pico e fator cauda gerando valores de DPR de 1,15%, 0,40% e 0,72%, respectivamente.

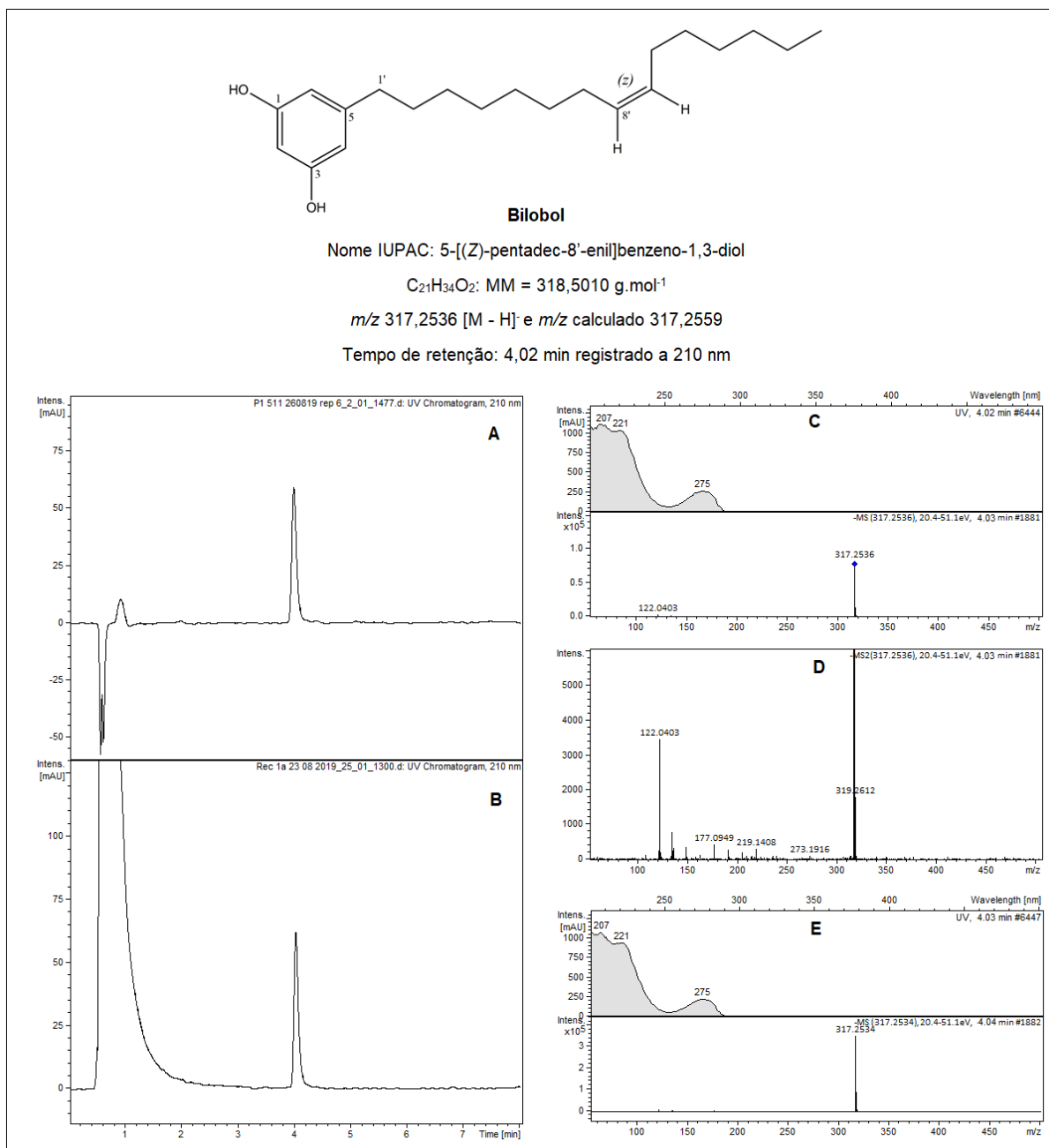


Figura 23. Estudo de seletividade. Cromatogramas de: **(A)** bilobol em acetonitrila e **(B)** bilobol em água de cultivo; **(C)** espectro de massas e de UV adquiridos de **A**; **(D)** espectro de MS2 mostrando perfil de fragmentação obtido de MS1 – **C**; e **(E)** espectro de massas e de UV obtido de **B**.

A linearidade usando sistema de UPLC foi avaliada plotando as áreas dos picos cromatográficos de bilobol em relação às concentrações teóricas. Experimentos foram conduzidos em triplicata e as curvas de calibração de bilobol foram plotadas em sete diferentes concentrações, de acordo com literatura especializada (136,137). A faixa linear dinâmica foi estabelecida entre 0,77 e 49,36 mg/L, resultando em equação da reta $y = 27,94x + 4,81$ e valor do coeficiente $r^2 = 0,9999$ (Figura 24). Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir da equação da reta resultando em LD = 0,27 mg/L e LQ = 0,82 mg/L com DPR de 1,83%.

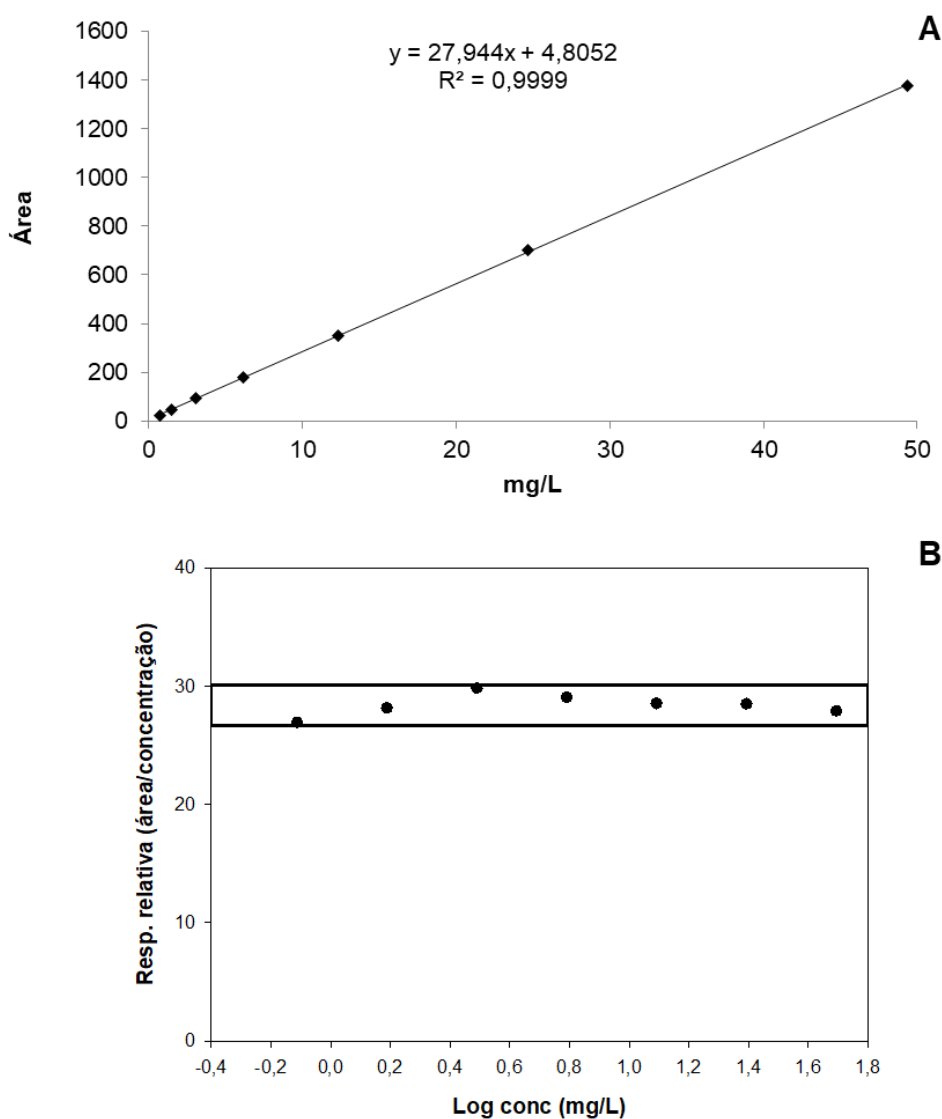


Figura 24. Estudo de linearidade para bilobol. (A) Curva analítica obedecendo faixa linear dinâmica em (B), com concentração variando entre 0,77 e 49,36 mg/L e com $r^2 = 0,9999$.

Resultados de exatidão, recuperação, precisão e efeito matriz estão listados na Tabela 3. Valores de recuperação de bilobol variaram entre 95 e 106%, com DPR < 5% e erro de $\pm 6.6\%$. No contexto de repetibilidade e precisão intermediária, valores de DPR encontrados para as variáveis tempo de retenção, área do pico e fator cauda foram de no máximo 10,13%. Fator de matriz normalizado demonstrou variação de 0,98 a 1,02 e DPR entre 0,52 e 1,55 nos três níveis de concentração.

Tabela 3 - Resultados para recuperação, precisão e efeito matriz obtidos durante validação do método de quantificação de bilobol em água de cultivo.

Recuperação (n = 5)	CT (mg/L)	CR (mg/L)	Recuperação (%) \pm DP	DPR (%)	Erro (%)	
Alta	25,73	24,46	95,10 \pm 1.02	1,07	-4,90	
Média	12,28	12,05	98,16 \pm 3.57	3,64	-1,84	
Baixa	5,12	5,45	106,61 \pm 3.36	3,15	6,61	
Precisão (n = 6)	TR	DPR (%)	AP	DPR (%)	FC	DPR (%)
Repet.	4,017 \pm 0,06	0,02	654,32 \pm 39,12	5,98	3,57 \pm 0,25	6,99
Inter.	4,024 \pm 0,05	1,36	690,04 \pm 49,28	7,14	4,01 \pm 0,41	10,13
Efeito matriz (n = 3)	AP_(BiCN)	AP_(BiAC)	FMN \pm DP	DPR (%)	Recovery (%)	
Alta	702,42	715,83	1,02 \pm 0,01	0,52	101,91	
Média	308,04	297,07	0,96 \pm 0,01	1,20	96,44	
Baixa	133,98	131,27	0,98 \pm 0,02	1,55	97,97	

CT = concentração teórica; **CR** = concentração real; **AP** = área do pico; **FC** = fator cauda; **TR** = tempo de retenção; **Repet.** = repetibilidade; **Inter.** = precisão intermediária; **BiCN** = bilobol em acetonitrila; **BiAC** = bilobol em água de cultivo; **FMN** = fator matriz normalizado.

Os resultados para linearidade, exatidão, precisão e efeito matriz foram considerados aceitáveis, com limites de detecção e quantificação na escala de ppm e DPR < 2%. Sendo assim, os resultados apresentados demonstraram que o método de quantificação desenvolvido foi capaz de identificar e quantificar o bilobol,

inequivocamente, na presença de outros componentes presentes na amostra, como componentes da matriz, impurezas ou produtos de degradação.

