

NATÁLIA MENDES GOMES MAGALHÃES

Vismia gracilis Hieron. (Hypericaceae): caracterizações químicas e atividade biológica em *Aedes aegypti*

BRASÍLIA, 2020

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

NATÁLIA MENDES GOMES MAGALHÃES

Vismia gracilis Hieron. (Hypericaceae): caracterizações químicas e atividade biológica em *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.

Orientador: Laila Salmen Espindola
Co-Orientador: João Paulo Barreto Sousa

BRASÍLIA, 2020

NATÁLIA MENDES GOMES MAGALHÃES

Vismia gracilis Hieron. (Hypericaceae): caracterizações químicas e atividade biológica em *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.

Aprovada em 28 de outubro de 2020

BANCA EXAMINADORA

Profa. Laila Salmen Espindola - Presidente
Universidade de Brasília

Prof. Renato de Oliveira Resende
Universidade de Brasília

Profa. Vanderlan da Silva Bolzani
Universidade Estadual Paulista – Unesp/Araraquara

Profa. Eloisa Dutra Caldas
Universidade de Brasília
Suplente

AGRADECIMENTOS

À equipe do Laboratório de Farmacognosia, agradeço a amizade, o companheirismo e as contribuições acadêmicas. Sem vocês esse trabalho não seria possível. Obrigada pelas boas energias de sempre.

À Profa. Dra. Laila S. Espindola, que confiou no meu trabalho e me deu a oportunidade de fazer parte dessa equipe maravilhosa. Obrigada pelo carinho e amor de sempre. Com a senhora aprendi a resiliência e o amor que um cientista precisa ter pra seguir em frente. Um exemplo de ser humano.

À Profa. Dra. Lorena Albernaz por todos os ensinamentos, amizade e principalmente por fazer essa caminhada ter sido mais alegre.

Ao Prof. Dr. João Paulo B. Sousa. Agradeço a paciência e confiança. Você é um professor incrível. Obrigada por ter me ajudado a conduzir esse projeto.

Ao Prof. Daniel Demarque pelos ensinamentos e por ter me apresentado a metabolômica. Obrigada pela atenção ilimitada às minhas dúvidas infundáveis.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências da Saúde / UnB, principalmente às meninas da limpeza, por nos proporcionarem um ambiente acolhedor.

A todos os docentes responsáveis pelas disciplinas da pós-graduação, os seus ensinamentos foram primordiais.

À Central Analítica do Instituto de Química, especialmente ao Dr. Luiz Eduardo Benedito, pelo auxílio com análises e interpretação de resultados, e ao Prof. Dr. Carlos Eduardo de Melo Salvador pela realização da síntese.

À Universidade de Brasília, pela oportunidade.

Ao Projeto ArboControl (TED 74/2016 e TED 42/2017) - acordo de cooperação entre a UnB e o Ministério da Saúde, pelo apoio financeiro.

Ao Programa Capes PrInt, pela oportunidade de capacitação *na University of Notre Dame*, Estados Unidos.

I would like to thank Dr. John Grieco and Dr. Nicole Achee for kindly receiving me at University of Notre Dame. I am grateful for all I learned with you.

I also would like to thank my friend Marianne Krebs for all support and kindness.

Aos meus pais, Jomar e Ana, meus exemplos de vida. Obrigada por serem meu porto seguro e pelo incentivo que sempre me deram. Vocês são minha base.

Aos meus irmãos Tiago, Laura e Beatriz pelo amor e alegria. Vocês trouxeram diversão aos meus dias. Obrigada por serem meu lar.

Às minhas avós, tios e primos. Vocês são essenciais à minha vida.

A minha querida amiga de infância, Tainá Wanderley. Ter você ao meu lado, mesmo de longe, é inspirador.

Ao meu marido Eduardo, que me apoiou desde o primeiro instante a seguir essa jornada. Não tenho palavras para agradecer tudo o que tem feito pela nossa família. Obrigada por me ensinar a levar a vida com mais leveza e tranquilidade. Obrigada por estar sempre ao meu lado e me trazer paz.

*Ciência vai além de resultados bem-sucedidos.
Ciência é mudar crenças e perspectivas.
É gerar novas dúvidas, comprovar e refutar teorias.
Ciência é adquirir conhecimento. É crescer. É sobre ser resiliente.*

RESUMO

Inseticidas químicos tem papel fundamental no controle do *Aedes aegypti*. Em virtude do desenvolvimento de resistência pelos mosquitos e de toxicidade a organismos não-alvo, novos produtos são necessários. Produtos naturais são alternativas potenciais, tendo em vista a diversidade de metabólitos secundários e seus variados mecanismos de ação. Neste projeto, avaliou-se a atividade de extratos de *Vismia gracilis* em larvas, pupas e mosquitos adultos. Técnicas cromatográficas clássicas, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear e análises metabolômicas foram utilizadas para identificar compostos presentes no extrato ativo. O extrato hexânico das folhas apresentou atividade larvicida aumentada com o tempo de exposição: CL₅₀ de 46,48 µg/mL (24 h) e CL₅₀ de 20,57 µg/mL (48 h). Oito compostos presentes no extrato foram isolados e/ou anotados: as benzofenonas clusiafenona A (1), isovismiafenona B (2), mirtiafenona B (3) e um derivado de clusiafenona (4); e as antraquinonas crisofanol (5), fisciona (6), vismiaquinona (7) e vismiaquinona D (8). Os compostos 1, 2 e 5-7 não apresentaram atividade larvicida. Considerando que os compostos anotados, destacados pelas análises metabolômicas como importantes para o agrupamento de frações ativas do extrato, eram benzofenonas, investigamos a atividade da benzofenona comercial, que foi larvicida (CL₅₀ 16,35 µg/mL - 24 h). Esse resultado sugeriu que o núcleo benzofenônico, comum à classe, estivesse envolvido no mecanismo de toxicidade em larvas. A benzofenona apresentou também atividade adulticida (100% *knockdown* após 5 min) e de irritação por contato (22,78 % de escape a 25 nmol/cm²), o que reforça essa classe de compostos como potencial para o desenvolvimento de inseticidas.

Palavras-chave: *Vismia gracilis*, metabolômica, benzofenonas, antraquinonas, controle do *Aedes aegypti*, larvicida.

ABSTRACT

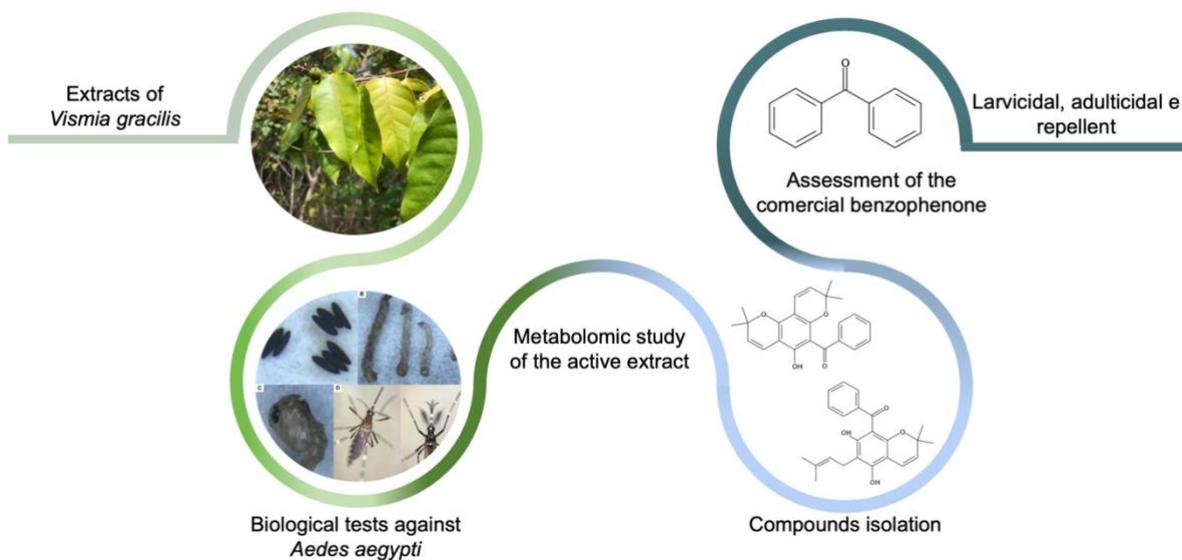
Chemical insecticides play a fundamental role in controlling *Aedes aegypti*. Due to the development of resistance by mosquitoes and toxicity to non-target organisms, new products are needed. Natural products are potential alternatives, given the diversity of secondary metabolites and their multiple mechanisms of action. In this project, we evaluated the activity of extracts of *Vismia gracilis* in larvae, pupae and adult mosquitoes. Classical chromatographic techniques, mass spectrometry, nuclear magnetic resonance and metabolomic analysis were used to identify compounds present in the active extract. The hexane extract of the leaves showed increased larvicidal activity with exposure time: LC50 of 46.48 µg/mL (24 h) and LC50 of 20.57 µg/mL (48 h). Eight compounds were isolated and/or annotated from the extract: the benzophenones clusiaphenone A (1), isovismiaaphenone B (2), myrtiaphenone B (3) and a clusiaphenone derivative (4); and the anthraquinones chrysophanol (5), physcion (6), vismiaquinone (7) and vismiaquinone D (8). Compounds 1, 2 and 5-7 did not show larvicidal activity. Considering the compounds annotated were significant for grouping the active fractions of the extract by the metabolomic analysis and classified as benzophenones, we investigated the activity of the commercial benzophenone. This compound was larvicidal (LC50 16.35 µg/mL - 24 h), suggesting the benzophenone moiety, common to the class, was involved in the mechanism of toxicity in larvae. Benzophenone also showed adulticidal activity (100% knockdown after 5 min) and contact irritancy (22.78% escape at 25 nmol/cm²), which supported this class of compounds for insecticides development.

Keywords: *Vismia gracilis*, metabolomics, benzophenones, anthraquinones, *Aedes aegypti* control, larvicide.

RESUMO GRÁFICO



GRAPHICAL ABSTRACT



LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Fotos de hospitais de campanha e profissionais de saúde da década de 1880 durante a construção do Canal do Panamá, em que doenças tropicais como a febre amarela tinham elevada taxa de mortalidade. Fotos expostas no Espaço *Aedes aegypti*, Museu do Canal do Panamá. Fonte: Fotos cedidas pelo Prof. João Paulo Barreto Sousa..... 19
- Figura 2 - Número de casos de dengue anual e proporção de casos severos na Região das Américas entre 1999 e 2020. Imagem traduzida de PAHO / WHO, 2020 (12)... 20
- Figura 3 - Estágios de desenvolvimento do *Ae. aegypti*. **A.** Ovos. **B.** Larvas (L1 a L4, da direita para a esquerda). **C.** Pupa. **D.** Mosquito adulto fêmea. **E.** Mosquito adulto macho. Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB..... 22
- Figura 4 – Fotos de árvore, arbusto e frutos de *Vismia gracilis* Hieron. (Hypericaceae). Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB 32
- Figura 5 – Foto de teste larvicida com larvas L3 de *Aedes aegypti* montado em placas de 12 poços. Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB..... 36
- Figura 6 - Desenho ilustrativo do aparato *HITSS* (96), utilizado para os testes de repelência espacial e de irritação por contato com fêmeas de *Aedes aegypti*. Na porção superior aparato montado para o teste de repelência espacial, e abaixo para o teste de irritação por contato. 1) Cilindro metálico externo com tratamento. 2) Cilindro transparente. 3) Tampas laterais com visor. 4) Conector. 5) Cilindro metálico interno com tratamento. 6) Rede de tratamento..... 38
- Figura 7 – Foto do aparato *HITSS* montado para teste de repelência espacial com fêmeas de *Aedes aegypti*. Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB. 40
- Figura 8 – Foto dos aparatos (*HITSS*) montados para teste de irritação por contato com fêmeas de *Aedes aegypti*. Tratamento à esquerda e controle à direita. Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB..... 41

Figura 9 – Foto da execução do teste aduicida com fêmeas adultas de <i>Aedes aegypti</i> em garrafas de acordo com o protocolo do CDC (99). Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB.....	42
Figura 10 – Foto da extração em fase sólida (<i>SPE</i> -diol e <i>SPE</i> -silica) do extrato ARBO0293. Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB.	44
Figura 11 – Esquemas de extração em fase sólida (<i>SPE</i> -diol e <i>SPE</i> -silica) do extrato ARBO0293.....	45
Figura 12 - Foto do equipamento de CLUE-EM/EM. Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB.....	47
Figura 13 – Fluxograma de obtenção dos compostos 1 e 2 a partir do extrato hexânico das folhas de <i>V. gracilis</i> (ARBO0293).	49
Figura 14 – Foto de processos cromatográficos para purificação dos compostos 1 e 2 . Fonte: fotos do autor - arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB.	50
Figura 15 - Foto do equipamento de CLAE. Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB.....	50
Figura 16 - Fluxograma de obtenção dos compostos 5 – 8 a partir do extrato hexânico das folhas de <i>V. gracilis</i> (ARBO0293).	52
Figura 17 – Foto do equipamento de Ressonância Magnética Nuclear. Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB.....	54
Figura 18 - Cromatograma de pico base (BPC) do extrato hexânico das folhas de <i>Vismia gracilis</i> (ARBO0293).....	60
Figura 19 - Cromatogramas de pico base (BPC) das frações ativas (vermelho) e inativas (verde) do extrato larvicida ARBO0293, obtidas por <i>SPE</i> para análise metabólica.	62
Figura 20 - <i>Volcano plot</i> . em rosa, íons significativos para diferenciação dos grupos de amostras ativas e inativas. No eixo y, teste-T (linha de corte = 0,05), e no eixo x fold-change (linha de corte = 2). À direita do gráfico, os íons presentes nas amostras	

ativas e, à esquerda, aqueles presentes nas amostras inativas. Em destaque com setas os compostos anotados: isovismiafenona B (<i>m/z</i> 365,1697), clusiafenona A (<i>m/z</i> 363,1605) e mirtiafenona B (<i>m/z</i> 379,1918).....	64
Figura 21 - PCA: em vermelho as amostras ativas agrupadas na porção superior do plano e, em verde, amostras inativas reunidas na porção inferior.	65
Figura 22 – Análise de agrupamento - mapa de calor: amostras agrupadas de acordo com a intensidade dos 50 íons mais importantes na diferenciação das amostras ativas e inativas (indicadas acima da primeira linha em vermelho e verde, respectivamente). Amostras estão dispostas em colunas e os íons em linhas. Análise de agrupamento hierárquica utilizando como medida de similaridade distância euclideana e algoritmo de agrupamento Ward. Cores mais quentes indicam maior intensidade do íon (eixo x) na amostra (eixo y).....	65
Figura 23 – A. PLS-DA: análise multivariada supervisionada que maximiza a separação entre as amostras. Em vermelho estão as frações ativas e em verde, as inativas. B. VIP SCORE: apresenta os íons importantes para separação dos grupos no PLS-DA. Em destaque os compostos anotados: clusiafenona A (<i>m/z</i> 363.1605), isovismiafenona B (<i>m/z</i> 365.1697), e o derivado de clusiafenona (<i>m/z</i> 381.1704). ..	66
Figura 24 - Estruturas dos compostos presentes no extrato larvicida ARBO0293 que foram anotados: clusiafenona A (1), isovismiafenona B (2), mirtiafenona B (3) e um derivado de clusiafenona (4): clusiafenona C (esquerda) ou clusiafenona D (direita).	68
Figura 25 - Fragmentação por ESI dos compostos 1 , 2 e 4 . No esquema, utilizou-se a Clusiafenona C como exemplo.	70
Figura 26 – Esquema das reações de síntese para obtenção de clusiafenona A.	71
Figura 27 - Espectro de RMN ¹ H 600 MHz da clusiafenona A (1).....	73
Figura 28 - Espectro de RMN ¹ H 600 MHz de isovismiafenona B (2).....	75
Figura 29 - Espectro de RMN ¹ H 600 MHz do crisofanol (5).....	78
Figura 30 - Espectro de RMN ¹ H 600 MHz da fisciona (6).....	79

Figura 31 - Espectro de RMN ¹ H 600 MHz da vismiaquinona (7).....	81
Figura 32 - Espectro de RMN ¹ H 600 MHz da vismiaquinona D (8).	83
Figura 33 – Compostos da classe das benzofenonas, naturais e sintéticos, testados em larvas de <i>Ae. aegypti</i> . O composto testado como benzofenona comercial (centro da figura) foi o único que apresentou atividade larvicida.	86
Figura 34 - Estereomicroscopia das larvas tratadas com extrato ARBO0293 e benzofenona. A. Larva controle. B. Larvas tratadas com o extrato. Em destaque (setas), papilas alteradas e presença de espaços no tubo digestivo, indicando desorganização celular. C. Larva tratada com a benzofenona, apresentando corpo hipertrofiado e presença de espaço no tubo digestivo (seta). D. Foco nos espaços indicando desorganização celular no tubo digestivo (seta) de larva tratada com benzofenona.	90
Figura 35 - Larvas tratadas com extrato ARBO0293 e benzofenona comparadas com a larva controle. A. Larva tratada com benzofenona (esquerda) e extrato (direita). B. Larva controle sem tratamento.	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos extratos de <i>V. gracilis</i> avaliados em <i>Aedes aegypti</i>	35
Tabela 2 - Atividade dos extratos de <i>Vismia gracilis</i> , testados a 250 µg/mL, em formas imaturas (larvas e pupas) de <i>Ae. aegypti</i>	56
Tabela 3 – Determinação dos valores de CL ₅₀ e CL ₉₅ do extrato hexânico das folhas de <i>V. gracilis</i> (ARBO0293) em larvas de <i>Ae. aegypti</i>	56
Tabela 4 – Avaliação da irritação por contato (<i>HITSS: HITSS: High-throughput screening system</i>) de extratos de <i>V. gracilis</i> (dose de 10%) em fêmeas de <i>Ae. aegypti</i>	58
Tabela 5 - Avaliação da repelência espacial (<i>HITSS: HITSS: High-throughput screening system</i>) de extratos de <i>V. gracilis</i> (dose de 10%) em fêmeas de <i>Ae. aegypti</i>	59
Tabela 6 - Rendimento das frações obtidas pela extração em fase sólida (<i>SPE</i> -diol e <i>SPE</i> -sílica) do extrato hexânico das folhas de <i>Vismia gracilis</i> (ARBO0293).....	60
Tabela 7 - Compostos presentes no extrato hexânico das folhas de <i>V. gracilis</i> anotados com base em seu perfil de fragmentação.	69
Tabela 8 - Dados de RMN ¹ H 600 MHz de clusiafenona A (1) e isovismiafenona B (2) comparados com a literatura.....	76
Tabela 9 - Dados de RMN ¹ H 600 MHz de crisofanol (5) e fisciona (6) comparados com a literatura.....	80
Tabela 10 - Dados de RMN ¹ H 600 MHz de vismiaquinona (7) e vismiaquinona D (8) comparados com a literatura.....	84
Tabela 11 – Determinação da CL ₅₀ do composto comercial benzofenona testado em larvas de <i>Ae. aegypti</i>	86
Tabela 12 - Avaliação da irritação por contato (<i>HITSS: High-throughput screening system</i>) do composto benzofenona (dose de 25 nmol/cm ²) em fêmeas de <i>Ae. aegypti</i>	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAP	<i>Automated Data Analysis Pipeline</i>
ATSB	<i>Attractive toxic sugar bait</i>
Bti	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
BPC	<i>Base peak chromatogram</i> (cromatograma de pico base)
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CL ₅₀	Concentração Letal 50%
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DEET	N,N-Dimetil-meta-toluamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDDA	<i>Ethylenediamine diacetate</i>
EM	Espectrometria de Massas
EP	Erro padrão
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
FC	<i>Fold change</i>
HITSS	<i>High-throughput screening system</i>
IC95%	Intervalo de Confiança 95%
KD	<i>Knockdown</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
PMD	<i>p</i> -mentano-3,8-diol

OMS	Organização Mundial da Saúde
PC	<i>Principal Component</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PLS-DA	<i>Partial Least Squares - Discriminant Analysis</i>
ppm	partes por milhão
RIDL	<i>Insects carrying a Dominant Lethal gene</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SAI	<i>Spatial Repellency index</i>
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
TOF	<i>Time of Flight</i>
TR	Tempo de retenção
UnB	Universidade de Brasília
UV	Ultravioleta
UR	Umidade relativa
VIP	<i>Variable Importance in Projection</i>
VIS	Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	18
1.2 O MOSQUITO <i>Aedes aegypti</i>	21
1.3 O CONTROLE VETORIAL.....	22
1.4 REPELENTES ESPACIAIS	24
1.5 PRODUTOS NATURAIS COMO ESTRATÉGIA PARA O CONTROLE DO <i>Aedes aegypti</i>	26
1.6 FERRAMENTAS METABOLÔMICAS NA INVESTIGAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS.....	28
1.7 A ESPÉCIE <i>Vismia gracilis</i>	29
2 OBJETIVOS.....	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 COLETAS DE <i>Vismia gracilis</i> E PRODUÇÃO DE EXTRATOS	34
3.2 TESTES BIOLÓGICOS.....	35
3.2.1 Criação dos mosquitos.....	35
3.2.2 Avaliação da Atividade Larvicida	36
3.2.2.1 Determinação da concentração letal (50% e 95%) das amostras ativas.....	37
3.2.3 Avaliação da Atividade Pupicida.....	37
3.2.4 Avaliação da Atividade Repelente Espacial e Irritação por Contato	37
3.2.4.1 Ensaios de Repelência Espacial	39
3.2.4.2 Ensaios de Irritação por Contato	41
3.2.5 Avaliação da Atividade Adulticida.....	42
3.3 ESTEREOMICROSCOPIA DAS LARVAS	43
3.4 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E ANÁLISE METABOLÔMICA	43
3.5 ISOLAMENTO DE COMPOSTOS.....	47
3.6 SÍNTESE DO COMPOSTO 1	53
3.7 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS OBTIDOS	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 ATIVIDADE DOS EXTRATOS DE <i>Vismia gracilis</i> EM LARVAS E PUPAS.....	55
4.2 ATIVIDADE DOS EXTRATOS DE <i>Vismia gracilis</i> EM ADULTOS	57
4.3 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE) E ANÁLISE METABOLÔMICA	59

4.4 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS A PARTIR DO EXTRATO ATIVO DE <i>Vismia gracilis</i>	71
4.5 ATIVIDADE LARVICIDA DOS COMPOSTOS OBTIDOS.....	85
5 CONCLUSÃO.....	91
6 REFERÊNCIAS.....	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

As arboviroses, como a dengue, a Zika, a chikungunya e a febre amarela são doenças infecciosas tropicais de grande impacto para a saúde pública (1). Elas podem ser desde assintomáticas, até levar o paciente a óbito. Os sintomas clássicos incluem doença febril, erupções cutâneas, artralgias, podendo desenvolver-se, em casos mais graves, síndromes hemorrágicas e neurológicas (2,3). Doenças transmitidas por mosquitos provocam mais vítimas anualmente do que guerras, terrorismo e violência armada combinados (4).

Historicamente, sabe-se que a presença do *Ae. aegypti* influencia o contágio por arboviroses trazendo inúmeros impactos para a civilização. Em 1880, por exemplo, quando se iniciou a construção do Canal do Panamá, considerado para aquela época o maior feito da engenharia de todos os tempos, um dos motivos que fizeram os franceses desistirem do projeto inicial foi a elevada taxa de mortalidade causada por doenças tropicais, em destaque a febre amarela (5). A figura 1 apresenta hospitais de campanha e profissionais de saúde da época em fotos que se encontram no Espaço *Aedes aegypti* do Museu do Canal do Panamá. Ainda, foi durante a II Guerra Mundial que se desenvolveram inúmeras pesquisas nos Estados Unidos sobre o efeito repelente de substâncias sintéticas em artrópodes, com o objetivo de proteger os soldados americanos nos locais de combate. As pesquisas culminaram com o desenvolvimento do DEET (N,N-Dimetil-meta-toluamida), o repelente tópico padrão ouro até hoje (6).

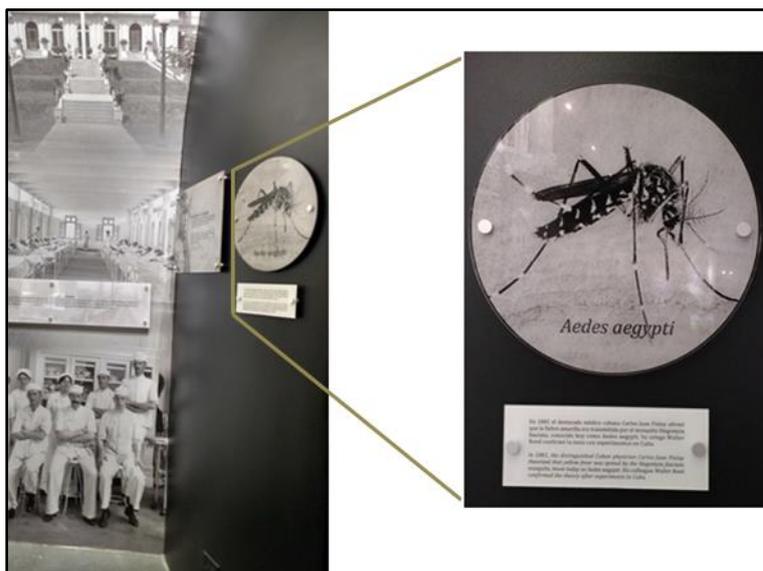


Figura 1 – Fotos de hospitais de campanha e profissionais de saúde da década de 1880 durante a construção do Canal do Panamá, em que doenças tropicais como a febre amarela tinham elevada taxa de mortalidade. Fotos expostas no Espaço *Aedes aegypti*, Museu do Canal do Panamá. Fonte: Fotos cedidas pelo Prof. João Paulo Barreto Sousa.

Fatores como mudanças climáticas, crescimento urbano desordenado e ampliação do intercâmbio internacional levaram à alteração da relação vírus-vetor-hospedeiro. Isso, por sua vez, aumentou a frequência de exposição de humanos aos mosquitos transmissores dos vírus associados ao desenvolvimento de tais doenças (arbovírus). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 390 milhões de casos de dengue ocorram todos os anos no mundo, e que esta arbovirose seja endêmica em mais de 100 países. Nas últimas duas décadas, a dengue e a febre chikungunya tornaram-se as arboviroses de maior relevância para a saúde pública, devido à taxa alarmante de expansão do número de casos (7–9).

Apesar de esforços e intervenções em nível mundial para redução das infecções, epidemias de arboviroses ainda são uma realidade preocupante (10). Estima-se que cerca de 4 bilhões de pessoas vivam em áreas de risco para transmissão de dengue (11). Em 2019, foram registrados mais de 3 milhões de casos de dengue na região das Américas, ultrapassando o recorde histórico alcançado entre 2015 e 2016 (Figura 2) (12). Para febre chikungunya, apenas no Brasil de dezembro de 2018 a agosto de 2019, foram registrados mais de 110 mil casos prováveis da doença (13).

