



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação da atividade larvicida de extratos vegetais do Cerrado sobre *Aedes aegypti*

Dulce Cristine dos Santos – 12/0115697

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Mariana Laundry de Mesquita

Brasília - DF

2018



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação da atividade larvicida de extratos vegetais do Cerrado sobre *Aedes aegypti*

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade de Brasília, como requisito parcial de obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

Dulce Cristine dos Santos – 12/0115697

Orientadora: Prof^ª Dr^a Mariana Laundry de Mesquita

Brasília - DF

2018

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dulce Cristine dos Santos

Avaliação da atividade larvicida de extratos vegetais do Cerrado sobre *Aedes aegypti*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção de grau de Farmacêutico.

Profª Drª Mariana Laundry de Mesquita

Universidade de Brasília

RESUMO

Doenças infecciosas são de difícil controle por possuírem caráter imprevisível e de alta transmissibilidade, onde se encontram as arboviroses graves e de notificação compulsória: dengue, febre amarela, febre de chikungunya e febre zika. O principal vetor transmissor dessas arboviroses é o mosquito fêmea de *Aedes aegypti* e as substâncias utilizadas como controle químico e biológico deste, atualmente disponíveis, são limitadas devido ao crescente mecanismo de resistência. Dessa forma, é clara a necessidade de se buscar moléculas alternativas menos tóxicas e mais eficazes. Uma fonte interessante são substâncias provenientes de plantas, sendo o Cerrado bioma de destaque no Brasil pela sua rica variedade de espécies endêmicas que possuem substâncias químicas promissoras. Diante disso, este trabalho busca substâncias de *Astronium fraxinifolium*, da família Anacardiaceae, com potencial larvicida sobre *Aedes aegypti*. Extratos de *Astronium fraxinifolium* foram testados em larvas em estágio L3 de *Ae. aegypti*. Dentre os vinte e dois extratos testados, três foram considerados ativos e pré-fracionados por SPE-DIOL, obtendo-se um total de quinze pré-frações, sendo que cinco dessas apresentaram atividade larvicida maior que 82,5% e três apresentaram atividade entre 20-50% na concentração de 150 µg/mL. A pré-fração Arbo0022B do extrato madeira da raiz foi escolhida para prosseguir com o fracionamento em coluna aberta de sílica com hexano e diclorometano por apresentar bom rendimento e pureza considerável por CCD. Foram obtidas treze frações, sendo a fração Arbo11A52E considerada pura pelos espectros de RMN unidimensionais e bidimensionais. A análise dos espectros indica a possibilidade de se tratar de um triterpeno, classe de metabólitos secundários já relatada na espécie. Dessa forma, a identificação dessa substância contribuirá para o aprofundamento da fitoquímica de *Astronium fraxinifolium*.

Palavras-chave: *Astronium fraxinifolium*, Anacardiaceae, *Aedes aegypti*, atividade larvicida.

ABSTRACT

Infectious diseases are difficult to control because they are unpredictable and have high transmissibility, among them there are the severe arboviruses of compulsory notification: dengue fever, yellow fever, chikungunya fever and zika fever. The main vector transmitter of these arboviruses is the female mosquito of *Aedes aegypti* and the substances used as chemical and biological control of this, currently available, are limited due to the increasing mechanism of resistance. In this way, it is clear the need to look for less toxic and more effective alternative molecules. Concerning this, an interesting source are substances from plants. The Cerrado biome is outstanding in Brazil for its rich variety of endemic species that have promising chemicals. Therefore, this work looks for substances of *Astronium fraxinifolium*, of the family Anacardiaceae, with potential larvicide on *Aedes aegypti*. Extracts of *Astronium fraxinifolium* were tested in larvae at stage L3 of *Ae. aegypti*. Among the twenty-two extracts tested, three were considered active and pre-fractionated by SPE-DIOL, obtaining a total of fifteen pre-fractions. Five of which had larvicidal activity greater than 82.5% and three presented activity between 20-50% at the concentration of 150 µg/mL. The Arbo0022B pre-fraction of the extract from the root wood was chosen to proceed with the open silica column fractionation with hexane and dichloromethane as it showed good yield and considerable purity by CCD. Among the thirteen fractions obtained, the Arbo11A52E fraction was considered pure by the one-dimensional and two-dimensional NMR spectra. The spectra analysis indicates the possibility of being a triterpene, a class of secondary metabolites already reported in this species. In this way, the identification of this substance will contribute to the deepening of the phytochemistry of *Astronium fraxinifolium*.

Keywords: *Astronium fraxinifolium*, Anacardiaceae, *Aedes aegypti*, larvicidal activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i> . A – ovo, B – larva, C – pupa, D – mosquito fêmea adulto.	22
Figura 2: Fotografia da espécie <i>Astronium fraxinifolium</i> (A), casca do caule (B), folhas (C), inflorescências (D).	24
Figura 3: Substâncias previamente isoladas do óleo essencial das folhas de <i>Astronium fraxinifolium</i> . A - (Z)- β -ocimeno, B - (E)- β -ocimeno, C - limoneno, D - α -terpinoleno, E - biciclogermacreno, F-viridifloreno.	25
Figura 4: Substâncias previamente isoladas do óleo essencial das folhas de <i>Astronium urundeuva</i> e <i>Astronium graveolens</i> . A - δ -3-careno, B - mirceno C - (E)- β -ocimeno	26
Figura 5: M-pentadecadienil-fenol – substância previamente isolada do extrato etanólico das sementes de <i>Astronium fraxinifolium</i> com atividade larvicida sobre <i>Aedes aegypti</i>	26
Figura 6: Pré-frações Arbo0022 A-E obtidas por SPE-DIOL do extrato Arbo0022.....	33
Figura 7: Coluna Cromatográfica Aberta de Sílica da pré-fração Arbo0022B.....	34
Figura 8: Fotos das placas de Cromatografia em Camada Delgada das 134 frações obtidas em coluna aberta de sílica da pré-fração Arbo0022B. A – 254nm, B – 365nm, C – vanilina sulfúrica.....	36
Figura 9: Fotos das placas de Cromatografia em Camada Delgada recapitulativa dos 13 grupos obtidos em coluna aberta de sílica da pré-fração Arbo0022B revelada com vanilina sulfúrica.....	37
Figura 10: Etapas do fracionamento químico do extrato Arbo0022.....	38

Figura 11: Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) das pré-frações Arbo0022A e Arbo0022B.	39
Figura 12: Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) dos grupos da pré-fração Arbo0022B. A – Arbo11A52E, B – Arbo11A52I, C – Arbo11A52K.	40
Figura 13: Expansão do espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) do grupo Arbo11A52I (A) e sinais característicos de ácido graxo (B).	41
Figura 14: Espectro de RMN 2D HSQC (600MHz, CDCl_3) do grupo Arbo11A52E.	42
Figura 15: Espectro de RMN 2D HMBC (600MHz, CDCl_3) do grupo Arbo11A52E.	42
Figura 16: Substâncias previamente isoladas do extrato etanólico da casca da raiz e do extrato acetato de etila das folhas de <i>Astronium fraxinifolium</i> . A - 3- β -cicloartenol, B - 3- β -cicloeucaleenol, C - tremulona, D - β -amirina, E - lupeol.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade larvicida dos extratos de <i>Astronium fraxinifolium</i>	31
Tabela 2. Atividade larvicida das pré-frações dos extratos Arbo0006, Abo0015 e Arbo0022 de <i>Astronium fraxinifolium</i>	32
Tabela 3. Frações reunidas após fracionamento em coluna aberta de Sílica da pré-fração Arbo0022B de <i>Astronium fraxinifolium</i>	34

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACE	Agentes de Combate a Endemias
<i>Ae. aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
<i>A. fraxinifolium</i>	<i>Astronium fraxinifolium</i>
ArboControl	Projeto de Controle das Arboviroses
BTI	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
CGEN	Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
CHIKV	Vírus Chikungunya
DCM	Diclorometano
DENV	Vírus Dengue
DL ₅₀	Dose Letal Mediana – LC ₅₀
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESPIN	Emergência em Saúde Pública de importância Nacional
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HEX	Hexano
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IC ₅₀	Concentração Inibitória Máxima

Kit ZDC	Kit teste rápido de detecção de Zika, Dengue e Chikungunya
L3	Larva no Terceiro estágio de desenvolvimento
LC ₅₀	Concentração Letal Mediana – DL ₅₀
MeOH	Metanol
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN 2D HSQC	Ressonância Magnética Nuclear em Duas Dimensões <i>Heteronuclear MultipleQuantum Coherence.</i>
RMN 2D HMBC	Ressonância Magnética Nuclear em Duas Dimensões <i>Heteronuclear MultipleBond Coherence.</i>
SBIM	Sociedade Brasileira de Imunizações
SPE	Extração em Fase Sólida
SUS	Sistema Único De Saúde
UnB	Universidade de Brasília
UBV	Inseticidas em Volume Ultraabaixo
YFV	<i>Yellow Fever Virus</i>
ZIKV	Zika Vírus

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. OBJETIVO GERAL	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
3.1. Arboviroses causadas por <i>Aedes aegypti</i>	16
3.1.1. Dengue	16
3.1.2. Febre Amarela	17
3.1.3. Febre de Chikungunya	18
3.1.4. Febre Zika	19
3.2. Vacinação	20
3.3. <i>Aedes aegypti</i>	21
3.4. Controle do Vetor	22
3.5. <i>Astronium</i> sp.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1. Obtenção dos extratos brutos	28
4.2. Criação das larvas <i>Aedes aegypti</i>	28
4.3. Avaliação da atividade larvicida sobre <i>Aedes aegypti</i>	28
4.4. Pré-fracionamento por extração em fase sólida (SPE-DIOL).....	29
4.5. Fracionamento em coluna aberta de sílica	29

4.6.	Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	30
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1.	Avaliação da atividade larvícida dos extratos de <i>Astronium fraxinifolium</i> sobre <i>Aedes aegypti</i>	31
5.2.	Pré-fracionamento por extração em fase sólida (SPE-DIOL).....	32
5.3.	Fracionamento em coluna aberta de sílica	33
5.4.	Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	38
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

1. INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas são de difícil controle, visto que possuem caráter imprevisível e de alta transmissibilidade (FAUCI e MORENS, 2012). Dentre as doenças infecciosas temos as arboviroses, que são viroses transmitidas por artrópodes hematófagos e que provocam principalmente sintomas neurológicos e hemorrágicos (JOURDAIN et al., 2015). Os arbovírus podem ser transmitidos por culicídeos, como os mosquitos do gênero *Culex* e *Aedes*, carrapatos e outros grupos de artrópodes (WEAVER e REISEN, 2010).

A dengue, febre amarela, febre de chikungunya e febre zika são arboviroses graves e doenças de notificação compulsória, presentes na Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública. O vírus da zika foi incluído nesta lista apenas no ano de 2016, pela Portaria nº 204 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017a), visto que é uma descoberta mais recente pela sua associação com a microcefalia em recém-nascidos de mães que entraram em contato com o vírus. Foram notificados 7.911 casos suspeitos desde o início das investigações em 2015 até abril de 2017, quando foi declarado o fim da emergência nacional para zika e microcefalia, visto que houve uma redução significativa em relação aos outros anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017d).

O principal vetor transmissor dessas arboviroses é o mosquito fêmea *Aedes aegypti*. O mosquito tem incidência maior em regiões tropicais, sendo seus principais criadouros os grandes reservatórios, muito utilizados para consumo doméstico de água, e por isso são os mais perigosos. Além disso, os ovos de *Ae. aegypti* conseguem sobreviver por até 450 dias fora da água (ZARA et al., 2016; FIOCRUZ, 2017).

