



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE PESQUISA EM FÁRMACOS E MEDICAMENTOS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS



DIÉGINA ARAÚJO FERNANDES

**Estudos fitoquímico e biológico de *Helicteres velutina* K. Schum (Sterculiaceae) nos
estágios de desenvolvimento do *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae)**

JOÃO PESSOA - PB

2021

DIÉGINA ARAÚJO FERNANDES

Estudos fitoquímico e biológico de *Helicteres velutina* K. Schum (Sterculiaceae) nos estágios de desenvolvimento do *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacoquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Vanderlei de Souza

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiola da Cruz Nunes

JOÃO PESSOA - PB

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F363e Fernandes, Diégina Araújo.

Estudos fitoquímico e biológico de *Helicteres velutina* K. Schum (Sterculiaceae) nos estágios de desenvolvimento do *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) / Diégina Araújo Fernandes. - João Pessoa, 2021.

247 f. : il.

Orientação: Maria de Fátima Vanderlei de Souza.

Coorientação: Fabiola da Cruz Nunes.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais - Estudo fitoquímico. 2. Sterculiaceae. 3. *Helicteres velutina* K. Schum. 4. Atividade biológica. 5. *Aedes aegypti* L. 6. Plantas medicinais. I. Souza, Maria de Fátima Vanderlei de. II. Nunes, Fabiola da Cruz. III. Título.

UFPB/BC

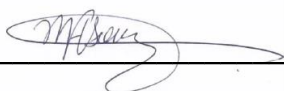
CDU 547.9(043)

DIÉGINA ARAÚJO FERNANDES

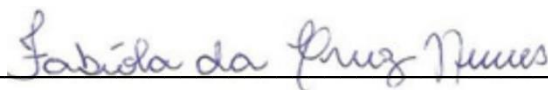
**Estudos fitoquímico e biológico de *Helicteres velutina* K. Schum (Sterculiaceae) nos
estágios de desenvolvimento do *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae)**

Aprovada em: 13/08/2021

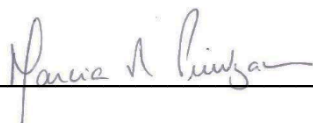
BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Vanderlei de Souza
(Orientadora)



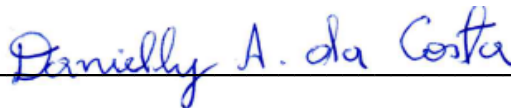
Prof^a. Dr^a. Fabiola da Cruz Nunes
(Coorientadora)



Prof^a. Dr^a. Marcia Regina Piuvezam
(Examinadora interna)



Prof^a. Dr^a. Luciana Scotti
(Examinadora interna)



Prof^a. Dr^a. Danielly Albuquerque da Costa
(Examinadora externa)



Prof^a. Dr^a. Renata Mendonça Araújo
(Examinadora externa)

*A **Deus** por ser meu guia e companheiro, e aos meus pais (**Maria de Fátima Fernandes Araújo** e **Daniel Araújo da Silva**) que nunca mediram esforços em favor da minha educação.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por ter me concedido o dom da vida, por ter me fortalecido nos momentos de fraqueza, por ter colocado pessoas boas no meu caminho que me acolheram e foram verdadeiros anjos na minha vida.

A painho (**Daniel Araújo da Silva**) e mainha (**Maria de Fátima Fernandes Araújo**), obrigada por ter acreditado em mim e pelo apoio incondicional mesmo frente às dificuldades, amo vocês.

Aos meus irmãos, **Daniery Fernandes Araújo, Francisca Flávia Araújo Fernandes, Daniela Araújo Fernandes, Danilo Fernandes Araújo e Fernanda Araújo Fernandes**, que me ajudaram durante toda a minha jornada, tenho um carinho muito especial por cada um de vocês.

Aos meus sobrinhos, **Lucas Silva Fernandes, Kauan Felipe Fernandes da Silva, Arthur Luiz Fernandes de Oliveira e Laryssa Silva Fernandes**, espero poder guiá-los e ajudá-los nas suas escolhas, para que todos possam ter as mesmas oportunidades que eu tive.

Agradeço aos amigos da minha cidade natal (Condado/PB), aos amigos que fiz na minha jornada acadêmica (Patos, Cuité, Campina Grande, João Pessoa/PB), que nossa amizade seja duradoura e que os reencontros sejam frequentes.

Aos amigos e colegas que conheci no decorrer da pesquisa, que sempre me ajudaram dentro e fora do laboratório: **Ana Laura, Anderson Angel, Amanda Amona, Edileuza Bezerra, Janderson Albuquerque, Jeferson Barbosa, Louise Guimarães, Patrícia Oliveira, Renata Barros, Maria Denise e Sallett Rocha** por sempre estarem ao meu lado, tanto nos momentos de alegria como nos de maior dificuldade, sendo fundamentais principalmente nessa etapa final.

À minha orientadora **Prof.^a Dr.^a Maria de Fátima Vanderlei de Souza**, pela confiança depositada em mim e por ter se mostrado sempre solícita quando precisei, sei que todos os ensinamentos transmitidos durante esse período de orientação foram para o meu crescimento pessoal e profissional, admiro muito sua dedicação e comprometimento com a pesquisa, que esse ciclo se encerre, mas que a amizade e carinho permaneçam.

À minha professora **Dr.^a Danielly Albuquerque da Costa**, por ter acreditado no meu potencial e ter me impulsionado a seguir mais essa árdua jornada, sem seu apoio eu não teria chegado até aqui, meu carinho e admiração serão eternos.

À **Prof.^a Dr.^a Fabiola da Cruz Nunes** por sua contribuição na parte biológica deste trabalho e pela paciência em me passar um pouco dos seus conhecimentos.

À botânica **Prof.^a Dr.^a Adilva de Souza Conceição** por sua contribuição na coleta, identificação e disponibilização da espécie estudada.

À banca examinadora pela disponibilidade em avaliar o trabalho e pelas contribuições com o mesmo.

Aos demais professores desta pós-graduação pelos ensinamentos transmitidos, e por terem me norteado quanto aos meus futuros passos como profissional, sendo para mim verdadeiros exemplos de ética e comprometimento.

A todos os funcionários deste programa, em especial: **Raimundo Nonato, Welligton Lima, Carol Manguiera, Evandro Ferreira e Roseane Meireles**, que de forma direta ou indireta, me ajudaram nessa trajetória.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por ter financiado a pesquisa.

E por fim, aos que mesmo distantes torcem pelo meu sucesso.

**A Todos Vocês,
meus sinceros agradecimentos.**

“A natureza é racional e revelará seus segredos àqueles que aprenderem a ler e a entender sua linguagem.”

(George Louis Leclerc)

RESUMO

FERNANDES, Diégina Araújo. **Estudos fitoquímico e biológico de *Helicteres velutina* K. Schum (Sterculiaceae) nos estágios de desenvolvimento do *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae).** 248 p. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2021.

Aedes aegypti é o vetor de doenças emergentes e negligenciadas, como dengue, chikungunya e zika. *Helicteres velutina* popularmente conhecida como ‘pitó’, é uma espécie endêmica do Brasil, tradicionalmente utilizada pela tribo indígena Pankararé/Raso da Catarina/Bahia, como repelente de insetos. O presente trabalho teve por objetivo isolar os fitoconstituintes da espécie *H. velutina* e avaliar o seu potencial inseticida e repelente frente ao *Ae. aegypti*. O extrato etanólico bruto (EEB) das partes aéreas de *H. velutina* foi submetido a cromatografia líquido-líquido com hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol, obtendo suas respectivas fases. Foi realizado um *screening* biológico dessas fases frente aos estágios do ciclo de vida do mosquito. A viabilidade dos ovos foi avaliada utilizando diferentes concentrações das substâncias teste durante 25 dias; a sobrevivência de larvas, pupas e adultos foi verificada após 48 e 72 horas. O estudo fitoquímico das fases hexano e diclorometano foi realizado usando técnicas cromatográficas clássicas e hifenadas, além dos métodos espectroscópicos (RMN 1D/2D, IV e LCMS), resultando no isolamento e identificação de 12 constituintes químicos, entre eles dois flavonoides sulfatados inéditos na literatura (mariahine e condadine). As moléculas isoladas desta espécie foram submetidas a um *screening in silico*, utilizando domínio de aplicabilidade e *docking* molecular com proteínas alvo do vetor (1YIY, 1PZ4 e 3UQI), as substâncias com maior probabilidade de ligação, foram testadas *in vitro* frente a larvas de *Ae. aegypti*. A repelência do extrato, fases e substâncias foi avaliada com um olfátometro de tubo Y. A atividade citotóxica foi avaliada por meio da microscopia de fluorescência e marcação com iodeto de propideo, avaliando a produção dos hemócitos e concentração de óxido nítrico. O *screening* biológico mostrou que as fases hexano e diclorometano exibiram melhores resultados, causando inviabilização de 72,7% e 67,7% dos ovos; CL₅₀ de 3,88 e 5,80 mg/mL para larvas; 0,12 mg/mL e 8,85 mg/mL para pupas; 8,01 mg/mL e 0,74 mg/mL para adultos (teste tarsal), 0,05 mg/mL e 0,23 mg/mL (teste corporal), respectivamente. O tilirosideo e 7,4’-di-O-metil-8-O-sulfato flavona mostraram atividade larvicida, com CL₅₀ de 0,275 mg/mL após 72 h e de 0,182 mg/mL após 24 h de exposição, respectivamente. A fase diclorometano e a 7,4’-di-O-metil-8-O-sulfato flavona no teste de repelência e atividade citotóxica foram promissoras, observando-se a presença de plasmócitos, levando a sugerir que esses seriam os hemócitos responsáveis pela maior produção de óxido nítrico nas larvas tratadas, atuando como agente de defesa. Esse é o primeiro relato de flavonoides sulfatados na família Sterculiaceae, foi possível comprovar que a presença do grupo sulfato (OSO₃H) no C-8 foi crucial na atividade larvicida. Esses resultados proporcionam compreensão da atividade inseticida e repelente de *H. velutina* frente ao *Ae. aegypti*, dados que permitem vislumbrar o desenvolvimento de um produto natural mais eficaz no combate ao vetor que os repelentes alopatícos.