Um estudo estimou a potencial aceleração do crescimento do número de mosquitos *Ae. aegypti* em função das alterações climáticas promovidas pelo aquecimento global. Os insetos vetores não são capazes de regular sua temperatura interna e, por isso, estão susceptíveis às variações climáticas do ambiente. De acordo com o estudo, entre os anos de 1950 e 2000, o mundo se tornou 1,5% mais susceptível ao desenvolvimento de *Ae. aegypti* por década desse período. A previsão

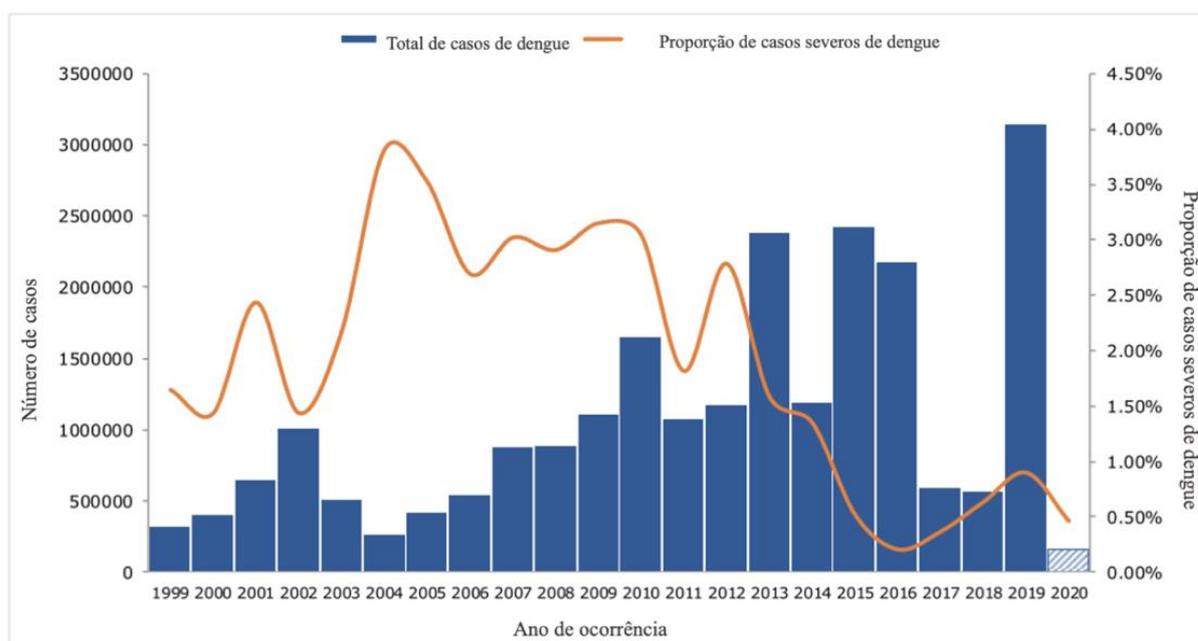


Figura 2 - Número de casos de dengue anual e proporção de casos severos na Região das Américas entre 1999 e 2020. Imagem traduzida de PAHO / WHO, 2020 (12).

é de que este percentual cresça para cerca de 4% até 2050. Esta condição ambiental mais favorável à proliferação dos mosquitos terá impacto direto na epidemiologia de arboviroses (14).

O controle dessas doenças pode ser pautado em duas principais vertentes. A primeira delas é focando no agente causador da doença, ou seja, os arbovírus. Isso inclui, por exemplo, aplicação de vacinas, uso de antivirais, e administração de medicamentos profiláticos em massa. Os tratamentos disponíveis para as arboviroses não são específicos, tão pouco capazes de curá-las, tratam-se apenas os sintomas. O desenvolvimento de alternativas profiláticas também não é trivial, somente a vacina contra febre amarela está bem estabelecida. (15). A segunda forma de mitigação das arboviroses é controlar a transmissão pelos vetores (16). O controle vetorial pode ser

mecânico, químico e/ou biológico (10,17). É nesse contexto que os produtos naturais entram como alternativas sustentáveis e menos tóxicas considerando organismos não alvo (18).

1.2 O MOSQUITO *Aedes aegypti*

Aedes aegypti é uma espécie de mosquito presente em regiões tropicais e subtropicais. Essa espécie de artrópode sofreu um processo de adaptação, a domesticação, e desenvolveu preferência por viver dentro de residências e alimentar-se em humanos (19). Outras espécies de *Aedes* antropofílicas, como *Ae. albopictus*, são importantes para a transmissão de arbovírus em regiões semi-urbanas e rurais, bem como em áreas de clima temperado (20). Essas espécies de *Aedes* são as mais relevantes para a transmissão de dengue nas Américas e Ásia (21).

O ciclo de vida do *Ae. aegypti* dura em torno de 28 dias, passando pelos estágios de ovo, larva, pupa e mosquito adulto (Figura 3). Ovos são lisos, longos e tem formato ovoide. As larvas possuem cabeça e tórax ovoides, abdome segmentado e, no segmento anal, há um sifão para respiração na superfície da água e estruturas de controle osmótico. O estágio larval é um período de alimentação e crescimento, sendo sua evolução influenciada pela temperatura da água, disponibilidade de alimento e densidade de larvas no recipiente. Esse estágio pode durar de 5 a 14 dias. Comparativamente, os machos se desenvolvem mais rapidamente do que as fêmeas. São quatro as fases larvais (L1, L2, L3 e L4), após a quarta o inseto atinge o estágio de pupa, que, diferentemente das larvas, não se alimentam. Em geral, as pupas levam dois dias para atingir a fase adulta, que é o estágio reprodutivo (21–23). O *Ae. aegypti* está entre os mosquitos com período de vida em água mais curto. Isso faz que pequenos recipientes com água sejam suficientes para seu desenvolvimento (22).

Na fase adulta, apenas as fêmeas de *Aedes* são hematófagas. O sangue permite o desenvolvimento dos ovos. Anatomicamente, os insetos possuem uma camada externa de cutícula, envolvendo a epiderme, que impede a perda de água. Receptores sensoriais estão presentes em localizações estratégicas e realizam a tradução dos estímulos do ambiente em sinais elétricos a serem interpretados pelo sistema nervoso central. O conjunto dos estímulos captados está associado à resposta

comportamental do mosquito (24). Entender como compostos químicos interferem no comportamento é desafiador, porém essencial no desenvolvimento de estratégias de

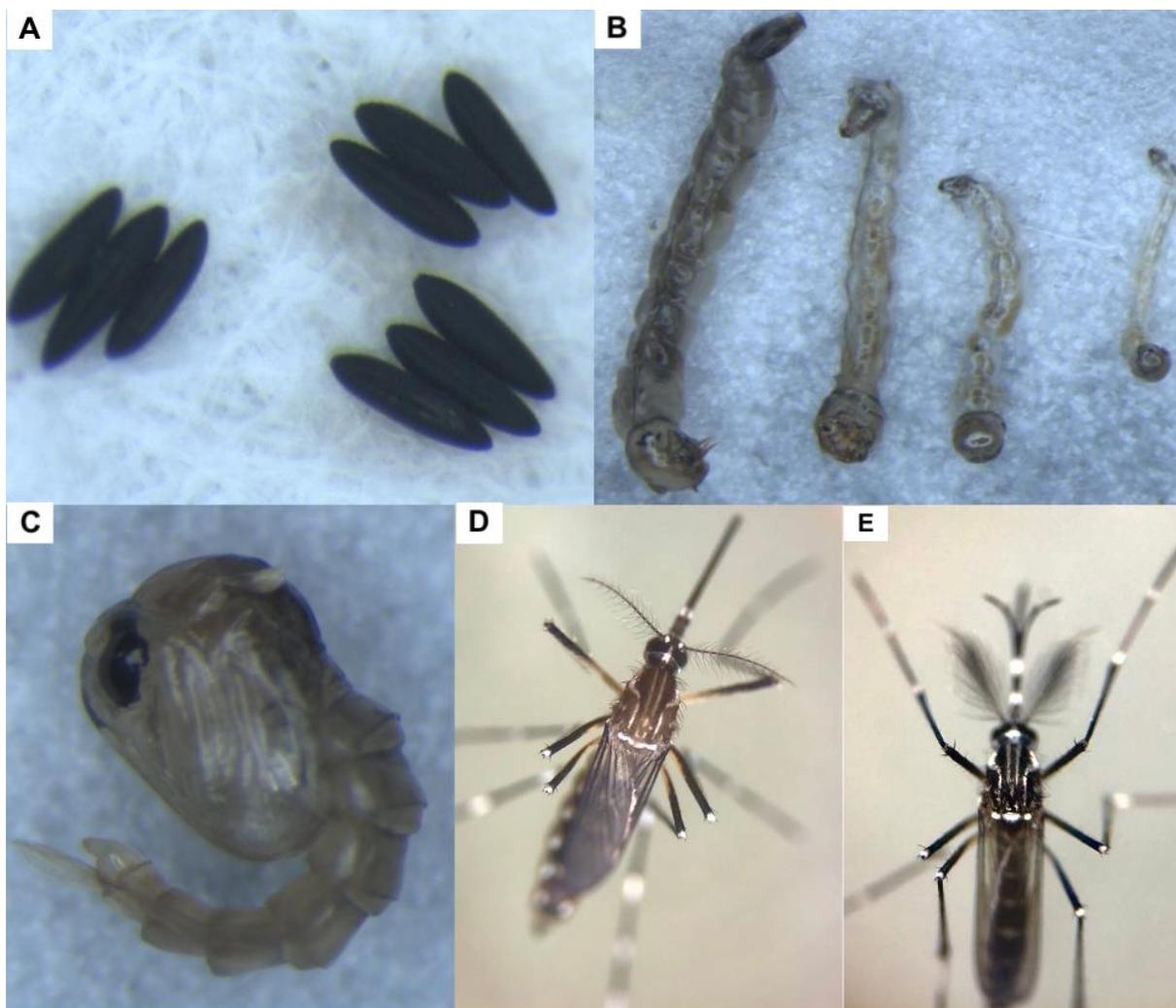


Figura 3 - Estágios de desenvolvimento do *Ae. aegypti*. **A.** Ovos. **B.** Larvas (L1 a L4, da direita para a esquerda). **C.** Pupa. **D.** Mosquito adulto fêmea. **E.** Mosquito adulto macho. Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB.

controle vetorial.

1.3 O CONTROLE VETORIAL

Atualmente, o controle do *Ae. aegypti* está pautado principalmente na utilização de inseticidas e no engajamento da comunidade em gerir o meio ambiente de forma a reduzir a proliferação do mosquito (25). O controle mecânico é a primeira estratégia

das vigilâncias ambientais em parceria com a população para destruir criadouros. O controle biológico, por sua vez, utiliza-se de predadores ou patógenos, principalmente agentes larvicidas, como o *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti). Segundo as Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue, o Bti passa a ser empregado nos municípios quando se detecta resistência a organofosforados, como o temefós (26). Peixes, como *Gambusia affinis*, anuros (sapos, rãs), copépodes (crustáceos) e outros animais podem ser utilizados em reservatórios de água por se alimentarem de ovos e larvas do mosquito, porém esses animais poderiam promover alterações nos ecossistemas onde estariam inseridos (27,28). Outras alternativas biológicas sugeridas para controle de larvas e mosquitos adultos são fungos como, *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. Contudo, elas têm custo muito superior aos inseticidas químicos (10).

Algumas estratégias inovadoras no controle da população vetorial incluem a soltura de mosquitos adultos infectados com a bactéria *Wolbachia*, que promovem a geração de ovos inviáveis por fêmeas infectadas, além de afetar a replicação viral no vetor (10). Estudos de campo já demonstraram a efetividade do processo em testes piloto em mais de dez países, incluindo o Brasil, pelo Projeto Eliminar a Dengue (29). Adicionalmente, existe uma técnica patenteada de modificação genética conhecida como *RIDL* - do inglês, liberação de insetos que carregam um gene letal dominante. A metodologia produz mosquitos machos transgênicos, cujos descendentes morrem ainda no estágio larval. Com o tempo, a expectativa é de que a população vetorial seja reduzida (30). A soltura já foi realizada em regiões da Malásia, Brasil e ilhas Cayman com resultados positivos (31,32). Há também pesquisas envolvendo mosquitos estéreis, além de armadilhas de oviposição para matar fêmeas (10) e iscas tóxicas – *ATSB*, do inglês iscas atraentes açucaradas tóxicas (10,33).

Em locais de epidemia, a principal estratégia para controle do mosquito continua sendo o controle químico, por meio da aplicação espacial de produtos que provocam a rápida mortalidade dos insetos adultos. Os inseticidas recomendados são majoritariamente piretroides, o que torna um desafio prevenir o desenvolvimento de resistência pelos insetos vetores com o uso extensivo dessa classe de produtos (10). Um estudo de revisão relatou resistência a quatro classes de inseticidas atualmente disponíveis - carbamatos, organoclorados, organofosforados e piretroides - nas Américas, África e Ásia. Os mecanismos de resistência envolvidos estão relacionados

a mutações e ao aumento da destoxificação dos inseticidas (25). O organofosforado temefós, por exemplo, foi utilizado como única forma de controle larval de *Ae. aegypti* durante mais de três décadas no Brasil e, em virtude da resistência, não é incluído nas ações de controle vetorial em diversos locais (34). Para otimizar e prolongar a vida útil de inseticidas, a OMS recomenda combinar estratégias com variados mecanismos de ação e que atuem em diferentes fases de desenvolvimento do mosquito (35).

O controle de larvas com compostos químicos também é amplamente realizado como estratégia primária para o controle do *Ae. aegypti*. Utilizam-se reguladores de crescimento, como piriproxifeno, novaluron, diflubenzuron (26,36,37); e espinosade, um bioinseticida que atua no sistema nervoso dos insetos (38).

A utilização de inseticidas, apesar de contribuir para o controle das doenças transmitidas por mosquitos, pode causar toxicidade a organismos não-alvo e acumulação no meio ambiente (33,39,40). Nesse sentido, e em decorrência do aumento da resistência dos vetores aos produtos disponíveis no mercado, faz-se urgente a busca por inseticidas com novos mecanismos de ação e formas de aplicação. Produtos estes que devem ser eficientes, não tóxicos para organismos não-alvo e sustentáveis, para que sejam incluídos como parte do manejo integrado de controle do *Aedes* (25,41).

1.4 REPELENTES ESPACIAIS

Historicamente, o desenvolvimento de inseticidas baseou-se no estudo de compostos potencialmente tóxicos para mosquitos, ou seja, que provocavam a morte do inseto. Contudo, inseticidas podem exercer outros efeitos independentes de toxicidade sobre o comportamento dos vetores, como irritação por contato e repelência espacial. Esses efeitos devem ser igualmente quantificados e avaliados em projetos que visam o desenvolvimento de produtos inovadores, tendo em vista seu potencial para o manejo de vetores (42,43).

Repelência espacial é definida como o movimento orientado de mosquitos na direção oposta a um estímulo químico, sem que haja a necessidade de contato físico entre o inseto e a superfície tratada (44,45). Os produtos são delineados para emanar os ingredientes ativos para o ambiente, criando espaços livres de vetores. O tratamento visa inibir a entrada de fêmeas à procura de hospedeiros em uma casa, por exemplo, para se alimentarem de indivíduos suscetíveis. Isso contribui, por sua vez, para a redução da transmissão de arboviroses (16,45).

Um dos benefícios da utilização de repelentes espaciais é que eles são normalmente utilizados em doses inferiores às doses tóxicas do ingrediente ativo, ou seja, o objetivo não é matar os mosquitos, mas repeli-los. Dessa forma, o desenvolvimento de resistência é mais lento, devido à menor pressão seletiva sobre os insetos. Adicionalmente, o uso de doses menores também promove menos toxicidade para mamíferos e outros organismos não-alvo. Por último, por serem dispositivos que emanam os ingredientes ativos passivamente no ambiente, sua aplicação é pontual e não necessita de contato direto com o vetor, o que pode facilitar sua distribuição (46).

Repelentes espaciais podem ser desenvolvidos a partir de ingredientes ativos já disponíveis, ao contrário de outras estratégias que necessitam de ser desenvolvidas de maneira completamente inovadora. Isso pode contribuir para redução dos custos do produto (16). Compostos já empregados no controle de *Ae. aegypti*, como alguns piretroides, demonstraram atividade repelente espacial importante (42,47). O DDT, historicamente utilizado no combate à malária e banido em muitos países, por sua persistência no ambiente e toxicidade não-alvo (40), possui como mecanismo de ação primário a repelência espacial, sendo ativo de forma repelente mesmo em linhagens do campo sabidamente resistentes a sua ação tóxica (42). A OMS atualmente acompanha estudos clínicos em campo que avaliam a eficiência de um protótipo que emana passivamente transflutrina, um inseticida da classe dos piretroides. Este ingrediente ativo já é comercializado mundialmente como aduictida. Os estudos buscam comprovar os efeitos epidemiológicos do ativo como repelente espacial sobre a incidência de malária e dengue nas regiões de teste (48,49).

Tendo em vista as atividades repelentes previamente reportadas na literatura para produtos naturais, bem como a atividade repelente já detectada em produtos comercialmente disponíveis, ratifica-se a importância da inclusão em programas de

screening de experimentos que avaliem os efeitos comportamentais de mosquitos. A avaliação de compostos baseada exclusivamente em seu efeito tóxico, durante a etapa de desenvolvimento de produtos para controle vetorial, certamente prejudicou a expansão do arsenal químico disponível atualmente (16,42,43).

1.5 PRODUTOS NATURAIS COMO ESTRATÉGIA PARA O CONTROLE DO *Aedes aegypti*

Produtos naturais são reconhecidos como fontes importantes de novos inseticidas, haja vista a complexidade dos metabólitos secundários. As diversidades químicas de seus grupos funcionais e farmacofóricos estão associadas à eficácia e a propriedades farmacocinéticas e toxicológicas singulares (50,51). As evidências relacionadas à atividade biológica das plantas embasam-se principalmente na produção de metabólitos secundários como mecanismo próprio de defesa contra o ataque de insetos (52).

Compostos naturais foram descritos na literatura com ação em diferentes fases de desenvolvimento de mosquitos (7,18,53,54). Diversas classes de metabólitos secundários foram associadas à atividade em *Ae. aegypti*: ácidos fenólicos, lignanas, flavonoides, fenilpropanoides, cumarinas, antraquinonas, xantonas, naftoquinonas, alcaloides, esteroides, lactonas, terpenos, benzofenonas e compostos alifáticos (28,52,54). Óleos essenciais têm especial destaque nas pesquisas sobre controle vetorial, com achados que incluem repelência, atividade inseticida, retardo da reprodução e regulação do crescimento dos insetos. Alguns exemplos são citronela, cálamo, tomilho, lavanda, neem e eucalipto (16,52).

A atividade larvicida de compostos naturais pode envolver mecanismos distintos, como neutralização do sistema detoxificante, neurotoxicidade, inibição do apetite e da respiração mitocondrial, alteração do desenvolvimento, da atividade motora, entre outros. Algumas classes exercem mais de um mecanismo simultaneamente, e, por isso, podem retardar o desenvolvimento de resistência pelo inseto (28).

Apesar do uso tradicional e milenar de produtos naturais e de inúmeras comprovações científicas sobre sua ação em mosquitos, o número de inseticidas naturais comercializados chega a ser irrisório quando comparado às riquezas naturais disponíveis no mundo, principalmente em regiões tropicais (52). Estimativas indicam que uma única planta pode produzir de 5 a 25.000 compostos e que o reino vegetal, como um todo, pode produzir de 200 mil a 1 milhão de metabólitos diferentes (55–57). Receptores sensíveis a compostos derivados de plantas presentes em *Ae. aegypti* já foram descritos, por isso entender a interação entre mosquitos e plantas é importante para aprofundar os conhecimentos que embasam o desenvolvimento de novos produtos para controle do vetor (58). Um exemplo de produto natural que tem sido utilizado no Brasil para manejo integrado de *Ae. aegypti* é o óleo de neem (59). Como repelente tóxico, tem-se o PMD (*p*-mentano-3,8-diol), que é derivado do óleo de eucalipto limão (16,60).

A complexidade das estruturas químicas naturais, bem como a presença de misturas de metabólitos com atuação sinérgica são importantes estratégias para dificultar o desenvolvimento de resistência pelos insetos alvo (61,62). Comercialmente, os inseticidas sintéticos possuem um relevante espaço de mercado. No entanto, a grande maioria destes compostos comumente estão associados a destruição de micro-flora e fauna, redução da produção de grãos, persistência no ambiente, além da toxicidade para humanos, animais selvagens e abelhas (52). Dessa forma, o apelo de não toxicidade a organismos não-alvo, sustentabilidade, meia-vida residual mais curta em superfícies tratadas e ação seletiva têm reforçado as pesquisas com foco no desenvolvimento de inseticidas a partir de produtos naturais (16,47,63–66). Apesar de haver muitos estudos que comprovem a eficácia dos produtos naturais em *Ae. aegypti* (18,28,67–69), faltam pesquisas que avaliem seus efeitos a campo e impacto epidemiológico na incidência de arbovirose (28).

Por fim, o estudo de plantas com atividade biológica pode ancorar projetos de síntese ou semi-síntese baseadas em estruturas naturais, além de promover a obtenção de extratos padronizados ou frações enriquecidas com compostos ativos. Os extratos podem ser atrativos pela facilidade de aplicação na forma de *spray*, quando permitem fácil diluição em solventes como a água. Mesmo a comercialização de plantas secas pode ser uma estratégia economicamente mais viável em países em desenvolvimento e contribuir para o mercado local (52).

1.6 FERRAMENTAS METABOLÔMICAS NA INVESTIGAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS

Durante as etapas de pesquisa e desenvolvimento de inseticidas a partir de produtos naturais, ferramentas quimiométricas empregadas em estudos metabolômicos podem ser utilizadas como estratégias para otimizar processos de identificação de metabólitos secundários com alguma atividade biológica de interesse (68,70). A metabolômica é uma ciência que fornece o estado metabólico de um sistema biológico sob certas condições ambientais, traçando um perfil de compostos (71,72). Na maioria dos casos, são realizados estudos para diferenciar metabolomas de grupos distintos, por exemplo, controle *versus* teste ou ativo *versus* inativo. Observações são realizadas, por meio de análises estatísticas complexas, para identificar as diferenças entre os grupos. Essas análises são aplicadas aos dados adquiridos geralmente por experimentos de espectrometria de massas ou ressonância magnética nuclear (72,73).

Abordagens metabolômicas são utilizadas com diversas aplicações. Um exemplo é seu emprego como ferramenta quimiotaxonômica. Um estudo apresentou a divisão entre espécies de *Tabebuia sensu lato* a partir da diferenciação de mudanças metabólicas nos indivíduos. As análises estatísticas permitiram a segregação das espécies em *Tabebuia* e *Handroanthus* e, portanto, mostraram-se importantes no estudo da evolução das espécies (74). Um segundo exemplo são as aplicações na indústria alimentícia, onde a metabolômica pode ser utilizada no controle de qualidade dos alimentos. Um estudo utilizou-se das análises estatísticas para avaliar a presença de antioxidantes e outros metabólitos em *ketchups* orgânicos e convencionais, sendo capaz de agrupá-los de acordo com a origem dos tomates utilizados em cada categoria de produto (75). Outras análises foram capazes de identificar compostos inéditos em tomates e determinar quais tipos de metabólitos estão mais presentes na pele em comparação com a porção carnosa do fruto (76). Uma outra aplicação da

metabolômica é na clínica, com a detecção de biomarcadores, desenvolvimento de novos tratamentos e diagnósticos (77).

No que tange produtos naturais, a metabolômica permite identificar compostos a partir de uma avaliação holística de amostras vegetais. Os produtos naturais são conhecidos como uma rica fonte para descoberta de novos compostos. Contudo a presença de um grande número de metabólitos nessas amostras muitas vezes dificulta o isolamento dos compostos bioativos. Nesse sentido, as análises metabolômicas associadas a testes biológicos das amostras proporcionam estudar misturas complexas sem a necessidade de isolamento dos metabólitos (78). Inicialmente, amostras biológicas são analisadas por técnicas de separação, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), acopladas a instrumentos analíticos, como o espectrômetro de massas. A espectrometria de massas (EM) é a técnica de análise mais utilizada na metabolômica, tendo em vista a rápida obtenção dos dados, alta sensibilidade e seletividade (77). Uma grande quantidade de dados é gerada e, por isso, *softwares*, como o MZmine são utilizados no pré-processamento dos dados e geração de um compilado em forma de matriz contendo os íons detectados nas amostras, seus respectivos tempos de retenção e intensidades (79). Em seguida, análises estatísticas auxiliam na visualização dos dados e identificação de potenciais compostos de acordo com o objetivo que se propõe (80). Plataformas online gratuitas, como o MetaboAnalyst, facilitam a realização de análises estatísticas complexas por pesquisadores que não são especialistas na área (81). A interpretação biológica dos dados tem por objetivo estabelecer hipóteses que respondam questões levantadas no início do fluxograma de trabalho. Para confirmar essa interpretação dos dados, uma confirmação biológica é recomendada (77).

1.7 A ESPÉCIE *Vismia gracilis*

Vismia gracilis Hieron (Figura 4), também conhecida como *Vismia amazonica*, e popularmente como “lacre”, é uma espécie com ocorrência em diversas regiões da América Latina (82–85). Esta espécie foi por muito tempo considerada parte da família

Clusiaceae, até que estudos filogenéticos fundamentaram a determinação do gênero *Vismia* como Hypericaceae (86). A família Hypericaceae possui 9 gêneros, dentre eles *Vismia* Vand. com aproximadamente 60 espécies com porte entre 1 e 15 metros de altura (87).

Cinco estados brasileiros possuem levantamento das espécies de Hypericaceae: Bahia, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo. Contudo, as espécies de *Vismia* Vand. são mais frequentes na região amazônica (88). *Vismia gracilis*, por sua vez, tem ocorrências distribuídas principalmente no norte e centro-oeste, sendo a Floresta Amazônica e o Cerrado seus domínios fitogeográficos (82). Além do Brasil, esta planta também pode ser encontrada na Colômbia, Venezuela, Bolívia, Peru e Equador (83). As espécies caracterizam-se por pequenas árvores ou arbustos de até 2 metros de altura, inflorescências terminais com cerca de 30 flores heterostílicas de ápice agudo e base truncada (88).

Cerca de 160 compostos químicos foram reportados em espécies do gênero *Vismia*. A maioria deles possui estruturas químicas aromáticas com funções oxigenadas, pertencentes às classes das antronas, xantonas e antraquinonas que são resultantes da via biossintética do acetato. Alguns flavonoides e benzofenonas, originados da combinação das vias do acetato malonato e shikimato; e terpenos, provenientes da via biossintética do ácido mevalônico, também já foram reportados (85,89–91). As espécies mais estudadas do gênero são *V. guineensis*, *V. guaramirangae* e *V. laurentii*. Uma característica marcante do gênero é a presença de um látex laranja que exsuda quando se faz uma incisão em qualquer parte da planta (87).

No que tange às atividades biológicas reportadas para *Vismia*, as mais comuns são antimicrobiana e antioxidante. Outros estudos sugeriram também ações cardiotônica, hipotensora, anti-nociceptiva, analgésica e anti-HIV (87,89). Tradicionalmente, espécies de *Vismia* são utilizadas para tratar ulcerações, febres, infecções fúngicas, herpes e como laxativos (87,90). Na literatura, há estudos de recuperação de áreas de pastagem incluindo *V. gracilis* (92), porém pouco se sabe sobre constituintes químicos e atividades biológicas dessa espécie.

Uma revisão revelou que 429 espécies de plantas foram testadas em larvas de mosquitos. Contudo a maioria delas pertencia às famílias Asteraceae, Lamiaceae, Fabaceae e Rutaceae. Apenas dois estudos desta revisão abordaram testes com

espécies de Hypericaceae (28). Extratos de *Vismia gracilis* (Hypericaceae) foram selecionados do Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado (Laboratório de Farmacognosia), após um *screening* da atividade em larvas de *Aedes aegypti*, em que alguns extratos tiveram resultados positivos. Este trabalho apresenta cinco diferentes testes, com formas imaturas e adulta de *Ae. aegypti*, em que foram avaliados 14 extratos de *V. gracilis*, envolvendo a utilização de estratégias metabolômicas para o estudo químico inédito desta espécie.



Figura 4 – Fotos de árvore, arbusto e frutos de *Vismia gracilis* Hieron. (Hypericaceae).
Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB

2 OBJETIVOS

Esta dissertação está inserida no projeto ArboControl, uma parceria entre a Universidade de Brasília e o Ministério da Saúde, que busca alternativas para o controle do *Ae. aegypti* por meio da prospecção de ativos da biodiversidade brasileira e de países parceiros. O **objetivo geral** é conhecer a diversidade química de *Vismia gracilis* e a atividade de seus extratos e compostos em *Ae. aegypti*.

Os **objetivos específicos** deste trabalho foram:

- Avaliar as atividades larvicida, pupicida e adulticida de extratos brutos e compostos;
- Estudar a repelência espacial e a irritação por contato dos extratos e compostos;
- Anotar e obter compostos presentes no extrato ativo, com base em análises metabolômicas;
- Encontrar compostos com atividade biológica;
- Identificar compostos do extrato para enriquecer o conhecimento da espécie.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETAS DE *Vismia gracilis* E PRODUÇÃO DE EXTRATOS

A coleta de *Vismia gracilis* Hieron. que deu origem aos extratos testados em *Ae. aegypti* ocorreu em Santo Antônio do Descoberto - Goiás, Brasil, em agosto de 2007, pelo botânico Prof. José Elias de Paula (*in memoriam*) que também foi responsável pela identificação da espécie. Sua exsicata foi depositada no Herbário da Universidade de Brasília, sob número UB 3769. As partes das plantas foram secas, pulverizadas e os extratos foram produzidos por maceração. Foram utilizados casca do caule, madeira do caule, casca da raiz, madeira da raiz, folha e fruto em variados solventes: hexano, acetato de etila, etanol e água. As soluções extrativas foram concentradas em um evaporador rotativo, e as soluções aquosas foram secas com auxílio de liofilizador. Os extratos brutos resultantes, como descrito na tabela 1, foram armazenados a -20 °C como parte do Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado do Laboratório de Farmacognosia – UnB.