Foram registrados 1.500.535 casos prováveis de dengue e 41.264 casos notificados de dengue no Brasil de 2015 a 2016, sendo as regiões Centro-Oeste e Sudeste as de maior incidência. Também em 2016 foram notificados 271.824 casos prováveis de febre de

chikungunya e 215.319 casos prováveis de febre pelo vírus Zika no Brasil, incluindo óbitos. Em 2017 os casos reduziram significativamente para 219.040 casos prováveis de dengue, 171.930 casos prováveis de febre de chikungunya e 15.586 casos prováveis de febre Zika no país, devido a programas de conscientização da população e cuidados para evitar focos de crescimento de larvas do mosquito, porém os números de incidência continuam altos para essas doenças de grave desfecho e que precisam ser controladas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017c). Até o mês de maio de 2018, os valores se encontram reduzidos, sendo 917 casos de dengue com sinais de gravidade, 29.675 casos prováveis de febre de chikungunya e 2.985 casos prováveis de febre Zika no país até o momento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

As substâncias utilizadas como controle químico e biológico de *A. aegypti* atualmente disponíveis são limitadas devido ao crescente mecanismo de resistência (MOYES et al., 2017), e é clara a necessidade de se buscar moléculas alternativas menos tóxicas, mais eficazes e mais acessíveis economicamente. Uma fonte interessante para essa pesquisa são substâncias provenientes de plantas, sendo o Cerrado bioma de destaque no Brasil pela sua rica variedade de substâncias químicas promissoras para obtenção de metabólitos secundários com atividades farmacológicas (MOURA, 2014).

Diante disso, este trabalho busca substâncias com potencial larvicida sobre *Aedes aegypti*. O Laboratório de Farmacognosia/UnB detém uma importante coleção de extratos e substâncias, autorizada pelo CGEN/IBAMA (n. 06/2012 – processo n. 02000.002272/2006-73), intitulada Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado. As espécies vegetais utilizadas na produção desses extratos foram coletadas no bioma Cerrado, juntamente com o saudoso botânico Prof. José Elias de Paula, e as respectivas exsiccatas foram depositadas no Herbário da Universidade de Brasília (UB/UnB).

Este projeto de Trabalho de Conclusão de Curso está inserido dentro do Componente 1 do projeto ArboControl – pesquisa para o controle do vetor *Aedes aegypti*, coordenado pelo Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Identificar frações de extratos de *Astronium fraxinifolium* oriundos do “Banco de extratos e substâncias de plantas do bioma Cerrado” com atividade sobre larvas de *Aedes aegypti*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar os extratos disponíveis de *Astronium fraxinifolium* em larvas de *Aedes aegypti*;
- Realizar o pré-fracionamento por SPE-diol dos extratos ativos selecionados;
- Testar as pré-frações obtidas em larvas de *Aedes aegypti*;
- Realizar o fracionamento biomonitorado em coluna cromatográfica aberta de Sílica e analisar pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN);
- Testar as frações obtidas em larvas de *Aedes aegypti*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Arboviroses causadas por *Aedes aegypti*

Os principais arbovírus que possuem o *Aedes aegypti* como vetor pertencem ao gênero *Flavivirus* da família Flaviviridae, sendo os responsáveis por provocar a dengue, febre amarela e febre zika (BÄCK e LUNDKVIST, 2013; ATKINSON et al., 2016; WILDER-SMITH et al., 2017). No caso da febre de chikungunya, o gênero *Alphavirus* da família Togaviridae é o responsável pela sintomatologia (MORO et al., 2010; DONALISIO et al., 2017).

Os sintomas da febre zika, da dengue e da febre de chikungunya são muito parecidos, como dor abdominal, febre e artralgia, dificultando a diferenciação entre elas. Em 2016, a Fiocruz, em parceria com outras instituições, lançou um teste triplo capaz de detectar os três vírus ao mesmo tempo nos primeiros dias de infecção, chamado kit ZDC, sendo um teste complementar aos testes específicos já existentes, auxiliando no diagnóstico mais rápido e preciso (FIOCRUZ, 2014). O tratamento das doenças cujo vetor é o *Aedes aegypti* é destinado essencialmente ao tratamento dos sintomas (ONG, 2007).

3.1.1. Dengue

A dengue é hoje a principal doença re-emergente no mundo causada pelos quatro tipos do vírus (DENV 1 a 4), pertencente à família Flaviviridae. Segundo a OMS, aproximadamente 100 milhões de pessoas são infectadas por ano, dentre as quais 500 mil desenvolvem dengue hemorrágica (DH), principalmente crianças (BÄCK e LUNDKVIST, 2013).

A dengue clássica pode ser assintomática ou se desenvolver em 3 fases: febril, crítica e de recuperação. A fase febril possui como sintomas principais febres altas, mialgias e artralgias e vômitos. A fase crítica se caracteriza pela diminuição dos episódios febris e aparecimento dos sinais de alarme: dor abdominal, vômitos persistentes, hipotensão postural, hepatomegalia,

letargia, sangramento da mucosa, entre outros. Dentro da fase crítica surgem as formas mais graves da doença, como a dengue hemorrágica, onde há hemorragia intensa que pode evoluir para síndrome de choque de dengue, caracterizada pela intensa dor abdominal, extravasamento plasmático e consequente hipotensão grave com taxa de mortalidade entre 1–2.5%. (BÄCK e LUNDKVIST, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). A fase de recuperação é aquela em que se observa progressiva melhora clínica do quadro geral do paciente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

O diagnóstico é definido pelos aspectos clínicos e diferenciais em relação a outras infecções e arboviroses, além da caracterização do estado de risco do paciente (BÄCK e LUNDKVIST, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016) e detecção por meio do teste rápido de dengue IgM/IgG, procedimento disponível no SUS (Sistema Único de Saúde) pela portaria nº 1.313, de 3 de agosto de 2017 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b). O tratamento é determinado após a devida caracterização de risco do paciente visando a terapia medicamentosa sintomática, avaliando a presença ou não dos sinais de alarme e a necessidade de internação hospitalar do paciente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

3.1.2. Febre Amarela

A febre amarela é uma das arboviroses que, nos séculos XVIII e XIX, foi responsável pelo óbito de milhares de pessoas até 1930, ano que foram desenvolvidas as vacinas, reduzindo a quantidade de infecções (GARDNER e RYMAN, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017e). Apesar das vacinas eficazes e da política de vacinação anual, no final do ano de 2016 e início de 2017, foram relatados novos casos de óbitos no sudeste do Brasil e na região amazônica do país (PAULES e FAUCI, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017a; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017e). Similarmente ao vírus da dengue (DENV), é causada por um vírus da família Flaviviridae, o YFV (*Yellow Fever Virus*), o qual permanece no mundo pela transmissão entre

primatas não humanos e mosquitos silvestres, como o do gênero *Aedes* sp. (WILDER-SMITH et al., 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017e).

A infecção pode ser assintomática ou se manifestar em 3 estágios: infecção, remissão e intoxicação. Os principais sintomas são febre, calafrios, mialgia e náuseas, podendo levar à hemorragia, insuficiência hepática ou renal, até morte nos casos mais graves (WILDER-SMITH et al., 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017e).

Em casos de suspeita o diagnóstico é definido pelos achados clínicos, caracterizado por febre aguda prolongada por mais de 7 dias apresentando dois outros sinais e sintomas característicos. Para confirmação, realiza-se o teste específico para detecção do vírus de forma direta em amostras clínicas ou indireta por meio de anticorpos, além do diagnóstico diferencial entre outras infecções e arboviroses. O tratamento é sintomatológico com uso de analgésicos, hidratação intensiva e hospitalização, se necessário (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017e).

3.1.3. Febre de Chikungunya

A respeito da febre de chikungunya, o vírus responsável é o CHIKV da família *Togaviridae*, sendo conhecidos quatro genótipos do vírus: do sudeste asiático, do Oceano Índico, do oeste africano e a da região leste-centro-sul africana (MORO et al., 2010). Sua expansão pandêmica começou em 2004 até em 2014 chegar na região do Amapá no Brasil e se difundir para todo território nacional (DONALISIO et al., 2017). Não possui alta taxa de mortalidade, entretanto sua artralgia vigorosa e elevada morbidade afetam a qualidade de vida e produtividade dos pacientes portadores do vírus (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015a).

A maioria dos casos é sintomática, demonstrando semelhança com os estágios da dengue, sendo febre e inflamação das articulações os sintomas mais característicos que podem persistir até 10 dias após a infecção (MARINHO et al., 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015a). O CHIKV tem preferência por se reproduzir no fígado, músculo e articulações, podendo

levar a fibrose e calcificação distrófica na sua fase subaguda. Na fase aguda e crônica o paciente pode desenvolver quadros graves de artropatias destrutivas, e na fase grave ocorrem manifestações atípicas como meningoencefalite, miocardite, nefrite, entre outras. Pode ser transmitido por via transplacentária na gravidez, repercutindo em caráter de risco para o feto (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015a).

O diagnóstico é determinado pela identificação dos sintomas e diferenciação das outras infecções e arboviroses (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015a; MARINHO et al., 2017). As alterações laboratoriais são de caráter inespecífico e em casos confirmados pode ser detectado por meio do teste rápido de dengue IgM, procedimento disponível no SUS desde 3 de agosto de 2017 pela portaria nº 1.313 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015a; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b).

3.1.4. Febre Zika

Entre as arboviroses, a febre zika foi a que despontou mais recentemente no Brasil, quando em 2015 foi associada à síndrome congênita e microcefalia (ZANLUCA et al., 2015; DONALISIO et al., 2017), sendo declarada “Emergência em Saúde Pública de importância Nacional (ESPIN) por alteração do padrão de ocorrência de microcefalias no Brasil” pelo MS na portaria nº 1.813, de 11 de novembro de 2015 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015b). O zika vírus (ZIKV), igualmente da família Flaviviridae, foi reconhecido pela primeira vez na Uganda em 1947, podendo ser transmitido pelo sêmen, por transmissão vertical e perinatal (ATKINSON et al., 2016; D'ORTENZIO et al., 2016; FARIA et al., 2016). Mulheres grávidas no primeiro trimestre são consideradas população de risco, visto que é o momento crítico onde o sistema nervoso do feto se encontra em desenvolvimento (CUNHA et al., 2016).

Apesar da semelhança de sinais e sintomas com a dengue e a febre de chikungunya, os achados clínicos mais frequentes são rash, febre, artralgia mediana e conjuntivite com duração

entre 3-6 dias (ZANLUCA et al., 2015; BRASIL et al., 2016; CUNHA et al., 2016). Como o ZIKV possui tropismo pelas células do sistema nervoso, é grande a ocorrência de manifestações neurológicas como a síndrome de Guillain-Barré, encefalite, paralisia facial, entre outros, incluindo a microcefalia nos recém-nascidos infectados (TAPPE et al., 2015; CUNHA et al., 2016; SUWANMANEE e LUPLERTLOP, 2017). A síndrome de Guillain-Barré é uma doença autoimune desmielinizante de nervos motores, principalmente, e sua ocorrência é comum após infecções como citomegalovírus, Epstein-barr, HIV e ZIKV. Seus sintomas principais são formigamento e fraqueza muscular (CUNHA et al, 2016).

O diagnóstico é delineado após avaliação dos sinais e sintomas associado ao diagnóstico diferencial em relação a outras doenças infecciosas e arboviroses. O teste laboratorial específico se baseia na detecção do RNA viral por meio das técnicas de PCR e sorologia (IgM/IgG). O tratamento é sintomático com o uso de analgésicos como manejo da dor, e outras medidas de acordo com a classificação de risco do paciente (CUNHA et al, 2016).

3.2. Vacinação

Apesar dos avanços das pesquisas, essas arboviroses ainda não possuem uma vacina preventiva eficaz, com exceção da febre amarela que possui política de vacinação mundial e é sempre divulgada para prevenir surtos nos países (OPAS/OMS, 2016).

A dengue possui uma vacina registrada apenas em alguns países da Ásia e América latina, a Dengvaxia® da Sanofi-Pasteur, e seus estudos clínicos estão em fase 3 (WICHMANN et al., 2017). No Brasil, ela está disponível para uso desde 2015. Entretanto, segundo a nota técnica lançada pela SBIM (Sociedade Brasileira de Imunizações), estudos recentes têm demonstrado que a vacinação em indivíduos soronegativos tem aumentado o risco dos mesmos desenvolverem a doença em sua forma grave. Por essa e outras limitações, a vacina ainda não

foi introduzida em programas públicos, estando disponível apenas no setor privado (SBIM, 2017).