Palavras-chave: *Helicteres velutina* K. Schum; Sterculiaceae; Estudo fitoquímico; Atividade biológica; *Aedes aegypti* L.

ABSTRACT

Aedes aegypti is the vector of emerging and neglected diseases, such as dengue, chikungunya and zika. *Helicteres velutina* popularly known as 'pitó', is an endemic plant in Brazil, traditionally used by an indigenous tribe Pankararé/Raso da Catarina/Bahia, as an insect repellent. The present study aimed to isolate the phytochemicals of the species *H. velutina* and evaluate its insecticidal and repellent potential against *Ae. aegypti*. The crude ethanolic extract (CEE) from aerial parts of *H. velutina* was subjected to liquid-liquid chromatography with hexane, dichloromethane, ethyl acetate and n-butanol, obtaining its respective phases. A biological screening of these phases against the stages of the mosquito's life cycle was carried out. The viability of the eggs was evaluated using different concentrations of the test substances for 25 days, the survival of larvae, pupae and adults was verified after 48 and 72 hours. The phytochemical study of promising *in vitro* phases was carried out using classic and hyphenated chromatographic techniques, in addition to spectroscopic methods (1D/2D NMR, IR and LCMS), resulting in the isolation and identification of twelve chemical constituents, including two sulphated flavonoids unpublished in the literature (mariahine and condadine). The isolated molecules of this species were subjected to *in silico* screening, using applicability domain and molecular docking with vector target proteins (1YIY, 1PZ4 and 3UQI), the substances most likely to be bound, were tested *in vitro* against *Ae. aegypti* larvae. The repellency of the extract, phases and substances was evaluated with a Y-tube olfactometer. Cytotoxic activity was assessed using fluorescence microscopy and propidium iodide staining, evaluating the production of hemocytes and nitrous oxide concentration. The biological screening showed that the hexane and dichloromethane phases showed better results, causing 72.7% and 67.7% of eggs to become unviable; LC₅₀ of 3.88 and 5.80 mg/mL for larvae; 0.12 mg/mL and 8.85 mg/mL for pupae; 8.01 mg/mL and 0.74 mg/mL for adults (tarsal test), 0.05 mg/mL and 0.23 mg/mL (body test), respectively. Tiliroside and 7,4'-di-O-methyl-8-O-sulphate flavone showed larvicidal activity, with LC₅₀ of 0.275 mg/mL after 72 h and 0.182 mg/mL after 24 h of exposure, respectively. The dichloromethane phase and the 7,4'-di-O-methyl-8-O-sulphate flavone were more promising, observing the presence of plasmocytes, suggesting that these would be the responsible hemocytes by the greater production of nitric oxide in the treated larvae, acting as a defense agent. This is the first report of sulphated flavonoids in the Sterculiaceae family, it was also possible to prove that the presence of the sulphate group (OSO₃H) at C-8 was crucial in larvicidal activity. These findings provide a better understanding of the insecticidal and repellent activity of *H. velutina* against *Ae. aegypti* data that allow us to glimpse the development of a natural product that is more effective in combating the vector than allopathic repellents.

Keywords: *Helicteres velutina* K. Schum; Sterculiaceae; Phytochemical study; Biological activity; *Aedes aegypti* L.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

1YPY: Proteína transferase (*Aedes aegypti* kynurenine aminotransferase)

1PZ4: Proteína de ligação de lipídeo (Sterol Carrier Protein-2)

3UQI: Proteína isomerase (AaFKBP12)

ANOVA: Análise de Variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APA: Área de Proteção Ambiental

APG: Angiosperm Phylogeny Group

APT: Attached Proton Test

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CC: Cromatografia em Coluna

CCDA: Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CCDP: Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CLMP: Cromatografia Líquida de Média Pressão

CHIKV: Chikungunya Vírus

CH₂Cl₂: Diclorometano

CD₃COCD₃: Acetona deuterada

CDCl₃: Clorofórmio Deuterado

CP: Controle Positivo

CN: Controle Negativo

CL₅₀: Concentração Letal Média

COSY: Correlation Spectroscopy

DEET: N, N-Dietil-m-toluamida

DENV: Dengue Vírus

DMSO-*d*₆: Dimetilsulfóxido deuterado

d: Dubleto

dd: Duplo dubleto

EEB: Extrato Etanólico Bruto

EtOH: Etanol

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Spectroscopy

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence Spectroscopy

HRMS: High Resolution Mass Spectrometry

Hz: Hertz

IC₅₀: Concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo

IP: Iodeto de Propidio

IRE: Índice de Repelência Espacial

IV: Infravermelho

***J*:** Constante de acoplamento

KBr: Brometo de potássio

L1, L2, L3, L4: Estágios larvais do *Aedes aegypti*

LAFAM: Laboratório de Análises Farmacêuticas e Moleculares

LAPAVET: Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Parasitas e Vetores

LMCA: Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise

m: *meta*

m: Multiplete

MCC: Coeficiente de Correlação de Matthews

MeOH: Metanol

MHz: Megahertz

MS: Ministério da Saúde

MVD: Molegro Virtual Docker

n-BuOH: n-butanol

NO: Nitric Oxide (Óxido Nítrico)

NO²: Íon nitrito

NOESY: Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy

NP: Difenilboriloxietilamina

OMS: Organização Mundial de Saúde

o: *orto*

p: *para*

PA: Para Análise

PDB: Protein Data Bank

PBS: Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato Salino)

ppm: Partes por milhão

R_f: Fator de retenção

RF: Random Forest

RMN ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono treze

ROC: Receiver Operating Characteristics (Característica de Operação de Receptor)

RVF: Rift Valley Fever (Febre do Vale do Rift)

s: Singleto

SDF: Formato de Dados do Sistema (Formato de arquivo)

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification

t: Tripleto

UPLC: Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

UV: Ultravioleta

ZIKV: Zika Vírus

YFV: Febre amarela

δ : Deslocamento químico em ppm

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Classificação filogenética da família Malvaceae <i>Sensu lato</i>	39
Esquema 2. Obtenção do extrato e prováveis classes de metabólitos extraídos	56
Esquema 3. Etapas propostas para um estudo biomonitorado	57
Esquema 4. Etapas da triagem virtual	58
Esquema 5. Obtenção do EEB de <i>Helicteres velutina</i>	63
Esquema 6. Cromatografia líquido-líquido do EEB de <i>Helicteres velutina</i>	64
Esquema 7. Fracionamento cromatográfico da fase Hexânica do EEB de <i>H. velutina</i>	65
Esquema 8. Fracionamento cromatográfico da fase Diclorometano do EEB de <i>H. velutina</i>	68
Esquema 9. Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila do EEB de <i>H. velutina</i>	70

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	Determinação da atividade larvicida	72
Equação 2	Determinação da atividade ovicida	73
Equação 3	Determinação da atividade pupicida	74
Equação 4	Determinação da atividade adulticida	75
Equação 5	Concentração total de células	78
Equação 6	Concentração de células viáveis	78
Equação 7	Porcentagem de células viáveis	78
Equação 8	Número de células necrosadas	78
Equação 9	Determinação do índice de repelência espacial	79
Equação 10	Determinação da inibição de pouso	79
Equação 11	Domínio de aplicabilidade	83
Equação 12	Coeficiente de Correlação de Matthews	199
Equação 13	Probabilidade de potencial ativo	206
Equação 14	Probabilidade de potencial ativo combinado	208

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica da família Malvaceae <i>sensu lato</i> , representada pelas áreas em destaque no mapa	40
Figura 2. Distribuição geográfica da família Sterculiaceae, representada pelas áreas em destaque no mapa	41
Figura 3. Distribuição geográfica do gênero <i>Helicteres</i> , representada pelas áreas em destaque no mapa	43
Figura 4. Distribuição geográfica da espécie <i>Helicteres velutina</i> , representada pelas áreas em destaque nos mapas	44
Figura 5. Detalhes botânicos da espécie <i>Helicteres velutina</i>	45
Figura 6. Localização da tribo indígena Pankararé na Bahia	45
Figura 7. Características morfológicas do <i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i>	46
Figura 8. Mapa global da distribuição do <i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i>	47
Figura 9. Mapa global da distribuição das principais arboviroses transmitidas por mosquitos do gênero <i>Aedes</i> em humanos e animais	47
Figura 10. Mapas de distribuição das principais arboviroses no mundo. A) Dengue; B) Febre amarela; C) Zika e D) Chikungunya	50
Figura 11. Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	51
Figura 12. Formas de controle: A) Mecânico; B) Biológico; C) Químico e D) Alternativas naturais	54
Figura 13. Localização da APA Serra Branca-BA destacado na área em verde do mapa	60
Figura 14. Ensaio larvicida, com fases obtidas do EBB de <i>H. velutina</i>	72
Figura 15. Ensaio das atividades, A) ovicida e B) pupicida	74
Figura 16. Ensaio da atividade adulticida, A) tarsal e B) corporal	76
Figura 17. Determinação da produção de NO	77
Figura 18. Olfatômetro utilizado no teste de repelência	80
Figura 19. Espectro de IV (cm ⁻¹ , KBr) de <i>Hv-1</i>	89