Em março de 2020, houve nova coleta de folhas de *V. gracilis*. Esta foi realizada na Reserva Ecológica Vargem Grande em Pirenópolis – Goiás, Brasil. Após secagem e pulverização das folhas, foi produzido novo extrato hexânico (ARBO0293b) por maceração, conforme metodologia descrita acima.

Tabela 1. Descrição dos extratos de *V. gracilis* avaliados em *Aedes aegypti*

Código do extrato	Parte vegetal	Solvente extrator
ARBO0286	casca do caule	hexano
ARBO0287	casca do caule	água
ARBO0288	casca do caule	etanol
ARBO0289	casca do caule	acetato de etila
ARBO0290	madeira da raiz	hexano
ARBO0291	casca da raiz	etanol
ARBO0292	folha	acetato de etila
ARBO0293	folha	hexano
ARBO0294	folha	etanol
ARBO0296	fruto	hexano
ARBO0297	fruto	acetato de etila
ARBO0298	madeira do caule	acetato de etila
ARBO0299	madeira do caule	etanol
ARBO0300	madeira do caule	hexano
ARBO0293b	folha	hexano

3.2 TESTES BIOLÓGICOS

3.2.1 Criação dos mosquitos

A colônia de *Aedes aegypti* (Rockefeller) foi mantida no Insetário ArboControl – UnB, sob temperatura e umidade relativa do ar controladas (26 ± 4 °C e $70 \pm 10\%$), com fotoperíodo de 12 horas. Após eclosão dos ovos, as larvas foram colocadas em bandejas plásticas (50 x 35 x 8 cm) e alimentadas com ração de peixe. As pupas fêmeas e machos foram separadas, com auxílio de um estereomicroscópio, para montagem das gaiolas na proporção 1:3 de machos e fêmeas, respectivamente. Os adultos foram alimentados com solução açucarada a 10% (peso/volume) e sangue de

égua, gentilmente fornecido pelo Hospital Veterinário da UnB. Os ovos foram coletados, secos e armazenados para novas eclosões e manutenção da colônia.

3.2.2 Avaliação da Atividade Larvicida

Os testes larvicidas foram realizados em placas de 12 poços, contendo 10 larvas no estágio L3 de desenvolvimento por poço com 3 mL de água deionizada (Figura 5). Em cada poço, foram aplicados 50 µL das amostras, previamente diluídas em DMSO (dimetilsulfóxido), para obtenção das concentrações finais desejadas. O percentual de mortalidade das larvas foi avaliado após 24 e 48 horas do tratamento (68).

Para *screening* da atividade larvicida, os extratos foram testados a 250 µg/mL, as frações a 125 µg/mL, e os compostos purificados a 25 µg/mL. As amostras foram consideradas ativas quando a taxa de mortalidade era $\geq 80\%$. Os testes foram realizados em quadruplicata. Como controle positivo foi usado o inseticida organofosforado temefós (Sigma Aldrich, Suíça) e, como controle negativo, foi usado o DMSO $< 2\%$.



Figura 5 – Foto de teste larvicida com larvas L3 de *Aedes aegypti* montado em placas de 12 poços. Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB

3.2.2.1 Determinação da concentração letal (50% e 95%) das amostras ativas

A determinação do CL₅₀ e CL₉₅ (concentrações letais para 50 e 95% das larvas respectivamente) de amostras ativas, ou seja, que apresentaram mortalidade $\geq 80\%$ na fase de *screening*, foi realizada por análise Probit utilizando o *software* RStudio® (93,94). Para o extrato ativo foram utilizadas 6 concentrações entre 250 e 7,8 $\mu\text{g/mL}$; e, para a benzofenona, 5 concentrações entre 25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$. As amostras tiveram suas quadruplicatas testadas em três lotes diferentes de larvas da mesma linhagem (95).

3.2.3 Avaliação da Atividade Pupicida

O ensaio com pupas foi realizado também em placas de 12 poços, em quadruplicata, nas mesmas especificações dos testes larvicidas, porém com 5 pupas de *Ae. aegypti* (Rockefeller) com no máximo 24 horas de vida, por poço. Os extratos foram avaliados a 250 $\mu\text{g/mL}$. O percentual de mortalidade foi observado após 24 e 48 horas de exposição às amostras, e o desenvolvimento das pupas foi acompanhado até que o controle (DMSO < 2%) virasse mosquito.

3.2.4 Avaliação da Atividade Repelente Espacial e Irritação por Contato

O protocolo de testes de repelência seguiu o Guia para Testes de Eficácia de Repelentes Espaciais, da Organização Mundial de Saúde (96). O aparato (*High-Throughput Screening System – HITSS*) utilizado nos testes possuía cinco componentes modulares facilmente ajustados para cada tipo de teste: irritação por contato ou repelência espacial (97). Dentre os componentes mostrados na figura 6 estão: tampas laterais com visores transparentes e orifício para inserção dos mosquitos, um cilindro transparente, conectores com válvulas borboletas giratórias

para abrir e fechar, um cilindro de metal externo e um cilindro interno de metal, onde era inserida a rede tratada com a amostra de interesse. Uma unidade completa para um teste de Repelência espacial tinha um cilindro transparente com dois cilindros de metal ligados lateralmente a ele. Para irritação por contato, a unidade possuía um cilindro de metal externo, com um interno contendo a rede tratada, ligado a um cilindro transparente (Figura 6).

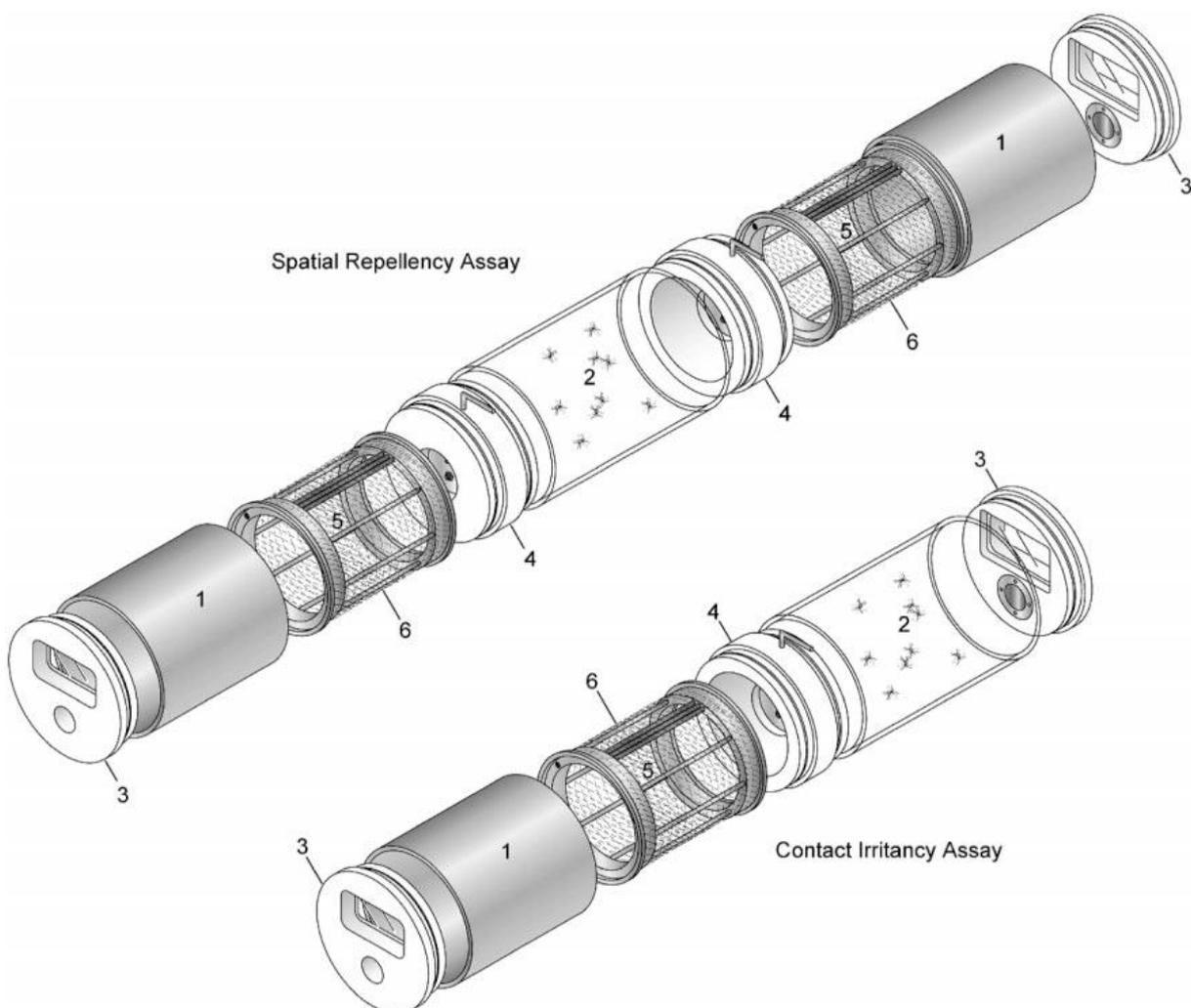


Figura 6 - Desenho ilustrativo do aparato *HITSS* (96), utilizado para os testes de repelência espacial e de irritação por contato com fêmeas de *Aedes aegypti*. Na porção superior aparato montado para o teste de repelência espacial, e abaixo para o teste de irritação por contato. 1) Cilindro metálico externo com tratamento. 2) Cilindro transparente. 3) Tampas laterais com visor. 4) Conector. 5) Cilindro metálico interno com tratamento. 6) Rede de tratamento.

Os testes foram realizados com fêmeas *Ae. aegypti* (Liverpool), com colônia estabelecida na *University of Notre Dame* (South Bend, Indiana, Estados Unidos), durante período de capacitação pelo programa Capes PrInt.

Os mosquitos foram mantidos a 27 °C, 80% umidade relativa do ar, com fotoperíodo de 12 horas. Grupos de fêmeas de 4 a 7 dias de vida foram separados em recipientes e alimentados com solução açucarada a 10% (p/v) até o dia anterior aos testes. Para os testes de irritação por contato, foram utilizadas 10 ± 2 fêmeas por replicata; para a repelência espacial, 20 ± 2 fêmeas. Como controle positivo foi utilizado o PMD (*p*-mentano-3,8-diol) a 20% (v/v), e como controle negativo o solvente em que era diluída a amostra, etanol ou acetona.

3.2.4.1 Ensaio de Repelência Espacial

O cilindro transparente foi conectado lateralmente a dois cilindros de metal, por meio dos conectores, que facilitavam a movimentação dos mosquitos em direção às extremidades do aparato. Os grupos de 20 ± 2 mosquitos foram introduzidos no cilindro central transparente, com as válvulas dos conectores fechadas. O cilindro central foi coberto e os mosquitos foram deixados em repouso por 30 segundos. Em seguida, as válvulas foram abertas por 10 minutos. Após esse período de tempo em que os mosquitos tinham livre voo pelo aparato, as válvulas foram fechadas e contou-se o número de mosquitos em cada cilindro metálico. O número de mosquitos que apresentaram *knockdown* (KD) nos três cilindros foi observado. Os mosquitos foram considerados KD quando estavam posicionados lateralmente e incapazes de se levantar quando o aparato era movimentado durante a leitura do teste. A figura 7 apresenta o aparato de teste de repelência espacial sendo utilizado no momento do ensaio.

Foram realizadas nove replicatas para cada amostra avaliada. Os extratos foram avaliados a 10% (p/v) diluídos em etanol ou acetona, e a benzofenona a 25 nmol/cm² em acetona. O índice de repelência espacial (SAI) foi expresso pela seguinte expressão:

$$SAI = \frac{(Nc - Nt)}{(Nc + Nt)}$$

Onde:

Nc corresponde ao número de mosquitos no cilindro controle;

Nt corresponde ao número de mosquitos no cilindro com tratamento.

Este índice (SAI) pode variar de -1 a 1, sendo que 0 (zero) indica que não houve resposta; -1 indica que todos os mosquitos entraram no cilindro com tratamento, ou seja, houve um efeito atrativo; e 1 indica que todos os mosquitos ficaram no cilindro controle, resultando em atividade repelente espacial.

Os dados foram analisados por um teste não paramétrico de postos com sinais (*signed-rank*), PROC UNIVARIATE, para determinar se a média do índice de repelência espacial (SAI) de cada tratamento foi diferente de zero, no *software* SAS Studio® (98).



Figura 7 – Foto do aparato *HITSS* montado para teste de repelência espacial com fêmeas de *Aedes aegypti*. Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB.

3.2.4.2 Ensaio de Irritação por Contato

Um cilindro transparente foi conectado a um cilindro de metal com tratamento utilizando-se um conector, de modo a obter uma unidade de teste. Os grupos de 10 ± 2 fêmeas foram introduzidos na porção metálica, o cilindro transparente e as tampas laterais foram cobertas e os mosquitos repousaram por 30 segundos antes do início do teste. A válvula borboleta do conector foi aberta durante 10 minutos, e então fechada. O número de mosquitos em cada porção do aparato foi anotado, bem como o número de indivíduos que apresentou *knockdown*. Foram realizadas 6 replicatas para cada tipo de tratamento. Um controle foi realizado ao mesmo tempo para cada experimento. A figura 8 mostra a realização do teste de irritação por contato, com os aparatos de tratamento e controle lado a lado. Calculou-se o percentual de escape dos mosquitos do cilindro tratado em direção ao transparente. Esse percentual foi corrigido pela mortalidade no cilindro tratado e escape no cilindro controle.

Os dados foram analisados usando o teste de *Wilcoxon*, PROC NPAR1WAY, para avaliar a diferença entre o número de mosquitos que escaparam dos cilindros controle e teste. Utilizou-se o *software SAS Studio®* (98).



Figura 8 – Foto dos aparatos (*HITSS*) montados para teste de irritação por contato com fêmeas de *Aedes aegypti*. Tratamento à esquerda e controle à direita. Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB.

3.2.5 Avaliação da Atividade Adulticida

Os testes foram realizados com fêmeas de *Ae. aegypti* (Liverpool), com colônia estabelecida em *University of Notre Dame* (South Bend, Indiana, Estados Unidos), de acordo com as diretrizes de avaliação de resistência a inseticidas do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (99). Os mosquitos foram mantidos a 27 °C, 80% umidade relativa do ar, com fotoperíodo de 12 horas. Os grupos de 25 fêmeas de 4 a 7 dias de vida foram separados em recipientes e alimentados com solução açucarada 10% (p/v) até o dia anterior ao teste.

Os testes foram realizados em quadruplicata em garrafas de vidro de 250 mL (Wheaton Science, Millville, NJ) (9), nas quais foram inseridos os mosquitos. Os extratos foram solubilizados em acetona ou etanol, obtendo-se a concentração de 500 µg/ mL. Uma alíquota de 1 mL desta solução foi utilizada para impregnar cada garrafa, incluindo a tampa. Para a benzofenona, aplicou-se 1,5 mL da mesma solução preparada para realização dos testes repelentes com o *HITSS* a 25 nmol/cm². As garrafas foram completamente secas, à temperatura ambiente, antes da inserção dos mosquitos. O controle foi realizado impregnando-se 2 garrafas para cada 4 garrafas teste, com o mesmo solvente utilizado para solubilizar a respectiva amostra. Uma foto da realização do teste está representada na figura 9.



Figura 9 – Foto da execução do teste adulticida com fêmeas adultas de *Aedes aegypti* em garrafas de acordo com o protocolo do CDC (99). Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB.

O número de mosquitos que apresentaram *knockdown* foi observado a cada 5 minutos na primeira hora de teste, e a cada 15 minutos na segunda hora. Por fim, determinou-se o tempo e a dose diagnóstica. O primeiro trata-se do tempo necessário para se atingir 100% de *knockdown* na dose testada (dose diagnóstica).

3.3 ESTEREOMICROSCOPIA DAS LARVAS

As larvas tratadas com o extrato ativo (250 µg/mL) e o composto sintético benzofenona (25 µg/mL) foram fixadas, após 24 horas do início do teste larvicida, segundo o método Karnovsky (100) sob rotação a 4 °C. Depois de 24 h de fixação, as amostras foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2). Este processo foi repetido 3 vezes por 20 min. 10 larvas de cada tratamento e controle foram gentilmente coletadas com auxílio de uma pipeta *Pasteur* para observação, análise e fotodocumentação sob o estereomicroscópio LEICA M205 FA (Buffalo Grove, IL, United States).

3.4 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E ANÁLISE METABOLÔMICA

O extrato ativo das folhas de *V. gracilis* obtido com hexano, ARBO0293, foi preliminarmente fracionado por dois sistemas analíticos de preparo de amostras envolvendo a extração em fase sólida (*SPE*) (Figura 10). Para isso, uma alíquota de 100 mg do extrato foi adsorvida em sílica ou diol, que estavam acondicionados em cartuchos pré-fabricados *Chromabond*®. Posteriormente, diferentes proporções de solventes (Figura 11) foram eluídos através da amostra adsorvida em uma sequência crescente de polaridade. Para cada proporção de solvente foi utilizado um volume de 6 mL. Ao final desses procedimentos, foram obtidas dez frações por meio do Sistema 1 e seis frações pelo Sistema 2 (Figura 11). Após concentração em evaporador

rotativo, as frações foram dessecadas por nitrogênio e submetidas aos testes larvicidas.



Figura 10 – Foto da extração em fase sólida (*SPE*-diol e *SPE*-silica) do extrato ARBO0293. Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB.

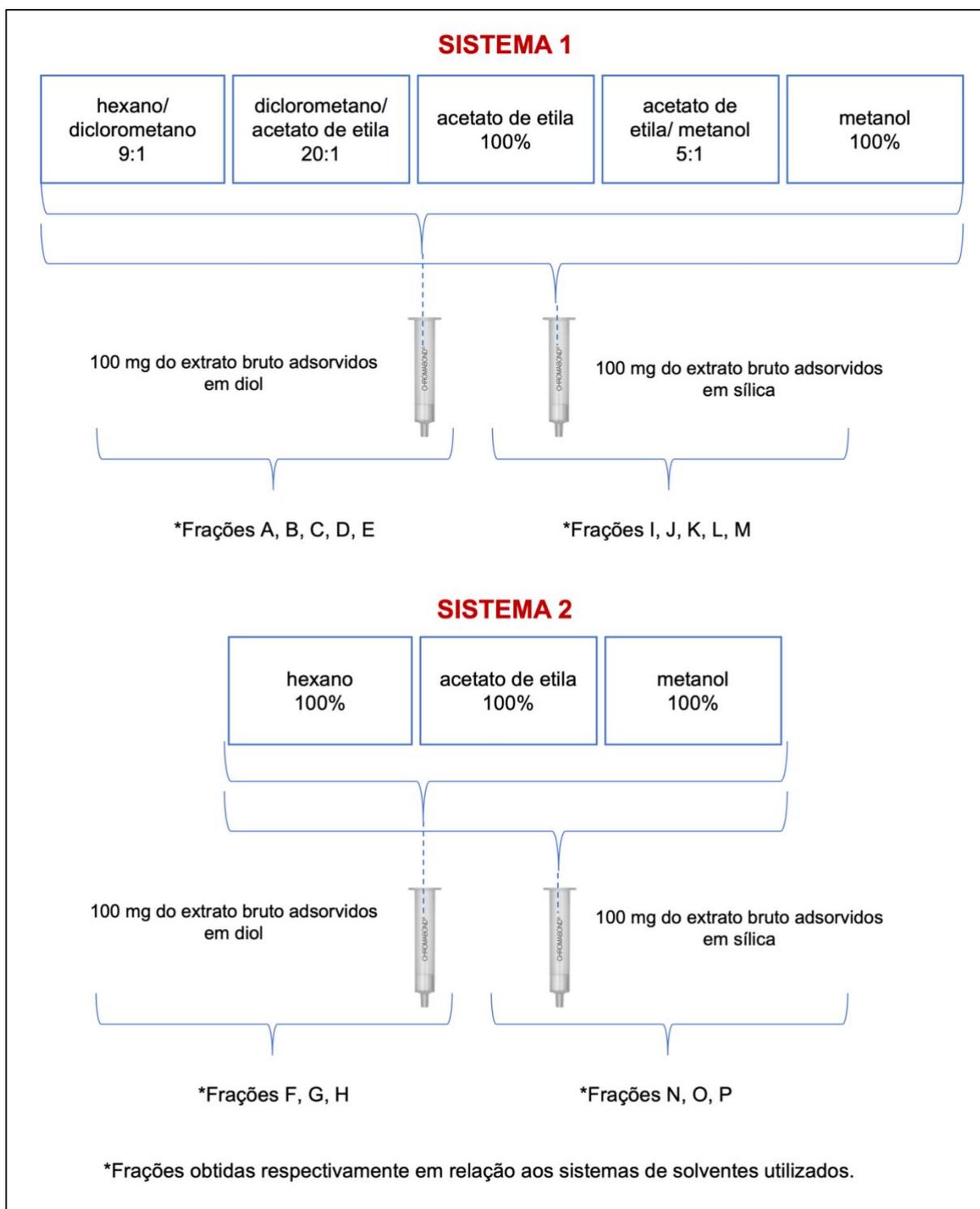


Figura 11 – Esquemas de extração em fase sólida (*SPE*-diol e *SPE*-sílica) do extrato ARBO0293.

Quatro frações ativas e quatro inativas foram direcionadas para um estudo de metabolômica, em que se realizou uma análise qualitativa dos metabólitos presentes nessas amostras. Para isso, elas foram analisadas por um equipamento de cromatografia líquida de ultra eficiência – CLUE com detector UV-Vis e arranjo de diodos, sistema binário de solventes HPG 1300, injetor automático e forno para a coluna cromatográfica. Esse sistema cromatográfico estava acoplado a um espectrômetro de massas (EM) de alta resolução (Bruker *compact ESI-QqTOF*, Figura 12). Para separação cromatográfica foi utilizada uma coluna C₁₈ ODS (100 x 2,1 mm e 1,8 µm). Na fase B foi usada acetonitrila grau cromatográfico, e na fase A utilizou-se água ultrapura, ambas acidificadas com ácido fórmico 0,1%. Durante a metodologia, foi usado um gradiente de eluição, o qual iniciou com 5% de acetonitrila, elevando-se para 98% em 13 minutos. Ao final do gradiente, 3 minutos foram utilizados para lavagem e estabilização da coluna. A temperatura do forno foi de 40 °C e a vazão da fase móvel foi de 0,5 mL/min. Como parâmetros de fonte de ionização utilizaram-se 4500 V no capilar, gás nebulizador a 9 L/min e temperatura da fonte em 200 °C.

As amostras foram analisadas no modo positivo. Os dados foram convertidos para o formato *mzXML* pelo *software* Bruker Compass DataAnalysis 4.4®, os quais foram exportados para processamento no programa Mzmine (101,102), com base no protocolo descrito por Wolfender, Houriet e Allard (103). Os parâmetros de processamento foram:

- Detecção das massas: *MS level: 1; RT: 2,4 a 11,5 min; mass detector: centroide, polarity positive; noise level: 5.0E3;*
- Construção de cromatogramas *ADAP: RT: 2,4 a 11,5 min; min group size in number of scans: 2; group intensity threshold: 1,0E3; min highest intensity: 1,0E3; m/z tolerance 0,006 m/z or 20 ppm;*
- Deconvolução: *algorithm Wavelets XCMS, S/N 10, wavelets scales: 0,1 – 5 min, peak duration range: 0,05 – 2, median;*
- Agrupamento de isótopos: *m/z tolerance: 0,006 m/z or 20 ppm; RT tolerance: 0,5 min; monoisotopic shape; minimum charge: 1; most intense representative isotope;*
- Alinhamento *Joint Aligner: m/z tolerance: 0,006 m/z or 20 ppm; weight for m/z: 0,8; RT tolerance: 0,5 min; weight for RT: 0,8;*

- *Gap filling: intensity tolerance: 5%; m/z tolerance: 0,006 m/z or 20 ppm; RT tolerance: 0,5 min; RT correction.*

Após processamento dos dados, uma matriz de intensidade de picos foi gerada e posteriormente exportada para a plataforma MetaboAnalyst 4.0 (81). Nessa plataforma, os dados foram filtrados pela média, normalizados pela soma e dimensionados na escala de Pareto. Foram realizadas análises estatísticas uni e multivariadas dos dados: o **volcano plot**, que combina análise *fold change* e teste - T, a **análise de componentes principais - PCA**, a **análise discriminante por mínimos quadrados parciais - PLS-DA** e a **análise de agrupamento- mapa de calor (heatmap)**.



Figura 12 - Foto do equipamento de CLUE-EM/EM. Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB.

3.5 ISOLAMENTO DE COMPOSTOS

Diante das informações resultantes das análises metabolômicas, 7,6 g do extrato ativo - extrato hexânico das folhas de *Vismia gracilis* – foram fracionados. Uma coluna cromatográfica de vidro (60 cm de altura e 6 cm de diâmetro interno) foi utilizada para

este procedimento. O extrato foi adsorvido a 30 g de sílica de fase normal (0,063 a 0,200 mm, Merck, Darmstadt, Alemanha) e aplicado no topo da fase estacionária estabelecida com 150 g desta mesma sílica. Iniciou-se o processo de separação utilizando-se como fase móvel hexano 100% e, posteriormente, atuando-se com gradiente de polaridade crescente com o uso de acetato de etila até 100%. Coletaram-se 27 frações de 500 mL cada, as quais foram secas por meio de evaporador rotativo e analisadas por cromatografia em camada delgada (placas de sílica 60, Merck, Darmstadt, Alemanha). A partir desse fracionamento, a amostra ARBO12A105C foi separada novamente por coluna cromatográfica aberta de menor proporção, similarmente ao primeiro procedimento. As frações resultantes foram analisadas por CLUE-EM/EM (Figura 13). Dessa coluna de menor proporção, a amostra ARBO12A116H foi filtrada com o uso de uma coluna cromatográfica preenchida com o polímero Sephadex LH20 (GE Healthcare, Chicago, USA), rendendo a amostra de interesse ARBO12A119C, a qual foi purificada utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE na escala semipreparativa.

Foram obtidos 2,35 mg do composto **1**. O composto **2** (1,91 mg) foi purificado mais rapidamente conforme escrito na figura 13, que traz um fluxograma de obtenção de **1** e **2**. A figura 14 demonstra alguns procedimentos cromatográficos em andamento durante a obtenção desses compostos. Importante ressaltar que o segundo extrato hexânico das folhas de *V. gracilis* (ARBO0293b), referente à coleta de março de 2020, também foi submetido a processos de separação semelhantes, com os quais foi possível isolar mais 2 mg do composto **2**.

Para purificação final de **1** e **2** por CLAE, utilizou-se o equipamento *Varian ProStar* (Figura 15); coluna Phenomenex Luna® C₁₈ (50 x 21 mm x 5 µm) e metodologia isocrática com 85% de metanol na fase **B** e 15% de água purificada na fase **A**, com vazão da fase móvel em 8 mL/min.