Com relação a febre zika, o ministro da saúde anunciou em 2017 uma parceria com os EUA para inserção da fase 2 da vacina contra o ZIKV, desenvolvida pelo Instituto Evandro Chagas, mas ainda há uma longa jornada até o fornecimento dessa vacina para a população geral (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017f).

Dessa forma, o alvo principal para redução da transmissão continua sendo o controle do vetor dessas arboviroses, o mosquito *Aedes aegypti* (OPAS/OMS, 2016).

3.3. *Aedes aegypti*

O mosquito fêmea *Aedes aegypti* é o principal vetor responsável por transmitir os vírus que causam dengue, febre amarela, febre de chikungunya, e febre zika (ZARA et al., 2016), visto que ele é hematófago e necessita do sangue para a maturação dos ovos (CHOUIN-CARNEIRO e SANTOS, 2017).

Sua primeira ocorrência foi descrita no Egito por Linnaeus, em 1762, nas regiões dos trópicos e subtropicais (CHRISTOPHERS, 1960; KRAEMER et al., 2015) e sua prevalência é maior em ambientes onde há a presença do homem, o qual fornece um ambiente propício para sua sobrevivência e rápida proliferação, com condições ideais para reprodução e fontes de alimentação. Têm preferência pelos recipientes artificiais para armazenamento de água domiciliar ou abandonados a céu aberto, servindo como reservatório de água de chuva (ZARA et al., 2016).

O desenvolvimento do mosquito começa a partir da oviposição em recipientes contendo água e a eclosão dos ovos dá origem às larvas, as quais passam por quatro estágios de muda até atingirem a forma mais madura de pupa. Todas essas formas imaturas são aquáticas e seu ciclo

de vida vai depender das condições climáticas e da disponibilidade de alimentos no ambiente em que se encontram (CHRISTOPHERS, 1960; HARKER et al., 2013).

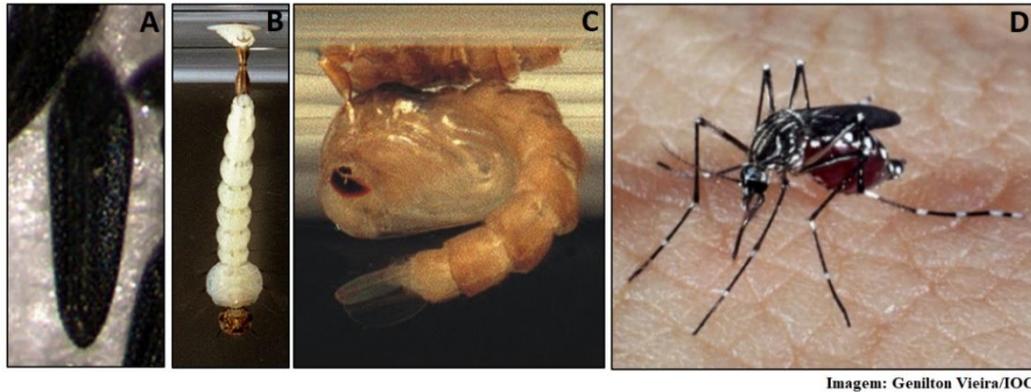


Figura 1: Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. A – ovo, B – larva, C – pupa, D – mosquito fêmea adulto (Fonte: Adaptado de FIOCRUZ, 2017; MEIRELLES et al., 2018).

3.4. Controle do Vetor

Dentre as políticas de controle adotadas no Brasil, a de controle mecânico é realizada pela ACE (Agentes de Combate a Endemias), com participação da população, visando a proteção, a destruição ou a destinação adequada de potentes criadouros. A colaboração intensiva da população é crucial, para dificultar a proliferação e instalação do mosquito. Além disso, reforça-se a necessidade de condições sanitárias adequadas nas cidades, eliminando estoques de água que propiciem a eclosão dos ovos. Uma estratégia importante é a promoção de ações educativas durante visitas domiciliares feitas de forma regular pelo Ministério da Saúde (ZARA et al., 2016).

Outro controle é o biológico, realizado com a utilização de predadores ou patógenos com potencial larvicida, como peixes e a bactéria *Bacillus thuringiensis israelensis* (BTI). E, por fim, o controle químico realizado com o uso de produtos químicos neurotóxicos ou inibidores de síntese de quitina, com potencial para matar larvas e insetos adultos, os quais

devem ser utilizados com cautela a fim de evitar impactos ambientais e intoxicações (ZARA et al., 2016).

O uso de inseticidas para controle de mosquitos adultos e larvas pode ser executado por meio da aspersão aeroespacial de inseticidas em volume ultrabaixo (UBV), em depósitos que contêm formas imaturas de difícil remoção mecânica (tratamento focal) ou em paredes externas dos criadouros localizados em pontos estratégicos (tratamento perifocal). Esse tratamento não é seletivo e elimina qualquer mosquito no ambiente. Tendo em vista a ocorrência de resistência em amostras de populações de *Aedes aegypti* aos inseticidas em uso, vê-se a necessidade de novas estratégias para sua substituição (ZARA et al., 2016).

No cenário das resistências, os produtos naturais e seus derivados surgem como fonte alternativa para novos inseticidas. Esses produtos consistem em um reservatório privilegiado de moléculas que têm potencial de interagir com uma variedade de alvos biológicos no meio ambiente (ROEMER et al., 2011).

Dentro desse contexto, têm-se as plantas, que são capazes de produzir diversos metabólitos secundários com uma grande variedade química e com alto potencial biotecnológico, sendo um modelo de desenvolvimento científico, econômico, social e ambiental (MOURA, 2014; WINK, 2017).

Diante disto, temos o Cerrado que é o segundo maior bioma do Brasil, com uma área de 2 milhões de Km² e 44% de flora endêmica (KLINK e MACHADO, 2005) e com muitas espécies com grande potencial farmacológico.

3.5. *Astronium* sp

Dentre as plantas do Cerrado, de acordo com a literatura, acredita-se que o gênero *Astronium*, pertencente à família Anacardiaceae, apresente moléculas com potencial larvicida promissor. O gênero *Astronium* possui oito espécies descritas, sendo sete presentes no Cerrado,

Caatinga, Floresta Amazônica e Mata Atlântica no Brasil. A exceção é o *Astronium obliquum* que ocorre apenas em Trinidad e Tobago. Seu nome se refere à forma da flor com cinco pétalas e as árvores podem chegar a 32m de altura (SANTIN, 1989).

A espécie *Astronium fraxinifolium* (Figura 2), conhecida na medicina tradicional por “Gonçalo-alves”, possui ampla distribuição geográfica no Cerrado brasileiro e em alguns países da América Central e América do Sul, sendo tradicionalmente conhecida pelas suas propriedades medicinais pela presença de taninos. Além do aspecto medicinal, essa espécie possui importância comercial para as indústrias pela qualidade da madeira e é utilizada em áreas de reflorestamento por sua rápida germinação (MOURA, 2014). A espécie *Astronium urundeuva*, popularmente conhecida como aroeira, nativa do nordeste brasileiro, possui também propriedades antimicrobiana e dermatológica (DE LIMA et al., 2014). As substâncias presentes em maior quantidade no *Astronium* sp. são em sua maioria da classe dos terpenos, de acordo com a literatura disponível até o momento (MAIA et al., 2002; MONTANARI et al., 2012; MOURA, 2014).

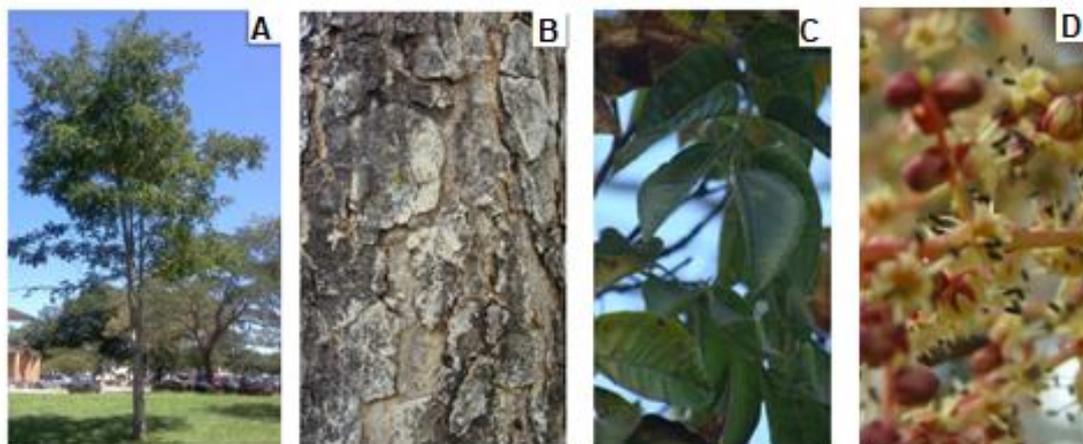


Figura 2: Fotografia da espécie *Astronium fraxinifolium* (A), casca do caule (B), folhas (C), inflorescências (D). (Fonte: Arquivo do laboratório de Farmacognosia/UnB adaptado de MOURA, 2014).

As substâncias obtidas em maior quantidade por Maia et al. (2002) e Montanari et al. (2012) foram o (Z)- β -ocimeno e (E)- β -ocimeno (40%), seguidas pelo biciclogermacreno,

limoneno, α -terpinoleno e viridifloreno, os quais constituem cerca de 10% do óleo essencial das folhas de *A. fraxinifolium*, sendo em sua maioria da classe dos monoterpenos e sesquiterpenos (Figura 3). Estudos realizados por Alencar et al. (1996) mostraram que o limoneno (50%) e o (E)- β -ocimeno (95%) são produzidos principalmente no estágio mais jovem da planta, e o (E)- β -ocimeno é a substância principal no estágio adulto, com concentrações entre 65-80% em óleo essencial de folhas de *A. fraxinifolium*.

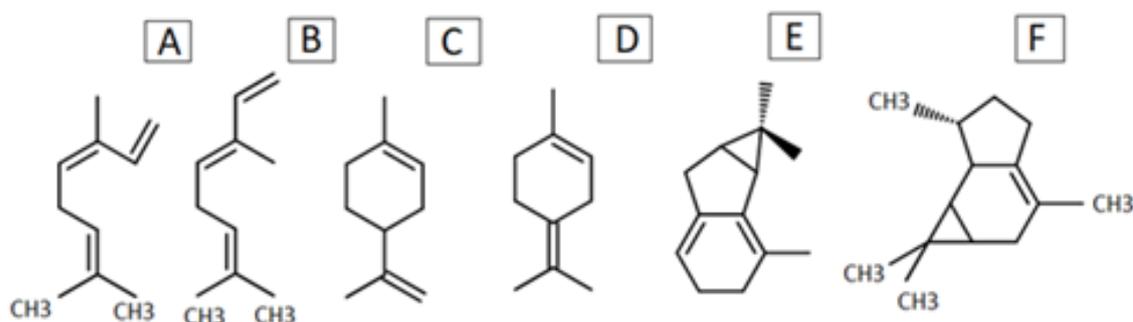


Figura 3: Substâncias previamente isoladas do óleo essencial das folhas de *Astronium fraxinifolium*. A - (Z)- β -ocimeno, B - (E)- β -ocimeno, C - limoneno, D - α -terpinoleno, E - biciclogermacreno, F - viridifloreno. (Adaptado de MOURA, 2014).