Figura 20. Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de <i>Hv</i> -1	90
Figura 21. Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de <i>Hv</i> -1	90
Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de <i>Hv</i> -1	91
Figura 23. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de <i>Hv</i> -1	91
Figura 24. Espectro de IV (cm^{-1} , KBr) de <i>Hv</i> -2	94
Figura 25. Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de <i>Hv</i> -2	95
Figura 26. Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de <i>Hv</i> -2	95
Figura 27. Espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de <i>Hv</i> -2	96
Figura 28. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de <i>Hv</i> -2	96
Figura 29. Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de <i>Hv</i> -3	101
Figura 30. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 6,80 e 9,90 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de <i>Hv</i> -3	101
Figura 31. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 4,10 e 6,70 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de <i>Hv</i> -3	102
Figura 32. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 2,95 e 4,20 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de <i>Hv</i> -3	102
Figura 33. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 0,60 e 2,80 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de <i>Hv</i> -3	103
Figura 34. Espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de <i>Hv</i> -3	103
Figura 35. Expansão do espectro de RMN ^{13}C na região entre δ_{C} 90,0 e 190,0 ppm (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de <i>Hv</i> -3	104
Figura 36. Expansão do espectro de RMN ^{13}C na região entre δ_{C} 10,0 e 66,0 ppm (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de <i>Hv</i> -3	104
Figura 37. Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de <i>Hv</i> -4	111
Figura 38. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 7,20 e 9,70 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de <i>Hv</i> -4	111
Figura 39. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 3,90 e 6,70 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de <i>Hv</i> -4	112

Figura 40. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 3,10 e 3,75 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de <i>Hv-4</i>	112
Figura 41. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 0,65 e 1,85 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de <i>Hv-4</i>	113
Figura 42. Espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de <i>Hv-4</i>	113
Figura 43. Expansão do espectro de RMN ^{13}C na região entre δ_{C} 172,0 e 193,0 ppm (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de <i>Hv-4</i>	114
Figura 44. Expansão do espectro de RMN ^{13}C na região entre δ_{C} 142,0 e 163,0 ppm (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de <i>Hv-4</i>	114
Figura 45. Expansão do espectro de RMN ^{13}C na região entre δ_{C} 123,0 e 138,0 ppm (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de <i>Hv-4</i>	115
Figura 46. Expansão do espectro de RMN ^{13}C na região entre δ_{C} 76,0 e 120,0 ppm (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de <i>Hv-4</i>	115
Figura 47. Expansão do espectro de RMN ^{13}C na região entre δ_{C} 34,0 e 62,0 ppm (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de <i>Hv-4</i>	116
Figura 48. Expansão do espectro de RMN ^{13}C na região entre δ_{C} 22,0 e 34,0 ppm (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de <i>Hv-4</i>	116
Figura 49. Expansão do espectro de RMN ^{13}C na região entre δ_{C} 10,5 e 21,0 ppm (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de <i>Hv-4</i>	117
Figura 50. Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de <i>Hv-5</i>	121
Figura 51. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 6,0 e 11,4 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de <i>Hv-5</i>	121
Figura 52. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 3,1 e 4,4 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de <i>Hv-5</i>	122
Figura 53. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 0,5 e 2,5 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de <i>Hv-5</i>	122
Figura 54. Espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de <i>Hv-5</i>	123
Figura 55. Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de <i>Hv-6</i>	128

Figura 56. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 2,7 e 5,4 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de <i>Hv-6</i>	128
Figura 57. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 0,7 e 2,2 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de <i>Hv-6</i>	129
Figura 58. Espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de <i>Hv-6</i>	129
Figura 59. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de <i>Hv-6</i>	130
Figura 60. Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de <i>Hv-7</i>	136
Figura 61. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 4,25 e 5,35 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de <i>Hv-7</i>	136
Figura 62. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 0,8 e 2,4 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de <i>Hv-7</i>	137
Figura 63. Espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de <i>Hv-7</i>	137
Figura 64. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de <i>Hv-7</i>	138
Figura 65. Espectro de RMN ^1H (δ , $\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) de <i>Hv-8</i>	144
Figura 66. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 6,5 e 8,2 ppm (δ , $\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) de <i>Hv-8</i>	144
Figura 67. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 2,4 e 4,2 ppm (δ , $\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) de <i>Hv-8</i>	145
Figura 68. Espectro de RMN ^{13}C (δ , $\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) de <i>Hv-8</i>	145
Figura 69. Expansão do espectro de RMN ^{13}C na região entre δ_{C} 110,0 e 185,0 ppm (δ , $\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) de <i>Hv-8</i>	146
Figura 70. Expansão do espectro de RMN ^{13}C na região entre δ_{C} 40,0 e 115,0 ppm (δ , $\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) de <i>Hv-8</i>	146
Figura 71. Espectro HMQC (δ , $\text{DMSO}-d_6$, 400 e 100 MHz) de <i>Hv-8</i>	147
Figura 72. Expansão do espectro HMQC na região entre δ_{H} 2,5 e 8,5 ppm e entre δ_{C} 15,0 e 80 ppm (δ , $\text{DMSO}-d_6$, 400 e 100 MHz) de <i>Hv-8</i>	147
Figura 73. Expansão do espectro HMQC na região entre δ_{H} 2,8 e 5,0 ppm e entre δ_{C} 10,0 e 150 ppm (δ , $\text{DMSO}-d_6$, 400 e 100 MHz) de <i>Hv-8</i>	148

Figura 74. Espectro HMBC (δ , DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) de Hv-8	148
Figura 75. Expansão do espectro HMBC na região entre δ_H 6,5 e 13,0 ppm e entre δ_C 90,0 e 180 ppm (δ , DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) de Hv-8	149
Figura 76. Expansão do espectro HMBC na região entre δ_H 3,65 e 4,15 ppm e entre δ_C 148,0 e 172 ppm (δ , DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) de Hv-8	149
Figura 77. Espectro de IV (cm^{-1} , KBr) de Hv-9	156
Figura 78. Espectro de RMN ^1H (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz) de Hv-9	157
Figura 79. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_H 6,4 e 8,3 ppm (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz) de Hv-9	157
Figura 80. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_H 3,65 e 4,03 ppm (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz) de Hv-9	158
Figura 81. Espectro de RMN ^{13}C (δ , DMSO- d_6 , 125 MHz) de Hv-9	158
Figura 82. Espectro HMBC (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125 MHz) de Hv-9	159
Figura 83. Expansão do espectro HMBC na região entre δ_H 6,6 e 8,4 ppm e entre δ_C 105,0 e 165 ppm (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125 MHz) de Hv-9	159
Figura 84. Expansão do espectro HMBC na região entre δ_H 3,78 e 3,89 ppm e entre δ_C 150,0 e 164 ppm (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125 MHz) de Hv-9	160
Figura 85. Espectro HMQC (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125MHz) de Hv-9	160
Figura 86. Expansão do espectro HMQC na região entre δ_H 6,4 e 8,4 ppm e entre δ_C 95,0 e 130,0 ppm (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125MHz) de Hv-9	161
Figura 87. Expansão do espectro HMQC na região entre δ_H 3,25 e 4,25 ppm e entre δ_C 54,0 e 58,0 ppm (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125MHz) de Hv-9	161
Figura 88. Espectro de COSY (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz) de Hv-9	162
Figura 89. Expansão do espectro de COSY (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz) de Hv-9	162
Figura 90. Espectro de NOESY (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz) de Hv-9	163
Figura 91. Expansão do espectro de NOESY (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz) de Hv-9	163
Figura 92. Espectro de UV à 340 nm em UPLC-DAD (A) e ESI base peak ion (BPI) Cromatograma de Hv-9, mistura analisada por UPLC-QTOF-MS (B).	164

Figura 93. Espectro de RMN ^1H (δ , CD_3COCD_3 , 500 MHz) de <i>Hv</i> -10	169
Figura 94. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 6,76 e 7,02 ppm (δ , CD_3COCD_3 , 500 MHz) de <i>Hv</i> -10	169
Figura 95. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 3,75 e 4,7 ppm (δ , CD_3COCD_3 , 500 MHz) de <i>Hv</i> -10	170
Figura 96. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 1,7 e 3,4 ppm (δ , CD_3COCD_3 , 500 MHz) de <i>Hv</i> -10	170
Figura 97. Espectro de RMN ^{13}C (δ , CD_3COCD_3 , 125 MHz) de <i>Hv</i> -10	171
Figura 98. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (δ , CD_3COCD_3 , 125 MHz) de <i>Hv</i> -10	171
Figura 99. Espectro HMBC (δ , $\text{DMSO}-d_6$, 500 e 125MHz) de <i>Hv</i> -10	172
Figura 100. Expansão do espectro HMBC na região entre δ_{H} 6,6 e 7,15 ppm e entre δ_{C} 80,0 e 150,0 ppm (δ , $\text{DMSO}-d_6$, 500 e 125MHz) de <i>Hv</i> -10	172
Figura 101. Expansão do espectro HMBC na região entre δ_{H} 3,6 e 4,8 ppm e entre δ_{C} 50,0 e 150,0 ppm (δ , $\text{DMSO}-d_6$, 500 e 125MHz) de <i>Hv</i> -10	173
Figura 102. Espectro HMQC (δ , $\text{DMSO}-d_6$, 500 e 125MHz) de <i>Hv</i> -10	173
Figura 103. Expansão do espectro HMQC na região entre δ_{H} 6,65 e 7,15 ppm e entre δ_{C} 108,0 e 121,0 ppm (δ , $\text{DMSO}-d_6$, 500 e 125MHz) de <i>Hv</i> -10	174
Figura 104. Expansão do espectro HMQC na região entre δ_{H} 2,8 e 5,0 ppm e entre δ_{C} 45,0 e 90,0 ppm (δ , $\text{DMSO}-d_6$, 500 e 125MHz) de <i>Hv</i> -10	174
Figura 105. Atividade larvicida das fases de <i>H. velutina</i> contra <i>Ae. aegypti</i> após 24 horas. CP = Controle Positivo, CN = Controle Negativo.	176
Figura 106. Atividade ovicida das fases de <i>H. velutina</i> contra <i>Ae. aegypti</i> após 25 dias. CP = Controle Positivo, CN = Controle Negativo.	178
Figura 107. Atividade pupicida das fases de <i>H. velutina</i> contra <i>Ae. aegypti</i> após 72 horas. CP = Controle Positivo, CN = Controle Negativo.	179
Figura 108. Atividade adulticida – contato tarsal das fases de <i>H. velutina</i> contra <i>Ae. aegypti</i> após 48 horas. CP = Controle Positivo, CN = Controle Negativo.	181
Figura 109. Atividade adulticida – contato corporal das fases de <i>H. velutina</i> contra <i>Ae. aegypti</i> após 48 horas. CP = Controle Positivo, CN = Controle Negativo.	181