Existem diversos métodos na literatura para quantificação de alquilresorcinois, que possibilitam determinar sua presença em urina, plasma e produtos naturais de interesse alimentar, como trigo e centeio (156), incluindo método em HPLC para quantificar 5-pentadecilresorcinol, estrutura próxima ao bilobol, em *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae) (157). Entretanto, até o momento, esta é a primeira vez que um método de UPLC-PDA-MS/MS foi desenvolvido para quantificar bilobol em água proveniente de sistema aquático.

5.5 ESTABILIDADE E PERFIL DE DEGRADAÇÃO DO BILOBOL

Durante a elaboração do método, o parâmetro de estabilidade foi estudado usando bilobol em DMSO dissolvido em água de cultivo:acetonitrila 1:1, como descrito no item 4.5.3. Na Figura 25, os resultados do estudo de estabilidade foram comparados ao perfil de degradação do bilobol, adquirido de acordo com procedimentos descritos no item 4.5.4. Resultados do estudo de estabilidade demonstraram recuperação a partir de solução de bilobol a 25,73 mg/L de 95,52 a 104,72% durante quatro ciclos de 24 h (Figura 25A). As características da estabilidade se mostraram adequadas, com variação do conteúdo de $\pm 5\%$ ao longo de 96 h.

Quando o perfil de degradação do bilobol foi avaliado em garrafas de vidro, foi observada queda sistemática dos valores de recuperação nos três níveis de concentração, com valores médios de recuperação de 75,0; 58,0; 43,0 e 28,0% após 24, 48, 72 e 96 h, respectivamente (Figura 25B). Esta queda sistemática do conteúdo de bilobol também foi observada nos experimentos realizados nas placas de 96 poços, tanto na ausência (Figura 25C), como na presença de embriões de peixe-zebra (Figura 25D), com valores médios de 26,0; 14,0; 8,0 e 5,0% durante o mesmo período.

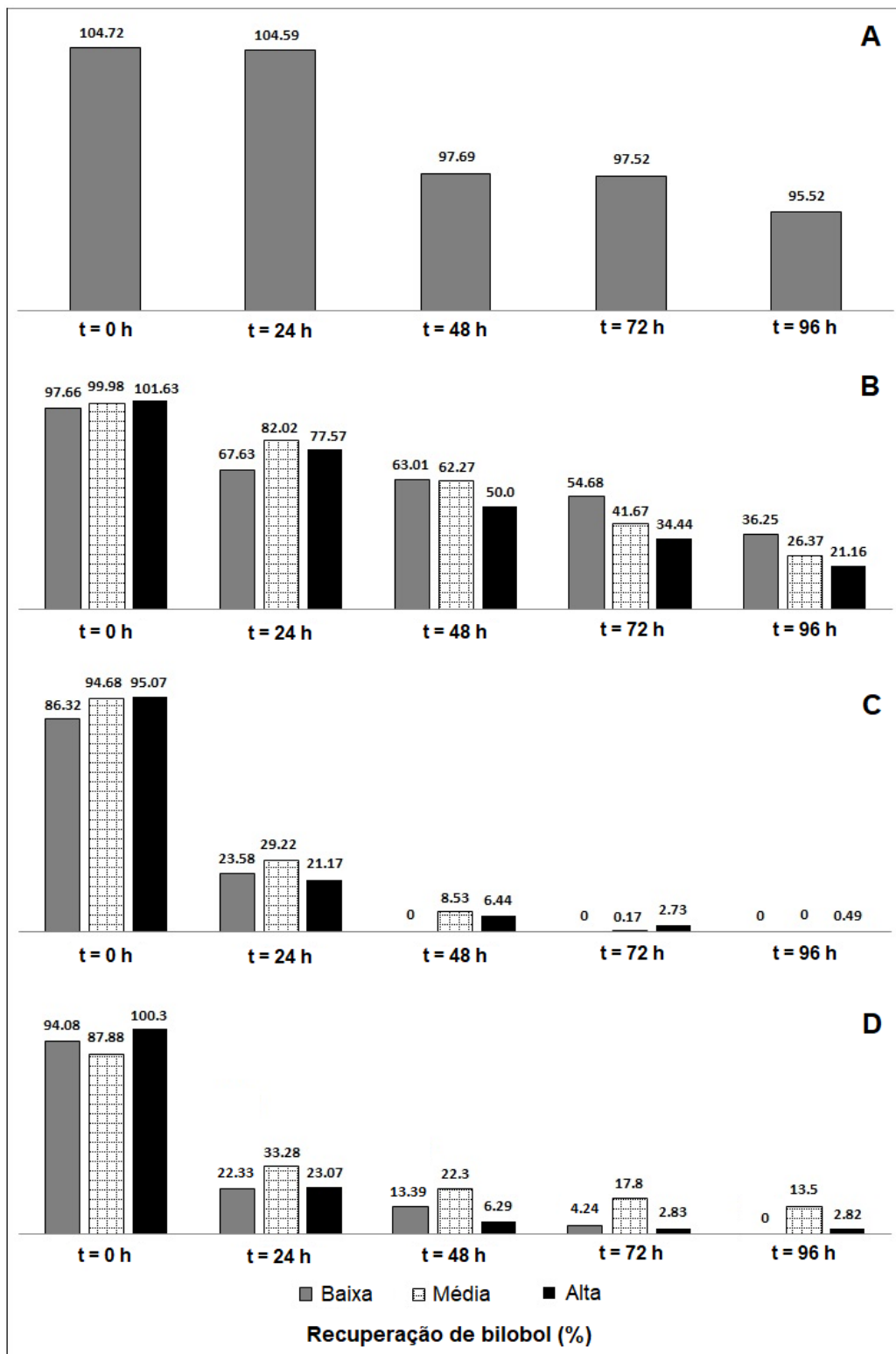


Figura 25. Recuperação (%) de bilobol na avaliação de parâmetro de estabilidade (A) comparado com perfil de degradação: (B) usando garrafas de vidro com 50 mL de solução; (C) na ausência de embriões de peixe-zebra, utilizando placas de 96 poços; (D) na presença de embriões de peixe-zebra e usando placas de 96 poços. Concentrações avaliadas: Baixa = 4,36 mg/L; Média: 12,2 mg/L; Alta: 23,86 mg/L.

Comparando as Figuras 25C e 25D, pode-se notar que os conteúdos de bilobol são similares em cada ciclo, demonstrando que a presença dos organismos vivos não influenciou na degradação de bilobol. Mais além, esta queda sistemática garante que os 5% remanescentes de bilobol seriam totalmente degradados após mais um ciclo de 24 h, indicando que qualquer resíduo de bilobol permaneceria no ambiente por pouco tempo.

Curiosamente, alquilfenóis convencionais geralmente degradam de forma diferente daquela apresentada pelo bilobol. Alquilfenóis frequentemente mostram degradação lenta, com meia-vida de várias semanas, ou mesmo anos. Sua persistência no ambiente pode ser danosa especialmente para organismos aquáticos, já que, em geral, são considerados altamente tóxicos. Entretanto, a segurança ambiental destes lipídeos fenólicos depende fortemente de sua estrutura química (158).

Normalmente, alquilfenóis possuem cadeias laterais saturadas, relativamente curtas e não exatamente lineares, características químicas que diferem da estrutura do bilobol. As características estruturais do bilobol, por sua vez, permitem que este seja biodegradável de forma tempo-dependente. Isto significa que bilobol não será persistente no ambiente, o que confere uma grande vantagem no desenvolvimento de um protótipo de produto larvicida ecologicamente seguro para controle de *Ae. aegypti*.

Como destacado na Figura 25, quando foi dissolvido somente em água de cultivo e DMSO e submetido aos ensaios, incluindo garrafas de vidro e placas de 96 poços, seu perfil de degradação foi evidente. Entretanto, soluções contendo acetonitrila, usadas no estudo de estabilidade, demonstraram variação mínima nos valores de recuperação. Provavelmente, a presença de acetonitrila e o congelamento durante a noite foram capazes de proteger o bilobol do processo de degradação.

Adicionalmente, no ensaio utilizando garrafas de vidro, a degradação de bilobol foi mais amena quando comparada à degradação observada nas placas. Possivelmente, a dimensão das garrafas de vidro e a quantidade de água presente em seu interior proveu ambiente propício para gerar perfil de degradação mais brando. Usando placas de 96 poços, o ambiente se torna mais drástico, resultando na degradação quase total de bilobol após 96 h. Quantificação de bilobol na presença de

embriões de peixe-zebra foi realizada em placas de 96 poços, para replicar as condições utilizadas nos ensaios de toxicidade.

Para determinar os produtos formados por este processo de biodegradação, amostra em água de cultivo contendo bilobol degradado foi liofilizada e analisada comparativamente com padrão de bilobol por Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio, H^1 RMN (Figura 26). No espectro de H^1 RMN da amostra degradada, os sinais correspondentes aos hidrogênios aromáticos em δ_H 6,70, aos hidrogênios olefínicos em δ_H 5,35, e aos grupos CH_2 próximos ao benzeno em δ_H 2,60 e 1,61 quase desapareceram, enquanto os sinais de outros CH_2 e CH_3 permaneceram intensos.

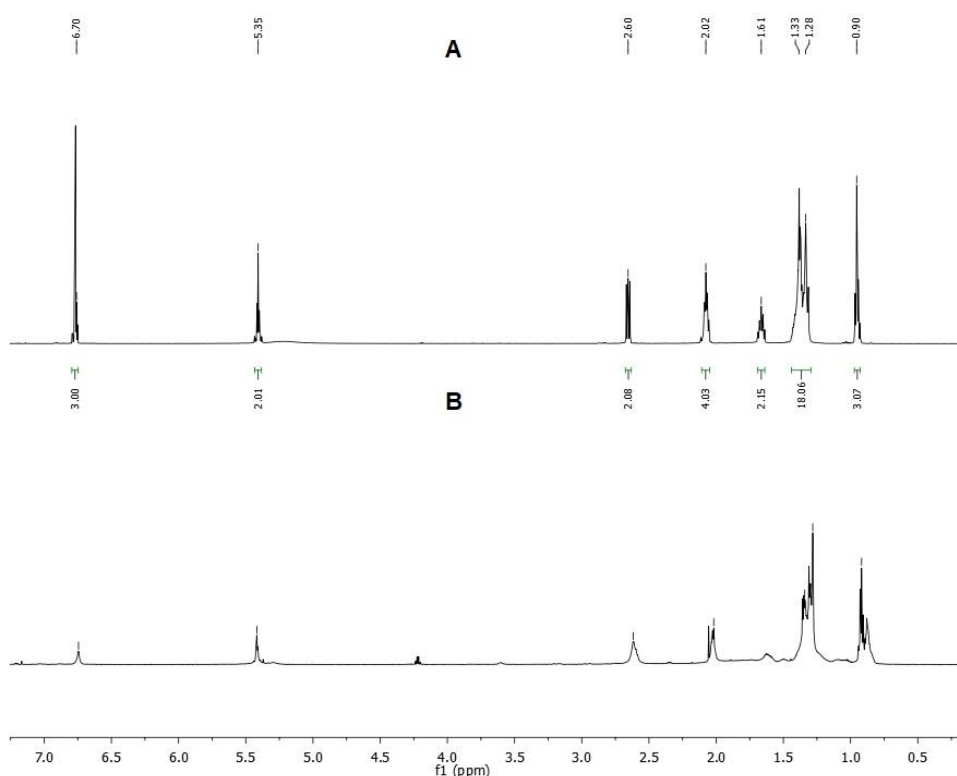


Figura 26. Espectros de H^1 RMN em clorofórmio deuterado. **A**: bilobol padrão; **B**: bilobol após processo de degradação.