A espécie *Astronium graveolens* também possui como substância predominante o (E)- β -ocimeno, seguida pelo mirceno e pelo δ -3-careno (CHEN et al., 1984; RODRIGUEZ-BURBANO et al., 2010; HERNÁNDEZ et al., 2013). Com relação ao óleo essencial das folhas de *Astronium urundeuva*, a substância majoritária descrita foi o δ -3-careno (50-70%) (Figura 3), seguida pelo (Z)- β -ocimeno e α -terpinoleno em menores quantidades, todos da classe dos monoterpenos (MONTANARI et al., 2012; MAIA et al., 2002). Em contrapartida, outro grupo de pesquisa encontrou o β -mirceno (60%) como substância predominante no óleo essencial das folhas de *Astronium urundeuva* (COSTA et al., 2014). Aquino et al. (2017) encontrou também as substâncias voláteis (E)- β -ocimeno e (Z)- β -ocimeno, além do mirceno e do δ -3-careno no óleo essencial de folhas de *Astronium urundeuva*.

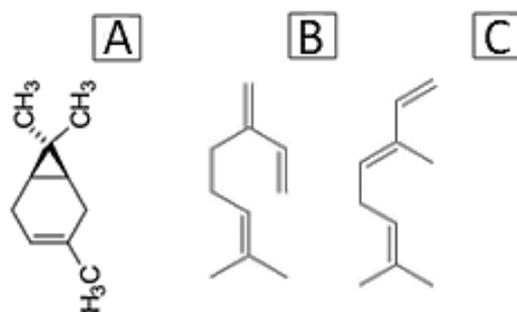


Figura 4: Substâncias previamente isoladas do óleo essencial das folhas de *Astronium urundeuva* e *Astronium graveolens*. A - δ -3-careno, B - mirceno C - (E)- β -ocimeno (Adaptado de MONTANARI et al., 2012; AQUINO et al., 2017).

Quanto às pesquisas recentes verificando atividade larvicida em *Ae. Aegypti* do gênero *Astronium* sp., observa-se uma maior quantidade de estudos com a espécie *Astronium urundeuva*. Lecitinas isoladas de folhas e sementes desta espécie apresentaram toxicidade sobre larvas de *Ae. Aegypti*, com LC50 variando entre 0,04 e 0,202mg/mL (SOUZA et al., 2015; NAPOLEÃO et al., 2012). O m-pentadecadienil-fenol, isolado do extrato etanólico das sementes (Figura 5), mostrou atividade larvicida, pupicida e ovicida com LC50 de 10,16; 99,06 e 49,79 μ g/mL respectivamente (SOUZA et al., 2012).

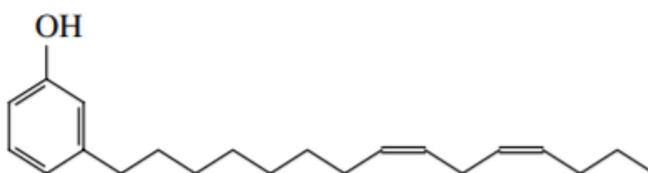


Figura 5: M-pentadecadienil-fenol – substância previamente isolada do extrato etanólico das sementes de *Astronium fraxinifolium* com atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* (Adaptado de SOUZA et al., 2012).

O extrato bruto etanólico da casca de *Astronium fraxinifolium* foi ativo sobre as larvas de *Ae. Aegypti* com DL50 de 200ppm (COSTA et al., 2007). Tendo em vista a pequena

quantidade de estudos fitoquímicos e biológicos existentes do *A. fraxinifolium*, essa espécie foi escolhida para investigação (MOURA, 2014).

Estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacognosia/UnB demonstraram que extratos de alguns órgãos vegetais (folha e raiz) de *A. fraxinifolium* foram considerados promissores em larvas de *Ae. aegypti*. Diante disso, e dos resultados encontrados na literatura, este plano de trabalho tem como objetivo selecionar frações de extratos de *A. fraxinifolium* com atividade larvicida sobre o *Ae. aegypti*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção dos extratos brutos

Os diferentes órgãos vegetais de *Astronium fraxinifolium* foram separados (casca e madeira do caule e da raiz, fruto, sementes e folhas), dessecados, estabilizados, pulverizados e submetidos a extrações exaustivas por maceração, com solventes de diferentes polaridades (hexano, acetato de etila e etanol). A solução extrativa foi recuperada e concentrada em rotaevaporador e/ou liofilizador para obtenção dos diferentes extratos brutos.

4.2. Criação das larvas *Aedes aegypti*

Cinco a seis dias antes de iniciar o teste em larvas L3, foram pesados os ovos do banco de ovos do Laboratório de Farmacognosia/UnB, eclodidos e criadas as larvas até o estágio de L3. As larvas foram alimentadas até o quinto dia com ração de gato moída.

4.3. Avaliação da atividade larvicida sobre *Aedes aegypti*

Os testes foram realizados em placas de 12 poços. Foram transferidas 10 larvas de *Ae. Aegypti* do terceiro estágio de desenvolvimento e o volume de água foi ajustado para 3 mL por poço. A temperatura da água foi controlada entre 25 a 28 °C com fotoperíodo de 12 horas. Após verificar a viabilidade de todas as larvas, adicionou-se 50 µL da amostra a uma concentração final de 250 µg/mL para os extratos brutos, 125 µg/mL para pré-fração e 100 µg/mL para frações. As amostras foram diluídas com o solvente dimetilsulfóxido (DMSO). Como controle negativo utilizou-se o DMSO e como controle positivo o BTI.

Foram considerados ativos os extratos e frações que causaram mortalidade superior a 80% e de média atividade aqueles que obtiveram taxa de mortalidade entre 40% e 80% em um período de 24h. Se a porcentagem de pupas vivas for >20% a amostra, a amostra é considerada

negativa e terá que ser retestada. Se ocorrer nas amostras de controle negativo, todo o experimento é inviabilizado.

4.4. Pré-fracionamento por extração em fase sólida (SPE-DIOL)

Após a determinação da atividade dos extratos e a análise do perfil químico por ressonância magnética nuclear (RMN ¹H), os extratos mais promissores foram selecionados para o pré-fracionamento químico biomonitorado. O pré-fracionamento por SPE-Diol foi realizado conforme o seguinte protocolo (ESPINDOLA et al., 2018):

- Solubilização do extrato (100 mg) em 1,6 mL de uma solução de diclorometano - metanol (1:1).
- Aplicação e adsorção em coluna Diol SPE (2 g).
- Dessecação em temperatura ambiente overnight.
- Eluição de cada coluna SPE com 6 mL de: A = hexano – diclorometano (9:1), B = diclorometano – acetato de etila (20:1), C = 100% acetato de etila, D = acetato de etila – metanol (5:1), E = 100% metanol, resultando em 5 pré-frações coletadas.
- As 5 pré-frações obtidas foram pesadas e analisadas por RMN – espectro de hidrogênio, e testadas nas larvas de *Ae. Aegypti*.

4.5. Fracionamento em coluna aberta de sílica

A pré-fração ativa selecionada foi submetida a uma série placas de cromatografia em camada delgada (CCD) para a escolha do melhor sistema eluente com base em uma separação efetiva para o fracionamento em coluna aberta de sílica. Foram utilizadas placas de sílica gel de 0,20 mm de espessura com indicador de fluorescência UV 254 nm (Macherey-Nagel®). As placas de CCD foram reveladas nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm (Vilber

Lourmat®) para observação de fluorescência e a revelação química foi realizada com vanilina sulfúrica seguida de aquecimento.

A cromatografia em coluna aberta de sílica foi realizada com Sílicagel 60 (0,04 – 0,063 mm) na proporção de 400 g de sílica para 1 g de pré-fração. As frações purificadas foram novamente testadas sobre as larvas de *Ae. Aegypti*.

4.6. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para a elucidação do perfil químico das pré-frações e frações obtidas, foram obtidos espectros unidimensionais de hidrogênio e bidimensionais (HSQC e HMBC) por espectrômetro de RMN 600 MHz (Bruker®). As amostras foram diluídas em clorofórmio deuterado (CDCl₃).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da atividade larvicida dos extratos de *Astronium fraxinifolium* sobre *Aedes aegypti*

Vinte e dois extratos de *Astronium fraxinifolium* foram avaliados. Dentre esses, o extrato bruto Arbo0006 foi o mais ativo, obtendo 100% de mortalidade das larvas em aproximadamente 30 minutos a uma concentração final de 250 µg/mL. Em seguida, os extratos Arbo0015 e Arbo0022 obtiveram atividade de 95% e 45%, respectivamente. Os outros extratos testados não foram considerados ativos, com mortalidade abaixo de 40%.

Tabela 1. Atividade larvicida dos extratos de *Astronium fraxinifolium*.

	% larvas mortas	% pupas
Arbo0006	100	0
Arbo0015	95	0
Arbo0022	45	0

O grupo do Laboratório de Farmacognosia da UnB tem observado, em seus anos de investigação de espécies do Cerrado, uma maior atividade antimicrobiana em extratos do caule e da raiz, tendo em vista que esses órgãos estão mais expostos ao ataque de fitopatógenos e insetos e por isso podem produzir mais metabólitos secundários como defesa (DA COSTA et al., 2014; MOURA, 2014). Além disso, observa-se que os extratos mais ativos são provenientes da maceração com acetato de etila e etanol, sendo de média ou alta polaridade respectivamente (DA COSTA et al., 2014), confirmando os resultados obtidos pela avaliação da atividade larvicida, onde os 3 extratos da tabela 1 são acetato de etila ou etanol, da madeira da raiz.

Dois outros extratos foram selecionados para pré-fracionamento, devido a suas atividades larvicidas de 95% e média atividade de 45% - o Arbo0015 e Arbo0022,

respectivamente - com intuito de conhecer o aspecto fitoquímico da espécie *A. fraxinifolium* cuja fitoquímica ainda é pouco conhecida.

5.2. Pré-fracionamento por extração em fase sólida (SPE-DIOL)

A pré-fração Arbo0006A foi escolhida para o pré-fracionamento químico em SPE-DIOL devido à sua alta e rápida atividade larvicida observada em um período inferior a 30 min. Além desse, outros dois extratos foram selecionados para o pré-fracionamento. As 5 pré-frações obtidas de cada um dos 3 extratos foram submetidas novamente ao teste rápido larvicida de 24h na concentração de 150 µg/mL, com o intuito de verificar em qual pré-fração se encontrava as substâncias responsáveis pela atividade larvicida. Dentre as 15 frações, se destacaram as seguintes:

Tabela 2. Atividade larvicida das pré-frações dos extratos Arbo0006, Abo0015 e Arbo0022 de *Astronium fraxinifolium*.

	% larvas mortas	% pupas
Arbo0006A	100	0
Arbo0006B	92,5	0
Arbo0006C	82,5	0
Arbo0006D	97	0
Arbo0015A	100	0
Arbo0022A	50	0
Arbo0022B	22,5	0

Tendo em vista que o pré-fracionamento SPE-DIOL não conseguiu uma boa separação do extrato Arbo0006, além da escassez de extrato disponível, este foi não foi escolhido para prosseguir com o fracionamento em coluna cromatográfica. O extrato Arbo0015, apesar de ter

sido observada uma separação efetiva da fração pelo SPE-DIOL, pela atividade larvicida de 100% apenas na pré-fração Arbo0015A, não foi escolhido para prosseguir com o fracionamento em coluna tendo em vista seu duvidoso perfil químico, o qual parece pertencer a outra espécie.

Dessa forma, o extrato escolhido para fracionamento em coluna foi o Arbo0022, pelo seu perfil químico, pela massa de extrato disponível adequada para continuidade do estudo e pela sua média atividade larvicida (45%), assim como de sua pré-fração A (50%). Foram realizadas o pré-fracionamento SPE-DIOL com quatro diferentes cartuchos para escalonamento, obtendo-se assim um rendimento de 156 mg da pré-fração A e 83 mg da pré-fração B.

As pré-frações Arbo0022A e Arbo0022B foram então submetidas a cromatografia de camada delgada, a fim de se determinar o melhor sistema eluente para separação, o qual apresentou um fator de retenção de 0,2 cm (HEX:DCM 8:2). De acordo com esses resultados, foi escolhida a pré-fração Arbo0022B para fracionamento, por aparentar ser mais pura em relação a pré-fração Arbo0022A.



Figura 6: Pré-frações Arbo0022 A-E obtidas por SPE-DIOL do extrato Arbo0022.