Figura 110. Atividade larvica das substâncias isoladas de <i>H. velutina</i> , tilirosídio após 72 h e 7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato flavona após 24 h. CP = Controle Positivo, CN = Controle Negativo.	183
Figura 111. Estruturas químicas. A) 7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato flavona; B) 7,4'-Di-O-metilisoescutelarein	183
Figura 112. Porcentagem da sobrevivência das larvas de <i>Ae. aegypti</i> expostas as fases e substâncias isoladas de <i>H. velutina</i> com suas respectivas concentrações letais	185
Figura 113. Aspectos macroscópicos das larvas de <i>Ae. aegypti</i> após 24 horas de exposição as fases hexânica e diclorometânica e as substâncias 7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato flavona e Tilirosídeo observados a olho nu	186
Figura 114. Aspectos macroscópicos das larvas de <i>Ae. aegypti</i> após 24 horas de exposição as fases hexânica, diclorometânica e as substâncias 7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato flavona e Tilirosídeo observados em microscópio	186
Figura 115. Produção de NO em larvas (L4) expostas a CL ₅₀ .	187
Figura 116. Quadrantes da câmara de Neubauer para contagem de hemócitos. A) Controle negativo; B) Fase Diclorometano; C) Fase Hexânica; D) 7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato flavona e E) Tilirosídeo	189
Figura 117. Porcentagem de necrose celular observada para as fases e substâncias isoladas de <i>H. velutina</i> . CN: Controle Negativo; FH: Fase Hexânica; FD: Fase Diclorometânica; FS: Flavonoide Sulfatado (7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato flavona); FG: Flavonoide Glicosilado (Tilirosídeo).	190
Figura 118. Hemócitos presentes nas análises. A) Plasmátocitos (59,4 µm); B) Oenocitoides (13 µm); C) Prohemócitos (1,6 µm)	191
Figura 119. Hemócitos predominantes em cada substância teste. CN: Controle Negativo; FH: Fase Hexânica; FD: Fase Diclorometânica; FS: Flavonoide Sulfatado (7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato flavona); FG: Flavonoide Glicosilado (Tilirosídeo).	192
Figura 120. Índice de repelência espacial da CL ₅₀ do extrato, fases e substâncias isoladas de <i>H. velutina</i> sobre fêmeas de <i>Ae. aegypti</i>	195
Figura 121. Índice de repelência espacial da CL ₁₀₀ do extrato, fases e substâncias isoladas de <i>H. velutina</i> sobre fêmeas de <i>Ae. aegypti</i>	195

Figura 122. Porcentagem de inibição de pouso proporcionada pela CL ₅₀ do extrato, fases e substâncias isoladas de <i>H. velutina</i> sobre fêmeas de <i>Ae. aegypti</i>	197
Figura 123. Porcentagem de inibição de pouso proporcionada pela CL ₁₀₀ do extrato, fases e substâncias isoladas de <i>H. velutina</i> sobre fêmeas de <i>Ae. aegypti</i>	197
Figura 124. Gráfico ROC com área sob a curva para o conjunto teste do modelo obtido com Random Forest	200
Figura 125. Comparações entre as interações dos ligantes e o redocking das três enzimas. A) Interações entre o ligante e o sítio ativo da proteína; B) Interações entre o ligante no redocking e o sítio ativo da proteína e C) Superposição da conformação do ligante (cinza) com o redocking (vermelho)	204
Figura 126. β -sitosterol glicosilado e suas respectivas interações nos sítios ativos de suas enzimas	210
Figura 127. 7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato flavona e suas respectivas interações nos sítios ativos de suas enzimas	211
Figura 128. Tilirosídeo e suas respectivas interações nos sítios ativos de suas enzimas	212
Figura 129. A) Mariahine e B) Condadine e suas respectivas interações nos sítios ativos de suas enzimas	213
Figura 130. Interações dos compostos com os sítios ativos da proteína. Os resíduos de aminoácidos em comum para as duas substâncias estão marcados com um asterisco vermelho e representam as interações de hidrogênio	215

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Eluentes utilizados e frações obtidas no primeiro fracionamento cromatográfico da fase hexânica de <i>Helicteres velutina</i>	66
Quadro 2. Eluentes utilizados e frações obtidas no fracionamento cromatográfico da subfração 36/40 da fase hexânica de <i>Helicteres velutina</i>	66
Quadro 3. Eluentes utilizados e frações obtidas no fracionamento cromatográfico da subfração 43/46 da fase hexânica de <i>Helicteres velutina</i>	67
Quadro 4. Eluentes utilizados e frações obtidas no primeiro fracionamento cromatográfico da fase diclorometano de <i>Helicteres velutina</i>	68
Quadro 5. Eluentes utilizados e frações obtidas no fracionamento cromatográfico da fração 24/30 da fase diclorometano de <i>Helicteres velutina</i>	69
Quadro 6. Eluentes utilizados e frações obtidas no fracionamento cromatográfico da fração 43/59 da fase diclorometano de <i>Helicteres velutina</i>	69
Quadro 7. Substâncias isoladas das partes aéreas de <i>Helicteres velutina</i> K. Schum	86
Quadro 8. Estruturas químicas das moléculas testadas, na ordem de potencial atividade contra <i>Ae. aegypti</i> , segundo modelo Random Forest	201

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Método de gradiente usado no LC-HRMS	63
Tabela 2. Substâncias com atividade conhecida para <i>Aedes aegypti</i>	81
Tabela 3. Proteínas alvo para <i>Aedes aegypti</i>	84
Tabela 4. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de <i>Hv-1</i> (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz) com modelo da literatura Mo-1 (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz) (BRITO-FILHO et al. 2017)	88
Tabela 5. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de <i>Hv-2</i> (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz) com modelo da literatura Mo-1 (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz) (BRITO-FILHO et al. 2017)	85
Tabela 6. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de <i>Hv-3</i> (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz) com os modelos Mo-1 (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz) (BRITO-FILHO et al., 2017) e Mo-2 (δ , CDCl_3 , 500 e 125 MHz) (CHAVES et al., 2017)	99
Tabela 7. Dados comparativos de RMN ^{13}C da cadeia fitil éster de <i>Hv-3</i> (δ , CDCl_3 , 100 MHz) com o modelo Mo-1 (CHAVES et al., 2017)	100
Tabela 8. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de <i>Hv-4</i> (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz) com os modelos Mo-1 (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz) e Mo-2 (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz) (LIRA, 2012)	108
Tabela 9. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de <i>Hv-4</i> (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz) com os modelos Mo-1 (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz) (LIRA, 2012) e Mo-2 (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz) (LIRA, 2012)	110
Tabela 10. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de <i>Hv-5</i> (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz) com os modelos <i>Hv-5</i> (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz) e Mo-1 (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz) (CHAVES et al., 2013)	120

Tabela 11. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de <i>Hv</i> -6 (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz) com modelo da literatura Mo-1 (δ , CDCl_3 , 500 e 125 MHz) (COSTA., 2013), Mo-2 (δ , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 e 125 MHz) (FERNANDES et al. 2018)	126
Tabela 12. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de <i>Hv</i> -7 (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz) com modelo da literatura Mo-1 (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz) (FERREIRA., 2014), Mo-2 (δ , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 e 125 MHz) (FERNANDES et al., 2018)	133
Tabela 13. Dados comparativos de RMN ^{13}C da cadeia fitil éster de <i>Hv</i> -7 (δ , CDCl_3 , 100 MHz) com o modelo Mo-1 (CHAVES et al., 2017)	135
Tabela 14. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de <i>Hv</i> -8 (δ , $\text{DMSO}-d_6$, 400 e 100 MHz) com modelo da literatura Mo-1 (δ , $\text{DMSO}-d_6$, 400 e 100 MHz) (TELES et al., 2015), Mo-2 (δ , $\text{DMSO}-d_6$, 500 e 125 MHz) (GOMES et al., 2011) e Mo-3 (δ , CD_3OD , 500 e 125 MHz) (BARRETO et al., 2013)	141
Tabela 15. Compilação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C , HMQC e HMBC de <i>Hv</i> -8 (δ , $\text{DMSO}-d_6$, 400 e 100 MHz)	143
Tabela 16. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de <i>Hv</i> -9 (δ , $\text{DMSO}-d_6$, 500 e 125 MHz) com modelo da literatura Mo-1 (δ , $\text{DMSO}-d_6$, 400 e 100 MHz) (TELES et al., 2015b)	153
Tabela 17. Compilação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C , HMBC de <i>Hv</i> -9 (δ , $\text{DMSO}-d_6$, 500 e 125 MHz)	155
Tabela 18. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de <i>Hv</i> -10 (δ , CD_3COCD_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente) com modelo da literatura Mo-1 (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz) (YI et al., 2010) e Mo-2 (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz) (MARQUES, 2014) e Mo-3 (δ , CDCl_3 , 500 e 125 MHz) (MESSIANO, 2010)	159
Tabela 19. Atividade das substâncias isoladas de <i>H. velutina</i> com atividade promissora <i>in silico</i> contra <i>Ae. aegypti</i> após 24, 48 e 72 horas de exposição	184
Tabela 20. Células contabilizadas na câmara de Neubauer, utilizando microscópio de fluorescência	190