Baseando-se nos resultados observados, foi proposto o seguinte mecanismo de degradação (Figura 27): devido à oxidação do anel benzênico em C2 e C4, os

primeiros produtos de degradação 1,3,4- e 1,2,3-trihydroxy-5-alkylbenzene são formados, diminuindo o número de hidrogênios no anel aromático (159). Estes intermediários hidroxilados podem gerar, subsequentemente, orto e para-quinonas, diminuindo ainda mais a presença de hidrogênios. O comprimento da cadeia alifática lateral pode ser alterado de maneira similar ao perfil de fragmentação mostrado na Figura 22D, ocasionando a formação de pequenas cadeias alifáticas e, assim, aumentando a detecção de grupos CH_2 e CH_3 , como sugerido na Figura 27.

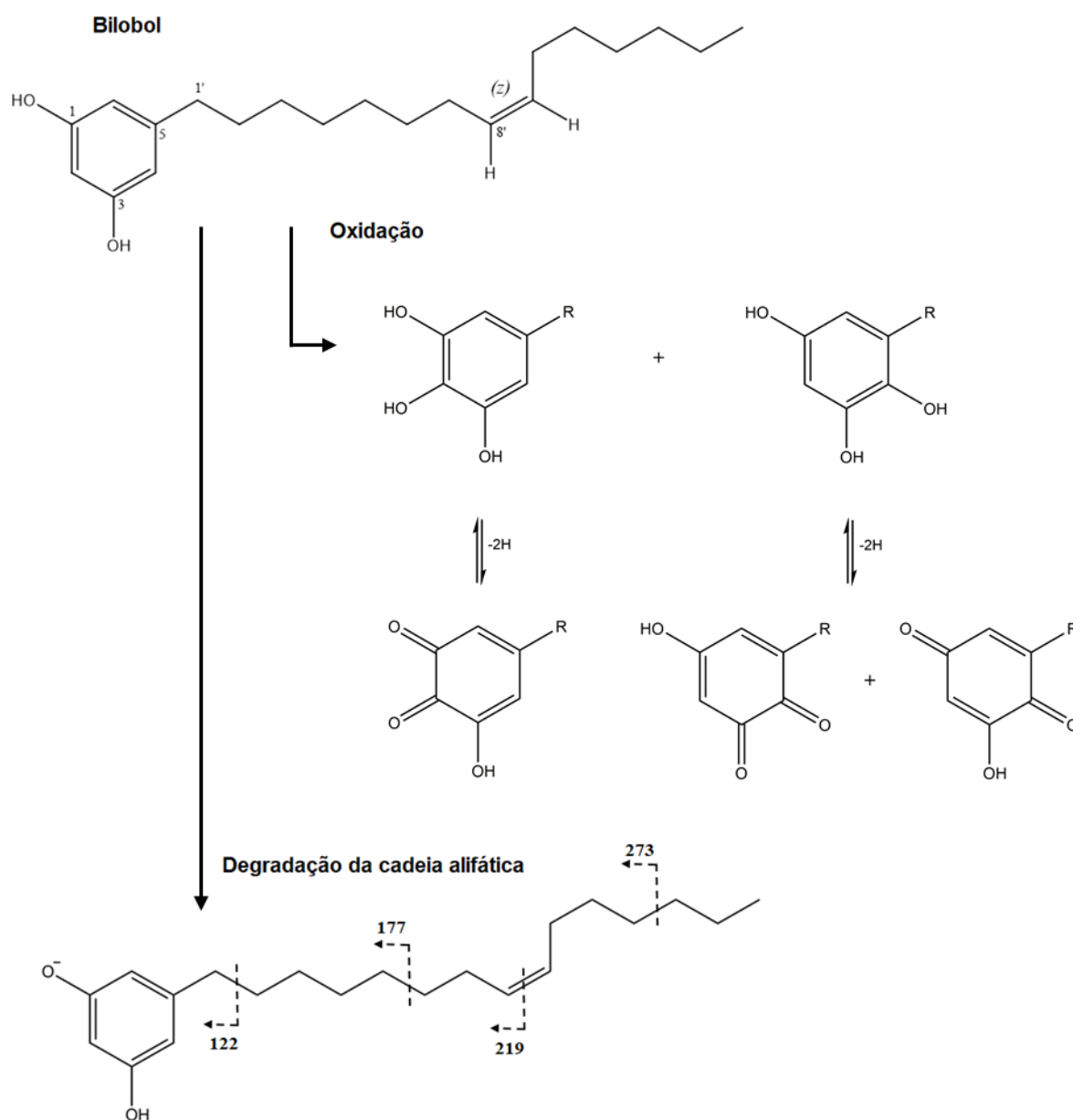


Figura 27. Mecanismo de degradação proposto para bilobol.

Atividade antioxidante descrita por Oliveira et al. (2011) indica que cardois atuam como antioxidantes por meio de captação de espécies reativas de oxigênio. O processo de oxidação também justifica a mudança de coloração observada após ocorrido o processo de degradação tempo-dependente. Portanto, a estrutura química do bilobol é transformada nos derivados descritos anteriormente ao longo do tempo, nas condições experimentais reportadas.

5.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

Soluções recém-preparadas de bilobol ($t = 0$ hod) geraram CL_{50} 6,00 mg/L (IC95% 5,22 – 6,85 mg/L) depois que embriões de peixe-zebra ficaram expostos a elas por 96 h. Quando as soluções preparadas foram deixadas nas placas de 96 poços para degradar por 24 h ($t = 24$ hod), o conteúdo médio de bilobol disponível foi de 26% e a CL_{50} resultante foi 18,88 mg/L (IC95% 15,90 – 22,92 mg/L), valor mais de três vezes maior do que aquele obtido quando soluções $t = 0$ hod foram testadas. Quando as soluções-teste ficaram degradando por 96 h ($t = 96$ hod), o conteúdo médio de bilobol disponível foi de 5,44%, e a $CL_{50} > 40$ mg/L.

A Figura 28 ilustra estes resultados, mostrando a porcentagem de mortalidade de embriões (96 hpf) em relação às concentrações de bilobol no momento em que as soluções-teste foram adicionadas às placas (2,0 a 40 mg/L), em diferentes tempos de degradação. Por exemplo, a 22 mg/L (96 hpf), bilobol após 0 hod gerou 97% de mortalidade nos embriões. Soluções-teste de bilobol após 24 hod, por sua vez, geraram 60% de mortalidade. E soluções com bilobol 96 hod, que só possuíam no máximo 5% do conteúdo original de bilobol restante, causaram mortalidade de apenas 15% nos embriões. Isto significa que quanto maior o período de degradação de bilobol, menor o dano infligido em embriões de peixe-zebra, o que indica que bilobol em seu estado fundamental é mais tóxico do que seus produtos de degradação.

Durante as 96 horas do teste FET, não foi observada mortalidade significativa nos grupos controle. Os grupos controle também mostraram desenvolvimento normal,

com taxa de eclosão e taxa de sobrevivência acima de 90%, conforme recomendado pelo protocolo n. 236 da OECD.

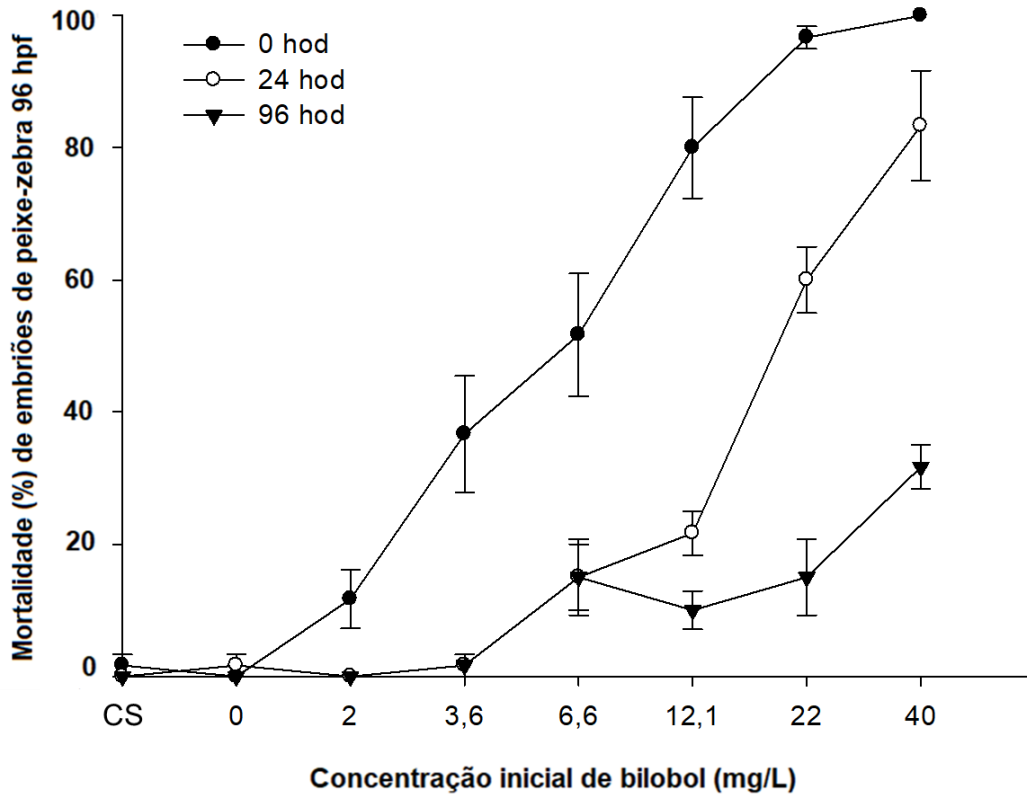


Figura 28. Comparação entre mortalidade (%) em embriões de peixe-zebra (96 hpf) causada por soluções de bilobol após 0 hod, 24 hod e 96 hod (horas de degradação). CS = controle solvente (DMSO 1%).

Nos três testes de embriotoxicidade, os mesmos efeitos subletais se destacaram: atraso na absorção no saco vitelínico, edema no pericárdio e curvatura da cauda (Figura 29), além de perda de equilíbrio a 96 hpf. Embora estes efeitos tenham sido registrados em todos os ensaios, a intensidade em que se manifestaram foi diferente em cada ensaio.