5.3. Fracionamento em coluna aberta de sílica

A pré-fração Arbo0022B (80 mg) foi submetida ao fracionamento por coluna aberta de sílica (32 g) (Figura 7). Iniciou-se o processo de separação com HEX:DCM 8:2, aumentando gradativamente de 20% em 20% a polaridade com diclorometano até este atingir 100%. Em

seguida, a polaridade continuou sendo aumentada aos poucos com metanol – com variações de 1%, 2%, 5%, 10% – até alcançar 100%. As 134 frações obtidas foram reunidas em 13 grupos, segundo o perfil em CCD. Foram utilizados aproximadamente 100mL de cada sistema de eluentes.

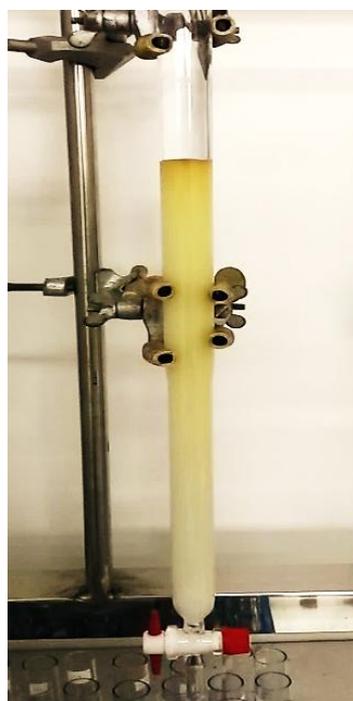


Figura 7: Coluna Cromatográfica Aberta de Sílica da pré-fração Arbo0022B.

As 134 frações obtidas foram reunidas em 13 grupos (Tabela 3) de acordo com o perfil químico obtido por CCD (Figura 8). A figura 9 mostra as placas de CCD dos 13 grupos.

Tabela 3. Frações reunidas após fracionamento em coluna aberta de Sílica da pré-fração Arbo0022B de *Astronium fraxinifolium*.

Grupos	Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)
Arbo11A52A	1-19	4,0	5,0
Arbo11A52B	20-51	4,7	5,9
Arbo11A52C	52-55	0,8	1,0
Arbo11A52D	56	0,5	0,6

Arbo11A52E	57-67	3,5	4,4
Arbo11A52F	68-74	1,6	2,0
Arbo11A52G	75-85	1,1	1,4
Arbo11A52H	86-90	0,8	1,0
Arbo11A52I	91-101	11,2	14,0
Arbo11A52J	102-106	6,8	8,5
Arbo11A52K	107-111	20,2	25,3
Arbo11A52L	112-123	18,8	23,5
Arbo11A52M	124-134	8,5	10,6

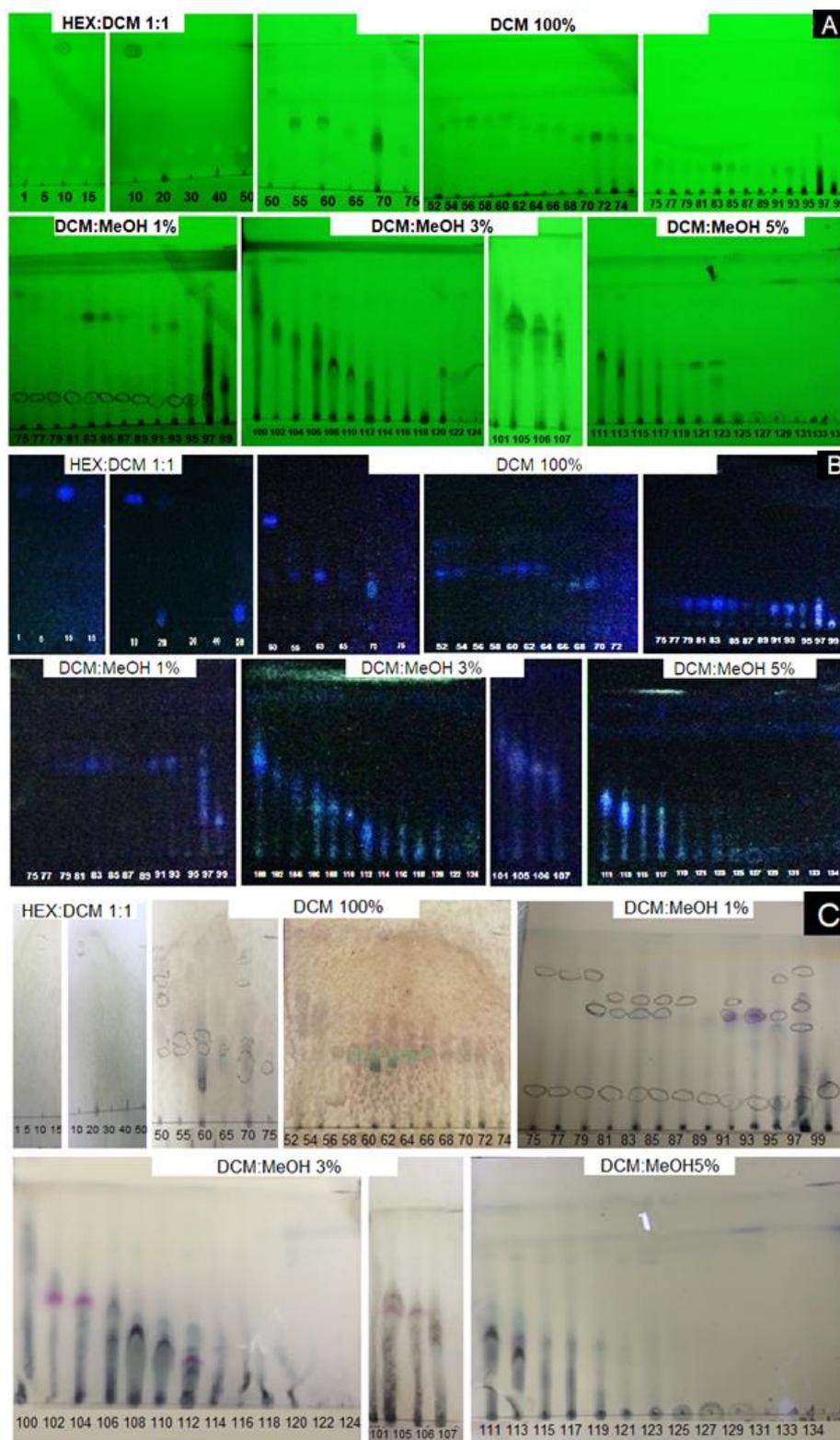


Figura 8: Fotos das placas de Cromatografia em Camada Delgada das 134 frações obtidas em coluna aberta de sílica da pré-fração Arbo0022B. A – 254nm, B – 365nm, C – vanilina sulfúrica.

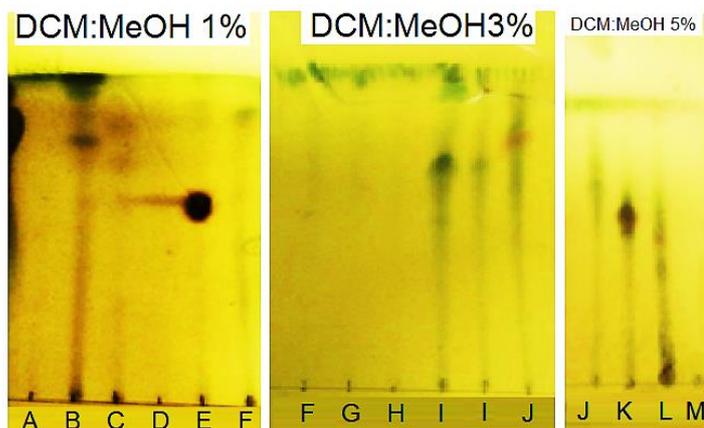


Figura 9: Fotos das placas de Cromatografia em Camada Delgada recapitulativa dos 13 grupos obtidos em coluna aberta de sílica da pré-fração Arbo0022B revelada com vanilina sulfúrica.

Dos 13 grupos, nove foram submetidos a novo teste larvicida na concentração de 100 µg/mL e não foi observada atividade larvicida desses grupos: Arbo11A52A, Arbo11A52B, Arbo11A52E, Arbo11A52F, Arbo11A52I, Arbo11A52J, Arbo11A52K, Arbo11A52L, Arbo11A52M. Os outros quatro grupos não foram testados devido ao seu baixo rendimento.

O fato dos grupos não terem apresentado atividade larvicida pode ser devido à baixa concentração desses, sendo necessário realizar novos testes utilizando concentrações diferentes. Além disso, é possível que a atividade observada na pré-fração Arbo0022B esteja presente nos grupos que não foram testados pelo seu baixo rendimento ou pela perda de substâncias minoritárias no processo. Ademais, a atividade pode ser consequência do sinergismo das moléculas presentes no extrato Arbo0022, visto que este é um fitocomplexo constituído por inúmeras substâncias ativas e inativas, que quando isoladas podem ter valores de atividade maiores ou menores do que o próprio extrato (MOURA, 2014).

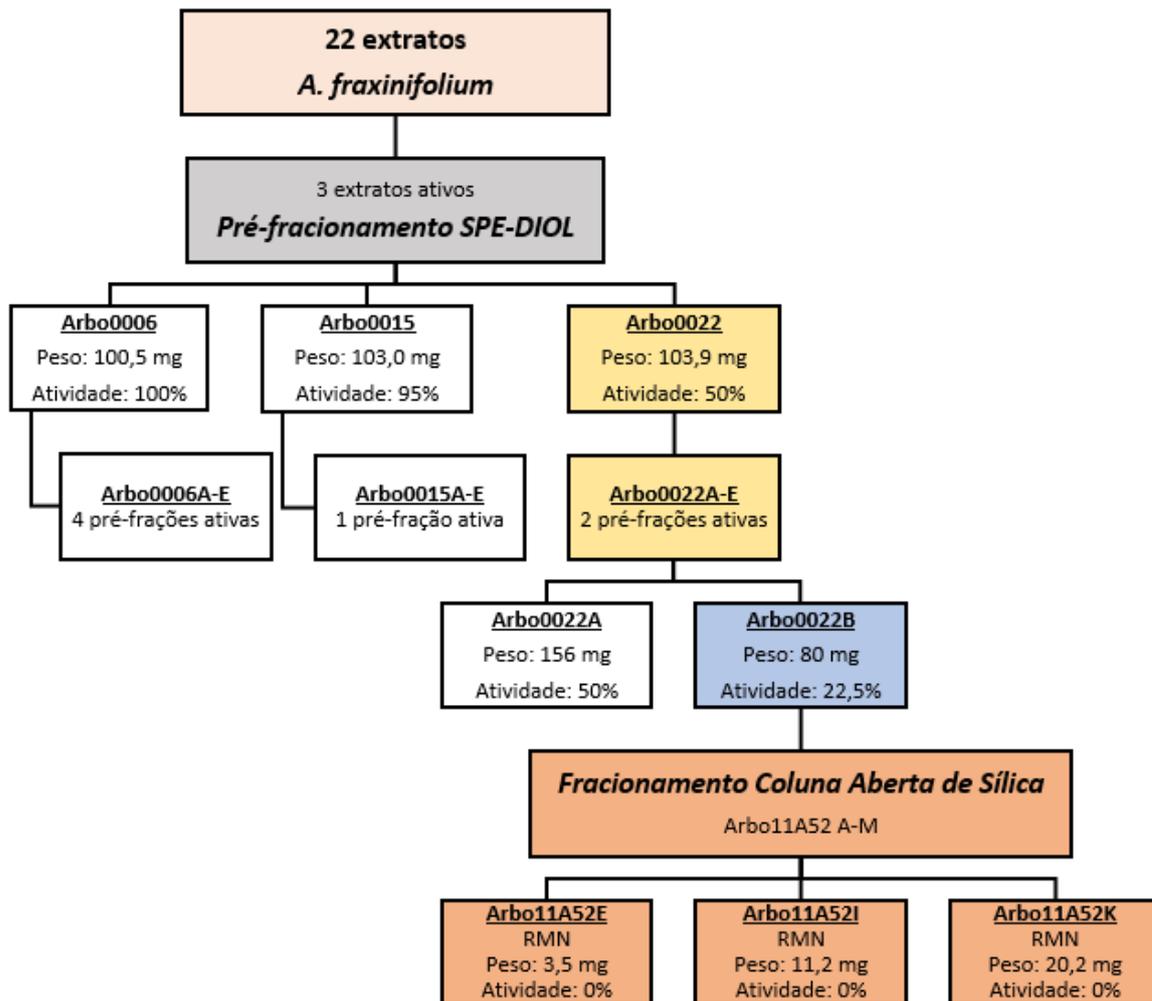


Figura 10: Etapas do fracionamento químico do extrato Arbo0022.