Tabela 21. Índice de repelência espacial da CL ₅₀ do extrato, fases e substâncias isoladas de <i>H. velutina</i> sobre fêmeas de <i>Ae. aegypti</i>	195
Tabela 22. Índice de repelência espacial da CL ₁₀₀ do extrato, fases e substâncias isoladas de <i>H. velutina</i> sobre fêmeas de <i>Ae. aegypti</i>	196
Tabela 23. Porcentagem de inibição de pouso proporcionada pela CL ₅₀ do extrato, fases e substâncias isoladas de <i>H. velutina</i> sobre fêmeas de <i>Ae. aegypti</i>	197
Tabela 24. Porcentagem de inibição de pouso proporcionada pela CL ₁₀₀ do extrato, fases e substâncias isoladas de <i>H. velutina</i> sobre fêmeas de <i>Ae. aegypti</i>	198
Tabela 25. Resumo dos parâmetros correspondentes aos resultados obtidos no modelo Random Forest para <i>Ae. aegypti</i> . PPV (Valor Positivo Predito/Precisão) e NPV (Valor Negativo Predito)	199
Tabela 26. Moléculas potencialmente ativas a partir do modelo de Random Forest	203
Tabela 27. A energia do docking (Kj/mol) do ligante com cada proteína do Protein Data Bank (PDB), energia do ligante do Moldock score e os valores de RMSD obtidos a partir do redocking	206
Tabela 28. Probabilidade de potencial ativo das substâncias isoladas de <i>Helicteres velutina</i> pontuados pelo Moldock	207
Tabela 29. Resumo das estruturas mais bem classificadas, obtidas utilizando uma abordagem que combina triagem virtual baseada em ligantes e estrutura (VS); p: valor de probabilidade ativa no VS; ps: valor de probabilidade ativo no VS baseado na estrutura; pc: valor da probabilidade combinada	209

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	31
2. OBJETIVOS.....	34
2.1. Objetivo geral.....	35
2.2. Objetivos específicos.....	35
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	36
3.1. Pesquisa em produtos naturais.....	37
3.2. Considerações sobre a família Malvaceae <i>sensu lato</i> A. Juss.....	38
3.3. Considerações sobre a família Sterculiaceae.....	41
3.4. Considerações sobre o gênero <i>Helicteres</i>	42
3.5. Considerações sobre a espécie <i>Helicteres velutina</i> K. Schum.....	44
3.6. Aspectos gerais dos vetores do gênero <i>Aedes</i>	46
3.6.1 Principais arboviroses.....	47
3.6.2 Características morfológicas do ciclo de vida dos vetores	51
3.6.3 Formas de combate: controle mecânico, biológico, químico e alternativas naturais.....	52
3.7. Estudo fitoquímico biomonitorado.....	55
3.8. Triagem virtual na química medicinal.....	57
4. METODOLOGIA.....	59
4.1. Levantamento bibliográfico.....	60
4.2. Coleta e identificação do material botânico.....	60
4.3. Estudo fitoquímico.....	61
4.3.1. Isolamento e purificação dos constituintes químicos de <i>Helicteres velutina</i>	61
4.3.2. Caracterização estrutural das substâncias isoladas.....	61
4.3.3. Processamento da planta.....	63
4.3.4. Obtenção do extrato etanólico bruto das partes aéreas de <i>Helicteres velutina</i>	63
4.3.5. Fracionamento do extrato etanólico bruto das partes aéreas de <i>Helicteres velutina</i>	63
4.4. Processamento cromatográfico da fase hexânica do EEB das partes aéreas de <i>H. velutina</i>	64

4.5. Processamento cromatográfico da fase diclorometano do EEB das partes aéreas de <i>H. velutina</i>.....	67
4.6. Processamento cromatográfico da fase acetato do EEB das partes aéreas de <i>H. velutina</i>.....	70
4.7. Bioensaios.....	70
4.7.1. Obtenção e manutenção do ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	70
4.7.2. Ensaio da atividade larvicida.....	71
4.7.3. Ensaio de eclodibilidade dos ovos.....	73
4.7.4. Ensaio da atividade pupicida.....	73
4.7.5. Ensaio da atividade adulticida.....	74
4.7.6. Determinação da produção de Óxido Nítrico (NO).....	76
4.7.7. Ensaio de citotoxicidade.....	77
4.7.8. Avaliação da atividade repelente.....	78
4.7.9. Análise estatística.....	80
4.8. Química Computacional.....	80
4.8.1. Banco de dados.....	80
4.8.2. Descritores Dragon.....	82
4.8.3. Modelo de Predição.....	82
4.8.4. Docking molecular.....	83
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
5.1. Substâncias isoladas das partes aéreas de <i>Helicteres velutina</i> K. Schum....	86
5.2. Caracterização estrutural das substâncias isoladas de <i>H. velutina</i> K. Schum.....	87
5.2.1. Caracterização estrutural de <i>Hv-1</i>	87
5.2.2. Caracterização estrutural de <i>Hv-2</i>	92
5.2.3. Caracterização estrutural de <i>Hv-3</i>	97
5.2.4. Caracterização estrutural de <i>Hv-4</i>	105
5.2.5. Caracterização estrutural de <i>Hv-5</i>	118
5.2.6. Caracterização estrutural de <i>Hv-6</i>	124
5.2.7. Caracterização estrutural de <i>Hv-7</i>	131
5.2.8. Caracterização estrutural de <i>Hv-8</i>	139

5.2.9. Caracterização estrutural de <i>Hv</i> -9.....	150
5.2.10. Caracterização estrutural de <i>Hv</i> -10.....	165
5.3. Avaliação da atividade das fases de <i>Helicteres velutina</i> frente a larvas L4 de <i>Aedes aegypti</i>.....	175
5.3.1. Avaliação da atividade ovicida das fases de <i>Helicteres velutina</i> frente ao <i>Aedes aegypti</i>	177
5.3.2. Avaliação da atividade pupicida das fases de <i>Helicteres velutina</i> frente ao <i>Aedes aegypti</i>	178
5.3.3. Avaliação da atividade adulticida das fases de <i>Helicteres velutina</i> frente ao <i>Aedes aegypti</i>	179
5.3.4. Avaliação da atividade das substâncias isoladas de <i>Helicteres velutina</i> frente a larvas L4 de <i>Aedes aegypti</i>	182
5.3.5. Tempo de sobrevivência das larvas (L4) expostas às fases e substâncias promissoras.....	184
5.3.6. Produção de NO em larvas (L4) expostas as fases e substâncias isoladas de <i>Helicteres velutina</i> em diferentes períodos.....	186
5.3.7. Atividade citotóxica das fases e substâncias isoladas de <i>Helicteres velutina</i> após 24h de exposição.....	188
5.3.8. Atividade repelente do extrato, fases e substâncias isoladas de <i>H. velutina</i>	193
5.4. Análise do modelo de <i>Aedes aegypti</i>.....	198
5.4.1 Análise do Docking.....	204
6. CONCLUSÃO.....	216
REFERÊNCIAS.....	218
ANEXOS.....	242
ANEXO A. Artigo de revisão publicado (FERNANDES et al. 2020a).....	243
ANEXO B. Artigo original publicado (FERNANDES et al. 2018).....	244
ANEXO C. Artigo original publicado (FERNANDES et al. 2019).....	245
ANEXO D. Artigo original publicado (FERNANDES et al. 2020b).....	246
ANEXO E. Artigo original publicado (FERNANDES et al. 2021).....	247
ANEXO F. Parecer de aprovação pelo Comitê de Ética Animal (CEUA-UFPB).....	248



1. Introdução



A pesquisa voltada para o conhecimento de drogas, também denominada Farmacognosia, remota a Hipócrates, quando era prática comum usar produtos providos da natureza, principalmente plantas, para alívio de diversos males (CARNEIRO et al., 2014; BADAL; SMITH; RAJNARAYANAN, 2017; CASANOVA; COSTA, 2017). Por milhares de anos, o homem aprofundou seu conhecimento empírico para promover a cura de doenças (MARTINS et al., 2015).

Desde o início da pesquisa farmacêutica os produtos naturais desempenham um papel fundamental na descoberta de medicamentos, tendo por base o uso tradicional de plantas medicinais e subsequente isolamento de seus constituintes bioativos, compostos diversos, capazes de abrir caminho para novas investigações biológicas e desenvolvimento de novos bioprodutos (DAVID, WOLFENDER, DIAS, 2014; WOLFENDER et al., 2015).

A notável diversidade de produtos obtidos oferece um campo praticamente ilimitado para descobertas em química e farmacologia, até o momento foi explorado apenas uma pequena fração desse espaço, estima-se que mais de 95% da biodiversidade do mundo ainda não foi estudada, o que desperta o interesse contínuo em trabalhos com foco nestas áreas (DAVID, WOLFENDER, DIAS, 2014; VALLI et al., 2013; MARTIN, 2017).