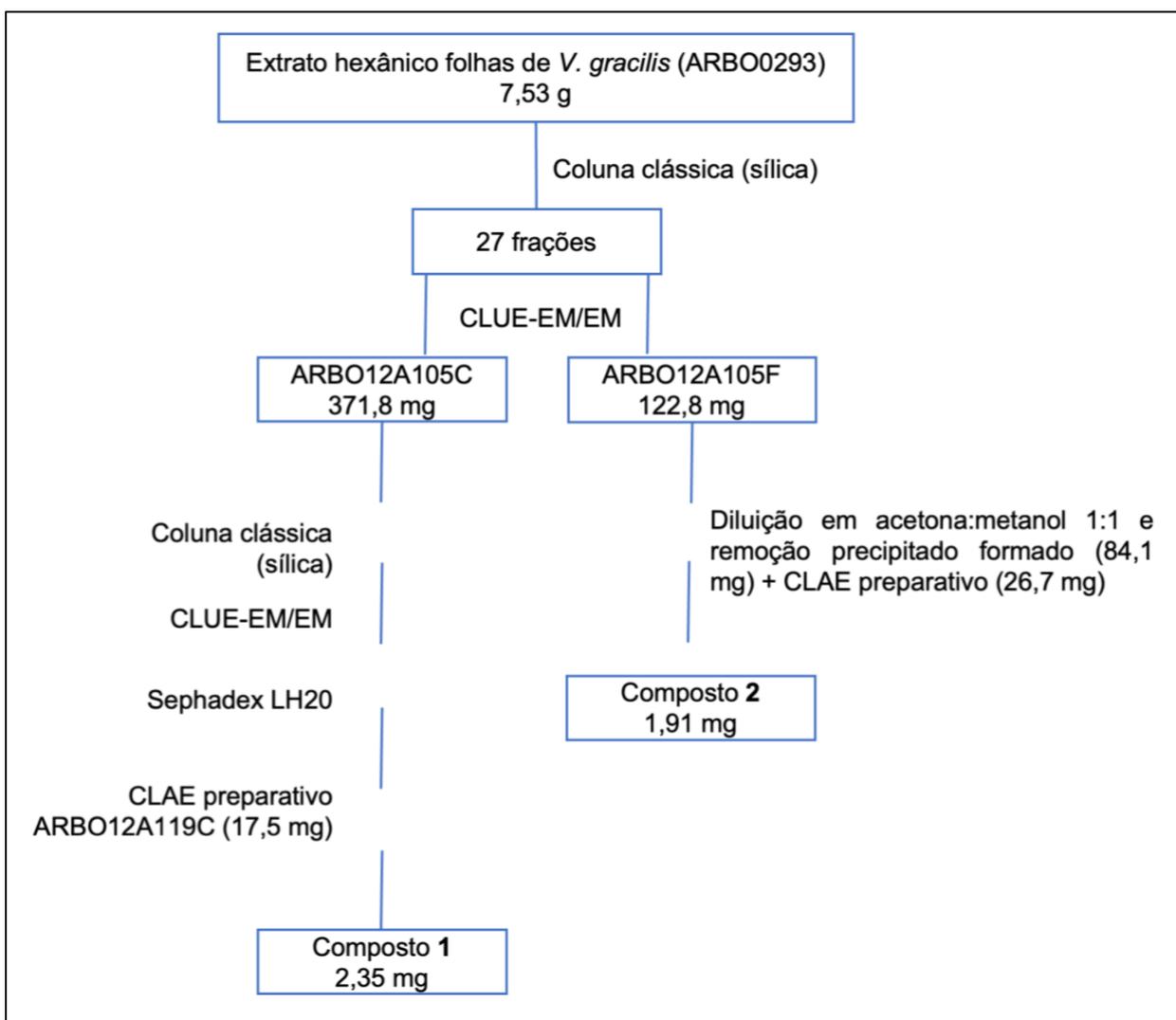


Figura 13 – Fluxograma de obtenção dos compostos 1 e 2 a partir do extrato hexânico das folhas de *V. gracilis* (ARBO0293).

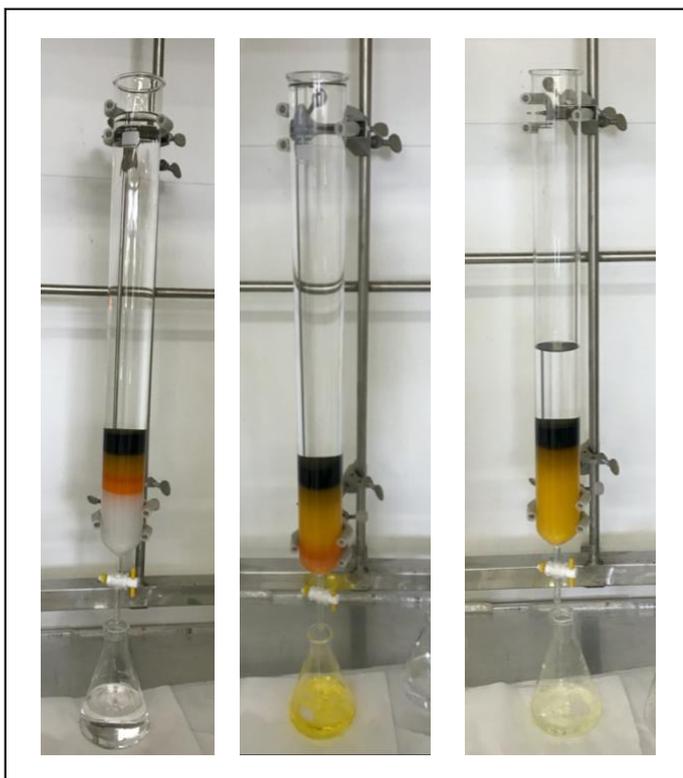


Figura 14 – Foto de processos cromatográficos para purificação dos compostos 1 e 2.
Fonte: fotos do autor - arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB.



Figura 15 - Foto do equipamento de CLAE. Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB.

Novas tentativas de separações a partir do extrato ativo de *V. gracilis* foram realizadas visando obter outros compostos. Nesse contexto, utilizou-se inicialmente a extração em fase sólida similarmente como apresentado para o Sistema 1 da figura 11. Porém, baseando-se no perfil cromatográfico em conjunto com a atividade larvicida, as frações ARBO12A004A e ARBO12A004B foram selecionadas para prosseguir com as purificações de forma escalonada (ARBO12A019A e ARBO12A019B, respectivamente) partindo-se de 1,5 g do extrato. Estas frações foram submetidas, separadamente, à cromatografia em coluna clássica. Logo em seguida, as frações resultantes que despertavam atenção pelo perfil cromatográfico menos complexo foram purificadas por CLAE semipreparativo utilizando-se o mesmo equipamento mostrado na figura 15. Ao longo das separações como mostrado no fluxograma da figura 16, foi possível obter os compostos **5**, **6**, **7** e **8**.

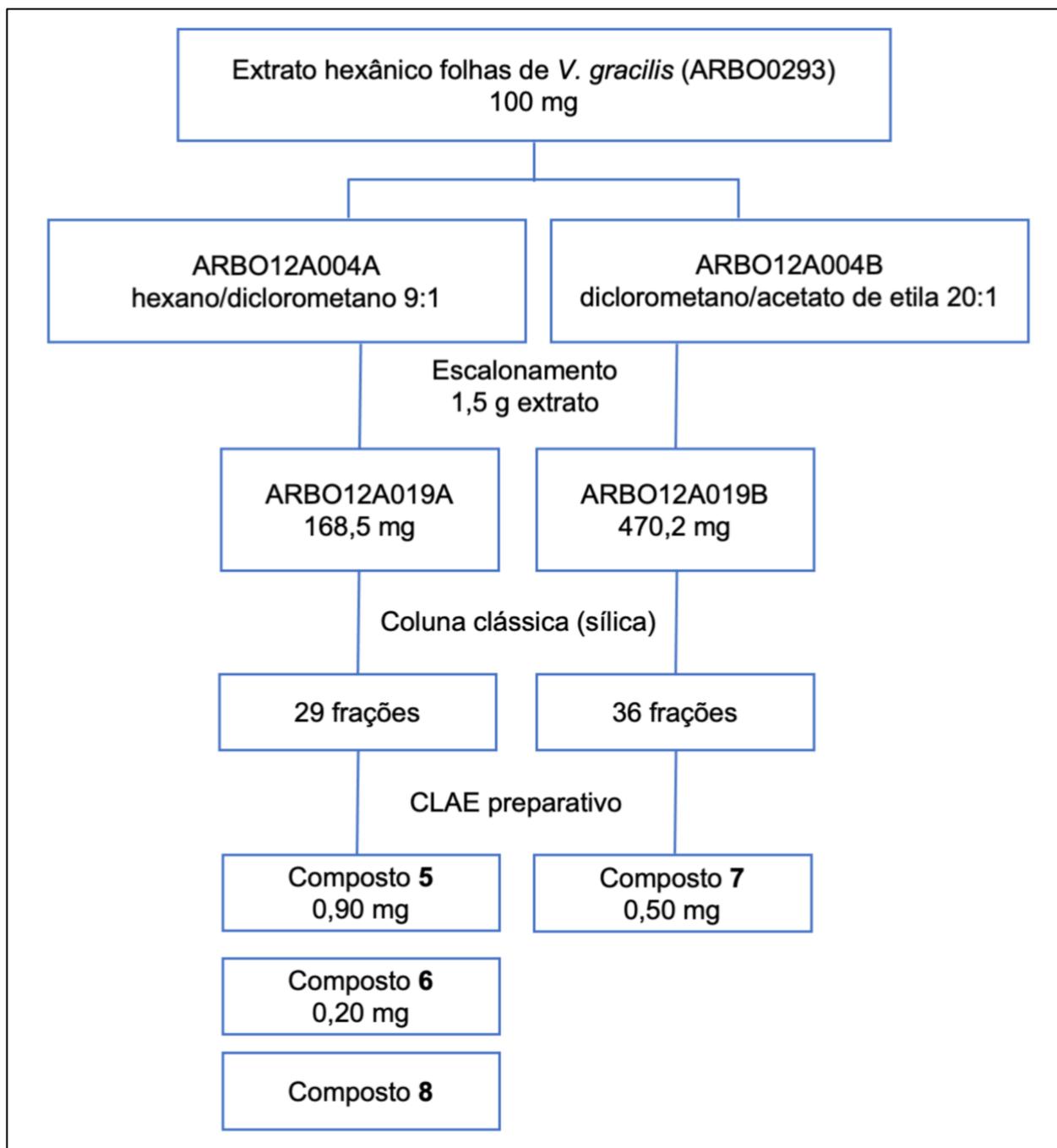


Figura 16 - Fluxograma de obtenção dos compostos 5 – 8 a partir do extrato hexânico das folhas de *V. gracilis* (ARBO0293).

3.6 SÍNTESE DO COMPOSTO 1

O composto **1** foi sintetizado como alternativa para sua obtenção em maior quantidade para realização dos ensaios biológicos. Este procedimento foi realizado em parceria com o Instituto de Química da UnB junto com o Professor Carlos Eduardo Salvador. Inicialmente, sínteses relatadas na literatura envolvendo a classe de benzofenonas foram estudadas (104–106). Dessa forma, foi definido o seguinte experimento reacional: em uma primeira etapa foi realizada a reação de acilação de *Friedel Crafts* entre o floroglucinol e o cloreto de benzoíla. Esta reação ocorreu a 65 °C durante 3 h envolvendo a catálise do cloreto de alumínio (AlCl₃) e o solvente nitrobenzeno. O composto intermediário florobenzofenona (fenil(2,4,6-trihidroxifenil)metanona) foi obtido com um rendimento de 67% após separação por cromatografia em coluna aberta. Para a segunda etapa, a reação de condensação entre a florobenzofenona e o óxido de mesitil (3-metilbut-2-enal) foi catalisada pelo EDDA (di-acetato de etileno di-amina). Após 10 h de reação em temperatura ambiente, o composto **1** foi purificado em coluna cromatográfica.

3.7 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS OBTIDOS

Todas as amostras adequadas para estudos de elucidções estruturais foram submetidas aos experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN). Os espectros obtidos destes experimentos foram registrados utilizando-se espectrômetro *Bruker Ascend Avance III HD* de 600 MHz (Figura 17). Para obtenção desses dados, as amostras em estudo foram dissolvidas em clorofórmio-*d* deuterado (CDCl₃) (Merck, Darmstadt, Alemanha). As massas em alta resolução dos compostos estudados foram obtidas através do espectrômetro de massas (EM) de alta resolução (*Bruker compact ESI-QqTOF*, Figura 12).



Figura 17 – Foto do equipamento de Ressonância Magnética Nuclear. Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ATIVIDADE DOS EXTRATOS DE *Vismia gracilis* EM LARVAS E PUPAS

Dentre os 14 extratos de *V. gracilis* do Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado (Laboratório de Farmacognosia), apenas o extrato hexânico das folhas (ARBO0293) foi ativo em larvas, apresentando mortalidade de 95% após 24 horas do início do teste. Os extratos hexânicos da casca do caule (ARBO0286) e da madeira da raiz (ARBO0290) também foram tóxicos para as larvas, causando 47,5% e 40,0% de mortalidade, respectivamente. Porém, esses extratos não foram classificados como ativos de acordo com os parâmetros adotados pelo Laboratório de Farmacognosia, no âmbito do Projeto ArboControl. Nenhum dos extratos avaliados apresentou atividade pupicida (Tabela 2).

A curva dose-resposta do extrato hexânico das folhas (ARBO0293) foi determinada com CL_{50} de 46,48 $\mu\text{g/mL}$ (IC_{95} 39,98 a 54,09) em 24 horas. A atividade do extrato foi duas vezes mais potente em 48 horas, apresentando CL_{50} de 20,57 $\mu\text{g/mL}$ (IC_{95} 18,00 a 23,34) (Tabela 3). O segundo extrato produzido a partir das folhas de *V. gracilis* (ARBO0293b) coletadas em março de 2020 também foi ativo, causando 92,5% de mortalidade das larvas em 24 horas.

Como os gêneros *Clusia* e *Vismia* já foram consideradas da mesma família: Clusiaceae (91), são apresentados a seguir alguns exemplos de extratos de plantas de Clusiaceae com atividade larvicida: extrato hexânico da casca do caule de *Calophyllum mucigerum* com CL_{50} 87,90 $\mu\text{g/mL}$ (107); extrato hexânico da casca da raiz de *C. inophyllum* $CL_{50} > 150 \mu\text{g/mL}$ (108); e extrato com hexano/ acetato de etila/ etanol da casca do caule de *Garcinia mangostana* com CL_{50} 180,70 $\mu\text{g/mL}$ (109). Mesmo a metodologia utilizada nos testes larvicidas dos estudos citados não sendo equivalente à metodologia do presente trabalho, é importante ressaltar que ARBO0293 chega a ser quase duas vezes mais potente que o extrato mais ativo citado, o hexânico da casca do caule *C. mucigerum*.

Tabela 2 - Atividade dos extratos de *Vismia gracilis*, testados a 250 µg/mL, em formas imaturas (larvas e pupas) de *Ae. aegypti*.

Código do Extrato	Parte vegetal	Solvente extrator	% Mortalidade 24 h (EP ²)	
			Larvas	Pupas
ARBO0286	casca do caule	hexano	47,50 (9,46)	0,00 (0,00)
ARBO0287	casca do caule	água	0,00 (0,00)	5,00 (5,00)
ARBO0288	casca do caule	etanol	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
ARBO0289	casca do caule	acetato de etila	2,50 (2,50)	0,00 (0,00)
ARBO0290	madeira da raiz	hexano	40,00 (9,13)	0,00 (0,00)
ARBO0291	casca da raiz	etanol	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
ARBO0292	folha	acetato de etila	0,00 (0,00)	10,00 (10,00)
ARBO0293 ¹	folha	hexano	95,00 (2,89)	10,00 (5,77)
ARBO0294	folha	etanol	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
ARBO0296	fruto	hexano	0,00 (0,00)	5,00 (5,00)
ARBO0297	fruto	acetato de etila	2,50 (2,50)	0,00 (0,00)
ARBO0298	madeira do caule	acetato de etila	2,50 (2,50)	0,00 (0,00)
ARBO0299	madeira do caule	etanol	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
ARBO0300	madeira do caule	hexano	0,00 (0,00)	5,00 (5,00)
ARBO0293b ¹	folha	hexano	92,50 (4,79)	-

¹Amostras consideradas ativas (% mortalidade ≥ 80 %). ²EP: erro padrão.

Tabela 3 – Determinação dos valores de CL₅₀ e CL₉₅ do extrato hexânico das folhas de *V. gracilis* (ARBO0293) em larvas de *Ae. aegypti*.

Amostra	Tempo (h)	CL ₅₀ µg/mL (IC ₉₅) ¹	CL ₉₅ µg/mL (IC ₉₅)	Chi (p) ²	Slope	Intercept
Extrato hexânico	24	46,48 (39,98-54,09)	>250	1,00	0.14	-3.24
folhas <i>V. gracilis</i>	48	20,57 (18,00-23,34)	77,90 (63,43-102,05)	1,00	2.84	-3.73

¹IC: intervalo de confiança. ²Chi (p): indica se os dados estão adequados à regressão, em que valores de p>0,05 são aceitáveis.

4.2 ATIVIDADE DOS EXTRATOS DE *Vismia gracilis* EM ADULTOS

Foram avaliados 11 extratos de *V. gracilis* em testes de toxicidade e repelência com mosquitos adultos (Tabelas 4 e 5). Nos testes de avaliação do comportamento de adultos utilizando o aparato *HITSS*, dois extratos demonstraram atividade atrativa no teste de repelência espacial. O extrato acetato de etila da casca do caule (ARBO0289) que apresentou índice de repelência espacial (SAI) = -0,61 (\pm 0,10); e o extrato etanólico das folhas (ARBO0294), com SAI = -0,64 (\pm 0,14) (Tabela 4). Nenhuma das amostras apresentou repelência espacial ou irritação por contato. Nos testes de toxicidade realizados com as garrafas, nenhum dos extratos foi adulticida na concentração testada. Dessa forma, os extratos de *V. gracilis* avaliados não foram consideradas promissoras do ponto de vista de desenvolvimento de um produto repelente doméstico, de acordo com a OMS (96).

Tabela 4 – Avaliação da irritação por contato (*HITSS: HITSS: High-throughput screening system*) de extratos de *V. gracilis* (dose de 10%) em fêmeas de *Ae. aegypti*.

Amostra	n° replicatas (n° mosq.)	Escape (n° mosquitos) média (EP ¹)		% Escape ² média (EP)	P ³
		Controle	Tratamento		
Arbo0286	6 (60)	0,67 (0,21)	1,00 (0,63)	3,15 (7,54)	0,740
Arbo0287	6 (60)	0,33 (0,21)	0,83 (0,31)	4,81 (4,41)	0,405
Arbo0288	6 (59)	0,50 (0,22)	0,16 (0,16)	-1,85 (3,41)	0,545
Arbo0289	6 (60)	2,33 (0,56)	1,67 (0,61)	-11,31 (12,26)	0,260
Arbo0292	6 (60)	0,83 (0,65)	1,33 (0,61)	0,56 (14,77)	0,470
Arbo0293	6 (61)	0,33 (0,21)	0,83 (0,31)	2,61 (4,27)	0,405
Arbo0294	6 (60)	0,50 (0,34)	0,67 (0,33)	-2,69 (5,14)	0,920
Arbo0296	6 (60)	0,33 (0,21)	0,67 (0,21)	4,66 (3,54)	0,567
Arbo0297	6 (60)	0,83 (0,40)	0,17 (0,17)	-8,10 (4,13)	0,303
Arbo0298	6 (60)	0,67 (0,33)	0,00 (0,00)	-7,87 (4,08)	0,182
Arbo0299	6 (59)	0,50 (0,50)	0,33 (0,21)	-2,14 (8,38)	1,000

¹EP: erro padrão. ²% Escape corrigido pela mortalidade no cilindro tratado e escape no controle. ³ Valor de P calculado pelo teste de *Wilcoxon* para a diferença entre o escape no cilindro com tratamento e no cilindro controle (solvente de diluição da amostra).

Tabela 5 - Avaliação da repelência espacial (*HITSS: HITSS: High-throughput screening system*) de extratos de *V. gracilis* (dose de 10%) em fêmeas de *Ae. aegypti*.

Amostra	n° replicatas (n° mosq.)	% resposta mosquitos média (EP ¹)	SAI ² média (EP)	SR ³	P>S
Arbo0286	9 (181)	13,27 (2,01)	0,05 (0,28)	0	1,000
Arbo0287	9 (179)	8,92 (2,73)	-0,13 (0,26)	-2,5	0,688
Arbo0288	9 (182)	10,93 (2,52)	0,06 (0,27)	1,5	1,000
Arbo0289	9 (178)	16,41 (2,87)	-0,61 (0,10)	-22,5	0,004
Arbo0292	9 (179)	10,51 (2,92)	-0,02 (0,18)	-0,5	1,000
Arbo0293	9 (180)	11,67 (2,36)	-0,07 (0,25)	-2,5	0,719
Arbo0294	9 (178)	12,88 (3,13)	-0,64 (0,17)	-14	0,016
Arbo0296	9 (180)	15,00 (3,44)	0,00 (0,22)	0,5	1,000
Arbo0297	9 (179)	8,51 (2,11)	-0,11 (0,24)	-3	0,656
Arbo0298	9 (179)	2,78 (1,21)	0,00 (0,24)	0	1,000
Arbo0299	9 (180)	6,11 (1,39)	0,44 (0,18)	5	0,125

¹EP: erro padrão. ² SAI, índice de repelência espacial. ³ SR, *signed-rank* calculado pelo PROC UNIVARIATE (SAS Studio).

4.3 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE) E ANÁLISE METABOLÔMICA

Técnicas metabolômicas foram aplicadas na avaliação e diferenciação de frações do extrato hexânico das folhas de *Vismia gracilis* (ARBO0293) com objetivo de otimizar o processo de isolamento e identificação de compostos potencialmente ativos. Inicialmente, realizou-se uma análise instrumental por CLUE-EM de uma amostra do extrato que resultou no perfil demonstrado na figura 18. No cromatograma

de pico base, nota-se a complexidade da amostra sendo possível detectar pelo menos 48 compostos presentes no extrato ARBO0293.

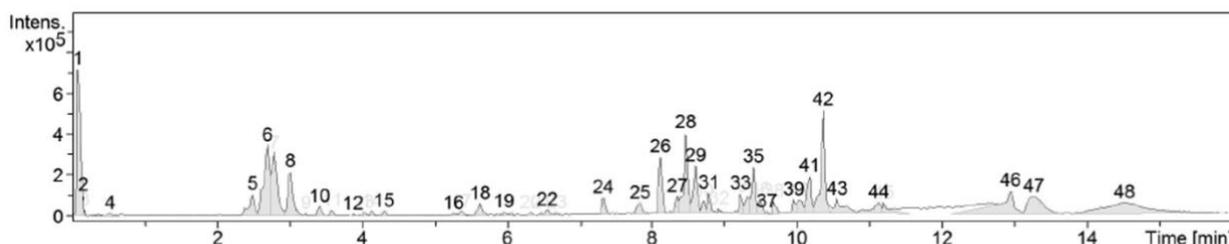


Figura 18 - Cromatograma de pico base (BPC) do extrato hexânico das folhas de *Vismia gracilis* (ARBO0293).

As frações obtidas por *SPE* para as análises metabolômicas tiveram rendimentos variados entre 11,80 e 62,42%, a depender do sistema eluente utilizado (Tabela 6).

Tabela 6 - Rendimento das frações obtidas pela extração em fase sólida (*SPE*-diol e *SPE*-sílica) do extrato hexânico das folhas de *Vismia gracilis* (ARBO0293).

SISTEMA ELUENTE	RENDIMENTO	
	Diol	Sílica
SISTEMA 1¹		
hexano/ diclorometano 9:1	16,61%	10,95%
diclorometano/ acetato de etila 20:1	39,55%	28,27%
acetato de etila 100%	29,05%	46,90%
acetato de etila/ metanol 5:1	13,60%	17,79%
metanol 100%	9,70%	14,41%
SISTEMA 2¹		
hexano 100%	13,07%	11,80%
acetato de etila 100%	62,42%	37,08%
metanol 100%	18,74%	40,14%

¹Os sistemas mencionados remetem aos mesmos exemplificados na figura 11.

O sistema 1, realizado em cartuchos preenchidos com diol, conforme descrito previamente (Figura 11) deu origem a duas frações ativas: ARBO12A004A e ARBO12A004B. O sistema 2 teve uma ativa: ARBO12004G. Já a *SPE* realizada com

cartuchos preenchidos com sílica apresentou como frações ativas: ARBO12A004J (sistema 1) e ARBO12A004O (sistema 2). As frações ativas apresentaram mortalidade de 100% das larvas após 24 horas de exposição, exceto AR12A004G, que promoveu 90%.

De acordo com os resultados dos testes biológicos, foram selecionadas as seguintes frações para o estudo metabolômico:

- As frações ativas: ARBO12A004A, ARBO12A004B, ARBO12A004J e ARBO12A004O (mortalidade das larvas de 100%).

- E as frações inativas: ARBO12A004C, ARBO12A004D, ARBO12A004K e ARBO12A004L (mortalidade das larvas < 2,5%).

As frações, assim como o extrato, apresentaram cromatogramas de pico base complexos, como pode ser observado na figura 19. Essas análises geraram uma diversidade de íons referentes a cada um dos picos detectados nas frações, cujas massas em alta resolução permitem obter a razão m/z exata de cada componente e suas prováveis fórmulas moleculares.

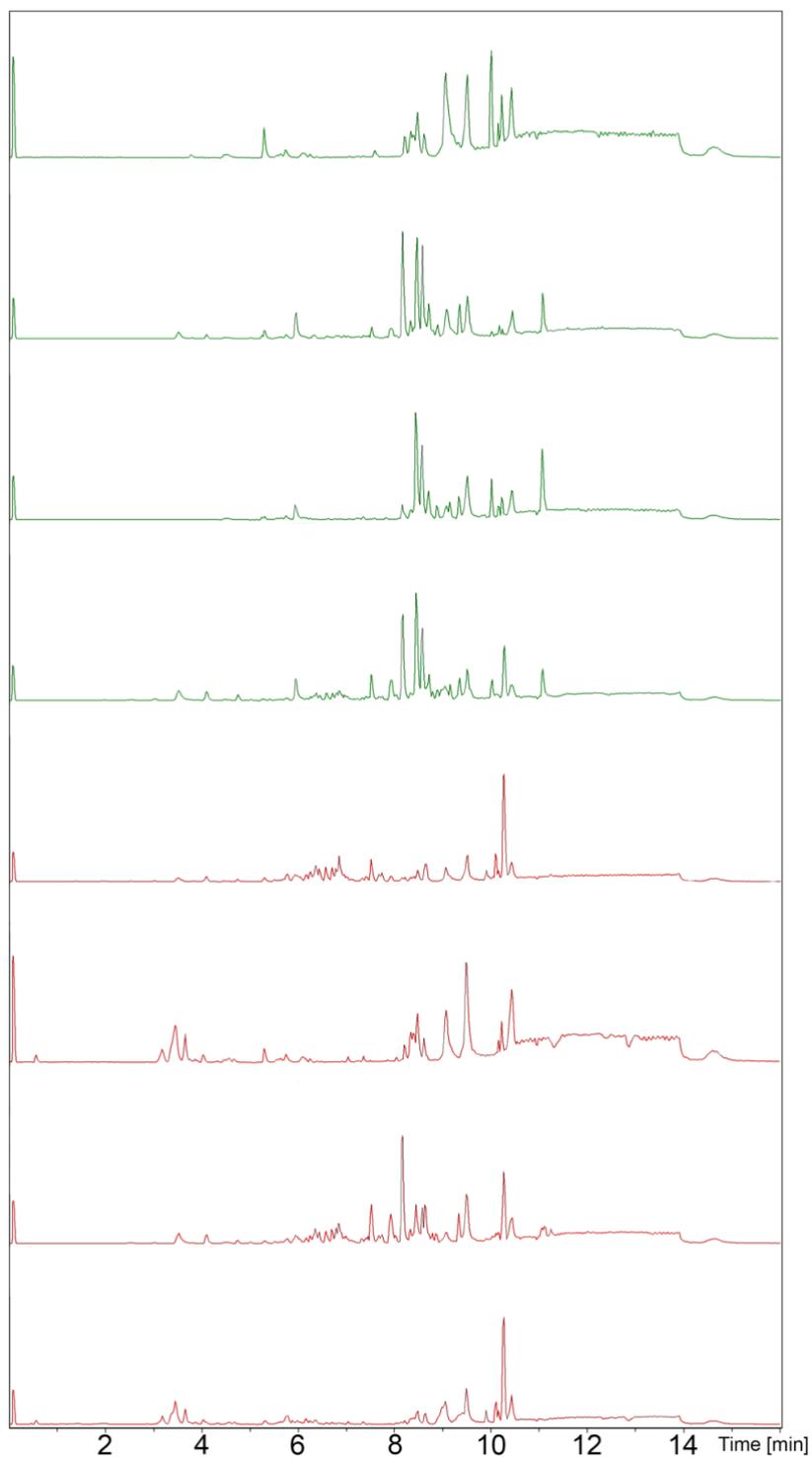


Figura 19 - Cromatogramas de pico base (BPC) das frações ativas (vermelho) e inativas (verde) do extrato larvicida ARBO0293, obtidas por *SPE* para análise metabolômica.