5.4. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

O pré-fractionamento do extrato Arbo0022 resultou em duas pré-frações com atividade larvicida, o Arbo0022A e Arbo0022B, sendo estes escolhidos para análise de RMN (Figura 11).

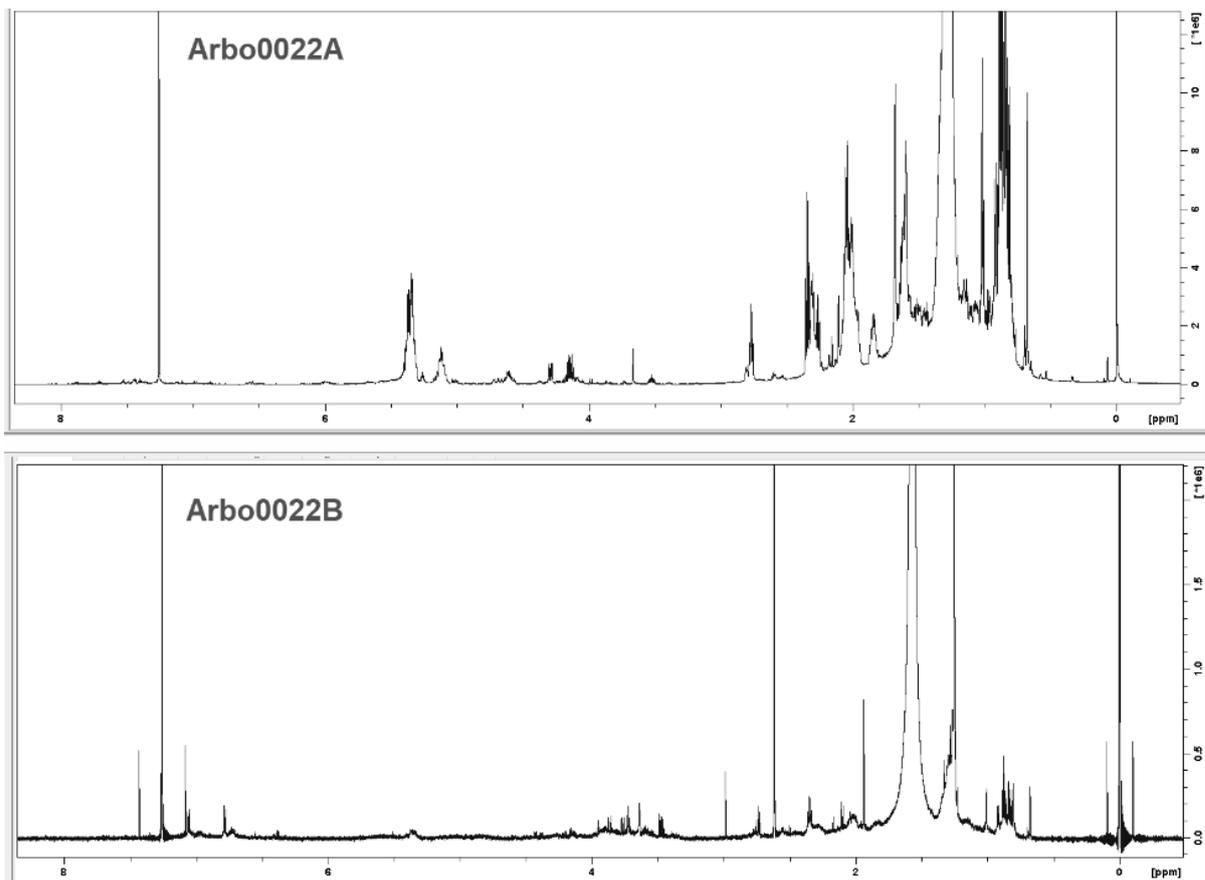


Figura 11: Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) das pré-frações Arbo0022A e Arbo0022B.

Os grupos Arbo11A52I e Arbo11A52K e o grupo Arbo11A52E foram submetidos à análise por RMN ^1H , por apresentarem um rendimento considerável e grau de pureza elevado sugerido em CCD a ser confirmado por outras técnicas.

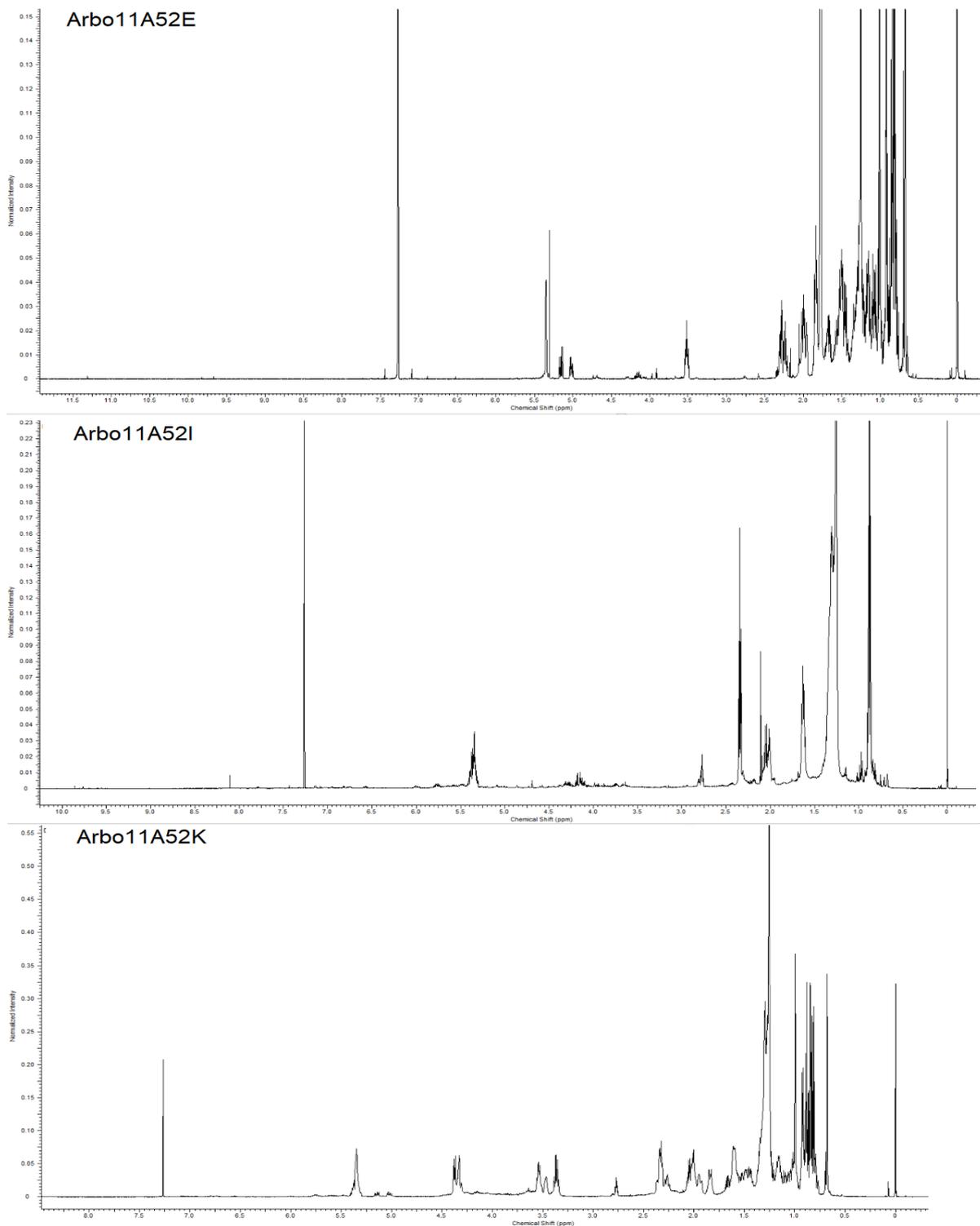


Figura 12: Espectro de RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) dos grupos da pré-fração Arbo0022B. A – Arbo11A52E, B – Arbo11A52I, C – Arbo11A52K.

O espectro de hidrogênio do Arbo11A52I possui quatro picos característicos de ácido graxo (Figura 13): sinal de CH₂ α de COOH como tripleto (δ 2.35 ppm); sinal de CH₂ de C₃ como multipletto (δ 1.65 ppm); CH₂ de C₃-C₁₆ (δ 1.3-1.4 ppm); sinal de CH₃ de C₁₈ metil terminal como tripleto (δ 0.88 ppm) (KNOTHE, 2018). Já os grupos Arbo11A52E e Arbo11A52K possuem perfil característico de terpenos pelo intenso sinal de hidrocarbonetos entre δ 2-0 ppm. O grupo Arbo11A52E foi submetido também à análise por RMN bidimensional pelo grau de pureza apresentado no espectro de hidrogênio. Os espectros HSQC e HMBC (Figura 14 e 15), os quais representam a relação entre os hidrogênios e seus carbonos ligados e vizinhos respectivamente, demonstram espectro característico de triterpenos por apresentarem múltiplas relações na região entre δ 2.5-0.5 ppm (FOUOKENG, 2017).

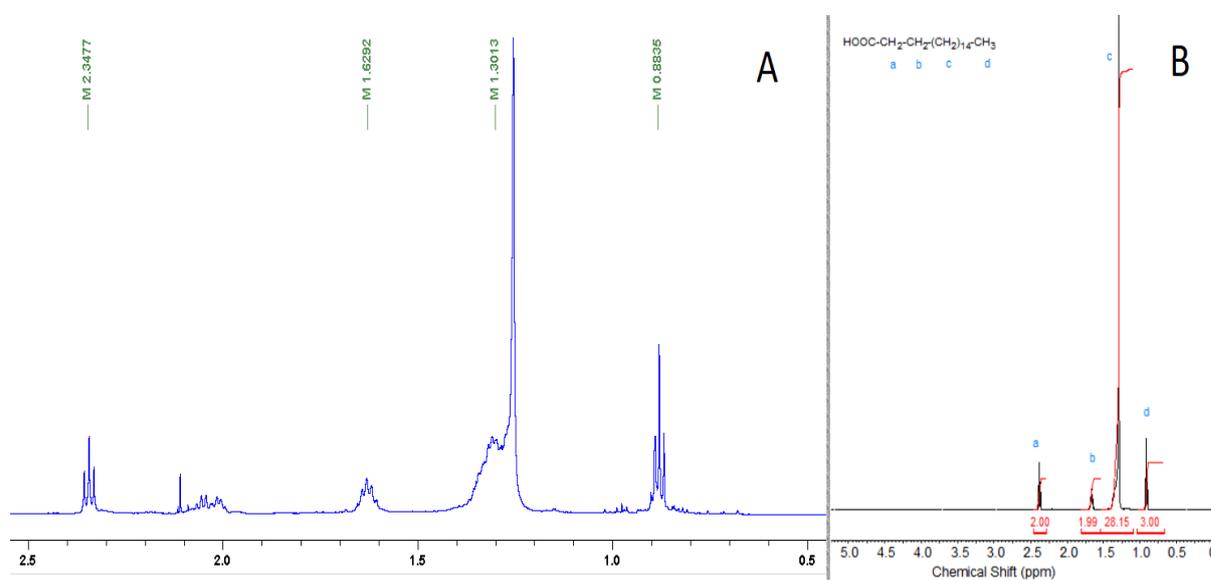


Figura 13: Expansão do espectro de RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) do grupo Arbo11A52I (A) e sinais característicos de ácido graxo (B – adaptado de KNOTHE, 2018).