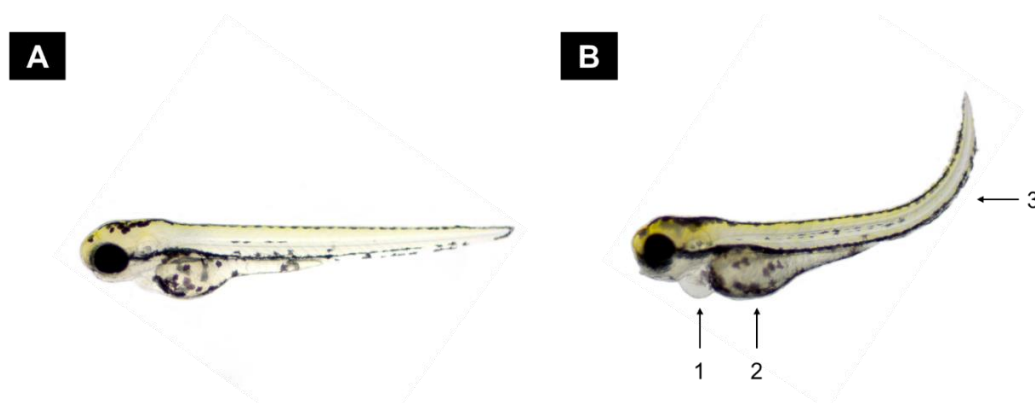


Figura 29. Principais efeitos subletais observados: 1 = edema no pericárdio; 2 = atraso na absorção do saco vitelínico; 3 = curvatura dorsal da cauda. **A**: controle solvente (DMSO 1%); **B**: organismo exposto a solução de bilobol 0 hod a 6,6 mg/L.

No ensaio realizado com bilobol 0 hod (Figura 30A), os efeitos subletais começaram a ocorrer a 6,6 mg/L, 48 hpf. Soluções de bilobol 24 hod (Figura 30B) também geraram malformações nos embriões 48 hpf, entretanto, estes efeitos começaram a se manifestar apenas em concentrações maiores, especialmente a 40 mg/L. Soluções de bilobol após 96 hod (Figura 30C), causaram malformações apenas em 96 hpf, começando a 6,6 mg/L. Em nenhum ensaio foram observados efeitos letais ou subletais significativos nas primeiras 24 hpf.

Curvatura dorsal da cauda e edema no pericárdio foram os primeiros efeitos subletais observados ao testar soluções de bilobol 0 hod. A 6,6 mg/L 48 hpf, 43,7% dos indivíduos apresentaram curvatura dorsal da cauda e 2% possuíam edema no pericárdio (Figura 30A). Em todas as concentrações mais altas, 100% dos organismos vivos apresentavam curvatura da cauda, porém não foram observados mais casos de edema no pericárdio.

A taxa de ocorrência destas malformações aumentou proporcionalmente ao tempo e concentração de exposição. Ao atingir 72 hpf, 97% e 92% dos embriões foram afetados com curvatura da cauda a 3,6 e 6,6 mg/L, respectivamente; e, em concentrações mais altas, 100% dos organismos vivos apresentaram curvatura da cauda (Figura 30A). A porcentagem de indivíduos com edema no pericárdio aumentou para 3% a 6,6 mg/L e 11% a 22 mg/L; não foi observado edema a 12,1 mg/L. Em 72 hpf, indivíduos também apresentaram atraso na absorção do saco vitelínico de maneira dose-dependente: 13% a 6,6 mg/L, 41% a 12,1 mg/L, e 89% a 22 mg/L.

Passadas 96 horas da fertilização, mais de 90% dos organismos vivos, exceto os organismos expostos a menor concentração (2 mg/L), apresentaram curvatura dorsal da cauda e atraso na absorção do saco vitelínico. Porcentagem de edema no pericárdio em 6,6 mg/L e 22 mg/L aumentaram para 23 e 33%, respectivamente. Perda de equilíbrio foi observada em mais de 80% dos organismos vivos a partir de 3,6 mg/L.

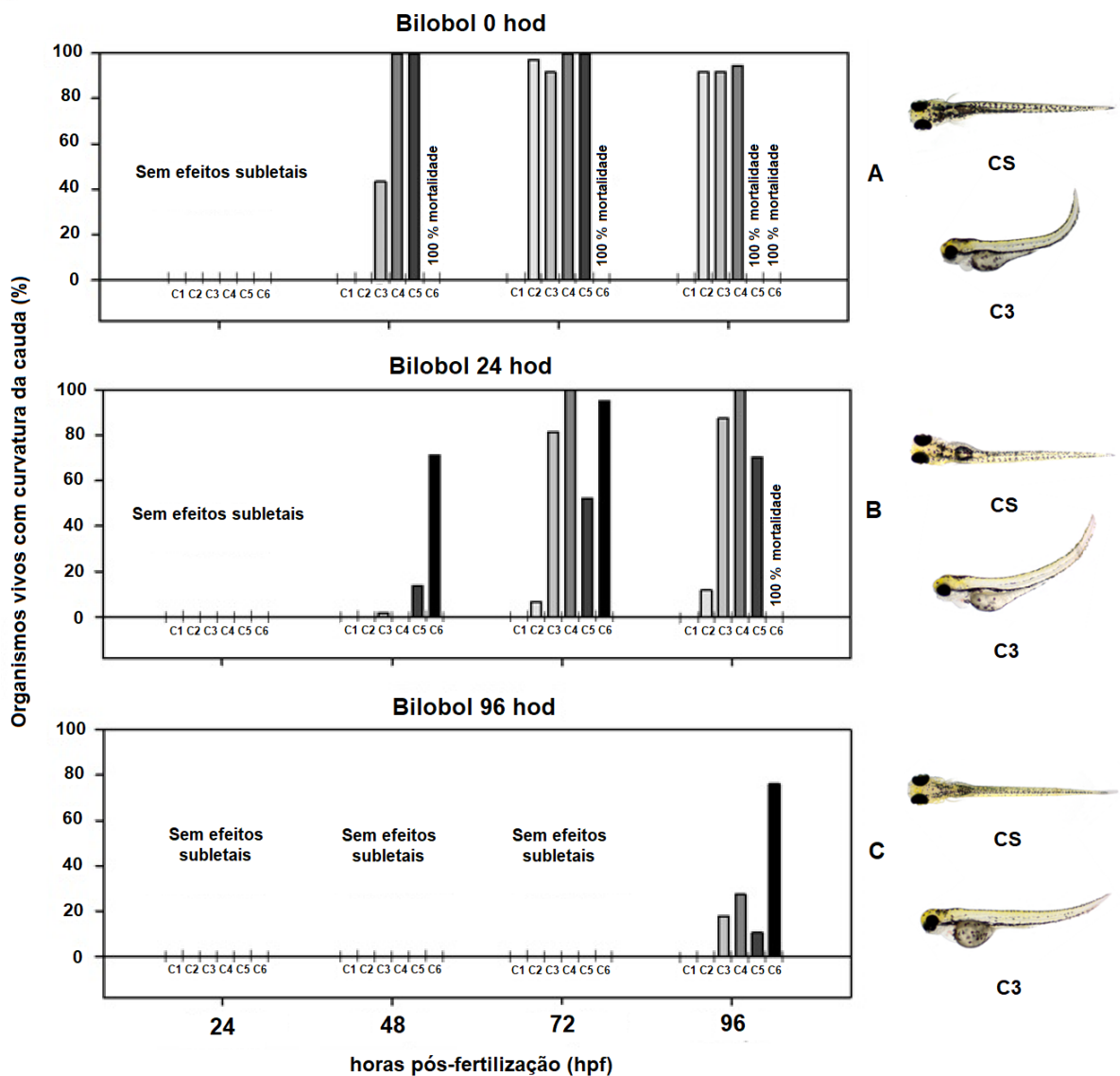


Figura 30. Visão geral da ocorrência de curvatura da cauda, o efeito mais marcante observado no teste de toxicidade aguda em embriões de peixe-zebra, nos experimentos executados com: bilobol 0 hod (A), bilobol 24 hod (B) e bilobol 96 hod (C). CS: controle solvente (1% DMSO); C1: 2,0 mg/L; C2: 3,6 mg/L; C3: 6,6 mg/L; C4: 12,1 mg/L; C5: 22,0 mg/L; C6: 40,0 mg/L.

No experimento realizado com soluções de bilobol deixadas para degradar por 24 horas (Figura 30B), 15% dos embriões apresentaram curvatura dorsal da cauda a 22 mg/L e 71% a 40 mg/L, em 48 hpf. Mais uma vez, a porcentagem de indivíduos afetados por este efeito subletal e a ocorrência de outros efeitos subletais aumentou ao longo do tempo. Atraso na absorção do saco vitelínico começou a ocorrer a partir de 72 hpf, porém apenas 38% dos indivíduos na concentração mais alta foram afetados. Edema no pericárdio estava presente em somente 2% e 5% a 3,6 e 22 mg/L, respectivamente. Em 96 hpf, curvatura da cauda, edema pericárdico e perda de equilíbrio foram observados em todas as concentrações, exceto 2 mg/L, porém em porcentagens menores do que aquelas obtidas para soluções com bilobol 0 hod.

Quando as soluções testes continham por volta de 5% de bilobol (96 hod), nenhum efeito subletal foi observado nas primeiras 72 horas (Figura 30C). Passadas 96 horas da fertilização (96 hpf), 18% dos organismos vivos apresentaram curvatura dorsal da cauda a 6,6 mg/L, 27% a 12,1 mg/L, 11% a 22,0 mg/L e 76% a 40,0 mg/L. Edema pericárdico e atraso na absorção do saco vitelínico também foram observados em aproximadamente 60% dos organismos vivos.

Em adição ao aumento mais lento nas taxas de mortalidade e de efeitos subletais quando soluções com menor conteúdo de bilobol foram testadas, a intensidade em que os efeitos subletais se manifestaram também foram menores. Como pode ser verificado pelas fotos dos organismos fornecidas nas Figuras 29A, B e C, a intensidade da curvatura dorsal da cauda, a mais proeminente das malformações, foi maior em organismos expostos a quantidades maiores de bilobol, indicando que estes organismos foram impactados de maneira mais severa.

Estes resultados de toxicidade, juntamente com as informações coletadas sobre o perfil de degradação do bilobol, sugerem que: apesar de bilobol em sua forma fundamental ter mostrado alguma toxicidade, o que realmente entraria em contato com organismos aquáticos após aplicação de bilobol no ambiente como um larvicida seriam os compostos de degradação, que demonstraram baixa embriotoxicidade ou toxicidade apenas em concentrações muito mais altas do que aquelas que seriam utilizadas para controle do vetor.

Bilobol se mostrou menos tóxico que outros inseticidas usados no combate ao *Ae. aegypti*, como cifenotrina e tetrametrina (127). Além disso, bilobol tem a vantagem

de gerar compostos de degradação não tóxicos, ao contrário da deltametrina, por exemplo, um piretroide comumente utilizado que gera metabólitos tóxicos e persistentes no ambiente (75).

Frações do líquido da casca da castanha de caju (LCC) contendo bilobol foram previamente testadas em *Artemia salina* para analisar seus efeitos ecotoxicológicos. As CL₅₀ das frações contendo cardanois e cardois variaram entre 0,41 e 1,59 mg/L após 24 e 48 h (160). Contudo, embora a CL₅₀ gerada pela fração contendo cardois tenha causado preocupação em relação a toxicidade ambiental (160), não é possível atribuir a atividade observada ao bilobol, já que outros cardois estavam presentes na fração.

Este é o primeiro trabalho a avaliar a ecotoxicologia de bilobol em sua forma isolada e purificada. As informações reportadas aqui confirmam que o perfil de degradação e de toxicidade do bilobol são distintas dos perfis descritos para alquilfenóis, como nonilfenol, octilfenol ou 4-terc-octilfenol, que são conhecidos por serem persistentes no ambiente e gerarem alta toxicidade, especialmente devido a sua capacidade de causar desregulamento endócrino (161).