Cerca de 68,8% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, a maioria destes sendo obtidos a partir de espécies vegetais (OLIVEIRA; GILBERT; VILLAS BÔAS, 2013; MOLINSKI, 2014; NEWMAN & CRAGG, 2019). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), de 65 a 80% da população de Países em desenvolvimento depende principalmente de plantas para alívio de suas doenças, e menos de 10% das atividades relatadas, são comprovadas cientificamente. Dados como estes fizeram com que a investigação farmacológica de plantas medicinais fosse considerada uma prioridade (ASSIS et al., 2015; MARTINS et al., 2015).

O Brasil possui uma rica biodiversidade distribuída em vários biomas importantes, como Amazônia, Caatinga e Mata Atlântica, contabilizando aproximadamente 20% de todas as espécies vivas conhecidas mundialmente, sendo, portanto, um dos países com maior potencial para fornecer novos produtos terapêuticos (VALLI et al., 2013; MARTINS et al., 2015). Dentre as diversas culturas brasileiras, os índios detêm o maior conhecimento de produtos oriundos da natureza, utilizam plantas

para fins estéticos, religiosos, alucinógenos e medicinais na cura e prevenção de diversas enfermidades (ALMEIDA; MARTINEZ; PINTO, 2017).

A espécie *Helicteres velutina* K. Schum (Sterculiaceae) conhecida popularmente como ‘pitó’ é utilizada tradicionalmente pela tribo indígena Pankararé na Bahia, como repelente de insetos (SANTOS et al. 2012). O que despertou interesse em estudar o potencial inseticida e repelente dessa espécie (FERNANDES et al. 2018; FERNANDES et al. 2019; FERNANDES et al., 2020a).

A elevada incidência de doenças virais, transmitidas pelas fêmeas do mosquito *Aedes aegypti* L., vetor primário de arboviroses, como dengue, zika e chikungunya, tem representado um grande problema de saúde pública no mundo. Vacinas eficientes contra esses vírus ainda não foram desenvolvidas, sendo a principal forma de combate, o controle vetorial. Os produtos naturais são tratados como prioridades nestas pesquisas, tendo em vista a sua biodegradabilidade, eficiência e baixo custo (AGUIAR et al., 2017; MENDES et al., 2017).

Diante desta problemática e buscando novas possibilidades para o combate ao *Ae. aegypti*, tem se avaliado o potencial inseticida e larvicida de extratos e óleos essenciais de plantas, nesta perspectiva, diversos estudos mostram que sua utilização tem efeito na mortalidade dos insetos (MATIAS, 2015; CHAGAS, 2016; LOPES et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016).

A triagem virtual que aplica técnicas *in silico*, representa um dos maiores avanços na atual era de planejamento de fármacos. Através dela inúmeras estratégias distintas são capazes de direcionar a seleção de moléculas com as características químicas desejadas para modular a atividade biológica dos mais diversos e atrativos alvos moleculares conhecidos (RODRIGUES et al., 2012). Tendo um papel essencial na seleção e desenvolvimento racional de compostos candidatos a fármacos antes de partir para análises clínicas (DOMINGUES, 2013).

Tendo em vista a necessidade de se buscar novos constituintes biologicamente ativos a partir de espécies vegetais e de se comprovar cientificamente o uso tradicional das mesmas pela população, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas no Brasil e no mundo. Baseando-se neste contexto explorou-se de forma biomonitorada neste estudo os potenciais fitoquímico e biológico da espécie *Helicteres velutina* K. Schum, família Sterculiaceae (Malvaceae *sensu lato*) frente ao *Ae. aegypti*, vislumbrando, desse modo, contribuir para o conhecimento quimiotaxonômico da referida família.

2. *Objetivos*



2.1 Objetivo geral

Realizar estudo fitoquímico da espécie *Helicteres velutina* K. Schum biomonitorado frente ao *Aedes aegypti*, explorando o potencial inseticida e repelente na espécie, visando fornecer novas alternativas de combate ao vetor.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Extrair e isolar metabólitos secundários de *H. velutina* utilizando diferentes métodos cromatográficos: Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia em Coluna (CC) Cromatografia líquida de Média Pressão (CLMP) e Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC);
- ✓ Definir as estruturas químicas dos constituintes isolados através do uso dos métodos espectroscópicos IV, UV, RMN ^1H e ^{13}C , uni e bidimensionais e/ou espectrometria de massas,
- ✓ Utilizar extrato, fases e substâncias isoladas para a realização de estudo biomonitorado frente ao *Aedes aegypti*;
- ✓ Determinar a atividade ovicida, larvicida, pupicida e adulticida das fases;
- ✓ Realizar estudo computacional *in silico*, para nortear a escolha de substâncias promissoras frente ao *Ae. aegypti*, com posterior análise *in vitro* dos compostos potencialmente ativos;
- ✓ Construir um modelo de predição de atividade larvicida contra *Ae. aegypti*, e realizar a triagem do banco criado de moléculas isoladas de *H. velutina*;
- ✓ Realizar estudo de modelagem molecular utilizando proteínas alvo de *Ae. aegypti* e como ligantes as moléculas do banco de dados;
- ✓ Investigar a ocorrência de necrose em hemócitos extraídos de larvas (L4) de *Ae. aegypti* expostas as fases e substâncias isoladas de *H. velutina*;
- ✓ Investigar a produção de NO em hemolinfa de larvas (L4) de *Ae. aegypti* expostas as fases e substâncias isoladas de *H. velutina*;
- ✓ Avaliar a atividade repelente do extrato, fases e substâncias isoladas de *H. velutina*;
- ✓ Divulgar os resultados da pesquisa em eventos científicos e periódicos especializados com Qualis no mínimo A4.

3. Referencial teórico



3.1 Pesquisa em produtos naturais

Os produtos naturais são resultados de milhões de anos de evolução de organismos terrestres e marinhos que se adaptaram a estresses abióticos e bióticos, se caracterizando, portanto, como compostos bioativos nas espécies que os produzem e atuam principalmente como mecanismos de defesa para garantir a sua perpetuação na natureza. Esses compostos biossintetizados desencadeiam respostas biológicas quando ingeridos por outros organismos vivos (DAVID, WOLFENDER, DIAS, 2014).

A utilização de produtos pelo homem com intuito de suprir suas necessidades físicas e biológicas é uma prática milenar e leva a um conhecimento adquirido sobre os recursos biológicos disponíveis, transmitido ao longo das gerações. Dentre estes recursos, pode-se destacar as plantas medicinais que são utilizadas com finalidades curativas (OLIVEIRA, BARROS, MOITA NETO, 2010; CARNEIRO et al., 2014).

No Brasil, o uso de plantas com fins medicinais e em rituais religiosos é resultado de uma miscigenação entre os indígenas locais, as tradições africanas oriundas do tráfico escravo e a cultura europeia trazida pelos colonizadores (SILVA et al., 2016a). Além da contribuição cultural, algumas espécies vegetais foram trazidas com os africanos, assim como certas plantas nativas do Brasil foram incorporadas na sua cultura, ampliando o elenco de espécies que colaboraram para a formação do conhecimento empírico fitoterápico (FERREIRA, 2017).

A comunidade indígena é detentora de um dos mais valiosos conhecimentos do uso tradicional de espécies vegetais, desempenhando um papel fundamental para preservação da biodiversidade. As relações históricas desses indivíduos com as plantas, utilizando-as como fonte de alimento, remédios e em rituais religiosos, se tornam fontes de substâncias que podem ser potencialmente interessantes e de grande valor para indústria farmacêutica e biomédica (SANTOS et al., 2012).

O desafio, portanto, é proteger esse conhecimento, atrelando-o ao campo científico para que não permaneça restrito a um pequeno grupo, uma vez que ambas as formas de conhecimento, ainda que distintas, devem ser consideradas como complementares (ELOY et al., 2014).

O estudo das plantas tem permitido a descoberta de atividades biológicas de extratos, frações e moléculas que atuam como novos princípios ativos, oferecendo melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico, a partir da observação, descrição e investigação experimental (SILVA et al., 2016b). Estas pesquisas

englobam conhecimentos de botânica, química, bioquímica e farmacologia, que contribuem amplamente para a descoberta de produtos naturais bioativos (OLIVEIRA, 2016).

Na vertente da pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos, a procura por compostos ativos presentes em plantas medicinais têm se intensificado nos últimos anos, visto que vários componentes isolados de plantas podem apresentar propriedades bioativas, como os compostos fenólicos, flavonoides, taninos, alcaloides (SOUSA et al., 2017). Nos últimos dois séculos, a indústria farmacêutica tem usado compostos químicos de ocorrência natural tanto como princípios ativos quanto como base para o desenvolvimento de novas moléculas (PIMENTEL, 2015).

As plantas medicinais ainda constituem fontes importantes na obtenção de identidades moleculares novas, embora exista o grande desenvolvimento dos métodos utilizados para sintetizar produtos farmacêuticos, uma vez que as plantas são capazes de produzir constituinte de difícil síntese química o que as torna meios e fins tecnológicos com perspectivas de utilização a longo prazo (SOUSA et al., 2017).

A etapa inicial do processo de desenvolvimento de um fitomedicamento ocorre com a seleção da planta que pode ser feita com auxílio de pesquisa na literatura científica, quanto a etnobotânica ou etnofarmacologia, da toxicidade observada, além de estudos farmacológicos prévios, quando não se tem um conhecimento prévio dos constituintes da espécie estudada, pode-se ainda utilizar informações quimiotaxonômicas ou filogenéticas da família ou gênero na qual a mesma se insere (HEINZMANN E BARROS, 2007).