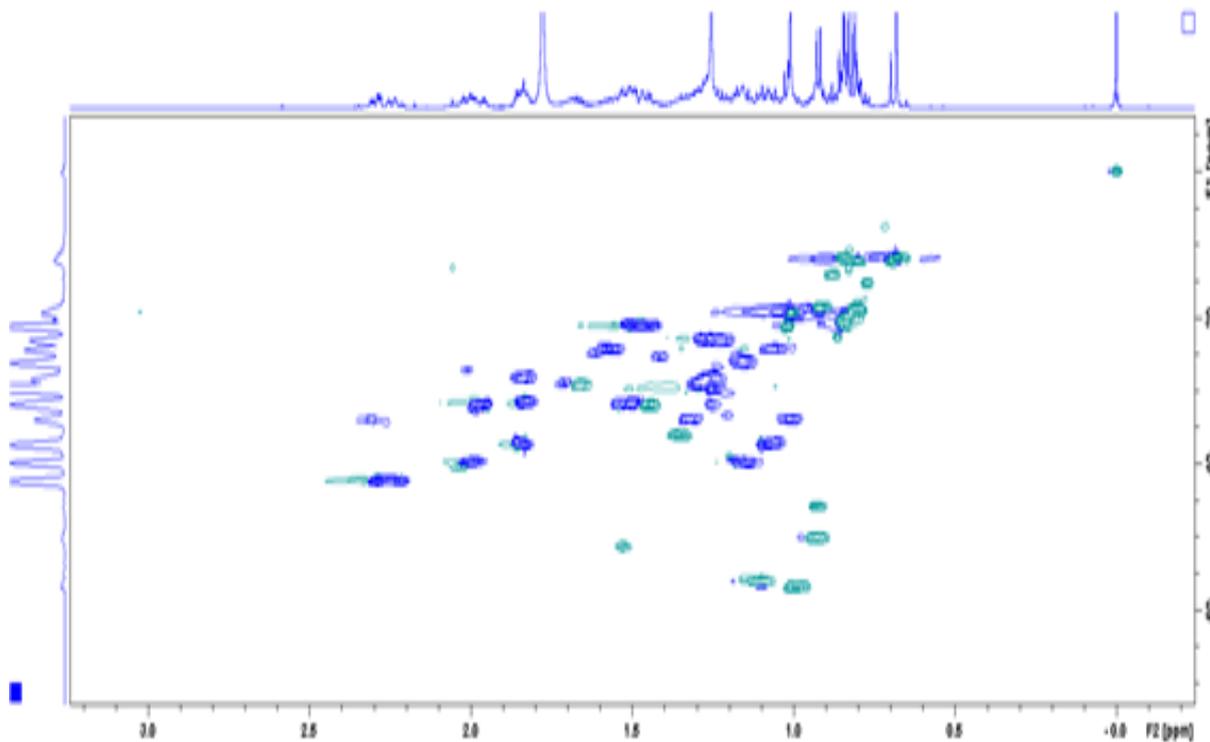


Figura 14: Espectro de RMN 2D HSQC (600MHz, CDCl_3) do grupo Arbo11A52E.

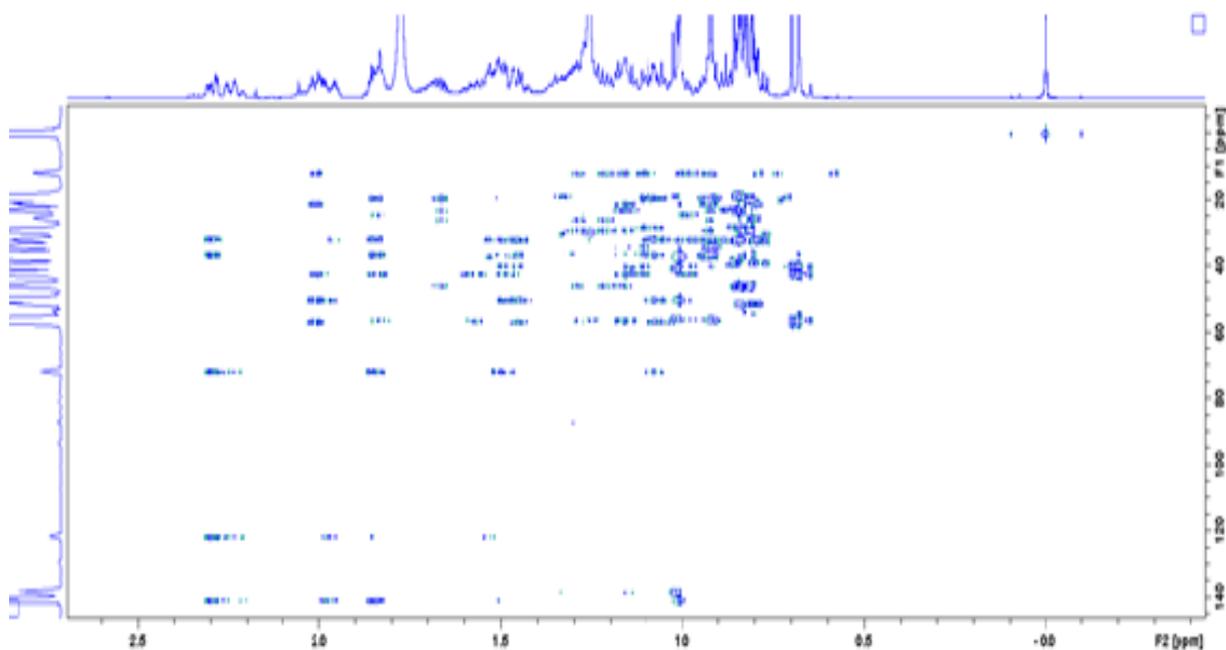


Figura 15: Espectro de RMN 2D HMBC (600MHz, CDCl_3) do grupo Arbo11A52E.

Os resultados encontrados corroboram com o encontrado na literatura por Moura (2014), que isolou dois triterpenos - o 3- β -cicloartenol e 3- β -cicloeucalenol - do extrato acetato

de etila da casca da raiz de *A. fraxinifolium*. No extrato acetato de etila das folhas, foram identificados um triterpeno com grupo funcional cetona e dois outros triterpenos (Figura 16): tremulona, β -amirina e lupeol, respectivamente (MOURA, 2014). Outros estudos também detectaram a presença de triterpenóides em grande quantidade no extrato etanólico de *A. fraxinifolium* e em extratos etanólicos e hexânicos de *A. urundeuva* (COSTA et al., 2007; VILAR et al., 2004). Dessa forma, os espectros encontram-se em fase de análise e comparação com esses triterpenos isolados para avaliar a semelhança entre eles.

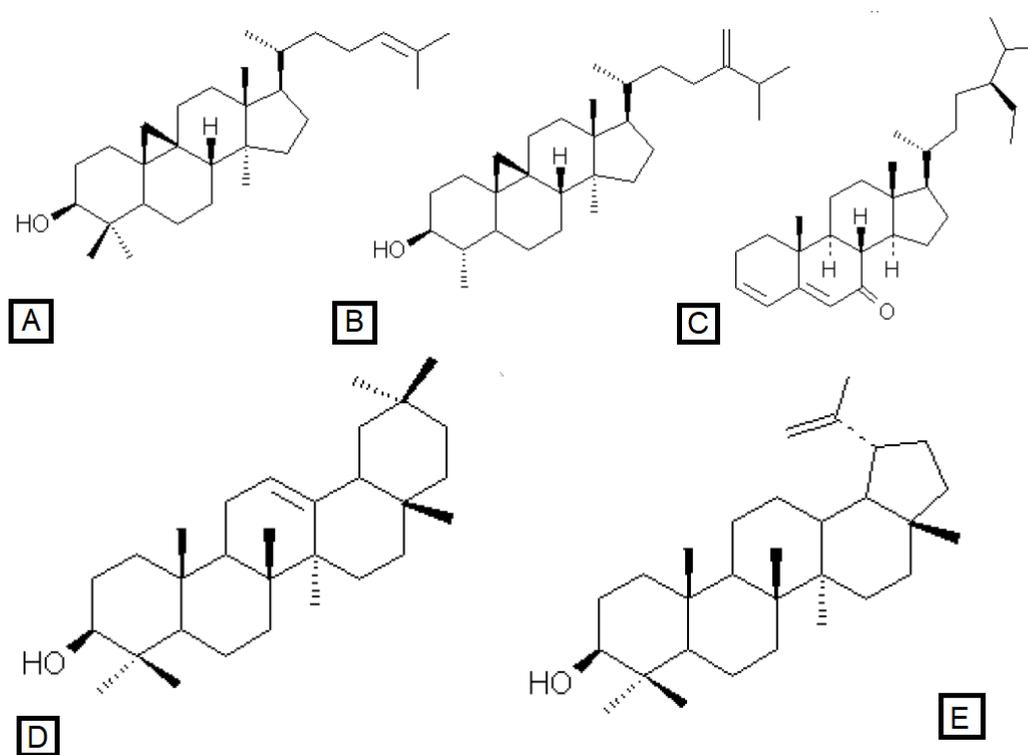


Figura 16: Substâncias previamente isoladas do extrato etanólico da casca da raiz e do extrato acetato de etila das folhas de *Astronium fraxinifolium*. A - 3- β -cicloartenol, B - 3- β -cicloeucaleanol, C - tremulona, D - β -amirina, E - lupeol (Adaptado de MOURA, 2014).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados mostraram que a espécie *Astronium fraxinifolium* possui considerável potencial larvicida. Os extratos selecionados precisam ser melhor estudados com o intuito de determinar as substâncias ativas. A pré-fração Arbo0022B escolhida apresentou atividade larvicida, no entanto suas frações não apresentaram a mesma atividade na concentração testada, sendo necessário realizar novos testes utilizando concentrações diferentes. Além disso, é possível que a atividade observada na pré-fração Arbo0022B esteja presente nas frações que não foram testadas pelo seu baixo rendimento. Ademais, a atividade pode ser consequência do sinergismo das moléculas presentes no extrato Arbo0022, visto que este é um fitocomplexo constituído por inúmeras substâncias ativas e inativas, que quando isoladas podem ter valores de atividade maiores ou menores do que o próprio extrato. Apesar de não ter sido encontrada atividade larvicida, a fração Arbo11A52E foi considerada pura de acordo com seu RMN, aparentando se tratar de um triterpeno, contribuindo assim para a o conhecimento da fitoquímica da espécie *Astronium fraxinifolium*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AQUINO, N. C. et al. Intraspecific Variation of the Volatile Chemical Composition of *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allem. ("Aroeira-do-Sertão"): Characterization of Six Chemotypes. J. Braz. Chem. Soc. Vol. 28, nº 5. São Paulo, 2017.

ALENCAR, J. W. et al. Essential Oil from *Astronium fraxinifolium* Schott. (Anacardiaceae) in Different Growth Stages. J. Essent. Oil Res., vol. 8, p. 177-178. USA, 1996.

ATKINSON, B. et al. Detection of Zika Virus in Semen. Emerg Infect Dis. Vol. 22, nº 5, p. 940. Atlanta, 2016.

BÄCK, A. T.; LUNDKVIST, A. Dengue viruses - an overview. Infect Ecol Epidemiol. Vol. 30; nº 3. London, 2013.

BRASIL, P. et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. N Engl J Med. Vol. 375, nº 24, p. 2321-2334. Massachusetts, 2016.

CHEN, T. K. et al. A volatile leafcutter ant repellent from *Astronium graveolens*. Naturwissenschaften, Vol. 71, nº 2, pp.97-98. Berlin, 1984.

CHOUIN-CARNEIRO, T.; SANTOS, F. B. Transmission of Major Arboviruses in Brazil: The Role of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Vectors, Biological Control of Pest and Vector Insects Vonnie D.C. Shields, IntechOpen, Cap.11. London, 2017. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/biological-control-of-pest-and-vectorinsects/transmission-of-major-arboviruses-in-brazil-the-role-of-aedes-aegypti-and-aedesalbopictus-vectors>> Acesso em: 15/04/2018.