Mais além, os resultados apresentados aqui sugerem que bilobol pode de fato ser um candidato viável para o desenvolvimento de um bioinseticida, especialmente para o controle de *Ae. aegypti*, uma vez que possui acentuada atividade larvicida em menos de 24 horas. Desta forma, um biolarvicida produzido com bilobol pode eliminar rapidamente as larvas de *Ae. aegypti* de um criadouro e, em seguida, começar seu processo de degradação, gerando compostos que não causarão dano ao ambiente.

Adicionalmente, bilobol tem grande vantagem competitiva por estar disponível em altas quantidades em resíduo industrial. O agronegócio do caju e da pimenta rosa geram, por ano, toneladas de resíduos ricos em bilobol (151,162), fornecendo, portanto, uma fonte barata e renovável para produção de um larvicida ecologicamente seguro. Ademais, bilobol também pode ser produzido por meio de processos de síntese já descritos (131). Sendo assim, bilobol pode ser facilmente obtido para ser incorporado em formulação de liberação controlada ou formulação com outro componente com maior efeito residual, resultando em um novo produto larvicida.

6. CONCLUSÃO

As análises quimiométricas revelaram que existe clara diferenciação entre a composição metabólica de frações ativas e inativas provenientes de extratos de *S. terebinthifolia*. Além disso, as análises quimiométricas foram capazes de apontar o componente responsável pela atividade e, conseqüentemente, guiar o processo de isolamento. A combinação dos resultados fornecidos pela quimiometria e de procedimentos de purificação bioguiados levaram ao isolamento do componente ativo bilobol, que demonstrou atividade larvicida e pupicida em *Ae. aegypti*. Bilobol está abundantemente presente em resíduos industriais, sendo possível obtê-lo em grandes quantidades com excelente custo-benefício.

A degradação de bilobol em água, sua toxicidade aguda em organismo não-alvo e a identidade e toxicidade de seus produtos de degradação eram, até então, desconhecidos. Os parâmetros analíticos envolvendo bilobol em água de cultivo descritos neste trabalho são eficientes e confiáveis. O método desenvolvido em UPLC-PDA-MS/MS pode ser utilizado para quantificação de bilobol em diversos contextos, já que demonstrou seletividade, linearidade, precisão, exatidão, efeito matriz e limite de detecção e quantificação adequados.

Graças ao método analítico desenvolvido, foi possível acompanhar o processo de degradação do bilobol em placas de 96 poços na presença e na ausência de embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*), revelando que bilobol degrada quase completamente após 96 horas. O estudo de espectros de ^1H RMN permitiu identificar os produtos de degradação gerados sob as condições experimentais relatadas como pequenas cadeias alifáticas.

Em relação à toxicidade aguda, não foi observada mortalidade em 24 hpf em nenhuma das concentrações testadas. Adicionalmente, os ensaios de toxicidade indicaram que quanto maior a taxa de degradação do bilobol, menor o dano infligido em embriões de peixe-zebra. Portanto, é possível concluir que bilobol é mais tóxico que seus produtos de degradação. Isto minimiza as preocupações em relação à segurança ambiental, já que, no ambiente, serão liberados os produtos de degradação, não o bilobol.

Em resumo, bilobol é um alquilresorcinol que elimina de maneira eficiente larvas de *Ae. aegypti* - vetor de arbovirose, enquanto desaparece quase completamente após 96 horas, deixando apenas produtos de degradação de baixa toxicidade. Portanto, foi possível isolar a partir de *Schinus terebinthifolia* uma substância ativa que é de fato uma boa candidata para desenvolvimento de produto larvicida ecologicamente seguro para auxiliar no combate do *Ae. aegypti*.

7. REFERÊNCIAS

1. Jones R, Kulkarni MA, Davidson TMV, Talbot B, Sander B, González C, et al. Arbovirus vectors of epidemiological concern in the Americas: A scoping review of entomological studies on Zika, dengue and chikungunya virus vectors. Samy AM, editor. PLoS One [Internet]. 2020 Feb 6 [cited 2020 Mar 22];15(2):e0220753. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0220753>
2. Long KC, Ziegler SA, Thangamani S, Hausser NL, Kochel TJ, Higgs S, et al. Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*. Am J Trop Med Hyg. 2011;85(4):750–7.
3. Colpitts TM, Cox J, Vanlandingham DL, Feitosa FM, Cheng G, Kurscheid S, et al. Alterations in the *Aedes aegypti* Transcriptome during Infection with West Nile, Dengue and Yellow Fever Viruses. Rice CM, editor. PLoS Pathog [Internet]. 2011 Sep 1 [cited 2020 Jun 25];7(9):e1002189. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1002189>
4. Chediak M, Pimenta FG, Coelho GE, Braga IA, Lima JBP, Cavalcante KRLJ, et al. Spatial and temporal country-wide survey of temephos resistance in Brazilian populations of *aedes aegypti*. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2016 May 1 [cited 2020 Jun 26];111(5):311–21. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762016000500311&lng=en&nrm=iso&tlng=en
5. WHO. Dengue and severe dengue [Internet]. World Health Organization. 2020 [cited 2020 Jun 16]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
6. Wang WH, Urbina AN, Chang MR, Assavalapsakul W, Lu PL, Chen YH, et al. Dengue hemorrhagic fever – A systemic literature review of current perspectives on pathogenesis, prevention and control. J Microbiol Immunol Infect. 2020;
7. Reina J. Current status of vaccines against Zika virus. Vacunas (English Ed [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2019 Jun 18];19(1):18–23. Available from:

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2445146017300134>
8. Tharmarajah K, Mahalingam S, Zaid A. Chikungunya: vaccines and therapeutics. *F1000Research* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jun 18];6:2114. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5728195/pdf/f1000research-6-13493.pdf>
 9. World Health Organization. Chikungunya [Internet]. World Health Organization. 2017 [cited 2020 Jun 23]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>
 10. World Health Organization. Zika virus [Internet]. World Health Organization. 2018 [cited 2020 Jun 21]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>
 11. IOC. Dengue [Internet]. 2020 [cited 2020 Jun 18]. Available from: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/oportunista.html>
 12. Moyes CL, Vontas J, Martins AJ, Ng LC, Koou SY, Dusfour I, et al. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(7):1–20.
 13. Yadav IC, Devi NL, Syed JH, Cheng Z, Li J, Zhang G, et al. Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India. Vol. 511, *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V.; 2015. p. 123–37.
 14. López-Fernández O, Rial-Otero R, Simal-Gándara J. High-throughput HPLC–MS/MS determination of the persistence of neonicotinoid insecticide residues of regulatory interest in dietary bee pollen. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2015 Jul 28 [cited 2020 Jul 25];407(23):7101–10. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-015-8870-4>
 15. Comissão Europeia. REGULAMENTO DE EXECUÇÃO (UE) N. 485/2013 DA COMISSÃO [Internet]. *Jornal Oficial da União Europeia*, N. 485/2013 May 24, 2013. Available from: www.efsa.europa.eu/efsajournal.htm.
 16. Jactel H, Verheggen F, Thiéry D, Escobar-Gutiérrez AJ, Gachet E, Desneux N.

- Alternatives to neonicotinoids. *Environ Int*. 2019 Aug 1;129:423–9.
17. Schaafsma A, Limay-Rios V, Xue Y, Smith J, Baute T. Field-scale examination of neonicotinoid insecticide persistence in soil as a result of seed treatment use in commercial maize (corn) fields in southwestern Ontario. *Environ Toxicol Chem* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2020 Jul 26];35(2):295–302. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/etc.3231>
 18. Xu C, Li X, Jin M, Sun X, Niu L, Lin C, et al. Early life exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to synthetic pyrethroids and their metabolites: a comparison of phenotypic and behavioral indicators and gene expression involved in the HPT axis and innate immune system. *Environ Sci Pollut Res* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2020 Aug 24];25(13):12992–3003. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1542-0>
 19. de Carvalho GHF, de Andrade MA, de Araújo CN, Santos ML, de Castro NA, Charneau S, et al. Larvicidal and pupicidal activities of eco-friendly phenolic lipid products from *Anacardium occidentale* nutshell against arbovirus vectors. *Environ Sci Pollut Res* [Internet]. 2019 Feb 28 [cited 2020 Mar 17];26(6):5514–23. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-018-3905-y>
 20. Patocka J, Diz De Almeida J. Brazilian Pepper Tree: Review of Pharmacology. *Mil Med Sci Lett* [Internet]. 2017 [cited 2020 Jun 27];86(1):32–41. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/314659275>
 21. Ministério da Saúde. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) [Internet]. 1st ed. 2020 [cited 2020 Jun 28]. Available from: <http://portalms.saude.gov.br/assistencia-farmaceutica/medicamentos-rename>
 22. Andrade SAL de, Tristão MI da S, Miguel MD, Dias J de FG, Gomes EC, Burci LM, et al. Fitoterápicos da relação nacional de medicamentos essenciais no Brasil. *Rev Cuba Plantas Med* [Internet]. 2017 [cited 2020 Jun 28];22(1). Available from: <http://scielo.sld.cu>
 23. Coelho AAM, Paula JE de, Espíndola LS. Atividade Larvívica de Extratos Vegetais sobre *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), em Condições de Laboratório. *BioAssay* [Internet]. 2009 Jul 3 [cited 2019 Jul 12];4(0). Available from: <http://bioassay.org.br/bioassay/article/view/22>

24. Procópio TF, Fernandes KM, Pontual EV, Ximenes RM, de Oliveira ARC, Souza C de S, et al. *Schinus terebinthifolius* Leaf Extract Causes Midgut Damage, Interfering with Survival and Development of *Aedes aegypti* Larvae. Soberón M, editor. PLoS One [Internet]. 2015 May 14 [cited 2020 Jun 29];10(5):e0126612. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0126612>
25. Pratti DLA, Ramos AC, Scherer R, Cruz ZMA, Silva AG. Mechanistic basis for morphological damage induced by essential oil from Brazilian pepper tree, *Schinus terebinthifolia*, on larvae of *Stegomyia aegypti*, the dengue vector. Parasites and Vectors [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2020 Jun 29];8(1):1–10. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s13071-015-0746-0>
26. Invivo - Fiocruz. Biologia do *Aedes aegypti* [Internet]. Fiocruz. 2020 [cited 2020 Aug 4]. Available from: <http://www.invivo.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1407&sid=8>
27. Moura PM de, Docile TN, Arnóbio A, Figueiró R. O Desmatamento e o crescimento urbano desordenado no estado do Rio de Janeiro: impactos na dinâmica do Dengue. Cad UniFOA. 2007;17:89–94.
28. Costa JM Da, Forbeloni JV. A RELAÇÃO ENTRE AS CONDIÇÕES PRECARIAS DE MORADIAS E A INCIDÊNCIA DE CASOS DE DOENÇAS TRANSMITIDA PELO Aedes Aegypti. 2018.
29. Fiocruz. Como é o ciclo de vida do mosquito “*Aedes aegypti*”? [Internet]. Fundação Oswaldo Cruz. 2019 [cited 2020 Jun 24]. Available from: <https://portal.fiocruz.br/pergunta/como-e-o-ciclo-de-vida-do-mosquito-aedes-aegypti>
30. Beserra EB, De Freitas EM, De Souza JT, Fernandes CRM, Santos KD. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. Porto Alegre; 2009 Sep.
31. OECD. Reproductive biology of the mosquito *Ae. aegypti*. In: Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment [Internet]. 2018 [cited 2020 Aug 26]. Available from: www.alamance-nc.com/envhealth/wp-content/uploads/sites/9/2013/10/Mosquitoes_Facts.pdf.
32. FUNASA. Biologia do *Aedes aegypti* - Instruções para Pessoal de Combate ao