A matriz obtida após processamento no MZmine dos dados das frações, obtidos por CLUE-EM/EM, possuía 504 íons por amostra, sendo estas divididas em dois grupos (amostras ativas e inativas), com 1,8% de valores faltantes, de acordo com a checagem de integridade dos dados pelo MetaboAnalyst.

O gráfico *volcano plot* apresentou alguns dos íons presentes nas amostras ativas e inativas, destacando aqueles significativos para diferenciação dos grupos em estudo. Na figura 20, os íons significativos para diferenciação das amostras ativas (círculos em rosa, à direita do gráfico) estão dispostos de acordo com sua relevância estatística para o agrupamento das frações considerando a semelhança química entre elas. Os íons mais distantes do centro do gráfico, em direção ao canto superior direito, são aqueles com menor valor de p (maior significância estatística) e maior FC (magnitude da diferença na intensidade do íon entre as frações), ou seja, são os íons mais significativos para diferenciação dos grupos. Dentre os íons importantes identificados pelo *volcano plot*, estão aqueles destacados com setas correspondentes à:

- Composto 1: $[M+H]^+$ m/z 363,1593 ; tempo de retenção (TR) = 10,5 minutos; fórmula molecular = $C_{23}H_{22}O_4+H^+$; erro = -0.5 ppm; anotado como clusiafenona A.
- Composto 2: $[M+H]^+$ m/z 365,1749; TR = 9,7 min.; fórmula molecular = $C_{23}H_{24}O_4+H^+$; erro = -0.5 ppm; anotado como isovismiafenona B.
- Composto 3: $[M+H]^+$ m/z 379,1704; TR = 9,68 min.; fórmula molecular = $C_{24}H_{26}O_4 +H^+$; erro = 0.7 ppm; anotado como mirtiafenona B.

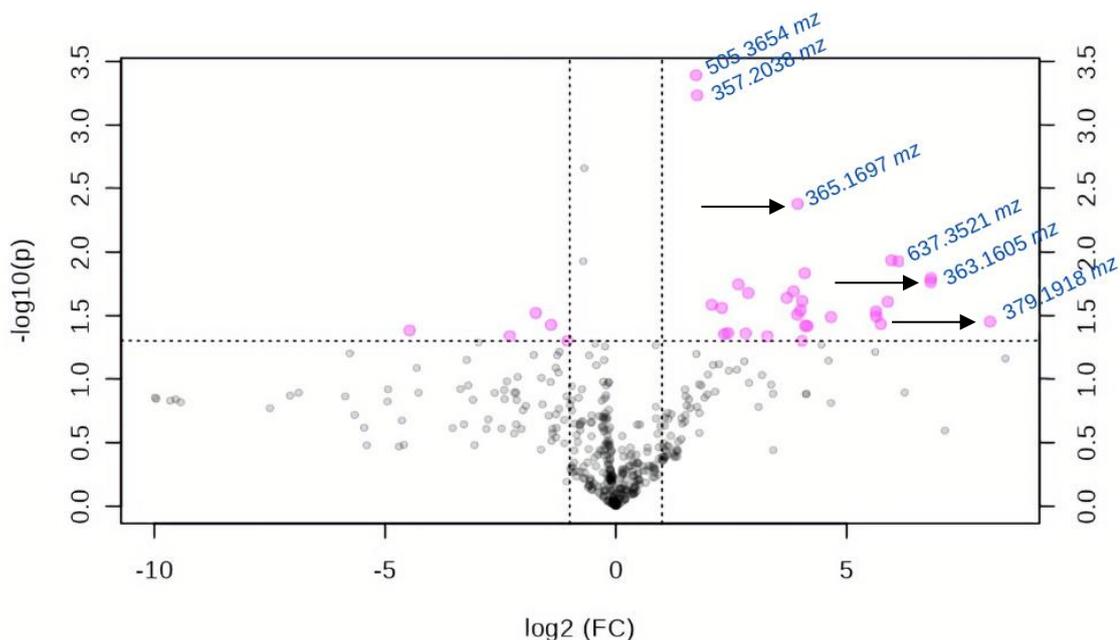


Figura 20 - *Volcano plot*: em rosa, íons significativos para diferenciação dos grupos de amostras ativas e inativas. No eixo y, teste-T (linha de corte = 0,05), e no eixo x fold-change (linha de corte = 2). À direita do gráfico, os íons presentes nas amostras ativas e, à esquerda, aqueles presentes nas amostras inativas. Em destaque com setas os compostos anotados: isovismiafenona B (m/z 365,1697), clusiafenona A (m/z 363,1605) e mirtiafenona B (m/z 379,1918).

A análise dos componentes principais - PCA (Figura 21) mostrou que os componentes 1 (eixo x) e 2 (eixo y) foram juntos responsáveis por 61,1% da variância da amostra. O PCA é uma análise estatística multivariada não-supervisionada, que apresenta a diferenciação das frações ativas e inativas no plano de acordo com o perfil metabólico das amostras. Nessa análise, observou-se que as frações não foram agrupadas de forma clara considerando seu perfil químico, o que pode ser explicado pela complexidade apresentada por seus cromatogramas de pico base (Figura 19). Contudo, outra análise não-supervisionada, a análise de agrupamento representada por um mapa de calor (Figura 22), foi capaz de agrupar com eficiência as amostras de acordo com seu perfil metabólico. Na figura, observa-se uma variação de cores. Os íons com maior abundância relativa estão representados em cores mais quentes (tons avermelhados). O agrupamento das amostras coincidiu com as respectivas atividades biológicas: as amostras inativas foram agrupadas do lado esquerdo do plano, e as ativas do lado direito.

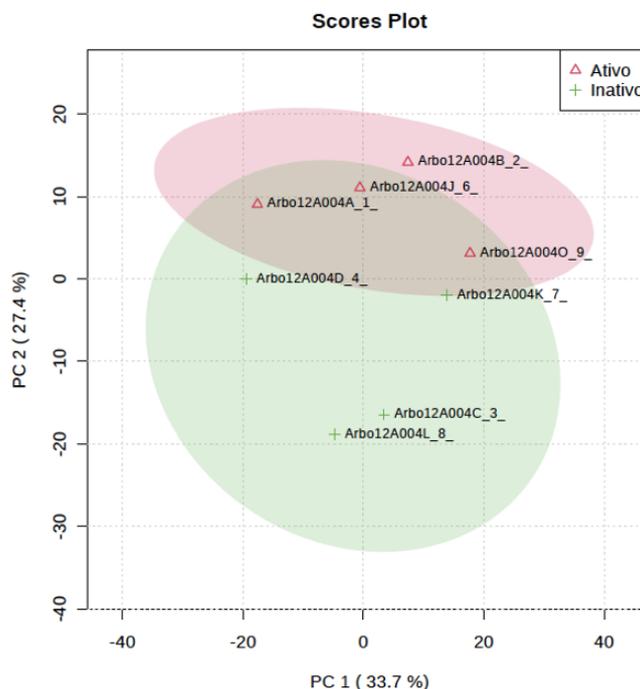


Figura 21 - PCA: em vermelho as amostras ativas agrupadas na porção superior do plano e, em verde, amostras inativas reunidas na porção inferior.

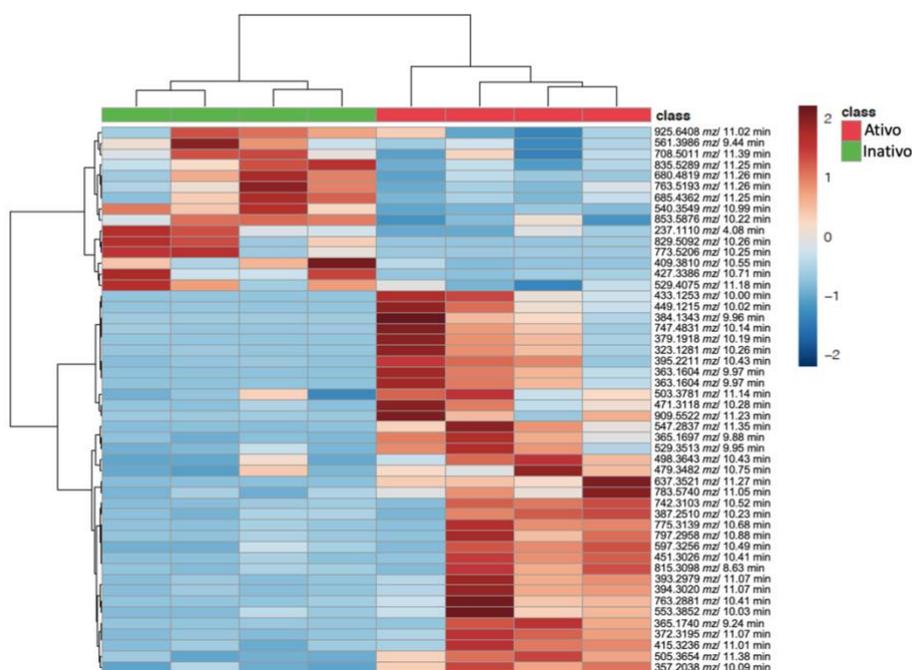


Figura 22 – Análise de agrupamento - mapa de calor: amostras agrupadas de acordo com a intensidade dos 50 íons mais importantes na diferenciação das amostras ativas e inativas (indicadas acima da primeira linha em vermelho e verde, respectivamente). Amostras estão dispostas em colunas e os íons em linhas. Análise de agrupamento hierárquica utilizando como medida de similaridade distância euclidiana e algoritmo de agrupamento Ward. Cores mais quentes indicam maior intensidade do íon (eixo x) na amostra (eixo y).

Em seguida, a figura 23A traz uma análise supervisionada, a análise discriminante por mínimos quadrados parciais - PLS-DA. O gráfico foi plotado com Y (bioatividade) em função de X (sinais detectados: metabólitos) (78), maximizando a diferenciação entre as amostras e apontando os metabólitos responsáveis pela separação dos grupos. Estes metabólitos foram elencados no *VIP SCORE* (Figura 23B), a projeção de variáveis importantes.

A eficiência na separação dos grupos é visivelmente maior no PLS-DA, comparando-se com a PCA. Isso ocorre em virtude de esta última análise considerar a atividade biológica das amostras para agrupá-las (supervisionada), enquanto a PCA é não-supervisionada. As análises supervisionadas são importantes para permitir visualizar as diferenças entre amostras complexas. O *VIP SCORE* destacou, como características importantes para distribuição das amostras no plano PLS-DA, os compostos: clusiafenona A (**1**), isovismiafenona B (**2**), e um derivado de clusiafenona (**4**) com $[M+H]^+$ m/z 381.1704, TR=8,7 min e fórmula molecular $C_{23}H_{24}O_5+H^+$ (-2.0 ppm).

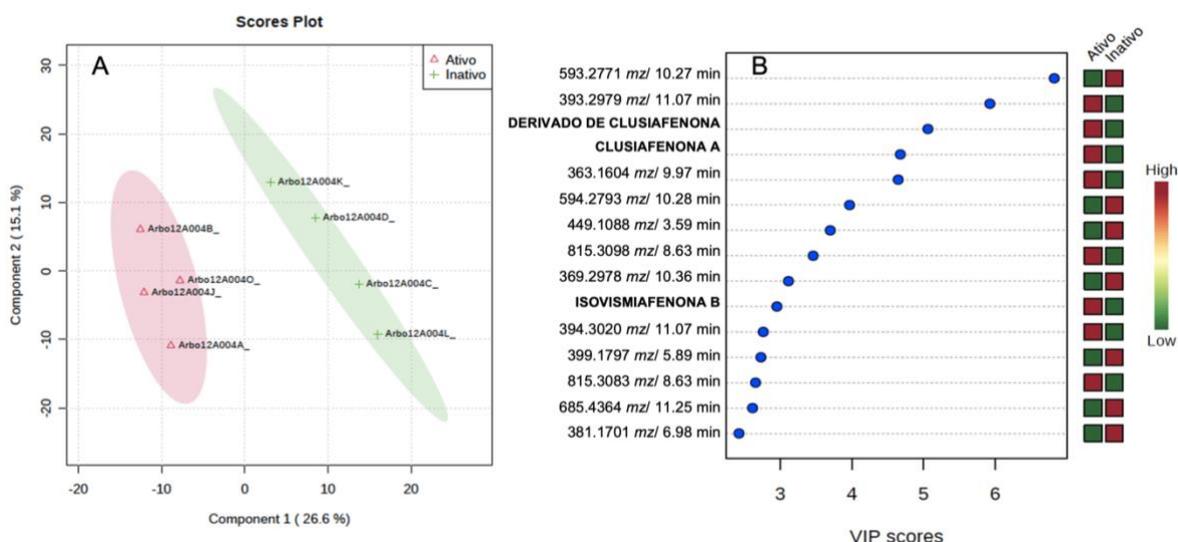


Figura 23 – **A**. PLS-DA: análise multivariada supervisionada que maximiza a separação entre as amostras. Em vermelho estão as frações ativas e em verde, as inativas. **B**. VIP SCORE: apresenta os íons importantes para separação dos grupos no PLS-DA. Em destaque os compostos anotados: clusiafenona A (m/z 363.1605), isovismiafenona B (m/z 365.1697), e o derivado de clusiafenona (m/z 381.1704).

Os compostos **1 – 4**, cujas estruturas estão dispostas na figura 24, pertencem à classe das benzofenonas. Esses metabólitos foram destacados nas análises quimiométricas como relevantes para diferenciação do grupo de frações ativas do extrato ARBO0293.

Clusiafenona A (**1**) já foi identificada em espécies de *Clusia* (110,111). O composto isovismiafenona B (**2**) já foi isolado de *Vismia descipiens* (112). Mirtiafenona B (**3**) já foi relatada na família Clusiaceae (113). Os três compostos, bem como o derivado de clusiafenona (**4**) apresentaram perda do fragmento m/z 105 [Ph-CO]⁺ quando ionizadas por ESI (*electrospray ionization*), típico do comportamento de benzofenonas (113–115), conforme figura 25. Os metabólitos **1 – 4** destacados nas análises metabolômicas foram anotados conforme seu perfil de fragmentação por EM (Tabela 7).

Sugere-se a anotação de **4** como um derivado de clusiafenona: clusiafenona C ou clusiafenona D. Ambas já foram relatadas em Clusiaceae (111,113). Em seu espectro de fragmentação, além do fragmento característico m/z 105 [Ph-CO]⁺, o composto apresentou também, a partir de uma desidratação, o fragmento m/z 363,1600 que corresponde ao composto **1** (Figura 25).

As análises estatísticas metabolômicas realizadas pelo MetaboAnalyst permitiram visualizar a magnitude de informações obtidas a partir dos dados de CLUE-EM/EM direcionando a anotação de compostos importantes na diferenciação do grupo de frações ativas. Estudos anteriores do Laboratório de Farmacognosia (UnB) utilizando estratégias metabolômicas foram capazes de prever os metabólitos responsáveis pela atividade larvicida de extratos de *Annona crassiflora* (68). Dessa forma, os compostos anotados por este trabalho, classificados quimicamente como benzofenonas (**1 – 4**), foram considerados como potenciais contribuintes para a atividade larvicida do extrato ARBO0293. Para confirmação de tal hipótese, seguiu-se para a segunda etapa deste trabalho, que incluiu a obtenção de alguns dos compostos anotados, por isolamento e síntese, para realização de testes biológicos em larvas de *Ae. aegypti*.

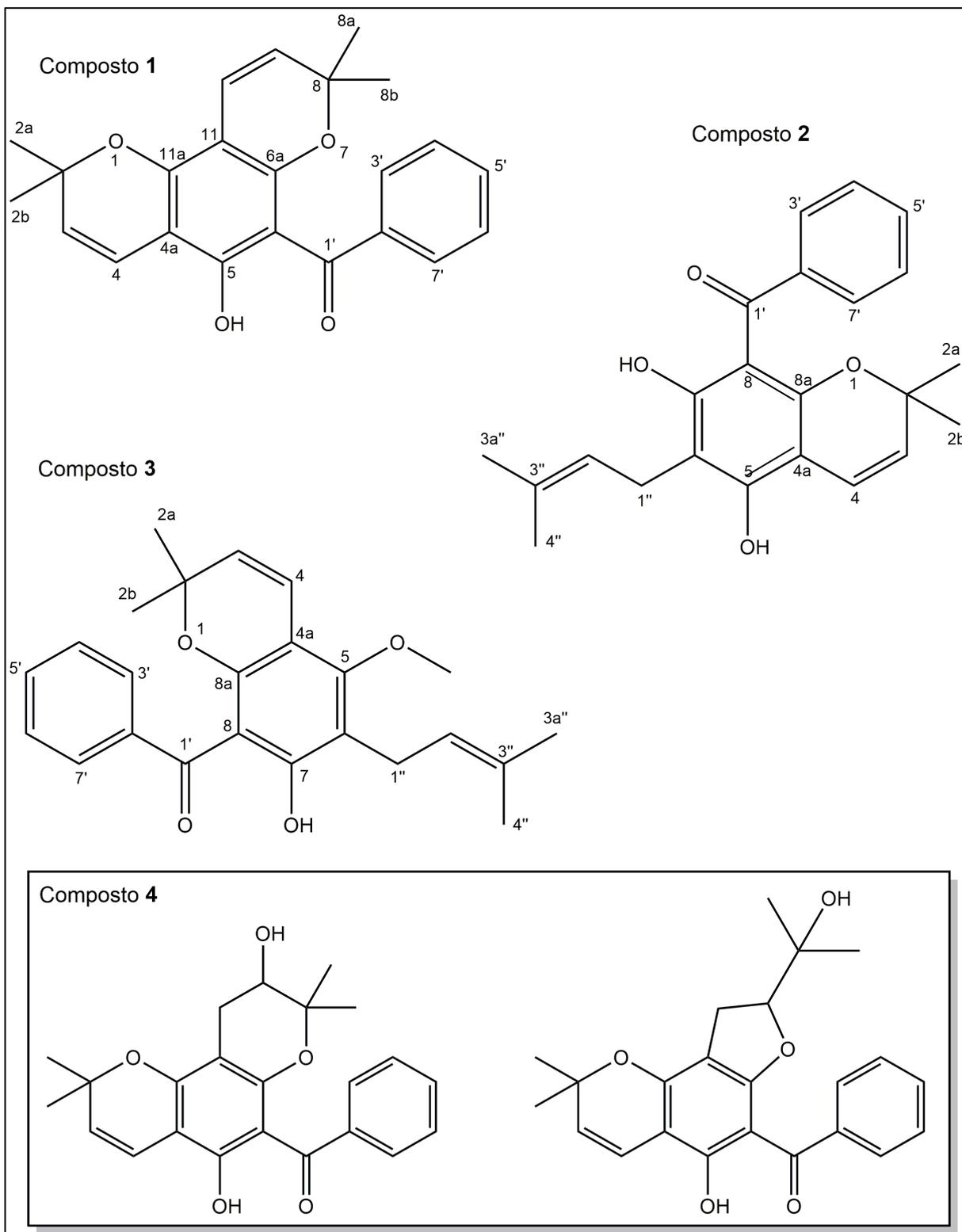


Figura 24 - Estruturas dos compostos presentes no extrato larvicida ARBO0293 que foram anotados: clusiafenona A (1), isovismiafenona B (2), mirtiafenona B (3) e um derivado de clusiafenona (4): clusiafenona C (esquerda) ou clusiafenona D (direita).

Tabela 7 - Compostos presentes no extrato hexânico das folhas de *V. gracilis* anotados com base em seu perfil de fragmentação.

Composto	TR (min)	m/z ion precursor [M + H] ⁺	Fórmula molecular [M] ⁺	Produto ion, m/z	Fragmento
(1) Clusiafenona A	10.5	363.1593	C ₂₃ H ₂₂ O ₄ (-0.5 ppm)	285 227 189 105 77	[M]-C ₆ H ₅ [M]-C ₁₀ H ₁₆ [M]- C ₆ H ₅ -C ₇ H ₁₂ [M]-C ₁₆ H ₁₇ O ₃ [M]- C ₁₆ H ₁₇ O ₃ -CO
(2) Isovismiafenona B	9.7	365.1749	C ₂₃ H ₂₄ O ₄ (-0.5 ppm)	309 231 189 105	[M]-C ₄ H ₈ [M]-C ₁₀ H ₁₃ [M]- C ₁₀ H ₁₃ -C ₃ H ₆ [M]- C ₁₀ H ₁₃ -C ₃ H ₆ - 3CO
(3) Mirtiafenona B	9.68	379.1901	C ₂₄ H ₂₆ O ₄ (0.7 ppm)	323 245 105	[M]-C ₄ H ₈ [M]-C ₁₀ H ₁₄ [M]-C ₁₇ H ₂₂ O ₃
(4) Derivado de clusiafenona	8.7	381.1704	C ₂₃ H ₂₄ O ₅ (-2.0 ppm)	363 309 231 189 105	[M]-H ₂ O [M]-H ₂ O-C ₄ H ₆ [M]- H ₂ O-C ₁₀ H ₁₁ [M]- H ₂ O-C ₁₀ H ₁₁ - C ₃ H ₆ [M]- H ₂ O-C ₁₀ H ₁₁ - C ₃ H ₆ -C ₃ O ₃

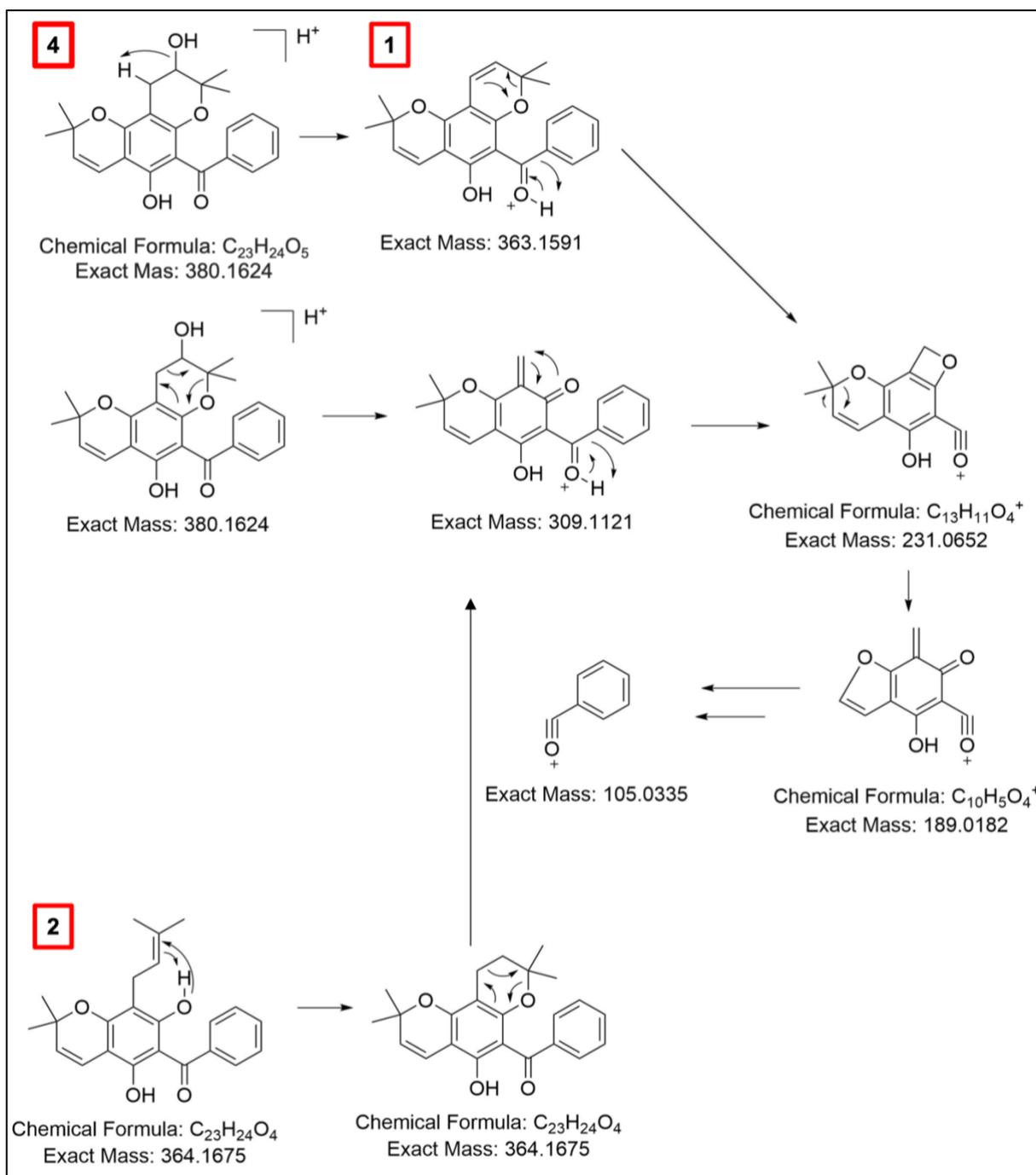


Figura 25 - Fragmentação por ESI dos compostos 1, 2 e 4. No esquema, utilizou-se a Clusiafenona C como exemplo.

4.4 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS A PARTIR DO EXTRATO ATIVO DE *Vismia gracilis*

Os compostos **1** e **2** foram destacados consistentemente pelas análises estatísticas: *volcano plot*, PLS-DA e análise de agrupamento – mapa de calor, como importantes para diferenciação dos grupos de frações ativas. Adicionalmente, foram facilmente identificados no cromatograma de pico base (BPC) do extrato e, portanto, foram selecionados para isolamento e posterior avaliação da atividade larvicida.

Dessa forma, clusiafenona A (**1**) foi inicialmente obtida a partir do extrato hexânico das folhas de *V. gracilis* utilizando-se técnicas cromatográficas clássicas com 0,03% de rendimento. Os dados experimentais de RMN e EM do composto foram devidamente comparados aos reportados na literatura (106). A isovismiafenona B (**2**), por sua vez, foi isolada com 0,025% de rendimento. A determinação estrutural baseou-se nos dados de RMN e EM experimentais, comparados aos dados da literatura (104).

Visando obter **1** e **2** com maior grau de pureza, a fim de confirmar a atividade larvicida destes, a clusiafenona A (**1**) foi sintetizada com rendimento global de 56 %, conforme figura 26. Enquanto a isovismiafenona B (**2**) foi obtida por meio de um segundo processo de isolamento, dessa vez a partir do fracionamento do extrato ARBO0293b, referente à nova coleta da espécie em março de 2020. Foram obtidos 2 mg do composto **2**.

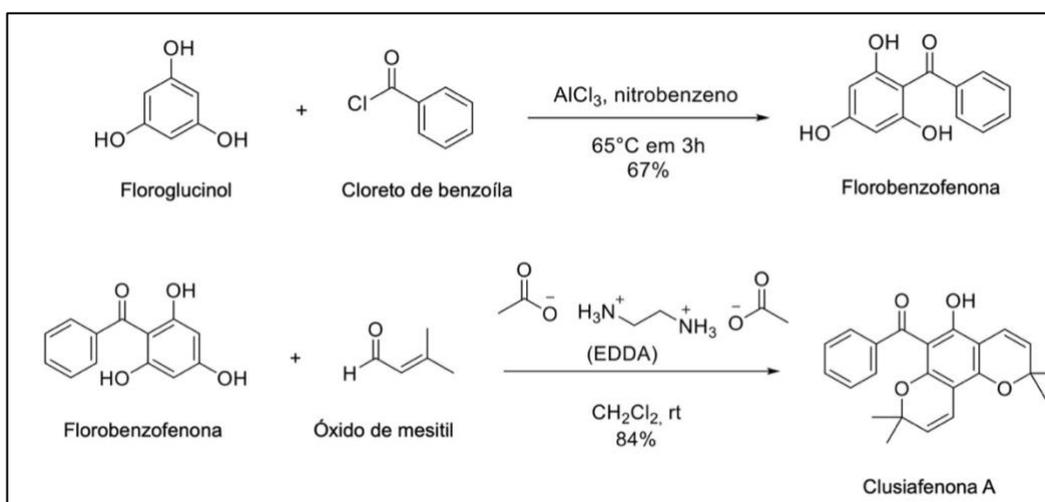


Figura 26 – Esquema das reações de síntese para obtenção de clusiafenona A.