CHRISTOPHERS, S. R. *Aedes aegypti* (L.): the yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure. Cambridge University Press. 750 p. London, 1960. Disponível em: http://www.dpi.inpe.br/geocxnets/wiki/lib/exe/fetch.php?media=wiki:christophers_1960.pdf

COSTA, A. C. R. et al. Abordagem fitoquímica e avaliação da atividade larvicida e nematicida de *Astronium fraxinifolium* Schott. Monografia (Curso de Licenciatura em Química) – Universidade Estadual do Ceará (FAEC). Ceará, 2007.

COSTA, O. B. et al. Essential Oil Constituents and Yields from Leaves of *Blepharocalyx salicifolius* (Kunt) O. Berg and *Myracrodruon urundeuva* (Allemão) Collected during Daytime. International Journal of Forestry Research. Vol. 2014, 6 p. London, 2014.

CUNHA, R. V. et al. Zika: Abordagem Clínica na Atenção Básica. UNA-SUS, Fiocruz Mato Grosso do Sul, Secretaria de Gestão do Trabalho e da Saúde (SGTES), Secretaria de Atenção à Saúde (SAS), Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Brasil, 2016. Disponível em: <http://www.saude.pi.gov.br/uploads/warning_document/file/276/livro.pdf>. Acesso em: 01/06/2018.

DA COSTA, R. C. et al. Discovery of the rapanone and suberonone mixture as a motif for leishmanicidal and antifungal applications. Bioorganic & Medicinal Chemistry, Vol. 22, nº 1, p. 135-140. England, 2014.

DE LIMA, S. C. G. et al. In Vitro and In Vivo Leishmanicidal Activity of *Astronium fraxinifolium* (Schott) and *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng against *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Hindawi Publishing Corporation. BioMed Research International, Vol. 2014, 7 p. London, 2014.

DONALISIO, M. R. et al. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. Rev. Saúde Pública vol.51, Epub. São Paulo, 2017.

D'ORTENZIO, E. et al. Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. N Engl J Med. Vol. 374, nº 22, p. 2195-8. Boston, 2016.

ESPINDOLA, L. S. et al. Cytotoxic Triterpenes from *Salacia crassifolia* and Metabolite Profiling of Celastraceae Species. Molecules vol. 23 n.6, p. 1494. Switzerland, 2018.

FARIA, N. R. et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science*. Vol. 352, nº 6283, p. 345-349. New York, 2016.

FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. The perpetual challenge of infectious diseases. *N Engl J Med*. Vol. 366, nº 5, p. 454-61. Boston, 2012.

FIOCRUZ. Kit ZDC - Zika, Dengue e Chikungunya. Bio-Manguinhos/Fiocruz. Manguinhos, Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <<http://www.bio.fiocruz.br/index.php/produtos/reativos/testes-moleculares/zdc>>. Acesso em: 13/05/2018.

FIOCRUZ. Dengue - Vírus e vetor. Brazil, 2017. Disponível em: <<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/opportunista.html>>. Acesso em 12/4/2017.

FOUOKENG, Y. et al. The structure of antrocarine E, an ergostane isolated from *Antrocaryon klaineinum* Pierre (Anacardiaceae). *Fitoterapia*, vol. 117, p. 61–64. Milano, 2017.

GARDNER, C. L.; RYMAN, K. D. Yellow fever: a reemerging threat. *Clin Lab Med*. Vol. 30, p. 237–260. Philadelphia, 2010.

HARKER, B. W. et al. Stage-specific transcription during development of *Aedes aegypti*. *BMC Developmental Biology*, vol. 13, p. 29. London, 2013.

HERNÁNDEZ, V. et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Astronium graveolens* jacq essential oil. *Rev. Latinoamer. Quím.*, v. 41, nº 2, p. 89-94. Naucalpan de Juárez, 2013.

JOURDAIN, F. et al. Entomological factors of arboviruses emergences. Elsevier, *Transfusion Clinique et Biologique*, Vol. 22, nº 3, p. 101-106. Paris, 2015.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, 1(1): 147: 155, 2005.

KNOTHE, G. Saturated Fatty Acids and Methyl Esters. AOCs Lipid Library, Canada, 2018. Disponível em:

<<http://lipidlibrary.aocs.org/Analysis/content.cfm?ItemNumber=40270>>. Acesso em: 11/06/18.

KRAEMER, M. U. G. et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife*. Vol. 4, e08347. Cambridge, 2015.

MACHADO, A. A. Análise inseticida de extratos de plantas do bioma Cerrado sobre triatomíneos e larvas de *Aedes aegypti*. Tese de Mestrado em Ciências da Saúde. Universidade de Brasília. Brasília, 2006.

MAIA, J. G. S. et al. Essential oils from *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. and *A. fraxinifolium* Schott ex Spreng. *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 17, nº1, p. 72-74. USA, 2002.

MARINHO, P. S. et al. A review of selected Arboviruses during pregnancy. *Matern Health Neonatol Perinatol*, vol. 3, p. 17. London, 2017.

MEIRELLES, R. M. S. et al. Com Ciência na Escola - Dengue I: brincando para descobrir novidades. LBC/IOC/Fiocruz, 2018. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/media/comciencia_04.pdf> Acesso em: 01/04/2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Febre de chikungunya: manejo clínico. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Atenção Básica. Editora MS, 1ª edição, OS 2015/0061, ISBN 978-85-334-2226-1. Brasília, 2015a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria Nº 1.813, de 11 de Novembro de 2015. Brasil, 2015b. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2015/prt1813_11_11_2015.html>. Acesso em: 01/06/2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança [recurso eletrônico]. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de

Vigilância das Doenças Transmissíveis. Editora MS, 5. Ed, ISBN 978-85-334-2344-2. Brasília, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Ministério da Saúde divulga novos dados de febre amarela. Brasil, 2017a. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/27482-ministerio-da-saude-divulga-novos-dados-de-febre-amarela>>. Acesso em 02/11/2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 1.313, de 3 de agosto de 2017. Secretaria de atenção à saúde. DOU nº 153, Seção 1, p. 56. Brasil, 2017b. Disponível em: <http://www.lex.com.br/legis_27485984_PORTARIA_N_1313_DE_3_DE_AGOSTO_DE_2017.aspx>. Acesso em: 13/05/2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vol. 48, nº 11 e nº29, ISSN 2358-9450. Brasil, 2017c.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Ministério da Saúde declara fim da Emergência Nacional para Zika e microcefalia. Brasil, 2017d. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/28347-ministerio-da-saude-declara-fim-da-emergencia-nacional-para-zika-e-microcefalia>>. Acesso em: 31/5/2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Febre amarela: guia para profissionais de saúde. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. Editora MS, OS 2017/0165, ISBN 978-85-334-2480-7. Brasília, 2017e.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasil e EUA firmam parceria para produção da 2ª etapa da vacina contra a Zika. Brasil, 2017f. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/29734-brasil-e-eua-firmam-parceria-para-producao-da-2-etapa-da-vacina-contra-a-zika>>. Acesso em: 01/06/2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. Editora MS, Vol. 49, Nº 23, ISSN 9352-7864. Brasil, 2018.

MONTANARI, R. M. et al. Exposure to Anacardiaceae volatile oils and their constituents induces lipid peroxidation within food-borne bacteria cells. *Molecules*, Vol., 17, nº 8, p. 9728-9740. Switzerland, 2012.

MORO, M. L. et al. Chikungunya virus in North-Eastern Italy: a seroprevalence survey. *Am J Trop Med Hyg.* Vol. 82, nº 3, p.508-11. Baltimore, 2010.

MOURA, C. M. Contribuição à quimiotaxonomia de Anacardiaceae - estudo fitoquímico e das atividades antifúngicas e antitumorais de *Astronium fraxinifolium* Schott ocorrente no Cerrado. Tese de Mestrado em Ciências Médicas. Universidade de Brasília. Brasília, 2014.

MOYES, C. L. et al. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS neglected tropical diseases*, vol. 11, nº 7, p. e0005625. San Francisco, 2017.

NAPOLEÃO, T. H. et al. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. *Parasitol Res.* Vol. 110, nº 2, p. 609-16. Berlin, 2012.

OMS. Febre amarela - ficha descritiva. OMS, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/pt/>>. Acesso em: 12/4/2017.

ONG, M. A. Dengue fever climbs the social ladder. *Nature*, vol. 448, p.734-5. England, 2007.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE/ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. WHO report on global surveillance of epidemic-prone infectious diseases. WHO, 2016. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11780%3Ascien-tists-studying-intensified-vector-control-measures-to-combat-zika-dengue-

chikungunyaamericas&catid=740%3Apress-releases&Itemid=1926&lang=es.>. Acesso em 15/04/2018.

PAULES, C. I.; FAUCI, A. S. Yellow fever – once again on the radar screen in the Americas. *N Engl J Med*. Vol. 376, nº 15, p. 1397–1399. England, 2017.

RODRIGUEZ-BURBANO, D. et al. Composition of the essential oil from leaves of *Astronium graveolens* Jacq grown in Colombia. *Journal of Essential Oil Research*, Vol. 22, p. 488-489. USA, 2010.

ROEMER, T. et al. Confronting the challenges of natural product-based antifungal Discovery. *Chemistry & Biology*. Vol. 18, nº 2, p. 148-164. USA, 2011.

SANTIN, D. A. Revisão taxonômica do gênero *Astronium* Jacq. e revalidação do gênero *Myracrodruon* Fr. Allem. (Anacardiaceae). Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1989.

SBIM. Nota Técnica – Vacina Dengue. Brasil, 2017. Disponível em: <<https://sbim.org.br/images/files/nt-conjunta-sbim-sbp-sbi-sbmt-febrasgo-dengvaxia-171219.pdf>>. Acesso em: 16/06/2018.

SOUZA, T. M. et al. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* of m-pentadecadienyl-phenol isolated from *Myracrodruon urundeuva* seeds. *Pest Manag Sci*. Vol. 68, nº 10, p. 1380-4. West Sussex, 2012.

SOUZA, T. M. et al. Further evidences for the mode of action of the larvicidal m-pentadecadienyl-phenol isolated from *Myracrodruon urundeuva* seeds against *Aedes aegypti*. *Acta Trop*. Vol. 152, p. 49-55. Netherlands, 2015.

SUWANMANEE, S.; LUPLERTLOP, N. Dengue and Zika viruses: lessons learned from the similarities between these *Aedes* mosquito-vectored arboviruses. *J Microbiol*. Vol. 55, nº 2, p.81-89. Korea (South), 2017.

TAPPE, D. et al. Acute Zika Virus Infection after Travel to Malaysian Borneo. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 21, nº 5. Atlanta, 2015.

VILAR, M. D. L. et al. Contact dermatites associated with *Astronium urundeuva* (allemão) Engl., a traditional medicinal plant from Brazil. *Contact Dermatitis*, Vol. 51, p. 311–322. Copenhagen, 2004.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res.* Vol. 85, nº 2, p. 328-45. Amsterdam, 2010.

WICHMANN, O. et al. Live-attenuated tetravalent dengue vaccines: The needs and challenges of post-licensure evaluation of vaccine safety and effectiveness. *Vaccine*, vol. 35, nº42, p. 5535–5542. Netherlands, 2017.

WILDER-SMITH, A. et al. Epidemic arboviral disease: priorities for research and public health. *Lancet Infect Dis.* Vol. 17, nº 3, p. e101–e106. New York, 2017.

WINK, K. Secondary Metabolites, the Role in Plant Diversification of. Elsevier, *Encyclopedia of Evolutionary Biology*. Vol. 4, p. 1–9. USA, 2016.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Vol. 110, nº 4, p. 569-72. Rio de Janeiro, 2015.

ZARA, A. L. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiol. Serv. Saúde.* Vol. 25, nº 2, ISSN 1679-4974. Brasília, 2016.