- Vetor [Internet]. Manual de Normas Técnicas. 2002 [cited 2020 Jun 24]. Available from:
<http://www.pbh.gov.br/smsa/montapagina.php?pagina=bhdengue/biologia.htm>
33. Ministério da Saúde. Dengue - Aspectos Epidemiológicos, Diagnóstico e Tratamento. Brasília: Ministério da Saúde; 2002.
 34. Paessler S, Walker DH. Pathogenesis of the Viral Hemorrhagic Fevers. *Annu Rev Pathol Mech Dis* [Internet]. 2013 Jan 24 [cited 2020 Jun 21];8(1):411–40. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pathol-020712-164041>
 35. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013 Apr 25;496(7446):504–7.
 36. Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, et al. Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(8).
 37. ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). Dengue worldwide overview [Internet]. European Union. 2020 [cited 2020 Aug 29]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/dengue-monthly>
 38. PAHO/WHO. Epidemiological Update Dengue March 2020. 2020;(February):1–14. Available from: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=dengue-2217&alias=50963-11-november-2019-dengue-epidemiological-update-1&Itemid=270&lang=en
 39. PAHO/WHO. Epidemiological Update Dengue and other Arboviruses. 2020;(June):1–15.
 40. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 01 a 52. Vol. 51. Brasília; 2020 Jan.
 41. Krauer F, Riesen M, Reveiz L, Oladapo OT, Martínez-Vega R, Porgo T V., et al. Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain–

- Barré Syndrome: Systematic Review. *PLoS Med.* 2017 Jan 1;14(1).
42. Counotte MJ, Meili KW, Taghavi K, Calvet G, Sejvar J, Low N. Zika virus infection as a cause of congenital brain abnormalities and Guillain-Barré syndrome: A living systematic review . *F1000Research.* 2019 Nov 13;8.
 43. World Health Organization. Guillain–Barré syndrome [Internet]. World Health Organization. 2016 [cited 2020 Jun 22]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/guillain-barré-syndrome>
 44. Wilder-Smith A, Vannice K, Durbin A, Hombach J, Thomas SJ, Thevarjan I, et al. Zika vaccines and therapeutics: Landscape analysis and challenges ahead. *BMC Med.* 2018 Jun 6;16(1).
 45. Ayu SM, Lai LR, Chan YF, Hatim A, Hairi NN, Ayob A, et al. Seroprevalence survey of Chikungunya virus in Bagan Panchor, Malaysia. *Am J Trop Med Hyg.* 2010 Dec;83(6):1245–8.
 46. CDC. Countries and territories where chikungunya cases have been reported. 2019.
 47. Paessler S, Walker DH. Pathogenesis of the Viral Hemorrhagic Fevers. *Annu Rev Pathol Mech Dis* [Internet]. 2013 Jan 24 [cited 2020 Jun 25];8(1):411–40. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pathol-020712-164041>
 48. OPAS/OMS Brasil. Folha informativa - Febre amarela [Internet]. Organização Pan-Americana de Saúde/Organização Mundial da Saúde. 2019 [cited 2020 Jun 26]. Available from: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5578:folha-informativa-febre-amarela&Itemid=875
 49. Ponte G, Pimentel I. História e qualidade: produção da vacina contra febre amarela na Fiocruz [Internet]. Bio-Manguinhos/Fiocruz. 2017 [cited 2020 Aug 4]. Available from: <https://portal.fiocruz.br/noticia/historia-e-qualidade-producao-da-vacina-contrafebre-amarela-na-fiocruz>
 50. MS/SVS. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* [Internet]. Vol. 51, Boletim Epidemiológico Arboviroses n° 24. 2020.

- Available from:
<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-02-1-.pdf>
51. Vanlandingham DL, McGee CE, Klinger KA, Vessey N, Fredregillo C, Higgs S. Short report: Relative susceptibilities of South Texas mosquitoes to infection with West Nile virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77(5):925–8.
 52. Pereira TN, Rocha MN, Sucupira PHF, Carvalho FD, Moreira LA. *Wolbachia* significantly impacts the vector competence of *Aedes aegypti* for Mayaro virus. *Sci Rep [Internet].* 2018 Dec 1 [cited 2020 Jun 25];8(1):1–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-25236-8>
 53. CDC. Symptoms, Diagnosis, & Treatment | West Nile Virus | CDC [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2018 [cited 2020 Jun 25]. Available from: <https://www.cdc.gov/westnile/symptoms/index.html>
 54. CDC. West Nile Virus Transmission Cycle. 2018.
 55. Dos Santos Dias L, MacOris MDLDG, Andrighetti MTMO, Otrera VCG, Dias ADS, Bauzer LGSDR, et al. Toxicity of spinosad to temephos-resistant *Aedes aegypti* populations in Brazil. *PLoS One.* 2017 Mar 1;12(3).
 56. Moreira IM. Avaliação da suscetibilidade de populações de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) do Distrito Federal à inseticidas e seu controle de qualidade químico [Internet]. [Brasília]: Universidade de Brasília; 2018 [cited 2020 Aug 4]. Available from: https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/34879/1/2018_IsraelMartinsMoreira.pdf
 57. Fonseca EOL, Macoris M de L da G, Santos RF Dos, Morato DG, Isabel MDSS, Cerqueira NA, et al. Estudo experimental sobre a ação de larvicidas em populações de *Aedes aegypti* do município de Itabuna, Bahia, em condições simuladas de campo. *Epidemiol e Serv saude Rev do Sist Unico Saude do Bras [Internet].* 2019 Feb 18 [cited 2020 Jun 26];28(1):e2017316. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2237-96222019000100302&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
 58. Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e

- alternativas de controle no Brasil. *Epidemiol e Serviços Saúde* [Internet]. 2007 Dec [cited 2020 Jun 26];16(4):295–302. Available from: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742007000400007&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
59. Coordenação-Geral de Vigilância de Arboviroses (CGARB), (DEIDT) D de I e DT, (SVS) S de V em S, (MS) M da S. Nota informativa nº 103/2019. Vol. 2012. 2019.
60. World Health Organization. Cielo ULV Adulticide Space Spray - Prequalification Team Vector Control Decision Document. 2019.
61. Dye-Braumuller KC, Haynes KF, Brown GC. Quantitative Analysis of *Aedes albopictus* Movement Behavior Following Sublethal Exposure to Prallethrin. *J Am Mosq Control Assoc* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2020 Jun 26];33(4):282–92. Available from: <http://www.bioone.org/doi/10.2987/17-6673.1>
62. Ministério da Saúde. Manual sobre Medidas de Proteção à Saúde dos Agentes de Combate às Endemias. Vol. 1. 2019. 92 p.
63. MS/SVS. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes*. *Bol Epidemiológico Arboviroses* [Internet]. 2020;51(24):1–13. Available from: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-02-1-.pdf>
64. World Mosquito Program. Sobre a *Wolbachia* [Internet]. [cited 2020 Jun 27]. Available from: <http://www.eliminatedengue.com/brasil/wolbachia>
65. Ministério da Saúde. *Wolbachia*: Campo Grande (MS) terá mosquitos que combatem a dengue [Internet]. 2020 [cited 2020 Jun 27]. Available from: <https://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/46387-campo-grande-tera-mosquitos-que-combatem-a-dengue>
66. Tetreau G, Grizard S, Patil CD, Tran FH, Tran Van V, Stalinski R, et al. Bacterial microbiota of *Aedes aegypti* mosquito larvae is altered by intoxication with *Bacillus thuringiensis israelensis*. *Parasites and Vectors*. 2018 Mar 2;11(1).
67. Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol e Serviços Saúde*. 2007;16(4):279–93.

68. De P, Vilarinhos TR, Geherin D, Dias S, Gomes Monnerat R. Persistência larvicida de formulações de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* para o controle de larvas de *Aedes aegypti* [Internet]. 2003 [cited 2020 Jun 27]. Available from: <http://www.cenargen.embrapa.br>
69. Ministério da Saúde (MS), Fundação Nacional da Saúde (FUNASA). Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor. 2001.
70. Zara AL de SA, Santos SM dos, Fernandes-Oliveira ES, Carvalho RG, Coelho GE. *Aedes aegypti* control strategies: a review . Epidemiol Serv Saude. 2016 Apr;25(2):391–404.
71. Bala R, Mittal S, Sharma RK, Wangoo N. A supersensitive silver nanoprobe based aptasensor for low cost detection of malathion residues in water and food samples. Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc. 2018 May 5;196:268–73.
72. Goulson D. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. J Appl Ecol [Internet]. 2013 Aug 1 [cited 2020 Jul 25];50(4):977–87. Available from: <https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1365-2664.12111>
73. Ernst F, Alonso B, Colazzo M, Pareja L, Cesio V, Pereira A, et al. Occurrence of pesticide residues in fish from south American rainfed agroecosystems. Sci Total Environ. 2018 Aug 1;631–632:169–79.
74. Ferreira RCB, Papini S, Luchini LC, Vieira E. Persistence of malathion used in dengue control on household surfaces. Arq Inst Biol (Sao Paulo) [Internet]. 2019 [cited 2020 Jul 26];86. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-16572019000100212&lng=en&nrm=iso&tlng=en
75. Chen S, Lai K, Li Y, Hu M, Zhang Y, Zeng Y. Biodegradation of deltamethrin and its hydrolysis product 3-phenoxybenzaldehyde by a newly isolated *Streptomyces aureus* strain HP-S-01. Appl Microbiol Biotechnol [Internet]. 2011 May 16 [cited 2020 Jul 26];90(4):1471–83. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-011-3136-3>
76. Paulo State S, Rubens Pirani São Paulo J. ANACARDIACEAE R. BR. NA

FLORA FANEROGÂMICA DO ESTADO DE SÃO PAULO ANACARDIACEAE
R. BR. IN THE PHANEROGAMIC FLORA OF THE. 2011.