Neste contexto, a família *Malvaceae sensu lato* vêm despertando grande interesse no meio científico se destacando na produção industrial, econômica, medicinal, alimentícia e ornamental. Os indivíduos pertencentes a essa família também se destacam por suas propriedades químicas e biológicas (PORDEUS, 2016; GOMES et al. 2015; TELES et al. 2015; CHAVES et al., 2017; LIMA & CONCEIÇÃO, 2013; ALVES et al., 2011).

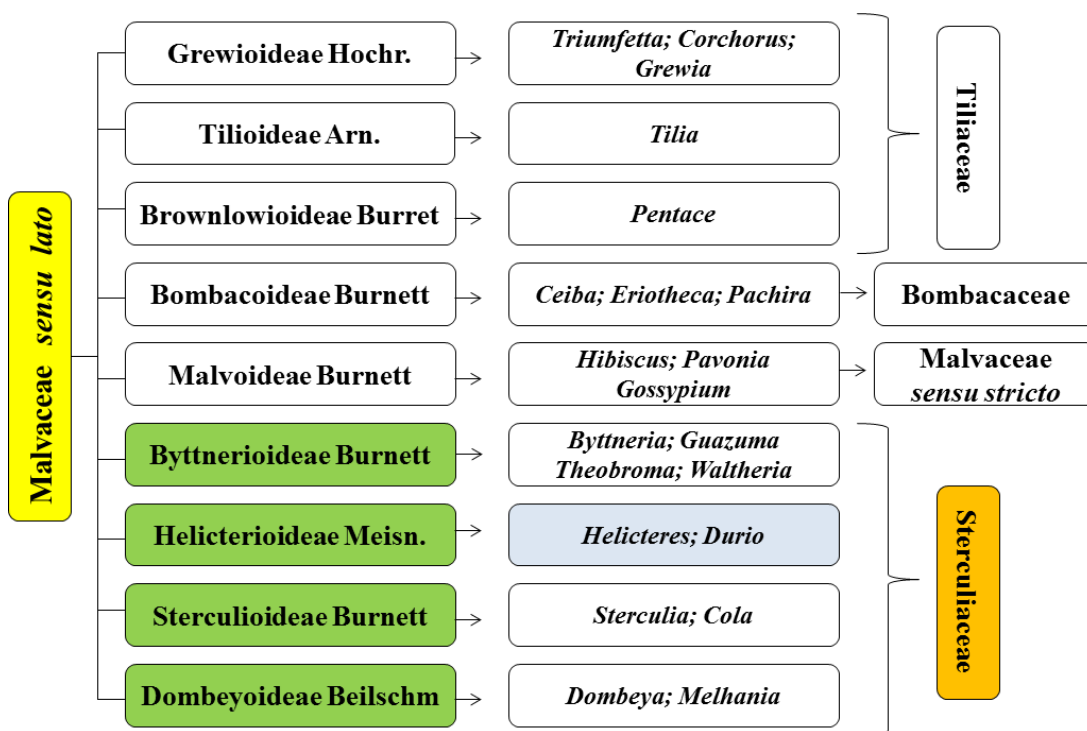
3.2 Considerações sobre a família *Malvaceae sensu lato* A. Juss.

Nos sistemas de classificação tradicionais, *Malvaceae* foi considerada uma família distinta de *Bombacaceae*, *Sterculiaceae* e *Tiliaceae*, todas estas inseridas na Ordem *Malvales* (GRIGS & BOLDRINI, 2013). Porém, a separação destas famílias sempre foi considerada problemática. Recentes trabalhos de filogenia, com base em dados

moleculares, associados com dados anatômicos, biogeográficos, químicos e morfológicos, comprovaram que a delimitação filogenética destas famílias é insustentável (SILVA, 2014). A partir destes trabalhos, nasceu a nova circunscrição da família Malvaceae "Malvaceae *sensu lato*" com a incorporação das três famílias de delimitação problemática (PORDEUS, 2016).

De acordo com o Sistema APG I (Angiosperm Phylogeny Group) (1998), aprimorado e revisado posteriormente pelos Sistemas APG II (2003), APG III (2009) e APG IV (2016), Malvaceae no seu conceito mais amplo pode ser dividida em nove subfamílias: Grewioideae, Tilioideae, Brownlowioideae, Bombacoideae, Malvoideae, Byttnerioideae, Helicterioideae, Sterculioideae e Dombeyoideae, conforme mostrado no esquema 1 (pág. 39) (SABA, 2007; ALVES et al, 2011; FERNANDES, 2017).

Esquema 1: Classificação filogenética da família Malvaceae *sensu lato*

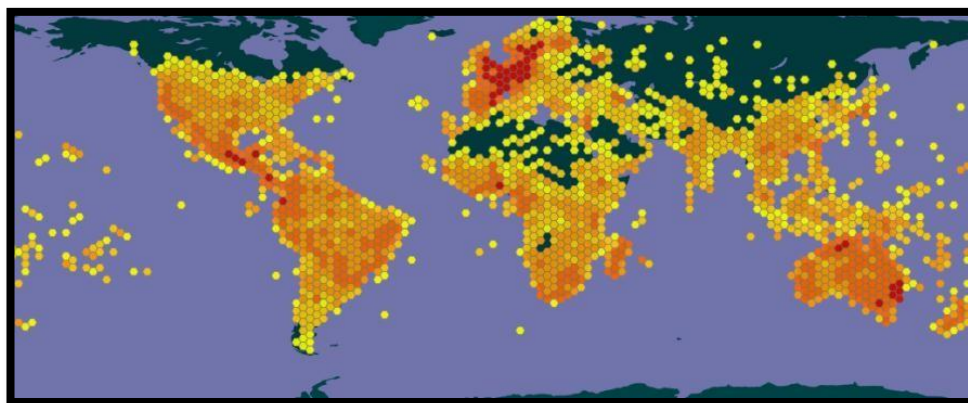


Fonte: Adaptado de APG IV, 2016.

A família Malvaceae, como atualmente circunscrita, está distribuída nas regiões tropicais e temperadas do globo, sendo predominantemente pantropical, tendo a América do Sul como o centro de riqueza específica (Figura 1, pág. 40) (GRIGS & BOLDRINI, 2013). Representada por aproximadamente 250 gêneros e 4200 espécies distribuídas em todo o mundo. No Brasil cerca de 80 gêneros e 754 espécies, distribuídas em todos os

domínios fitogeográficos, sendo 393 espécies endêmicas incluídas em nove gêneros, fato este que ressalta a importância de Malvaceae na flora brasileira (SABA, 2007; ALVES et al., 2011; GRIGS & BOLDRINI, 2013; SILVA, 2014).

Figura 1: Distribuição geográfica da Família Malvaceae *sensu lato*, representada pelas áreas em destaque no mapa.



Fonte: <https://www.gbif.org/species/6685>

A importância da família Malvaceae se estende para os setores da economia onde seus representantes são citados pela ampla utilização na industrial têxtil, com destaque para espécies dos gêneros *Gossypium*, *Malvastrum* e *Sida* que são excelentes fornecedoras de fibras e também algumas espécies de *Ceiba*, *Guazuma* e de *Sterculia* que fornecem madeira para carpintaria, forros, confecção de brinquedos e caixotaria (SABA, 2007; PORDEUS, 2016).

Na alimentação destaca-se a espécie *Abelmoschus esculentus*, “quiabo”, com seus frutos comestíveis (LIMA & CONCEIÇÃO, 2013). Na terapêutica, várias espécies de *Wissadula*, *Guazuma*, *Helicteres* L., *Sida* e *Waltheria* L. são amplamente utilizadas na medicina popular, como antitérmicos, antiespasmódicos, antissifilíticos, antiinflamatórios, antimicrobiana e ação hipotensora (SABA, 2007; TELES, 2015; CHAVES et al., 2013; CHAVES et al., 2017). Representantes de *Tilia*, *Hibiscus* e *Grewia*, destacam-se como ornamentais, sendo muito utilizadas na arborização de ruas, parques e jardins (SABA, 2007; ALVES et al., 2011).

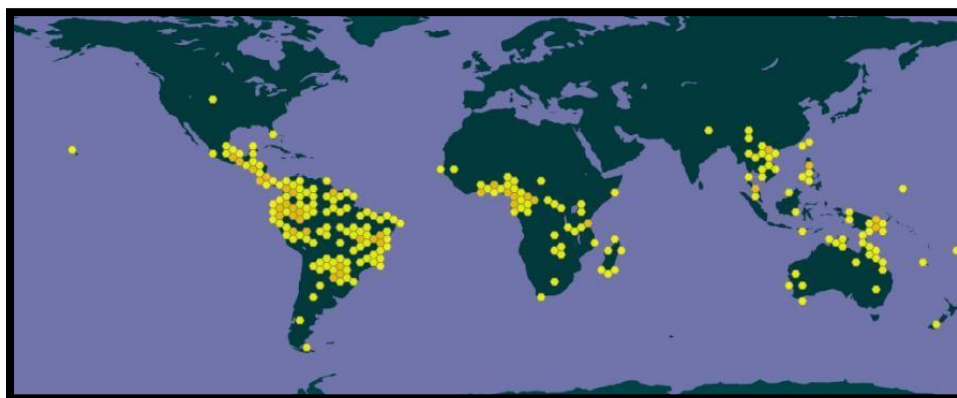
O grande interesse no meio científico pelas espécies de Malvaceae se deve a utilização dessas pela medicina popular (ALBUQUERQUE & HANAZAKI, 2006).

3.3 Considerações sobre a família Sterculiaceae

O nome Sterculiaceae é baseado no gênero *Sterculia*, e refere-se às flores com mau cheiro de algumas espécies (DESHPANDE & BHALSING, 2015).