Na análise do espectro de RMN de ^1H do composto **1** (Figura 27) foi possível observar dois singletos com deslocamentos químicos δ em 0,97 e 1,47 ppm integrando para seis hidrogênios cada, correspondentes à presença de quatro metilas. Há também a detecção de 4 dubletos com δ entre 5,27 a 6,71, com constante de acoplamento $J = 10$ Hz integrando para 1H cada. Estes sinais configuram o acoplamento em *orto* dos hidrogênios olefínicos nas posições 3 e 4; 9 e 10. Existem cinco hidrogênios na região aromática com δ entre 7,36 a 7,48 ppm e um hidrogênio bem deslocado com δ 12,71 ppm caracterizando a presença da hidroxila na posição 5. Os dados de RMN de ^1H apresentados na tabela 8, em conjunto à detecção do íon molecular protonado com m/z 363,1593 $[\text{M}+\text{H}]^+$, confirmam o isolamento da composto **1**, clusiafenona A, com o seu nome IUPAC: (5-hidroxi-2,2,8,8-tetrametil-2H,8H-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-6-il)fenilmetanona).

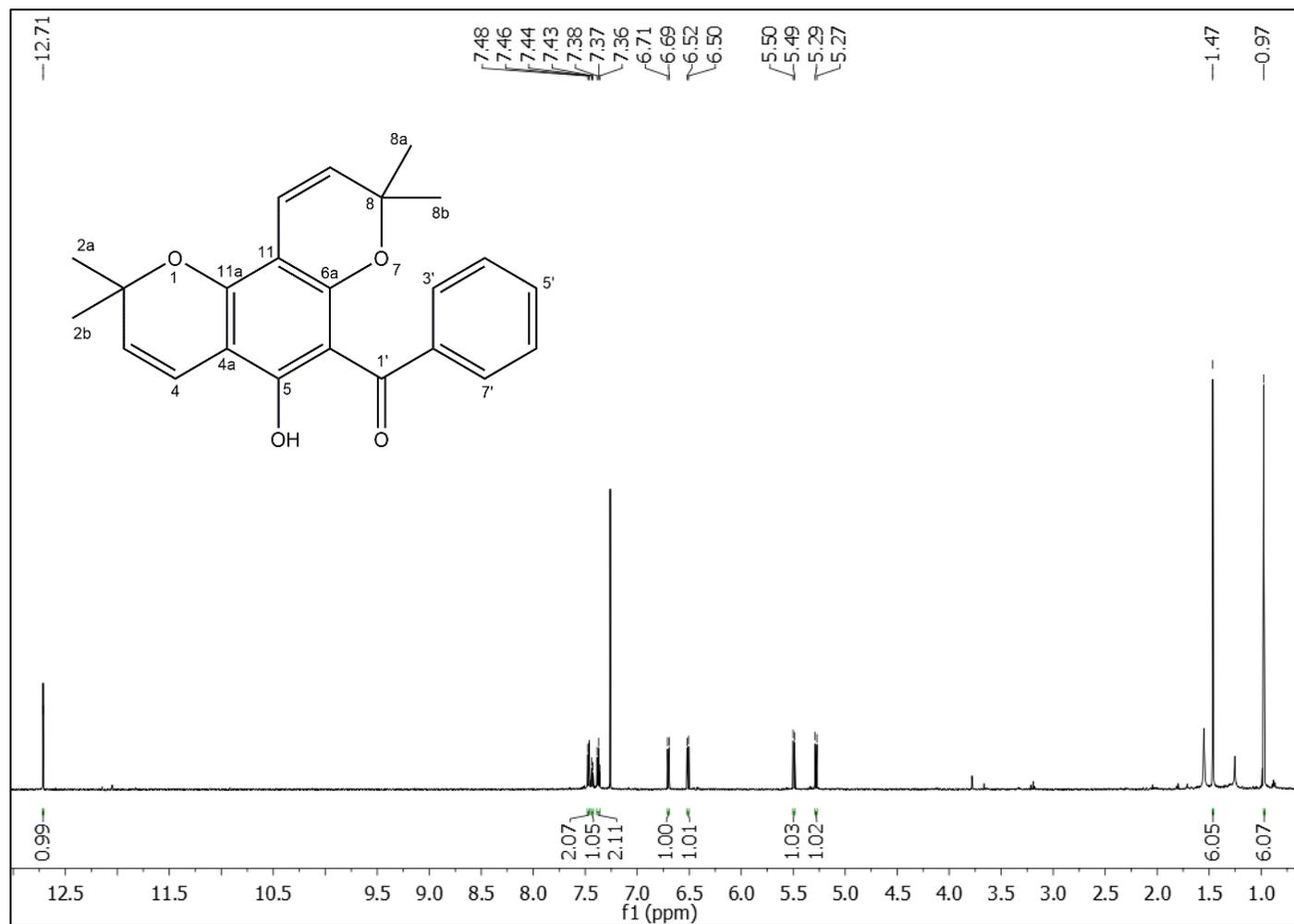


Figura 27 - Espectro de RMN ¹H 600 MHz da clusiafenona A (1).

Estudando a figura 28 para elucidação estrutural do composto **2**, verificou-se a presença de três singletos com δ em 1,45, 1,68 e 1,75 ppm. Um destes singletos está integrando para seis hidrogênios e os outros dois sinais correspondem a três hidrogênios cada. Esta configuração de sinais também caracteriza a existência de quatro metilas. Há um dubleto com δ em 3,25 ppm e $J = 7,0$ Hz indicando um CH₂ na posição 1'' que está ligado diretamente ao anel aromático com constituintes vicinais hidroxilados. Existe um multiplete com δ em 5,17 ppm na posição 2'' podendo acoplar com até oito hidrogênios vicinais ao mesmo tempo, além de dois dubletos com δ em 5,50 e 6,60 ppm com acoplamento em *orto* $J = 10$ Hz referindo-se às posições 3 e 4. Existem cinco hidrogênios aromáticos com δ entre 7,50 a 7,65 ppm e dois sinais que caracterizam as hidroxilas nas posições 5 e 7 com δ 8,73 e 9,20 ppm, respectivamente. Os dados de RMN e o íon molecular protonado com m/z 365,1749 [M+H]⁺ indicam o composto **2**, como isovismiafenona B com nome IUPAC: ([5,7-dihidroxi-2,2-dimetil-6-(3-metil-2-buten-1-il)- 2*H*-1-benzopiran-8-il]fenil-metanona).

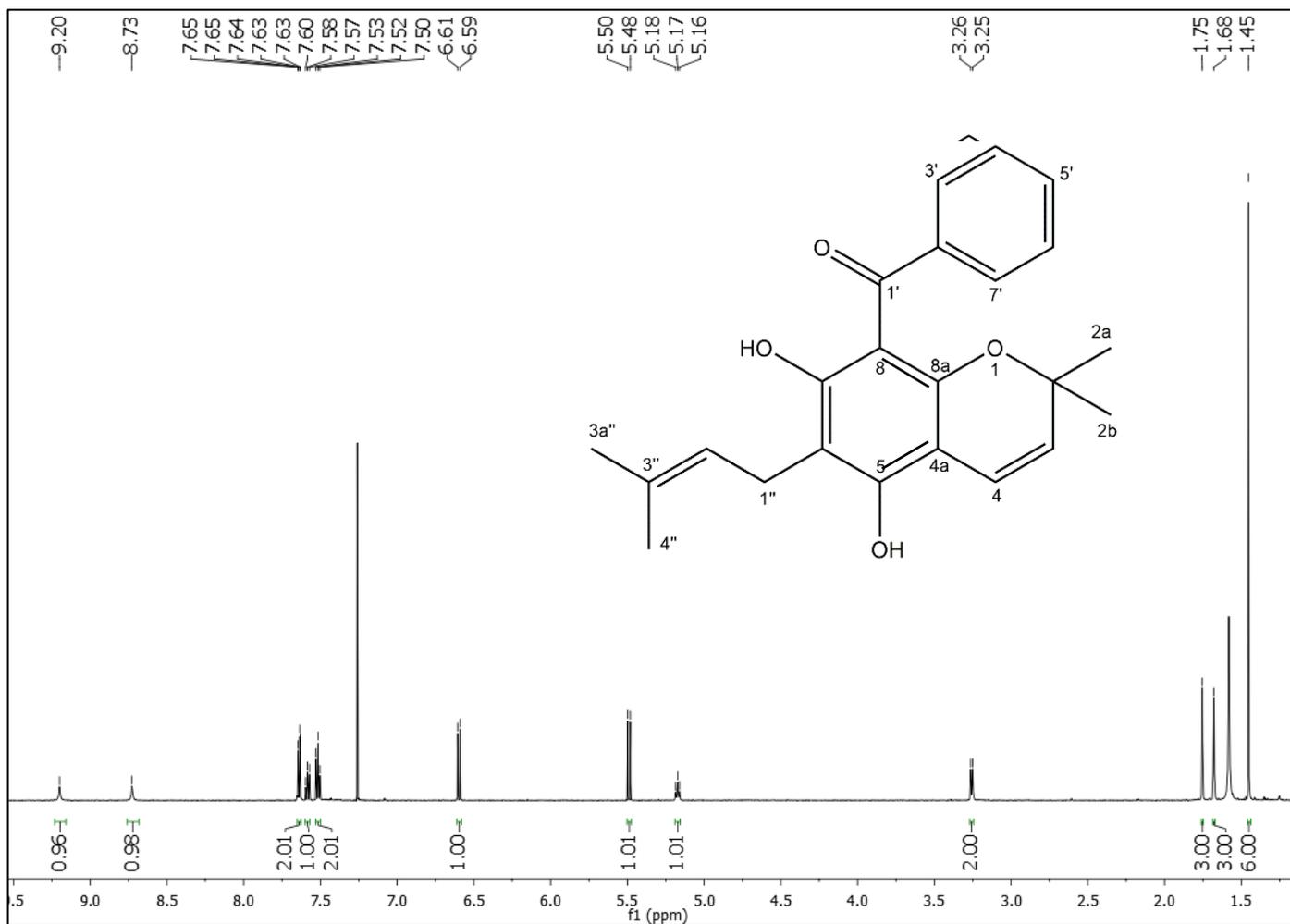


Figura 28 - Espectro de RMN ^1H 600 MHz de isovismiafenona B (2).

Os dados de RMN dos compostos **1** e **2** comparados com a literatura estão reunidos na tabela 8.

Tabela 8 - Dados de RMN ^1H 600 MHz de clusiafenona A (**1**) e isovismiafenona B (**2**) comparados com a literatura.

Posição	Composto 1 δ (I; ma; J)	Composto 1* δ (I; ma; J)	Composto 2 δ (I; ma; J)	Composto 2* δ (I; ma; J)
2a	1,47/0,97 (3H; s)	1,45/0,96 (3H; s)	1,75 (3H; s)	1,84 (3H; s)
2b	1,47/0,97 (3H; s)	1,45/0,96 (3H; s)	1,68 (3H; s)	1,78 (3H; s)
3	5,49 (1H; d; 10)	5,47 (1H; d; 10)	6,60 (1H; d; 10)	6,45 (1H; d; 10)
4	6,70 (1H; d; 10)	6,68 (1H; d; 10)	5,49 (1H; d; 10)	5,26 (1H; d; 10)
8a	1,47/0,97 (3H; s)	1,45/0,96 (3H; s)	-	-
8b	1,47/0,97 (3H; s)	1,45/0,96 (3H; s)	-	-
9	5,28 (1H; d; 10)	5,26 (1H; d; 10)	-	-
10	6,51 (1H; d; 10)	6,49 (1H; d; 10)	-	-
3'	7,47 (1H; m)	7,47 (1H; m)	7,64 (1H; m)	7,46 (1H; m)
4'	7,37 (1H; m)	7,35 (1H; m)	7,52 (1H; m)	7,35 (1H; m)
5'	7,43 (1H; m)	7,43 (1H; m)	7,58 (1H; m)	7,51 (1H; m)
6'	7,37 (1H; m)	7,37 (1H; m)	7,52 (1H; m)	7,58 (1H; m)
7'	7,47 (1H; m)	7,47 (1H; m)	7,64 (1H; m)	7,63 (1H; m)
1''	-	-	3,25 (2H; d; 7)	3,41 (2H; d; 7)
2''	-	-	5,17 (1H; m)	5,30 (1H; t; 7)
3a''	-	-	1,45 (3H; s)	0,95 (3H; s)
4''	-	-	1,45 (3H; s)	0,95 (3H; s)
OH-5	12,71 (s)	12,72 (s)	8,73 (s)	nd
OH-7	-	-	9,20 (s)	nd

δ = deslocamento químico; I = integral; ma = multiplicidade aparente; J = constante de acoplamento Hz. *Comparação com a literatura. nd = não detectado.

Com o objetivo de se ampliar o conhecimento de *V. gracilis*, considerando não terem sido encontrados na literatura estudos fitoquímicos sobre a espécie, prosseguiu-se com o isolamento de outros compostos a partir das frações ARBO12A004A e ARBO12A004B (obtidas por SPE), a partir de técnicas cromatográficas clássicas. Foram isolados quatro compostos da classe das antraquinonas: crisofanol (**5**), fisciona (**6**), vismiaquinona (**7**) e vismiaquinona D (**8**).

Crisofanol (**5**), $C_{15}H_{10}O_4+H^+$ (-8,2 ppm), foi obtido com rendimento de 0,53% (0,90 mg). Seus dados experimentais de RMN e EM corresponderam aos achados na literatura para o composto (116,117). Fisciona (**6**), $C_{16}H_{12}O_5+H^+$ (-7,02 ppm), foi obtida com 0,12% de rendimento (0,20 mg) e sua determinação por RMN e EM está de acordo com a literatura (116,118).

O espectro de RMN do composto **5** (Figura 29) evidencia três singletos com δ 12,14, 12,03 e 2,47 ppm indicando duas hidroxilas nas posições 1 e 8 e uma metila ligada ao carbono aromático 3. Além disso, existem cinco hidrogênios aromáticos com δ entre 7,11 a 7,84. Com relação ao composto **6** (Figura 30), quase todos sinais são semelhantes ao **5**. O diferencial de **6** é o singlete com δ 3,94 ppm determinando a presença de um grupo metoxila OCH_3 . Por isso, há quatro hidrogênios aromáticos com δ entre 6,69 a 7,64. Tais compostos **5** e **6** apresentaram íons moleculares protonados com m/z 255,0644 $[M+H]^+$ e 285,0743 $[M+H]^+$, respectivamente. Portanto, o crisofanol (**5**) e a fisciona (**6**) foram nomeados seguindo a IUPAC como: 1,8-dihidroxi-3-metil-9,10-antracenediona e 1,8-dihidroxi-3-metoxi-6-metil-9,10-antracenediona, respectivamente.

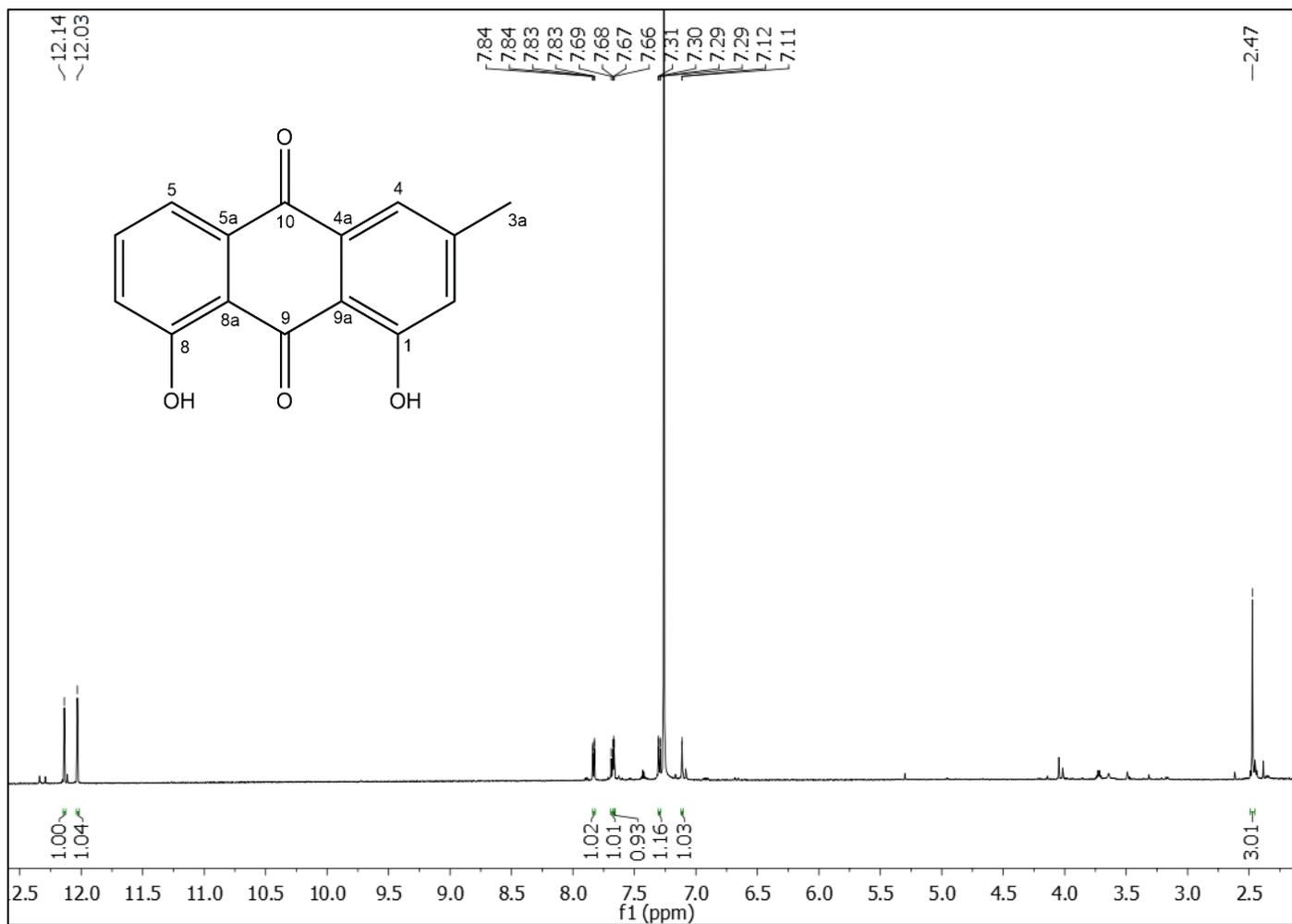


Figura 29 - Espectro de RMN ^1H 600 MHz do crisofanol (5).

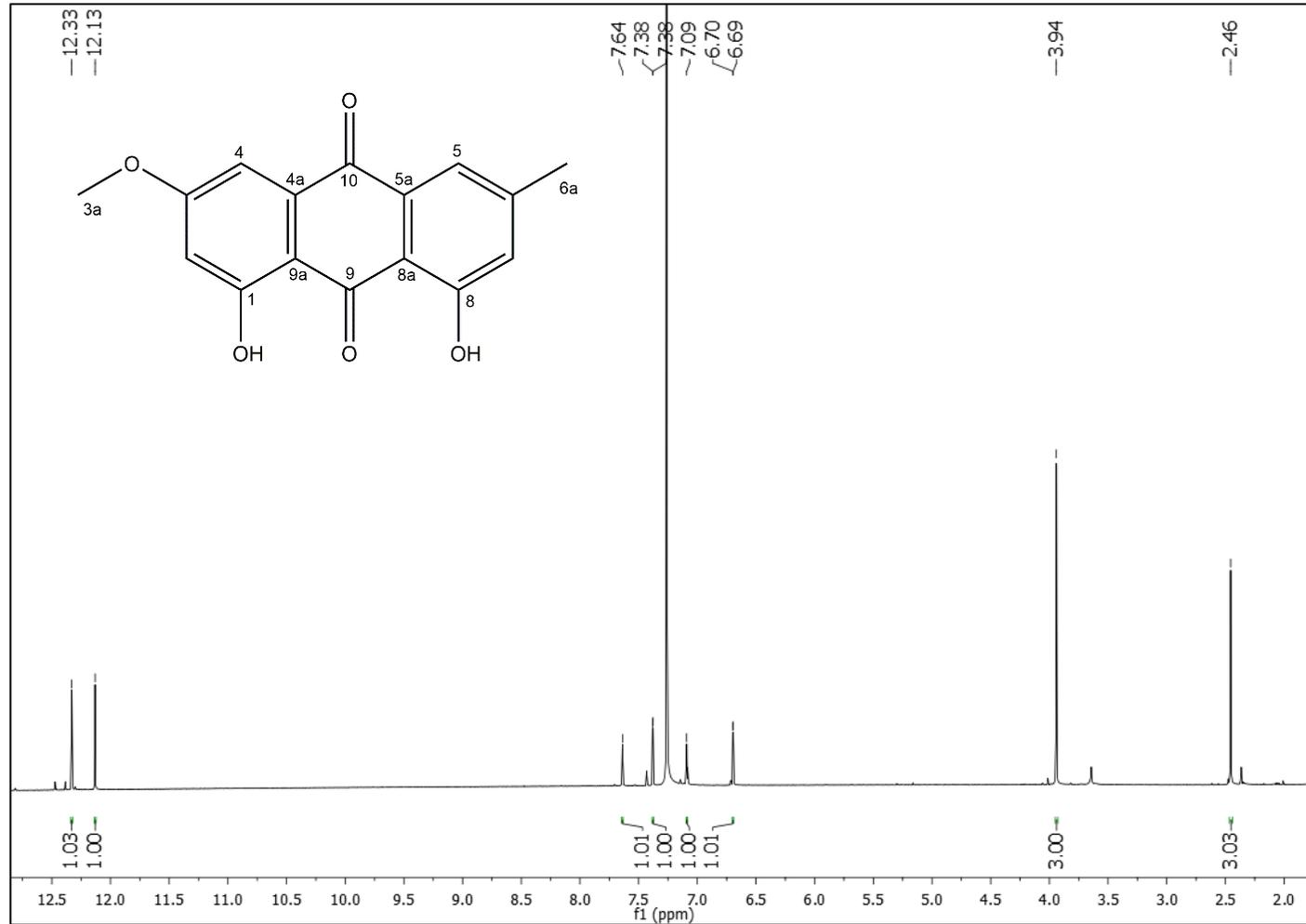


Figura 30 - Espectro de RMN ^1H 600 MHz da fisciona (**6**).

A tabela 9 apresenta os dados de RMN de ^1H dos compostos **5** e **6** em comparação com a literatura.

Tabela 9 - Dados de RMN ^1H 600 MHz de crisofanol (**5**) e fisciona (**6**) comparados com a literatura.

Posição	Composto 5 δ (I; ma; J)	Composto 5* δ (I; ma; J)	Composto 6 δ (I; ma; J)	Composto 6* δ (I; ma; J)
2	7,11 (1H; s)	7,06 (1H; s)	7,09 (1H; s)	7,07 (1H)
4	7,66 (1H; s)	7,61 (1H; s)	7,64 (1H; s)	7,62 (1H)
5	7,83 (1H; d; 8)	7,78 (1H; d; 8)	7,38 (1H; d; 2,5)	7,36 (1H)
6	7,68 (1H; m)	7,64 (1H; t; 8)	-	-
7	7,29 (1H; d; 8)	7,25 (1H; d; 8)	6,69 (1H; d; 2,5)	6,68 (1H)
3a	2,44 (3H; s)	2,44 (3H; s)	3,94 (3H; s)	3,93 (3H)
6a	-	-	2,46 (3H; s)	2,44 (3H)
OH-1	12,03 (s)	11,98 (s)	12,33 (s)	12,30 (s)
OH-8	12,14 (s)	12,10 (s)	12,13 (s)	12,11 (s)

δ = deslocamento químico; I = integral; ma = multiplicidade aparente; J = constante de acoplamento Hz. *Comparação com a literatura.

A vismiaquinona (**7**) foi obtida com rendimento de 0,11% (0,50 mg), $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_5 + \text{H}^+$ (-1,98 ppm). Os sinais observados para o composto no espectro de RMN de ^1H (Figura 31), comparados com a literatura (119), incluem: dois singletos deslocados com δ em 12,97 e 12,11 ppm tipicamente para as hidroxilas ligadas aos anéis aromáticos, um singleto em δ 4,05 ppm para o grupo OCH_3 e outros três singletos em δ 2,45, 1,13 e 1,14 ppm denotando a presença de três metilas, sendo duas em ambientes similares e uma ligada diretamente à posição 6 do anel. Há um multiplete em 2,52 ppm correspondente à posição 3', e dois duplos dubletos em δ 6,66 e 6,92 ppm com $J = 16, 7,0$ e $1,2$ Hz. A constante $J = 16$ indica o acoplamento *trans* entre os hidrogênios 1' e 2'. A constante $J = 7,0$ demonstra o acoplamento *cis* entre as posições 2' e 3' e a constante $J = 1,2$ Hz significa o acoplamento *trans* à longa distância entre os hidrogênios 1' e 3'. Na região com δ entre 7,07 e 7,62 ppm há três hidrogênios aromáticos. Pela espectrometria de massas foi detectado o íon molecular com m/z 353,1382 $[\text{M} + \text{H}]^+$. Por estes dados estruturais a vismiaquinona (**7**) recebeu o nome IUPAC: 1,8-dihidroxi-3-metoxi-6-metil-2-(3-metil-1-buten-1-il)-9,10-antracenodiona.

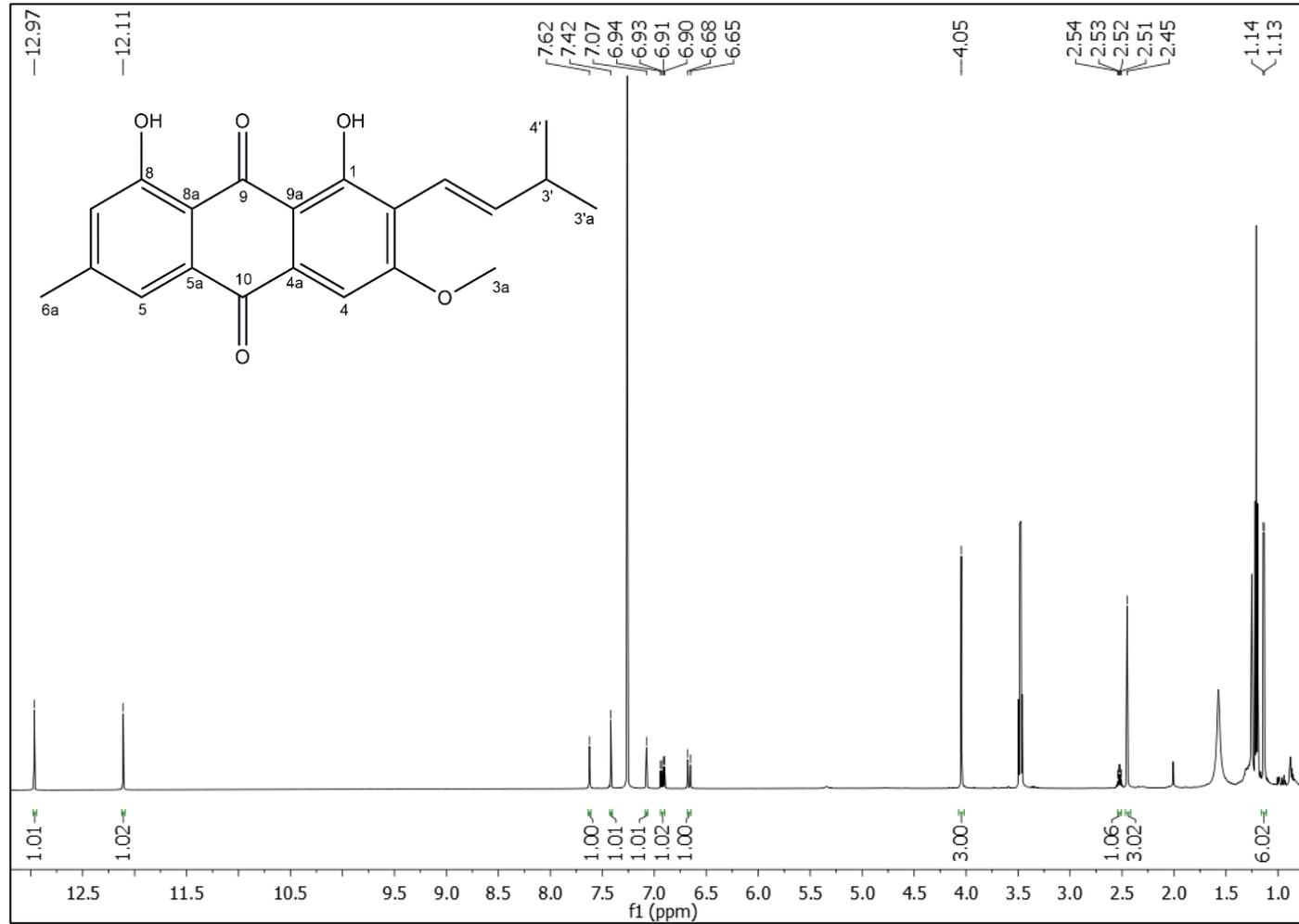


Figura 31 - Espectro de RMN ^1H 600 MHz da vismiaquinona (7).