77. Correia SDJ, David JP, David JM. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. Quim Nova [Internet]. 2006 [cited 2020 Jun 27];29(6):1287–300. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000600026&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
78. Simpson MG. Diversity and Classification of Flowering Plants: Eudicots. In: Plant Systematics. Elsevier; 2010. p. 275–448.
79. Morais T, da Costa-Silva T, Tempone A, Borborema S, Scotti M, de Sousa R, et al. Antiparasitic Activity of Natural and Semi-Synthetic Tirucallane Triterpenoids from *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae): Structure/Activity Relationships. Molecules [Internet]. 2014 May 5 [cited 2019 Jul 12];19(5):5761–76. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/5/5761>
80. El-Massry KF, El-Ghorab AH, Shaaban HA, Shibamoto T. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. J Agric Food Chem [Internet]. 2009 Jun 24 [cited 2020 Jun 28];57(12):5265–70. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf900638c>
81. Silva AB, Silva T, Franco ES, Rabelo SA, Mota RA, Da Câmara CAG, et al. Antibacterial activity, chemical composition, and cytotoxicity of leaf's essential oil from Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Brazilian J Microbiol [Internet]. 2010 [cited 2020 Jun 28];41(1):158–63. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822010000100023&lng=en&nrm=iso&tlng=en
82. De Lima MRF, De Souza Luna J, Dos Santos AF, De Andrade MCC, Sant'Ana AEG, Genet JP, et al. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. J Ethnopharmacol. 2006;105(1–2):137–47.
83. Alves LA, Freires I de A, Pereira TM, Souza A de, Lima E de O, Castro RD de. Effect of *Schinus terebinthifolius* on *Candida albicans* growth kinetics, cell wall formation and micromorphology. Acta Odontol Scand [Internet]. 2013 Jan 8 [cited 2019 Jul 12];71(3–4):965–71. Available from:

- <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/00016357.2012.741694>
84. Gomes FS, Procópio TF, Napoleão TH, Coelho LCBB, Paiva PMG. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. J Appl Microbiol [Internet]. 2013 Mar 1 [cited 2020 Jun 28];114(3):672–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jam.12086>
 85. Barbieri DSV, Tonial F, Lopez PVA, Sales Maia BHLN, Santos GD, Ribas MO, et al. Antiadherent activity of *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* extracts on in vitro biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol. 2014 Sep 1;59(9):887–96.
 86. Rosas EC, Correa LB, Pádua T de A, Costa TEMM, Luiz Mazzei J, Heringer AP, et al. Anti-inflammatory effect of *Schinus terebinthifolius* Raddi hydroalcoholic extract on neutrophil migration in zymosan-induced arthritis. J Ethnopharmacol [Internet]. 2015 Dec 4 [cited 2019 Jul 12];175:490–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874115301732>
 87. Freires I de A, Alves LA, Ferreira GLS, Jovito VC, Dias De Castro R, Cavalcanti AL. A Randomized Clinical Trial of *Schinus terebinthifolius* Mouthwash to Treat Biofilm-Induced Gingivitis. Evidence-Based Complement Altern Med [Internet]. 2013 [cited 2020 Jun 29];2013. Available from: <http://dx>.
 88. Velázquez E, Tournier HA, Mordujovich De Buschiazso P, Saavedra G, Schinella GR. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. Fitoterapia. 2003 Feb 1;74(1–2):91–7.
 89. Moustafa AMY, Kouam SF, Kulsoom A, Ejaz A, Ali S, Anjum S, et al. Phytochemical investigation and biological evaluation of *Schinus terebinthifolius*. Res J Phytochem [Internet]. 2010 [cited 2020 Jun 28];4(3):162–72. Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20103234317>
 90. D'Sousa Costa CO, Ribeiro PR, Loureiro MB, Simões RC, De Castro RD, Fernandez LG. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of extracts prepared from different tissues of *Schinus terebinthifolius* Raddi that occurs in the coast of Bahia, Brazil. Pharmacogn Mag [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2020 Jun 29];11(43):607–14. Available from: </pmc/articles/PMC4522850/?report=abstract>

91. Bulla MK, Hernandez L, Baesso ML, Nogueira AC, Bento AC, Bortoluzzi BB, et al. Evaluation of Photoprotective Potential and Percutaneous Penetration by Photoacoustic Spectroscopy of the *Schinus terebinthifolius* Raddi Extract. *Photochem Photobiol* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2020 Jun 29];91(3):558–66. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/php.12419>
92. Uliana MP, Fronza M, da Silva AG, Vargas TS, de Andrade TU, Scherer R. Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2019 Jul 12];83:235–40. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669015305756>
93. Santana JS, Sartorelli P, Guadagnin RC, Matsuo AL, Figueiredo CR, Soares MG, et al. Essential oils from *Schinus terebinthifolius* leaves – chemical composition and in vitro cytotoxicity evaluation. *Pharm Biol* [Internet]. 2012 Oct 8 [cited 2020 Jun 28];50(10):1248–53. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880209.2012.666880>
94. Matsuo AL, Figueiredo CR, Arruda DC, Pereira F V., Borin Scutti JA, Massaoka MH, et al. α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2011 Jul 29 [cited 2019 Jul 12];411(2):449–54. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X11011892>
95. Bendaoud H, Romdhane M, Souchard JP, Cazaux S, Bouajila J. Chemical Composition and Anticancer and Antioxidant Activities of *Schinus Molle* L. and *Schinus Terebinthifolius* Raddi Berries Essential Oils. *J Food Sci* [Internet]. 2010 Aug 1 [cited 2020 Jun 28];75(6):C466–72. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1750-3841.2010.01711.x>
96. QUEIRES LCS, FAUVEL-LAFÈVE F, TERRY S, DE LA TAILLE A, KOUYOUMDJIAN JC, CHOPIN DK, et al. Polyphenols Purified from the Brazilian Aroeira Plant (*Schinus terebinthifolius* Raddi) Induce Apoptotic and Autophagic Cell Death of DU145 Cells. *Int Inst Anticancer Res* [Internet]. 2006 [cited 2020 Jun 28]; Available from: <http://ar.iijournals.org/content/26/1A/379.short>

97. Cavalher-Machado SC, Rosas EC, Brito F de A, Heringe AP, de Oliveira RR, Kaplan MAC, et al. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. *Int Immunopharmacol*. 2008 Nov 1;8(11):1552–60.
98. Pawlowski Â, Kaltchuk-Santos E, Zini CA, Caramão EB, Soares GLG. Essential oils of *Schinus terebinthifolius* and *S. molle* (Anacardiaceae): Mitodepressive and aneugenic inducers in onion and lettuce root meristems. *South African J Bot*. 2012 May 1;80:96–103.
99. Nunes-Neto PA, Peixoto-Sobrinho TJ da S, da Silva Júnior ED, Leopoldina da Silva J, Rodrigo da Silva Oliveira A, Pupo AS, et al. The Effect of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) Bark Extract on Histamine-Induced Paw Edema and Ileum Smooth Muscle Contraction. *Evidence-Based Complement Altern Med* [Internet]. 2017 Aug 27 [cited 2019 Jul 12];2017:1–10. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2017/1416375/>
100. Santos OJ dos, Malafaia O, Ribas-Filho JM, Czezczko NG, Santos RHP, Santos RAP. Efeito de *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira) e *Carapa guianensis* Aublet (andiroba) na cicatrização de gastrorrafias. *ABCD Arq Bras Cir Dig* (São Paulo) [Internet]. 2013 Jun 1 [cited 2020 Jun 29];26(2):84–91. Available from: <https://europepmc.org/article/med/24000017>
101. Estevão LRM, De Medeiros JP, Simões RS, Arantes RME, Rachid MA, Da Silva RMG, et al. Mast cell concentration and skin wound contraction in rats treated with Brazilian pepper essential oil (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Acta Cir Bras* [Internet]. 2015 [cited 2020 Jun 29];30(4):289–95. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502015000400289&lng=en&nrm=iso&tlng=en
102. Silva AG, Almeida DL, Ronchi SN, Bento AC, Scherer R, Ramos AC, et al. The essential oil of Brazilian pepper, *Schinus terebinthifolia* Raddi in larval control of *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762). *Parasites and Vectors* [Internet]. 2010 Aug 27 [cited 2020 Jun 28];3(1):1–7. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/1756-3305-3-79>
103. Cole ER. Estudo Fitoquímico do Óleo Essencial dos Frutos da Aroeira (*Schinus*

- terebinthifolius* Raddi) e sua Eficácia no Combate ao Dengue. Universidade Federal Espírito Santo; 2008.
104. Alves MS, Santos DP, Silva LCP, Pontes EG, Souza MAA. Essential Oils Composition and Toxicity Tested by Fumigation Against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) Pest of Stored Cowpea. Rev Virtual Química [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 12];7(6):2387–99. Available from: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1984-6835.20150142>
 105. Benzi V, Stefanazzi N, Ferrero AA. Bioactividad de aceites esenciales de hojas y frutos del aguaribay (*Schinus molle* L.) en el gorgojo del arroz (*Sitophilus oryzae* L.). Chil J Agric Res [Internet]. 2009 [cited 2020 Jun 29];69(2):154–9. Available from: <http://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/69339>
 106. Ruiz AR, De La Torre RA, Alonso N, Villaescusa A, Betancourt J, Vizoso A. Screening of medicinal plants for induction of somatic segregation activity in *Aspergillus nidulans*. J Ethnopharmacol. 1996 Jul 5;52(3):123–7.
 107. Carvalho MCRD, Barca FNTV, Agnez-Lima LF, de Medeiros SRB. Evaluation of mutagenic activity in an extract of pepper tree stem bark (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Environ Mol Mutagen [Internet]. 2003 Jan 1 [cited 2020 Aug 27];42(3):185–91. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/em.10183>
 108. Moraes MO, Bezerra FAF, Lotufo LC, Cient CP. Avaliação clínica da eficácia e segurança de fitoterápicos no Brasil. Arq Bras Fitomed Cient. 2004;1:30–9.
 109. Carvalho MG, Melo AGN, Aragão CFS, Raffin FN, Moura TFAL. *Schinus terebinthifolius* Raddi: Composição química, propriedades biológicas, e toxicidade. Rev Bras Plantas Med [Internet]. 2013 [cited 2020 Jun 29];15(1):158–69. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722013000100022&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 110. Gilbert B, Favoreto R. *Schinus terebinthifolius* Raddi. Rev Fitos. 2011;6:43–56.
 111. Lima LB, Vasconcelos CFB, Maranhão HML, Leite VR, Ferreira PA, Andrade BA, et al. Acute and subacute toxicity of *Schinus terebinthifolius* bark extract. J Ethnopharmacol. 2009 Dec 10;126(3):468–73.