A vismiaquinona D (**8**) $C_{21}H_{18}O_5+H^+$ (7,8 ppm), foi obtida em quantidade não mensurável. Os dados de RMN de 1H (Figura 32) e de massas do composto foram comparados com a literatura (119). No espectro foram detectados três singletos similarmente ao composto **7** indicando a presença de uma metoxila δ 4,02 ppm, duas metilas em ambientes semelhantes δ 1,57 ppm e uma metila ligada ao anel aromático δ 2,43 ppm. O hidrogênio da hidroxila foi verificado em δ 13,20 ppm e os hidrogênios aromáticos ficaram na região entre δ 7,07 e 7,57 ppm. Há também dois dubletos em δ 5,84 e 6,73 ppm com $J = 10$ caracterizando o acoplamento *orto* das posições 3 e 4. O íon molecular com m/z 351,1222 $[M+H]^+$ corrobora a estes dados estruturais para a vismiaquinona D (**8**). IUPAC: 11-hidroxi-5-metoxi-2,2,9-trimetil-2*H*-antra[1,2-*b*]piran-7,12-diona.

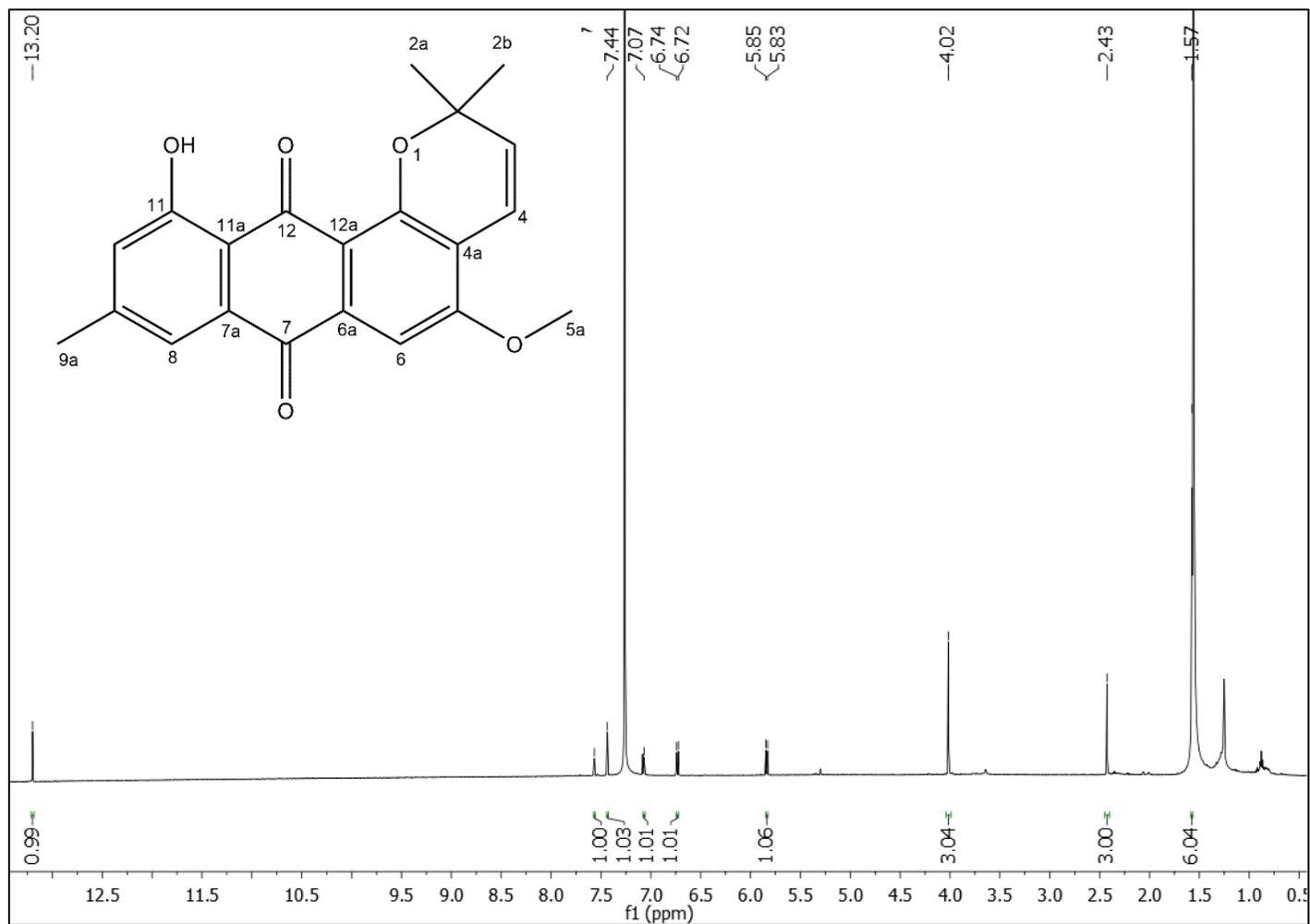


Figura 32 - Espectro de RMN ¹H 600 MHz da vismiaquinona D (**8**).

A tabela 10 reúne os dados de RMN ^1H comparados com a literatura dos compostos **7** e **8**.

Tabela 10 - Dados de RMN ^1H 600 MHz de vismiaquinona (**7**) e vismiaquinona D (**8**) comparados com a literatura.

Posição	Composto 7 δ (I; ma; J)	Composto 7* δ (I; ma; J)	Composto 8 δ (I; ma; J)	Composto 8* δ (I; ma; J)
2a	-	-	1,57 (3H; s)	1,57 (3H; s)
2b	-	-	1,57 (3H; s)	1,57 (3H; s)
3	-	-	5,84 (1H; d; 10)	5,83 (1H; d, 10)
3a	4,05 (3H; s)	4,04 (3H; s)	-	-
4	7,42 (1H; s)	7,40 (1H; s)	6,73 (1H; d; 10)	6,73 (1H; d; 10)
5	7,62 (1H; d; 1,5)	7,61 (1H; d; 1,5)	-	-
5a	-	-	4,02 (3H; s)	4,01 (3H; s)
6	-	-	7,44 (1H; s)	7,43 (1H; s)
6a	2,45 (3H; s)	2,44 (3H; s)	-	-
7	7,07 (1H; d; 1,5)	7,06 (1H; d; 1,6)	-	-
8	-	-	7,57 (1H; d; 1,5)	7,56 (1H; d; 1,5)
9a	-	-	2,43 (3H; s)	2,42 (3H; s)
10	-	-	7,07 (1H; d; 1,5)	7,06 (1H; d; 1,5)
1'	6,66 (1H; dd; 1,2, 16)	6,65 (1H; dd; 1,2, 16)	-	-
2'	6,92 (1H; dd; 7, 16)	6,91 (1H; dd; 7, 16)	-	-
3'	2,52 (1H; m)	2,52 (1H; qdd; 7,2; 7; 1,2)	-	-
3a'	1,13 (3H; d; 7,2)	1,13 (3H; d; 7,2)	-	-
4'	1,13 (3H; d; 7,2)	1,13 (3H; d; 7,2)	-	-
OH-1	12,97 (s)	12,94 (s)	-	-
OH-8	12,11 (s)	12,09 (s)	-	-
OH-11	-	-	13,20 (s)	13,19 (s)

δ = deslocamento químico; I = integral; ma = multiplicidade aparente; J = constante de acoplamento Hz. *Comparação com a literatura.

Todos compostos foram isolados com rendimentos muito baixos, variando de 0,11 a 0,53%, assim como **1** e **2**. Durante a realização das colunas, observou-se a presença de ácidos graxos nas frações coletadas, o que dificultava a obtenção de amostras puras, e levou à necessidade de coleta de picos em CLAE semipreparativa.

Os compostos **5** e **6** já foram identificados em espécies de *Vismia* (112,119–122). Crisofanol (**5**) apresentou atividade citotóxica em células humanas de hepatocarcinoma, e **6** ação anti-tumoral ao inibir uma fosfatase envolvida na fisiopatologia de câncer de mama em humanos (123). Essas antraquinonas são conhecidas por seu efeito laxativo e já demonstraram atividades antifúngica, antibacteriana e antiprotozoária (124). Os compostos **7** e **8** também já foram identificadas em espécies de *Vismia* (119,122,125), sendo a vismiaquinona (**7**) considerada uma antraquinona típica deste gênero (89).

4.5 ATIVIDADE LARVICIDA DOS COMPOSTOS OBTIDOS

Considerando os achados da metabolômica, os compostos **1** e **2** foram isolados e testados, promovendo 100% de mortalidade das larvas após 24 horas de tratamento. Como os espectros de RMN de ^1H dessas amostras apresentavam alguns sinais minoritários, indicando a presença de impurezas, **1** e **2** foram obtidos com pureza ainda mais elevada para confirmação da atividade biológica. Contudo, quando reavaliados, clusiafenona A (**1**) e isovismiafenona B (**2**) não foram larvicidas. Esses resultados sugerem que outros componentes minoritários presentes nas primeiras amostras testadas estavam associados à atividade larvicida observada, possivelmente atuando de forma sinérgica. Essa hipótese foi reforçada quando se testou a clusiafenona A sintetizada, que não promoveu atividade larvicida.

Os compostos crisofanol (**5**), fisciona (**6**) e vismiaquinona (**7**) isolados do extrato ativo também não apresentaram atividade larvicida, apesar de diversas antraquinonas já terem sido associadas à atividade tóxica em larvas em *Ae. aegypti* (28,67). A amostra de vismiaquinona D (**8**) não pôde ser testada, pois foi obtida em quantidade insuficiente para teste. Cabe ressaltar que os compostos **5** – **8** não foram estatisticamente significativos nas análises metabolômicas esplanadas.

Considerando que todos os compostos significativos nas análises estatísticas anotados (**1** – **4**) pertenciam à classe química das benzofenonas, outros compostos estruturalmente relacionados e disponíveis no laboratório foram testados em larvas: a

florobenzofenona (intermediário da síntese de **1**), a benzofenona e o cetoprofeno. A figura 33 apresenta todas as 5 benzofenonas avaliadas quanto à toxicidade em larvas de *Ae. aegypti*. Desses, apenas o composto comercial benzofenona apresentou atividade larvicida, o que sugere que o núcleo benzofenônico esteja envolvido no mecanismo de toxicidade. A substância apresentou atividade larvicida com CL_{50} de 16,35 $\mu\text{g/mL}$ (IC_{95} 16,00 a 16,72) e 14,99 $\mu\text{g/mL}$ (CL_{95} 14,50 a 15,45), em 24 e 48 horas respectivamente (Tabela 11).

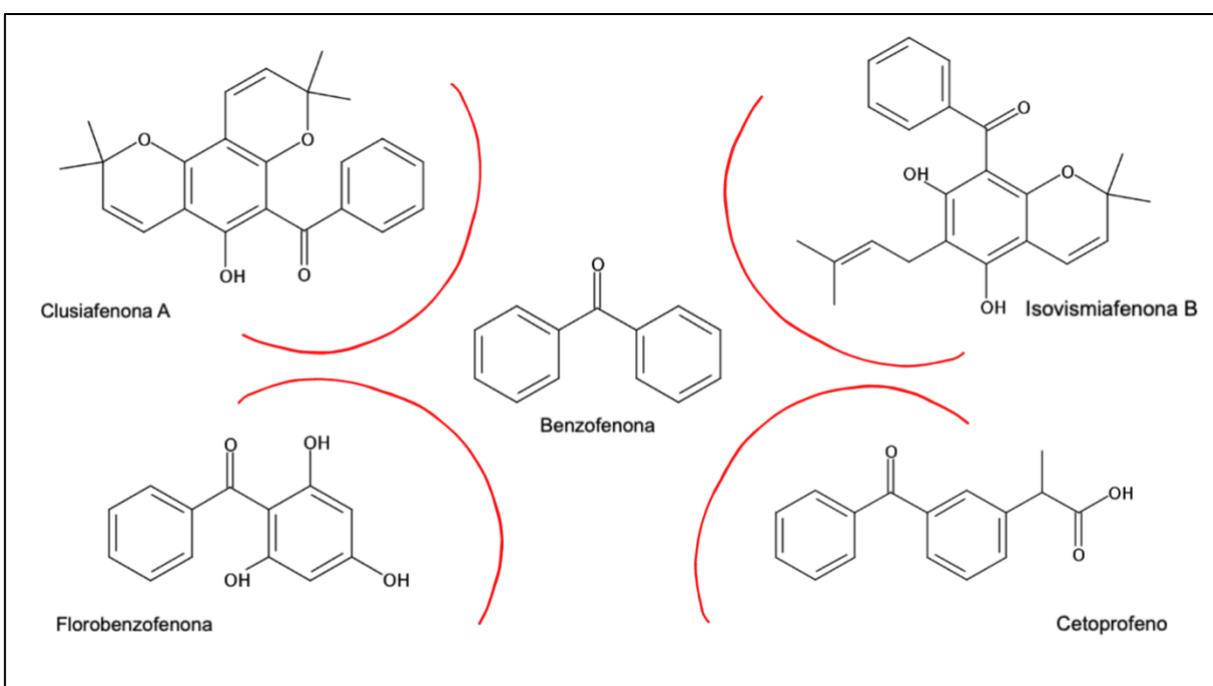


Figura 33 – Compostos da classe das benzofenonas, naturais e sintéticos, testados em larvas de *Ae. aegypti*. O composto testado como benzofenona comercial (centro da figura) foi o único que apresentou atividade larvicida.

Tabela 11 – Determinação da CL_{50} do composto comercial benzofenona testado em larvas de *Ae. aegypti*.

Amostra	Tempo (h)	CL_{50} $\mu\text{g/mL}$ (IC_{95}) ¹	CL_{95} $\mu\text{g/mL}$ (IC_{95})	Chi (p) ²	Slope	Intercept
Benzofenona	24	16,35 (16,00-16,72)	20,71 (19,85-22,00)	0,99	16,02	-19,44
	48	14,99 (14,50-15,45)	20,73 (19,61-22,45)	1,00	11,69	-13,75

¹IC: intervalo de confiança. ²Chi (p): indica se os dados estão adequados à regressão, em que valores de $p > 0,05$ são aceitáveis.

Adicionalmente, em testes com fêmeas adultas, a benzofenona promoveu *knockdown* de 100% dos mosquitos em 5 min no teste adulticida com garrafas, sendo este seu tempo diagnóstico. O composto promoveu também irritação por contato, no teste com o aparato *HITSS* (*High-throughput screening system*), causando percentual de escape das fêmeas de 22,78% ($\pm 5,93$) (Tabela 12). O composto não teve ação repelente espacial, mas mostrou-se um potencial candidato para o desenvolvimento de inseticidas, por atuar em diferentes estágios de desenvolvimento do mosquito.

Tabela 12 - Avaliação da irritação por contato (*HITSS: High-throughput screening system*) do composto benzofenona (dose de 25 nmol/cm²) em fêmeas de *Ae. aegypti*.

Amostra	nº replicatas (nº mosq.)	Escape (nº mosquitos) média (EP ¹)		% Escape ² média (EP)	P ³
		Controle	Tratamento		
Benzofenona	6 (60)	0,17 (0,17)	2,50 (0,67)	22,78 (5,93)	0,015

¹ EP: erro padrão. ² % Escape corrigido pela mortalidade no cilindro tratado e escape no controle. ³ Valor de P calculado pelo teste de *Wilcoxon* para a diferença entre o escape no cilindro com tratamento e o cilindro controle (solvente de diluição da amostra).

A maioria das benzofenonas naturais relatadas na literatura foram detectadas em *Clusia*, *Garcinia* e *Hypericum*. Apenas em *Clusia* já foram identificadas 55 diferentes benzofenonas poli-isopreniladas, em flores, frutos, caule, ramos e folhas, sendo essa uma classe de compostos típica desse gênero. Ratifica-se que, apesar de *Vismia gracilis* pertencer atualmente à família Hypericaceae, *Clusia* e *Vismia* já foram consideradas da mesma família, Clusiaceae (91).

Estruturalmente, as benzofenonas compartilham um núcleo comum de dois anéis ligados por um grupo carbonílico (Figura 36). Um dos anéis é derivado da via do shikimato e tem um benzoil-CoA ou derivado como precursor. O outro anel tem origem policetídica. Este último pode ser prenilado e sofrer posterior ciclização, dando origem a estruturas variadas (91). Esses metabólitos são associadas a inúmeras atividades biológicas, como antifúngica, antioxidante, antimicrobiana, antiviral e até anti-cancerígena (114,126).

Benzofenonas são metabólitos com potencial para o desenvolvimento de inseticidas. Muitos derivados desses compostos com diferentes estruturas e funções já foram descritos, contudo poucos compostos desta classe tiveram sua atividade biológica avaliada (127). Derivados de benzofenona associados a grupos indol apresentaram atividade larvicida em *Culex quinquefasciatus* (128). Uma fração de um extrato hexânico das partes aéreas de *Hypericum carinatum* (Clusiaceae), cujos compostos majoritários eram as benzofenonas carifenona A e carifenona B, apresentou atividade tóxica para larvas de *Ae. aegypti* com CL₅₀ de 100 µg/mL (129). Comparativamente, o extrato hexânico das folhas de *V. gracilis* reportado por este trabalho, ARBO0293, foi duas vezes mais potente que a fração de *H. carinatum* mencionada acima. Extratos hexânicos das flores de *Clusia fluminensis* (Clusiaceae) e seu principal componente, a benzofenona clusianona, também apresentaram atividade em larvas de *Ae. aegypti* (127).

O mecanismo de ação das benzofenonas em larvas de *Ae. aegypti* ainda não foi estudado, contudo compostos estruturalmente relacionados, os benzopiranos, também tóxicos para larvas de *Ae. aegypti* (130), são reconhecidos por inibir monoaminoxidases (131). Benzofenonas poli-isopreniladas possuem ação anticancerígena pelos mecanismos de indução da apoptose celular, modulação da expressão gênica nas células cancerosas, além de interagirem com a formação de microtúbulos durante a divisão celular (126).

Em revisão bibliográfica sobre as benzofenonas anotadas, identificou-se que a clusiafenona A (1) apresentou atividade anti-HIV (132), além disso inibiu o apetite de uma espécie de cupim, *Coptotermes formosanus* Shiraki. Esta atividade foi associada à presença do anel pirano na estrutura (133). A inibição do apetite é um dos mecanismos de ação de inseticidas (28). Não foram encontrados estudos biológicos com os demais compostos identificados.

Tendo em vista a toxicidade do extrato hexânico das folhas de *V. gracilis* - ARBO0293 e do composto benzofenona, as larvas tratadas com as respectivas amostras foram avaliadas sob estereomicroscópio. A figura 34A corresponde à larva controle, sem tratamento. Observou-se que ambos os tratamentos causaram deformações no corpo das larvas e alterações no sistema digestivo. Na figura 34B estão larvas tratadas com o extrato, e nas figuras 34C e 34D, com a benzofenona. Observou-se a presença de regiões de desorganização celular no tubo digestivo que

criaram espaços entre células, indicados por setas nestas imagens. Esse achado já foi reportado em larvas tratadas com outros produtos naturais (134–137). Além desta alteração, o extrato promoveu também deformação das papilas anais, conforme já observado em larvas tratadas com óleos essenciais (138). Larvas tratadas com a benzofenona apresentaram o corpo hipertrofiado (Figura 34C) comparado com o controle (Figura 34A), conforme já descrito para tratamentos com extratos de *Schinus terebinthifolius* e *Magonia pubescens* (134,136).

Na figura 35 as larvas tratadas com a benzofenona (esquerda da imagem) e com o extrato (direita da imagem) estão lado a lado na mesma figura (Figura 35A) e comparadas com a larva controle, sem tratamento (Figura 35B). O extrato aparenta ter causado maior deformação da larva em comparação com a tratada com benzofenona. O maior número de alterações provocadas pelo extrato reforça a hipótese discutida previamente de que haja um efeito sinérgico de compostos presentes no extrato promovendo o efeito larvicida observado nos testes biológicos. As demais benzofenonas anotadas, **3** e **4**, que não foram isoladas, podem também estar associadas à atividade larvicida do extrato, conforme sugere sua relevância estatística nos estudos metabolômicos.

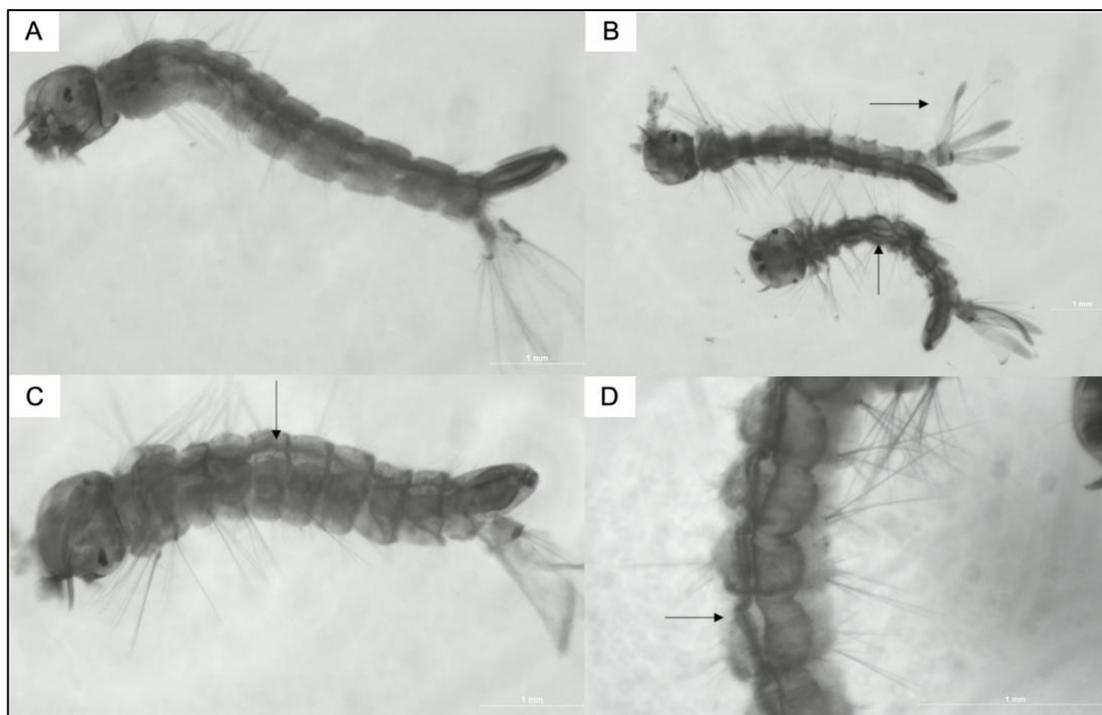


Figura 34 - Estereomicroscopia das larvas tratadas com extrato ARBO0293 e benzofenona. **A.** Larva controle. **B.** Larvas tratadas com o extrato. Em destaque (setas), papilas alteradas e presença de espaços no tubo digestivo, indicando desorganização celular. **C.** Larva tratada com a benzofenona, apresentando corpo hipertrofiado e presença de espaço no tubo digestivo (seta). **D.** Foco nos espaços indicando desorganização celular no tubo digestivo (seta) de larva tratada com benzofenona.

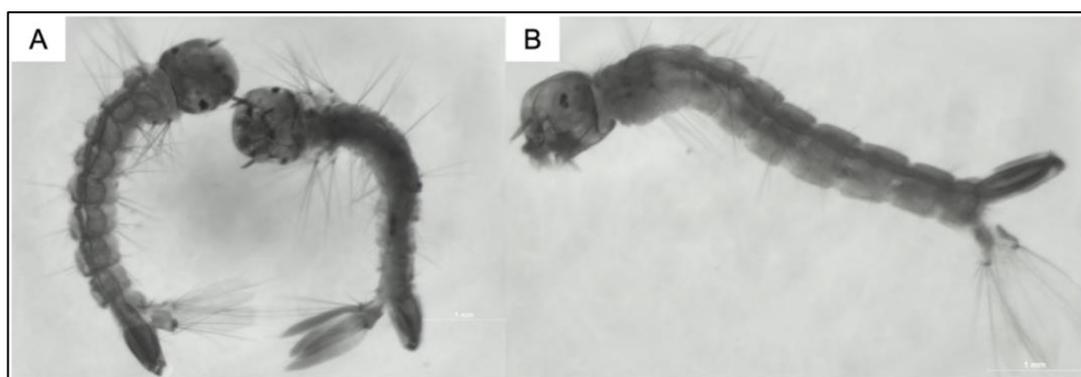


Figura 35 - Larvas tratadas com extrato ARBO0293 e benzofenona comparadas com a larva controle. **A.** Larva tratada com benzofenona (esquerda) e extrato (direita). **B.** Larva controle sem tratamento.

5 CONCLUSÃO

Este trabalho é o primeiro estudo fitoquímico e de atividade biológica de *Vismia gracilis* em *Aedes aegypti*. O extrato hexânico das folhas de *V. gracilis* (ARBO0293) apresentou atividade larvicida, com CL_{50} de 46,48 $\mu\text{g/mL}$ e duas vezes mais potente após 48 horas de tratamento (CL_{50} 20,57 $\mu\text{g/mL}$). Análises metabolômicas foram utilizadas como estratégia para direcionar o isolamento de compostos potencialmente ativos presentes no extrato.

A avaliação conjunta das análises estatísticas apresentadas pelo estudo metabolômico foram capazes de diferenciar o grupo de frações ativas das inativas, mesmo essas amostras apresentando perfil cromatográfico complexo. Adicionalmente, dos compostos estatisticamente significativos para os agrupamentos, quatro foram anotados: clusiafenona A (1), isovismiafenona B (2), mirtiafenona B (3) e um derivado de clusiafenona (4), sendo todos eles pertencentes à classe das benzofenonas. Clusiafenona A (1) e isovismiafenona B (2) foram isolados e testados, porém não foram ativos.

A atividade larvicida do extrato não foi atribuída isoladamente a nenhum dos compostos purificados. Contudo, considerando a atividade das amostras inicialmente obtidas com presença majoritária de clusiafenona A (1) e isovismiafenona B (2), sugere-se que haja ação sinérgica de metabólitos minoritários contribuindo para a atividade larvicida do extrato. As análises morfológicas por estereomicroscopia reforçaram essa hipótese, mostrando que, apesar de ambas as amostras (benzofenona e extrato) terem promovido deformações do trato digestivo das larvas, o extrato causou deformações mais severas. Ainda, as demais benzofenonas anotadas (3 e 4), que não tiveram sua atividade biológica observada, também poderiam contribuir para a toxicidade do extrato. Porém há necessidade de que estes compostos sejam isolados e testados para confirmar essa hipótese.

Três outras benzofenonas sintéticas foram adicionalmente avaliadas: benzofenona, cetoprofeno e florobenzofenona. Dentre eles, apenas a benzofenona apresentou atividade larvicida, com CL_{50} de 16,35 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando que o núcleo comum às benzofenonas tem relação com o mecanismo de toxicidade em larvas de *Ae. aegypti*. Além disso, o composto apresentou repelência mediada por contato (teste

de irritação por contato), promovendo 22,73% de escape a 25 nmol/cm², e atividade adulticida, com *knockdown* de fêmeas após 5 min de exposição no teste de garrafas do CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*). Dessa forma, esse estudo reforça o potencial inseticida de benzofenonas.

Por fim, este trabalho ampliou o conhecimento químico de *Vismia gracilis* ao identificar/anotar oito compostos presentes no extrato: as benzofenonas - clusiafenona A (1), isovismiafenona B (2), mirtiafenona B (3) e um derivado de clusiafenona (4); e as antraquinonas - crisofanol (5), fisciona (6), vismiaquinona (7) e vismiaquinona D (8).

6 REFERÊNCIAS

1. Lima-Camara TN. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. *Rev Saude Publica*. 2016;50(36).
2. Mayer S V., Tesh RB, Vasilakis N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta Trop*. 2017;166:155–63.
3. de Andrade GC, Ventura C V., Filho PA de AM, Maia M, Vianello S, Rodrigues EB. Arboviruses and the eye. *Int J Retin Vitro*. 2017;3(4):1–7.
4. Leal WS. The enigmatic reception of DEET - The gold standard of insect repellents. *Curr Opin Insect Sci*. 2014;6:93–8.
5. Navarro D. O Canal do Panamá: política e estratégia. *Univ Relações Int*. 2015;13(2):99–106.
6. Paluch G, Bartholomay L, Coats J. Mosquito repellents: A review of chemical structure diversity and olfaction. *Pest Manag Sci*. 2010;66(9):925–35.
7. Da Silveira Oliveira AFC, Teixeira RR, De Oliveira AS, De Souza APM, Da Silva ML, De Paula SO, et al. Potential antivirals: Natural products targeting replication enzymes of dengue and Chikungunya viruses. *Molecules*. 2017;22(505):1–20.
8. World Health Organization. Dengue and severe dengue [Internet]. World Health Organization. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
9. World Health Organization. Dengue Control [Internet]. World Health Organization. Disponível em: http://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/en/
10. Achee NL, Grieco JP, Vatandoost H, Seixas G, Pinto J, Ching-Ng L, et al. Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(1):1–22.
11. 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).
12. Pan American Health Organization, World Health Organization. Epidemiological Update: Dengue [Internet]. Washington, DC: PAHO / WHO; 2020. Disponível

em:

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

13. Brasil. Boletim Epidemiológico 22 - monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 34. Secr Vigilância em Saúde Ministério da Saúde Bras. 2019;50(22):1–11.
14. Iwamura T, Guzman-Holst A, Murray KA. Accelerating invasion potential of disease vector *Aedes aegypti* under climate change. *Nat Commun.* 2020;11(1).
15. Lindsay SW, Wilson A, Golding N, Scott TW, Takken W. Improving the built environment in urban areas to control *Aedes aegypti*-borne diseases. *Bull World Health Organ.* 2017;95(8):607–8.
16. Norris EJ, Coats JR. Current and future repellent technologies: The potential of spatial repellents and their place in mosquito-borne disease control. *Int J Environ Res Public Health.* 2017;14(2).
17. Laura de Sene Amâncio Zara A, Maria dos Santos S, Synthia Fernandes-Oliveira E, Gomes Carvalho R, Evelim Coelho G. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiol e Serviços Saúde.* 2016;25(2):1–2.
18. Silvério MRS, Espindola LS, Lopes NP, Vieira PC. Plant Natural Products for the Control of *Aedes aegypti*: The Main Vector of Important Arboviruses. *Molecules.* 2020;25(15):1–45.
19. Gould E, Pettersson J, Higgs S, Charrel R, de Lamballerie X. Emerging arboviruses: Why today? *One Heal.* 2017;4:1–13.
20. Kamal M, Kenawy MA, Rady MH, Khaled AS, Samy AM. Mapping the global potential distributions of two arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus* under changing climate. *PLoS One.* 2018;13(12):1–21.
21. Anoopkumar AN, Puthur S, Varghese P, Rebello S, Aneesh EM. Life cycle, bioecology and DNA barcoding of mosquitoes *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes albopictus* (Skuse). *J Commun Dis.* 2017;49(3):32–41.
22. Natal D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. *Biológico, São Paulo.* 2002;64(2):205–7.
23. Michael J Nelson. *Aedes aegypti*: biology and ecology [Internet]. Washington:

- Pan American Health Organization; 1986. Disponível em: http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/28514/PNSP8664_eng.pdf?sequence=1
24. Klowden MJ. Vector behavior. In: Beaty BJ, Maquardt WC, editors. The biology of disease vectors. 87(2), 219. Bulletin of Entomological Research; 1997. p. 34–50.
 25. 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.
 26. Brasil. Ministério da Saúde. Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue [Internet]. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2009. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_prevencao_controle_dengue.pdf
 27. Ling N. Gambusia in New Zealand: Really bad or just misunderstood? New Zeal J Mar Freshw Res. 2004;38(3):473–80.
 28. Pavela R, Maggi F, Iannarelli R, Benelli G. Plant extracts for developing mosquito larvicides: From laboratory to the field, with insights on the modes of action. Acta Trop. 2019;193:236–71.
 29. O'Neill SL. The Use of Wolbachia by the World Mosquito Program to Interrupt Transmission of Aedes aegypti Transmitted Viruses. In: Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies Advances in Experimental Medicine and Biology. 2018. p. 265–76.
 30. Wallace H. Mosquitos geneticamente modificados: preocupações atuais [Internet]. Third World Network e Fundação Heinrich Böll Brasil. Penang, Malásia: Third World Network e Fundação Heinrich Böll Brasil; 2013. Disponível em: http://br.boell.org/sites/default/files/livro_mosquitos_geneticamente_modificados_web_bollbrasil.pdf
 31. Andrade PP De, Lima FJ, Nepomuceno AL, Gorgônio F, Helena M, Zanettini B. Bulletin of the World Health Organization Use - Use of transgenic Aedes perception and assessment. 2016;94:766–71.
 32. Evans BR, Kotsakiozi P, Costa-da-Silva AL, Ioshino RS, Garziera L, Pedrosa MC, et al. Transgenic Aedes aegypti Mosquitoes Transfer Genes into a Natural

- Population. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–6.
33. Fiorenzano JM, Koehler PG, Xue R De. Attractive toxic sugar bait (ATSB) for control of mosquitoes and its impact on non-target organisms: A review. *Int J Environ Res Public Health*. 2017;14(4).
 34. Bellinato DF, Viana-Medeiros PF, Araújo SC, Martins AJ, Lima JBP, Valle D. Resistance status to the insecticides temephos, deltamethrin, and diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* populations. *Biomed Res Int*. 2016;2016.
 35. World Health Organization. Monitoring and Managing Insecticide Resistance in *Aedes* mosquito Populations - Interim guidance for entomologists [Internet]. World Health Organization. 2016. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204588/2/WHO_ZIKV_VC_16.1_eng.pdf
 36. Samuel M, Maoz D, Manrique P, Ward T, Runge-Ranzinger S, Toledo J, et al. Community effectiveness of indoor spraying as a dengue vector control method: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(7).
 37. World Health Organization. Pyriproxyfen in Drinking-water: Use for Vector Control in Drinking-water Sources and Containers. WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Geneva: World Health Organization; 2008.
 38. Fernandes KM, Tomé HVV, Miranda FR, Gonçalves WG, Pascini TV, Serrão JE, et al. *Aedes aegypti* larvae treated with spinosad produce adults with damaged midgut and reduced fecundity. *Chemosphere*. 2019;221:464–70.
 39. Abeyasuriya KGTN, Nugapola NWNP, Perera MDB, Karunaratne WAIP, Karunaratne SHPP. Effect of dengue mosquito control insecticide thermal fogging on non-target insects. *Int J Trop Insect Sci*. 2017;37(1):11–8.
 40. Van Den Berg H, Manuweera G, Konradsen F. Global trends in the production and use of DDT for control of malaria and other vector-borne diseases. *Malar J*. 2017;16(401):1–8.
 41. Puthur S, Anoopkumar AN, Rebello S, Aneesh EM. *Hypericum japonicum*: a Double-Headed Sword to Combat Vector Control and Cancer. *Appl Biochem Biotechnol*. 2018;186(1):1–11.
 42. Achee NL, Sardelis MR, Dusfour I, Chauhan KR, Grieco JP. Characterization of Spatial Repellent, Contact Irritant, and Toxicant Chemical Actions of Standard Vector Control Compounds 1. *J Am Mosq Control Assoc*. 2009;25(2):156–67.

43. Choi DB, Grieco JP, Apperson CS, Schal C. Effect of Spatial Repellent Exposure on Dengue Vector Attraction to Oviposition Sites. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(7):1–11.
44. Grieco JP, Achee NL, Chareonviriyaphap T, Suwonkerd W, Chauhan K, Sardelis MR, et al. A new classification system for the actions of IRS chemicals traditionally used for malaria control. *PLoS One*. 2007;2(8).
45. Achee NL, Bangs MJ, Farlow R, Killeen GF, Lindsay S, Logan JG, et al. Spatial repellents: From discovery and development to evidence-based validation. *Malar J*. 2012;11:1–9.
46. Achee N, Masuoka P, Smith P, Martin N, Chareonviriyaphap T, Polsomboon S, et al. Identifying the effective concentration for spatial repellency of the dengue vector *Aedes aegypti*. *Parasites and Vectors*. 2012;5(1):1–9.
47. Estrada JLT, Moscoso KEP, Salas IF, Achee NL, Grieco JP. Spatial repellency and other effects of transfluthrin and linalool on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *J Vector Ecol*. 2019;44(1):89–93.
48. World Health Organization. Eleventh meeting of the WHO Vector Control Advisory Group [Internet]. World Health Organization. Geneva; 2019. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240000759>.
49. World Health Organization. Overview of intervention classes and prototype/products under Vector Control Advisory Group (VCAG) review for assessment of public health value [Internet]. 2019. p. 1–4. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/evaluation-process-vector-control-products/en/andonVCAGat:http://www.who.int/vector-control/vcag/en/>.
50. Paloque L, Triastuti A, Bourdy G, Haddad M. Natural Products as Antiparasitic Agents. In: *Natural Antimicrobial Agents* [Internet]. Springer, Cham; 2018. p. 215–45. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-67045-4>.
51. Li G, Lou HX. Strategies to diversify natural products for drug discovery. *Med Res Rev*. 2017;38(4):1–40.
52. Kishore N, Mishra BB, Tiwari VK, Tripathi V, Lall N. Natural products as leads to potential mosquitocides. *Phytochem Rev*. 2014;13:587–627.
53. Coelho AAM, de Paula JE, Espíndola LS. Atividade Larvívica de Extratos Vegetais sobre *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), em Condições de Laboratório. *BioAssay*. 2009;4(3):1–6.

54. Da Silva FC, De Barros FMC, Prophiro JS, Da Silva OS, Pereira TN, Bordignon SADL, et al. Larvicidal activity of lipophilic extract of *Hypericum carinatum* (Clusiaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and benzophenones determination. *Parasitol Res.* 2013;112(6):2367–71.
55. Beckles DM, Roessner U. Plant metabolomics: Applications and opportunities for agricultural biotechnology. First Edit. *Plant Biotechnology and Agriculture*. Elsevier Inc.; 2012. 67–81 p.
56. Oksman-Caldentey KM, Inzé D. Plant cell factories in the post-genomic era: New ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Sci.* 2004;9(9):433–40.
57. Saito K, Matsuda F. *Metabolomics for Functional Genomics, Systems Biology, and Biotechnology*. *Annu Rev Plant Biol.* 2010;61(1):463–89.
58. Zeng F, Xu P, Leal WS. Odorant receptors from *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* sensitive to floral compounds. *Insect Biochem Mol Biol.* 2019;113.
59. Anvisa. Produtos saneantes para o combate ao *Aedes aegypti* [Internet]. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2020. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/produtos-aedes>
60. Nguyen Q-BD, Vu M-AN, Hebert AA. Insect Repellents: An Updated Review for the Clinician. *J Am Acad Dermatol.* 2018.
61. Pavela R. History, presence and perspective of using plant extracts as commercial botanical insecticides and farm products for protection against insects - A review. *Plant Prot Sci.* 2016;52(4):229–41.
62. Chansang A, Champakaew D, Junkum A, Amornlerdpison D, Chaithong U, Jitpakdi A, et al. Potential of natural essential oils and cinnamaldehyde as insecticides against the dengue vector *aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2018;49(1):6–22.
63. Suwansirisilp K, Visetson S, Prabaripai A, Tanasinchayakul S, Grieco JP, Bangs MJ, et al. Behavioral responses of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to four essential oils in Thailand. *J Pest Sci (2004).* 2013;86:309–20.
64. Nararak J, Sathantriphop S, Kongmee M, Mahiou-Leddet V, Ollivier E, Manguin S, et al. Excito-repellent activity of β -caryophyllene oxide against *Aedes aegypti* and *Anopheles minimus*. *Acta Trop.* 2019;197.

65. Kumar S, Mishra M, Wahab N, Warikoo R. Larvicidal, repellent, and irritant potential of the seed-derived essential oil of *Apium graveolens* against dengue vector, *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Front Public Heal*. 2014;2:1–6.
66. Peach DAH, Almond M, Gries R, Gries G. Lemongrass and Cinnamon Bark: Plant Essential Oil Blend as a Spatial Repellent for Mosquitoes in a Field Setting. *J Med Entomol*. 2019;56(5):1346–52.
67. Silva RL, Demarque DP, Dusi RG, Albernaz LC, Espindola LS. Residual Larvicidal Activity of Quinones against *Aedes aegypti*. *Molecules*. 2020;25(3978):1–12.
68. Demarque DP, Dusi RG, de Sousa FDM, Grossi SM, Silvério MRS, Lopes NP, et al. Mass spectrometry-based metabolomics approach in the isolation of bioactive natural products. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–9.
69. Leyva M, French L, Pino O, Montada D, Morejón G, Marquetti M del C, et al. Plantas con actividad insecticida: una alternativa natural contra mosquitos. Estado actual de la temática en la región de las Americas. *Rev Biomédica*. 2017;28(3):89–115.
70. Covington BC, McLean JA, Bachmann BO. Comparative mass spectrometry-based metabolomics strategies for the investigation of microbial secondary metabolites. *Nat Prod Rep*. 2017;34(1):6–24.
71. Yeung PK. Metabolomics and biomarkers for drug discovery. *Metabolites*. 2018;8(1):10–2.
72. Pilon AC, Selegato DM, Fernandesb RP, Buena PCP, Pinhoa DR, Neto FC, et al. Metabolômica de plantas: métodos e desafios. *Quim Nov*. 2020;43(3):329–54.
73. Courant F, Antignac J-P, Dervilly-Pinel G, Bizec B Le. Basics of mass spectrometry based metabolomics. *Proteomics*. 2014;14:2369–88.
74. dos Santos VS, Macedo FA, do Vale JS, Silva DB, Carollo CA. Metabolomics as a tool for understanding the evolution of *Tabebuia sensu lato*. *Metabolomics*. 2017;13(6):0.
75. Vallverdú-Queralt A, Medina-Remón A, Casals-Ribes I, Amat M, Lamuela-Raventós RM. A Metabolomic Approach Differentiates between Conventional and Organic Ketchups. *J Agric Food Chem*. 2011;59(21):11703–10.
76. Moco S, Bino RJ, Vorst O, Verhoeven HA, Groot J De, Beek TA Van, et al. A

- liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato. *Plant Physiol.* 2006;141:1205–18.
77. Canuto GAB, Da Costa JL, Da Cruz PLR, De Souza ARL, Faccio AT, Klassen A, et al. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. *Quim Nova.* 2018;41(1):75–91.
 78. Yuliana ND, Khatib A, Choi YH, Verpoorte R. Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. *Phyther Res.* 2011;25(2):157–69.
 79. Olivon F, Grelier G, Roussi F, Litaudon M, Touboul D. MZmine 2 Data-Preprocessing to Enhance Molecular Networking Reliability. *Anal Chem.* 2017;89(15):7836–40.
 80. Roessner U, School DAD. *Metabolomics Tools for Natural Product Discovery Methods and Protocols* [Internet]. Walker JM, editor. Vol. 1055. Victoria: Humana Press; 2013. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-577-4>.
 81. Chong J, Wishart DS, Xia J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Curr Protoc Bioinforma.* 2019;68(e86):1–128.
 82. Vogel Ely C, Shimizu G, Martins M, Marinho L. *Hypericaceae in Flora do Brasil 2020 em construção* [Internet]. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2020 [Acessado em 9 mar 2020]. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB84127>
 83. Tropicos.org. *Vismia gracilis* Hieron. [Internet]. Missouri Botanical Garden. 2020 [acessado em 20 ago 2020]. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/7800485>
 84. Hopkins MJG. Flora Da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil. *Rodriguesia.* 2005;56(86):9–25.
 85. Hussain H, Hussain J, Al-Harrasi A, Saleem M, Green IR, Ree T Van, et al. Chemistry and biology of genus *Vismia*. *Pharm Biol.* 2012;50(11):1448–62.
 86. Chase MW, Christenhusz MJM, Fay MF, Byng JW, Judd WS, Soltis DE, et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot J Linn Soc.* 2016;181(1):1–20.
 87. Rojas J, Buitrago A. The Genus *Vismia*: Geographical Distribution, Chemical Composition and Recent Biological Studies. In: Martinez JL, Muñoz-Acevedo A,

- Rai M, editors. *Ethnobotany Application of Medicinal Plants*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2018. p. 105–35.
88. Marinho LC, Ely CV, Amorim AM. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Hypericaceae. *Rodriguesia*. 2017;68(3):979–86.
 89. Tala MF, Talonsi FM, Wabo HK, Eliane J, Lantovololona R, Tane P, et al. Anthraquinones and triterpenoids from seeds of *Vismia guineensis*. *Biochem Syst Ecol*. 2013;50:310–2.
 90. Vizcaya M, Morales A, Rojas J, Nunez R. Revisión bibliográfica sobre la composición química y actividades farmacológicas del género *Vismia* (Guttiferae). *Boletín Latinoam y del Caribe Plantas Med y Aromáticas*. 2012;11(1):12–34.
 91. Anholeti MC, Paiva SR de, Figueiredo MR, Kaplan MAC. Chemosystematic aspects of polyisoprenylated benzophenones from the genus *Clusia*. *An Acad Bras Cienc*. 2015;87(1):289–301.
 92. Rocha GPE, Vieira DLM, Simon MF. Fast natural regeneration in abandoned pastures in southern Amazonia. *For Ecol Manage*. 2016;370:93–101.
 93. RStudio Team. *RStudio: Integrated Development for R* [Internet]. Boston, MA: RStudio, Inc.; 2018. Disponível em: <http://www.rstudio.com/>
 94. Milesi P, Pocquet N, Labbé P. *BioRssay: A R Script For Bioassay Analyses*. 2013.
 95. World Health Organization. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides [Internet]. World Health Organization. Geneva; 2005. p. 1–41. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf?ua=1
 96. World Health Organization. Guidelines for efficacy testing of spatial repellents [Internet]. World Health Organization. Geneva; 2013. 58 p. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/78142/9789241505024_eng.pdf;jsessionid=A382A24B87FDC443D18392CDCEC74B29?sequence=1
 97. Grieco JP, Achee NL, Sardelis MR, Chauhan KR, Roberts DR. A novel high-throughput screening system to evaluate the behavioral response of adult mosquitoes to chemicals 1. *J Am Mosq Control Assoc*. 2005;21(4):404–11.
 98. SAS Institute Inc. *SAS Studio*. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.; 2018.

99. Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for Evaluating Insecticide Resistance in Vectors Using the CDC Bottle Bioassay. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 2019. p. 1–28.
100. Morris J. Karnovsky. A Formaldehyde-Glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for Use in Electron Microscopy. *J Cell Biol.* 1965;27(2):1A-149A.
101. Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Orešič M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics.* 2010;11(395):1–11.
102. Myers OD, Sumner SJ, Li S, Barnes S, Du X. One Step Forward for Reducing False Positive and False Negative Compound Identifications from Mass Spectrometry Metabolomics Data: New Algorithms for Constructing Extracted Ion Chromatograms and Detecting Chromatographic Peaks. *Anal Chem.* 2017;89(17):8696–703.
103. Wolfender J-L, Houriet J, Allard P-M. MZmine a tutorial [Internet]. Geneva; Disponível em: www.unige.ch/sciences/pharm/fasie30quaiErnest-AnsermetCH-1211Genève4
104. Yong RL, Jung HK, Chul SY, Jong SI, Won SL. A new synthetic route for natural products with the pyranobenzophenone moiety: Clusiacitrin A, vismiaphenone B, isovismiapphenone B, and myrtiaphenone B. *Bull Korean Chem Soc.* 2008;29(2):515–8.
105. Lee YR. Method for the preparation of bioactive pyrano-chromene derivative and related natural product [Internet]. Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo 16pp. Patent 2009 CODEN:KRXXA7. South Korea; KR 2009090414, 2009. p. 1–17. Disponível em: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=1533-4880&volume=7&issue=4&spage=1239%5Cn>.
106. Yong RL, Li X. An efficient and concise synthesis of biologically interesting pyranochromenes by ethylenediamine diacetate-catalyzed double condensation of substituted trihydroxybenzenes to α,β -unsaturated aldehydes and application to natural product analogues. *Bull Korean Chem Soc.* 2007;28(10):1739–45.
107. Ee GCL, Ng KN, Taufiq-Yap YH, Rahmani M, Ali AM, Muse R. Mucigerin, a new coumarin from *Calophyllum mucigerum* (Guttiferae). *Nat Prod Res.* 2004;18(2):123–8.

108. Ee GCL, Kua ASM, Lim CK, Jong V, Lee HL. Inophyllin A, a new pyranoxanthone from *Calophyllum inophyllum* (Guttiferae). *Nat Prod Res.* 2006;20(5):485–91.
109. Ee GCL, Daud S, Taufiq-Yap YH, Ismail NH, Rahmani M. Xanthonones from *Garcinia mangostana* (Guttiferae). *Nat Prod Res.* 2006;20(12):1067–73.
110. Olivares EM, Gonzalez JG, Monache FD. Benzophenones from *Clusia ellipticifolia*. *Phytochemistry.* 1994;36(2):473–5.
111. Monache FD, Monache GD, Gacs-Baitz E. Prenylated benzophenones from *Clusia sandiense*. *Phytochemistry.* 1991;30(6):2003–5.
112. Monache DG, Gonzalez JG, Monache FD, Bettolo GBM. Prenylated benzophenones from *Vismia decipiens*. *Phytochemistry.* 1980;19:2025–8.
113. Ali S, Goundar R, Sotheeswaran S, Beaulieu C, Spino C. Benzophenones of *Garcinia pseudoguttifera* (Clusiaceae). *Phytochemistry.* 2000;53(2):281–4.
114. Bagget S, Mazzola EP, Kennelly EJ. The benzophenones: isolation, structural elucidation and biological activities. *Stud Nat Prod Chem.* 2005;32:721–71.
115. Medina-Pérez NI, Arrizabalaga-Larrañaga A, Seró R, Moyano E. Determination of benzophenone and related compounds in plastic packaged baby food by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Methods.* 2020;12(3):358–67.
116. Zhou X, Song B, Jin L, Hu D, Diao C, Xu G, et al. Isolation and inhibitory activity against ERK phosphorylation of hydroxyanthraquinones from rhubarb. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2006;16(3):563–8.
117. Chang S, Park Y, Chai S, Kim I, Seo Y, Cho K, et al. Anthraquinones and sterols from the Korean marine *Echiura urechis uncinatus*. *J Korean Chem Soc.* 1998;42(1):64–8.
118. Danielsen K, Aksnes DW, Francis GW. NMR Study of Some Anthraquinones from Rhubarb. *Magn Reson Chem.* 1992;30:359–63.
119. Reyes-Chilpa R, Gómez-Cansino R, Guzmán-Gutiérrez SL, Hernández-Ortega S, Campos-Lara M, Vega-Avila E, et al. Anthraquinones from *Vismia mexicana*. *Zeitschrift für Naturforsch - Sect C J Biosci.* 2014;69 C(1–2):29–34.
120. Nagem JT, De Oliveira FF. Xanthonones and other constituents of *Vismia parviflora*. 1997;8(5):505–8.
121. Monache FD, Mac-Quhae MM, Monache DG, Bettolo GBM, De Lima RA. Xanthonones, xanthonolignoids and other constituents of the roots of *Vismia*

- guaramirangae. *Phytochemistry*. 1983;22(1):227–32.
122. Nagem TJ, Jesus Faria T de. Quinonoid and other constituents of *Vismia martiana*. *Phytochemistry*. 1990;29(10):3362–4.
123. Mohammed MM. Structure Antimutagenicity Relationship of Anthraquinones. *Nat Prod Chem Res*. 2016;4(5).
124. Mekala AB, Satyal P, Setzer WN. Phytochemicals from the bark of *Rhamnus caroliniana*. *Nat Prod Commun*. 2017;12(3):403–6.
125. Da Silva Lins AC, Agra MF, Conceição DCO, Pinto FCT, Camara CA, Silva TMS. Chemical constituents and antioxidant activity from aerial parts of *Clusia paralicola* and *Vismia guianensis*. *Rev Virtual Quim*. 2016;8(1):157–68.
126. Acuña UM, Jancovski N, Kennelly EJ. Polyisoprenylated benzophenones from Clusiaceae: Potential Drugs and Lead Compounds. *Curr Top Med Chem*. 2009;9:1560–80.
127. Anholeti MC, Duprat RC, Figueiredo MR, Kaplan MAC, Santos MG, Gonzalez MS, et al. Biocontrol evaluation of extracts and a major component, clusianone, from *Clusia fluminensis* Planch. & Triana against *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(5):629–35.
128. Lakshmi Ranganatha V, Bushra Begum A, Prashanth T, Gurupadaswamy HD, Madhu SK, Shivakumar S, et al. Synthesis and larvicidal properties of benzophenone comprise indole analogues against *Culex quinquefasciatus*. *Drug Invent Today*. 2013;5(4):275–80.
129. Da Silva FC, De Barros FMC, Prophiro JS, Da Silva OS, Pereira TN, De Loreto Bordignon SA, et al. Larvicidal activity of lipophilic extract of *Hypericum carinatum* (Clusiaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and benzophenones determination. *Parasitol Res*. 2013;112(6):2367–71.
130. da Silva OS, da Silva FC, de Barros FMC, da Silva JLR, de Loreto Bordignon SA, Eifler-Lima VL, et al. Larvicidal and growth-inhibiting activities of extract and benzopyrans from *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Ind Crops Prod*. 2013;45:236–9.
131. Gnerre C, von Poser GL, Ferraz A, Viana A, Testa B, Rates SMK. Monoamine oxidase inhibitory activity of some *Hypericum* species native to South Brazil. *J Pharm Pharmacol*. 2001;53(9):1273–9.
132. Pailee P, Kuhakarn C, Sangsuwan C, Hongthong S, Piyachaturawat P, Suksen

- K, et al. Anti-HIV and cytotoxic biphenyls, benzophenones and xanthenes from stems, leaves and twigs of *Garcinia speciosa*. *Phytochemistry*. 2018;147:68–79.
133. Hiramatsu Y, Adfa M, Ninomiya M, Yoshimura T, Koketsu M. Effects of 2,2-dimethylchromenes against the feeding behavior of *Coptotermes formosanus shiraki*. *J Pestic Sci*. 2013;38(4):228–31.
134. Procópio TF, Fernandes KM, Pontual EV, Ximenes RM, De Oliveira ARC, Souza CDS, et al. *Schinus terebinthifolius* Leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae. *PLoS One*. 2015;10(5):1–19.
135. Maleck M, Ferreira B, Mallet J, Guimarães A, Kato M. Cytotoxicity of piperamides towards *aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2014;51(2):458–63.
136. Arruda W, Cavasin GM, Da Silva IG. Estudo ultra-estrutural do efeito da toxicidade do extrato da *Magonia pubescens* (ST. HIL.) no mesêntero de larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Rev Patol Trop*. 2008;37(3):255–67.
137. Valotto CFB, da Silva HHG, Cavasin G, Geris R, Filho ER, da Silva IG. Alterações ultraestruturais em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao diterpeno labdano, isolado de *Copaifera reticulata* (Leguminosae), e à uma fração rica em taninos de *magonia pubescens* (Sapindaceae). *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(2):194–200.
138. Pessoa LZ da S, Duarte JL, Ferreira RM dos A, Oliveira AEM de FM, Cruz RAS, Faustino SMM, et al. Nanosuspension of quercetin: preparation, characterization and effects against *Aedes aegypti* larvae. *Rev Bras Farmacogn*. 2018;28(5):618–25.