112. PIRES OC, TAQUEMASA A, AKISUE VCG, OLIVEIRA F de, ARAUJO CEP. Análise preliminar da toxicidade aguda e dose letal mediana (DL50) comparativa entre os frutos de Pimenta-do-Reino do Brasil (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e Pimenta do Reino (*Piper nigrum* L.) . Acta Farm Bonaer [Internet]. 2004 [cited 2020 Aug 4];23(2):176–82. Available from: http://www.latamjpharm.org/trabajos/23/2/LAJOP_23_2_1_10_245QQHC1QV.pdf
113. Otto M. What is Chemometrics? In: Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry [Internet]. 3rd ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2017 [cited 2020 Aug 27]. p. 1–13. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527699377.ch1>
114. Pilon A, Selegato D, Fernandes R, Bueno P, Pinho D, Carnevale Neto F, et al. METABOLÔMICA DE PLANTAS: MÉTODOS E DESAFIOS. Quim Nova. 2020;43(3):329–54.
115. Turi CE, Finley J, Shipley PR, Murch SJ, Brown PN. Metabolomics for phytochemical discovery: Development of statistical approaches using a cranberry model system. J Nat Prod [Internet]. 2015 Apr 24 [cited 2020 Aug 27];78(4):953–66. Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
116. Garrido-Delgado R, Eugenia Muñoz-Pérez M, Arce L. Detection of adulteration in extra virgin olive oils by using UV-IMS and chemometric analysis. Food Control. 2018 Mar 1;85:292–9.
117. Karunathilaka SR, Yakes BJ, He K, Brückner L, Mossoba MM. First use of handheld Raman spectroscopic devices and on-board chemometric analysis for the detection of milk powder adulteration. Food Control. 2018 Oct 1;92:137–46.
118. Koch W, Kukula-Koch W, Komsta Ł, Marzec Z, Szwerc W, Głowniak K. Green Tea Quality Evaluation Based on Its Catechins and Metals Composition in Combination with Chemometric Analysis. Molecules [Internet]. 2018 Jul 11 [cited 2020 Aug 27];23(7):1689. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/7/1689>
119. Freitas JVB, Alves Filho EG, Silva LMA, Zocolo GJ, de Brito ES, Gramosa N V. Chemometric analysis of NMR and GC datasets for chemotype characterization

- of essential oils from different species of *Ocimum*. *Talanta*. 2018 Apr 1;180:329–36.
120. Gad HA, Ayoub IM, Wink M. Phytochemical profiling and seasonal variation of essential oils of three *Callistemon* species cultivated in Egypt. de Brito E, editor. *PLoS One* [Internet]. 2019 Jul 11 [cited 2020 Aug 27];14(7):e0219571. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0219571>
 121. Radulescu C, Olteanu RL, Stihl C, Florescu M, Lazurca D, Dulama ID, et al. Chemometric Assessment of Spectroscopic Techniques and Antioxidant Activity for *Hippophae rhamnoides* L. Extracts Obtained by Different Isolation Methods. *Anal Lett* [Internet]. 2019 Oct 13 [cited 2020 Aug 27];52(15):2393–415. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=lanl20>
 122. Falcão MAP, de Souza LS, Dolabella SS, Guimarães AG, Walker CIB. Zebrafish as an alternative method for determining the embryo toxicity of plant products: a systematic review. *Environ Sci Pollut Res*. 2018;25(35):35015–26.
 123. Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs Then and Now: The Need for Clarity in Definition and Purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2015 Mar;54(2):120–32.
 124. Ašmonaitė G, Boyer S, de Souza KB, Wassmur B, Sturve J. Behavioural toxicity assessment of silver ions and nanoparticles on zebrafish using a locomotion profiling approach. *Aquat Toxicol*. 2016 Apr 1;173:143–53.
 125. Kanungo J, Cuevas E, Ali SF, Paule MG. Zebrafish Model in Drug Safety Assessment [Internet]. 2014 [cited 2020 Jun 10] p. 5416–29. Available from: www.epa.gov/comptox/toxcast
 126. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* [Internet]. 2013 Apr 25 [cited 2020 Jul 26];496(7446):498–503. Available from: www.ensembl.org/info/docs/compara/homology_method.html
 127. Mendis JC, Tennakoon TK, Jayasinghe CD. Zebrafish Embryo Toxicity of a Binary Mixture of Pyrethroid Insecticides: d-Tetramethrin and Cyphenothrin. 2018 [cited 2020 Jun 18]; Available from: <https://doi.org/10.1155/2018/4182694>

128. Guo D, Wang Y, Qian Y, Chen C, Jiao B, Cai L, et al. Joint acute and endocrine disruptive toxicities of malathion, cypermethrin and prochloraz to embryo-larval zebrafish, *Danio rerio*. *Chemosphere*. 2017 Jan 1;166:63–71.
129. Elskus AA, Myers MD. Pilot Study of Sublethal Effects on Fish of Pesticides Currently Used and Proposed for Use on Maine Blueberries [Internet]. 2007 [cited 2020 Jun 24]. Available from: <http://www.usgs.gov/pubprod>
130. Wolfender J, Houriet J, Allard P-M. MZmine: a tutorial [Internet]. Geneva: Section des sciences pharmaceutiques. Université de Genève; [cited 2019 Oct 30]. Available from: www.unige.ch/sciences/pharm/fasie30quaiErnest-AnsermetCH-1211Genève4
131. Tanaka A, Arai Y, Kim SN, Ham J, Usuki T. Synthesis and biological evaluation of bilobol and adipostatin A. *J Asian Nat Prod Res*. 2011;13(4):290–6.
132. WHO. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. World Health Organization [Internet]. 2005;1–41. Available from: http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf?ua=1
133. Milesi P, Pocquet N, Labb P. A R script for analysis of bioassays and probit graphs. 2015;(November):7p. Available from: <http://www.isem.univ-montp2-fr/recherche/equipes/evolution-vecteurs-adaptation-et-symbioses/personnel/labbe-pierrick/>
134. Brogdon WG, Chan A. Diretriz para Avaliar a Resistência a Inseticida em Vetores Usando o Bioensaio com Garrafa do CDC. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2013. p. 1–28.
135. Achee NL, Grieco JP, Bernier U, Moore S. Guidelines for Efficacy Testing of Spatial Repellents. World Health Organization (WHO). 2013. p. 5-7,14-15,28-30,41-48.
136. ICH. VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1). Geneva: INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE; 2005.

137. ANVISA. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166. National Agency of Health Vigilance: Brazil. Brasília: DOU nº141; 2017.
138. Lammer E, Carr GJ, Wendler K, Rawlings JM, Belanger SE, Braunbeck T. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol*. 2009 Mar 1;149(2):196–209.
139. OECD. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidel Test Chem Sect 2, OECD Publ. 2013;(July):1–22.
140. Pavela R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. Vol. 76, *Industrial Crops and Products*. Elsevier B.V.; 2015. p. 174–87.
141. Ryan MF, Byrne O. Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *J Chem Ecol* [Internet]. 1988 Oct [cited 2020 Aug 27];14(10):1965–75. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01013489>
142. Bortolucci W de C, de OLIVEIRA HLM, Silva ES, Campo CF de AA, Gonçalves JE, Junior RPIAU, et al. *Schinus terebinthifolius* essential oil and fractions in the control of *Aedes aegypti*. *Biosci J* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2020 Jul 28];35(5):1575–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v35n5a2019-41999>
143. Silva PRC, Camaroti JRSL, Almeida WA, Ferreira ECB, Paiva PMG, Barros R, et al. *Schinus terebinthifolia* leaf extract is a larvicidal, pupicidal, and oviposition deterring agent against *Plutella xylostella*. *South African J Bot*. 2019 Dec 1;127:124–8.
144. Xia J, Wishart DS. Using metaboanalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. *Curr Protoc Bioinforma* [Internet]. 2016 Sep [cited 2020 Jul 24];2016(1):14.10.1-14.10.91. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cpbi.11>
145. Yuliana ND, Khatib A, Choi YH, Verpoorte R. Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. *Phyther Res*. 2011 Feb;25(2):157–69.
146. HASLER A, VAN BEEK TA. Chemical constituents of *Ginkgo biloba*. In: *Ginkgo*

- Biloba [Internet]. 2000 [cited 2020 Jul 29]. p. 137–42. Available from: https://books.google.com.br/books?hl=pt-PT&lr=&id=g_MPcQ1gu3MC&oi=fnd&pg=PA124&dq=%22bilobol%22+isolated+from+ginkgo+biloba+first+time&ots=-GvgFAXRTh&sig=guvZslzEKGISkpuOr41mcsuEEhU#v=onepage&q&f=false
147. Tocco G, Fais A, Meli G, Begala M, Podda G, Fadda MB, et al. PEG-immobilization of cardol and soluble polymer-supported synthesis of some cardol-coumarin derivatives: Preliminary evaluation of their inhibitory activity on mushroom tyrosinase. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2009 Jan 1;19(1):36–9.
 148. Oliveira MSC, Morais SM de, Magalhães DV, Batista WP, Vieira ÍGP, Craveiro AA, et al. Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut shell liquid constituents. *Acta Trop* [Internet]. 2011;117(3):165–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.08.003>
 149. Zuo-wei K. Insecticidal Ingredients of Ginkgo biloba L.Sarcotesta. *J Guangxi Norm Univ*. 2008;(Natural Science Edition).
 150. Santiago VR. Avaliação de Formulações Cosméticas Contendo Bioaditivos Antioxidantes Derivados do LCC. Rede Nordeste de Biotecnologia; 2016.
 151. Gomes RB de A, de Souza ES, Gerhardt Barraqui NS, Tosta CL, Nunes APF, Schuenck RP, et al. Residues from the Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolia* Raddi) processing industry: Chemical profile and antimicrobial activity of extracts against hospital bacteria. *Ind Crops Prod*. 2020 Jan 1;143:111430.
 152. Serrano-León JS, Bergamaschi KB, Yoshida CMP, Saldaña E, Selani MM, Rios-Mera JD, et al. Chitosan active films containing agro-industrial residue extracts for shelf life extension of chicken restructured product. *Food Res Int*. 2018 Jun 1;108:93–100.
 153. Kala S, Sogan N, Verma P, Naik SN, Agarwal A, Patanjali PK, et al. Nanoemulsion of cashew nut shell liquid bio-waste: Mosquito larvicidal activity and insights on possible mode of action. *South African J Bot* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2020 Mar 24];127:293–300. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0254629919307847>

154. Motti PR, Rejane De Andrade Porto K, Roel AR, Bosco D. Toxicidade da formulação obtida a partir do líquido da castanha do caju *Anacardium occidentale* L. em *Artemia salina* Leach. Multitemas [Internet]. 2015 Nov 27 [cited 2020 Jul 26]; Available from: <https://www.interacoes.ucdb.br/multitemas/article/view/153>
155. Byers NM, Fleshman AC, Perera R, Molins CR. Metabolomic insights into human arboviral infections: Dengue, chikungunya, and zika viruses. *Viruses*. 2019 Mar 1;11(3).
156. Marklund M. Alkylresorcinol Metabolites Candidate Biomarkers for Whole Grain Wheat and Rye Intake. Swedish University of Agricultural Sciences; 2012.
157. Supriya A, Kumar A, Kudachikar VB. A Comparison Investigation on Antioxidant Activities, Constitutive Antifungal Phenolic Lipids and Phenolics Contents of Anthracnose Resistant and Susceptible Mango Fruit Cultivars. *Int J FRUIT Sci* [Internet]. 2019 [cited 2020 Apr 18]; Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=wsfr20>
158. Liao Y, Dewaele A, Verboekend D, Sels BF. Alkylphenols as Bio-Based Solvents: Properties, Manufacture and Applications. In: Jérôme F, Luque R, editors. *Bio-Based Solvents*. John Wiley & Sons, Ltd.; 2017. p. 149–73.
159. Kozubek A, Tyman JHP. Resorcinolic Lipids, the Natural Non-isoprenoid Phenolic Amphiphiles and Their Biological Activity. 1999 [cited 2020 Jan 9]; Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
160. Pimentel MF, de Lima DP, Martins LR, Beatriz A, Santaella ST, Lotufo LVCL. Ecotoxicological analysis of cashew nut industry effluents, specifically two of its major phenolic components, cardol and cardanol. *Panam J Aquat Sci* [Internet]. 2009 [cited 2020 Mar 18];4(3):363–8. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/215658636>
161. Yu H, Caldwell DJ, Suri RP. In vitro estrogenic activity of representative endocrine disrupting chemicals mixtures at environmentally relevant concentrations. *Chemosphere*. 2019 Jan 1;215:396–403.
162. Taiwo EA. Cashew Nut Shell Oil — A Renewable and Reliable Petrochemical Feedstock. In: *Advances in Petrochemicals*. InTech; 2015.