A família Sterculiaceae compreendendo cerca de 70 gêneros e 1500 espécies com distribuição Pantropical e com alguns representantes em regiões temperadas, são encontradas predominantemente na região Paleotropical, na África, parte da Ásia e Oceania, especialmente na Austrália (Figura 2, pág. 41). Na região neotropical ocorre desde o sul dos Estados Unidos até a América do Sul e se distribui por todo o território brasileiro, estando representada por aproximadamente 14 gêneros e 165 espécies, amplamente distribuídas por todo o país, em maior diversidade nas regiões Nordeste e Sudeste (CRUZ & ESTEVES, 2009; MIA et al., 2011; MUQARRABUN & AHMAT, 2015).

Figura 2: Distribuição geográfica da família Sterculiaceae, representada pelas áreas em destaque no mapa.



Fonte: <https://www.gbif.org/species/2434>

Os membros de Sterculiaceae são fontes medicamentos, fibras, lenha e madeira, e são utilizados para fabricação de móveis, como plantas decorativas, como produtos farmacêuticos e itens domésticos (DESHPANDE & BHALSING, 2015).

Uma espécie de grande valor econômico é a *Cola nitida* Shott & Endl., a “árvore de caud”, cujos frutos são utilizados na preparação de bebidas refrescantes que são conhecidas no mundo sob o nome de “cola”. As nozes de cola são mastigadas e causam efeito estimulante, nelas são encontradas substâncias como: cafeína e teobromina (FRANKENBERGER, 2017).

Outras espécies de Sterculiaceae se destacam pelo seu grande valor para a indústria alimentícia como por exemplo a *Theobroma cacao*, o “cacau”, cujas sementes são empregadas na fabricação do chocolate; e a *Theobroma grandiflorum*, o “cupuaçu”, fruto usado na produção de sucos, refrigerantes e compotas (SILVA, LIMA, LANDA, 2007; GONÇALEZ, 2013).

No campo da fitoquímica foram isolados e identificados de várias espécies desta família compostos da classe dos alcaloides, fenilpropanoides, flavonoides, terpenoides, quinonas, ácidos fenólicos, lactonas, lignanas, aminas e amidas. Poucos estudos relataram atividade farmacológica dos extratos e compostos isolados de suas espécies. Estima-se que dos 170 compostos identificados, apenas cerca de 25 foram submetidos a ensaios de bioatividade, incluindo antibacterianos, antioxidantes, antiinflamatórios e citotoxicidade (MUQARRABUM & AHMAT, 2015).

Espécies pertencentes a essa família são citadas pela medicina popular também com fins terapêuticos. As cascas de *Guazuma ulmifolia* são utilizadas pela tribo dos índios mixe no México para tratar diarreia; a folha ou raiz de *Melochia tomentosa* é recomendada para o alívio da inflamação da garganta em regiões da Venezuela. *Sterculiae lychnophorae* e *Waltheria dorandinha* são usadas para tratar distúrbios respiratórios, aliviar dor de garganta, como estimulantes, eméticos e diuréticos. Algumas espécies desta família ainda foram relatadas pela medicina tradicional para o tratamento de doenças crônicas, como câncer, tumor, diabetes e doença renal (MUQARRABUM & AHMAT, 2015).

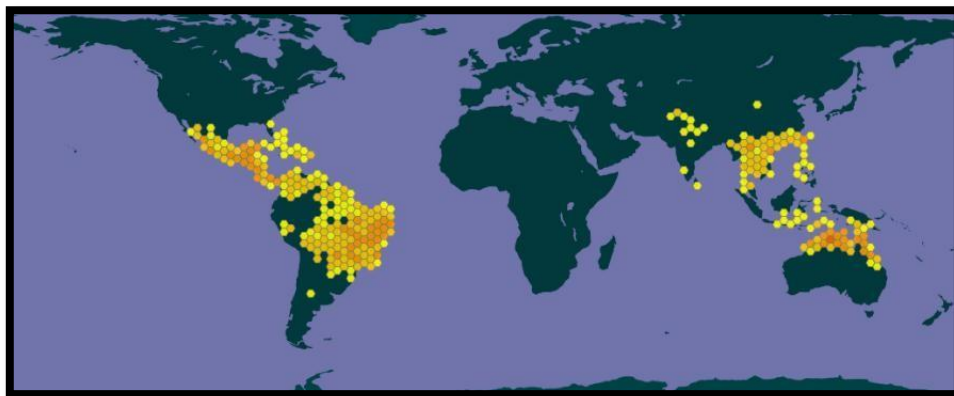
3.4 Considerações sobre o gênero *Helicteres*

O gênero *Helicteres* L. encontra-se distribuído nos trópicos de ambos os hemisférios, são arbustos ou árvores pequenas, caracterizadas por ter frutos distintivos, que são cápsulas espirais, muitos sementes e com um androginóforo longo livre ou forma fundida, com 10 estames transversais exsertos a uma corola de cor amarela a vermelho (BALOUNG et al., 2014). As flores do gênero são vistosas, zigomorfas, pediceladas, geralmente pêndulas e inodoras. As características florais dessas espécies sugerem morcegos (SAZIMA, 1988) e beija-flores como seus polinizadores (FRANCESCHINELLI & BAWA, 2000).

Compreendem cerca de 60 espécies, sendo mais abundantes nas Américas, com 38 espécies distribuídas pelo México, América Central, Caribe e América do Sul, não

sendo relatada sua presença no Equador e Chile (GOLDBERG, 2009). No Brasil ocorrem cerca de 31 espécies que habitam várias formações vegetacionais, destas, 23 são exclusivas do cerrado, caatinga e florestas secas (Figura 3, pág. 43) (CRUZ, 2007). Seus membros são também encontrados no Sudeste Asiático e Austrália (GOLDBERG, 2009).

Figura 3: Distribuição geográfica do gênero *Helicteres*, representada pelas áreas em destaque no mapa.



Fonte: <https://www.gbif.org/species/3152154>

Estudos fitoquímicos anteriores com espécies de *Helicteres* revelaram a presença majoritária de triterpenoides (HARDE & SHAH, 2017), esteroides (DAYAL et al., 2015), flavonoides (NGUYEN, et al., 2017), compostos fenólicos (OLIVAS-QUINTERO et al., 2017), lignanas e quinonas (YIN et al., 2016), além de pequena ocorrência de taninos (MEENA & PATNI, 2017), alcaloides (ALEYKUTTY et al., 2012).

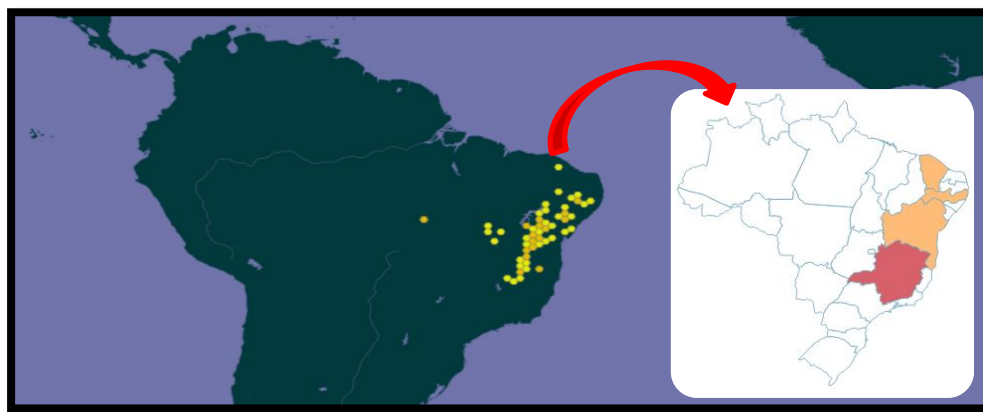
Os efeitos biológicos e farmacológicos de algumas espécies do gênero *Helicteres* foram confirmados através de estudos *in vitro* e *in vivo*. Entre outros, atividade anti-inflamatória, analgésica (SHUKLA & GOSWAMI, 2016; NGUYEN, et al., 2017), antitumoral, citotóxica (DAYAL, SINGH, MISHRA, 2017; SU et al., 2017), hepatoprotetora (SAHANE et al., 2017), antidiabética, hipolipidêmica (HU et al., 2016; HU, ZHANG, CHENG, 2016), antioxidante (LIU et al., 2018), antimicrobiana, antiplasmídica (KUMAR, SINGH, FAROOQ, 2017a; KUMAR, SINGH, FAROOQ, 2017b).

Um levantamento bibliográfico das moléculas isoladas de espécies do gênero *Helicteres* e suas atividades biológicas foi realizado utilizando banco de dados científicos como *Web of Science*, *Scifinder* e *Google Scholar*, abrangendo publicações sobre o tema no período de 1981-2019 (FERNANDES et al., 2020b) (ANEXO A, pág. 244).

3.5 Considerações sobre a espécie *Helicteres velutina* K. Schum

Helicteres velutina K. Schum, popularmente conhecida como ‘Pitó’, é endêmica do Brasil, distribuída nos biomas da caatinga, cerrado e mata atlântica, com registro nos estados da Bahia, Ceará e Pernambuco/NE, e Minas Gerais/SE (Figura 4, pág. 44) (SANTOS et al. 2012; COLLI-SILVA & ANTAR, 2018; FERNANDES et al. 2018). Pesquisas com espécies nativas são as mais recomendadas por aumentar as chances de adaptações ao meio natural, além de contribuírem para conservação da biodiversidade local e regional (SILVA et al. 2017).

Figura 4: Distribuição geográfica da espécie *Helicteres velutina*, representada pelas áreas em destaque nos mapas.



Fonte: Adaptado de http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Helicteres_velutina

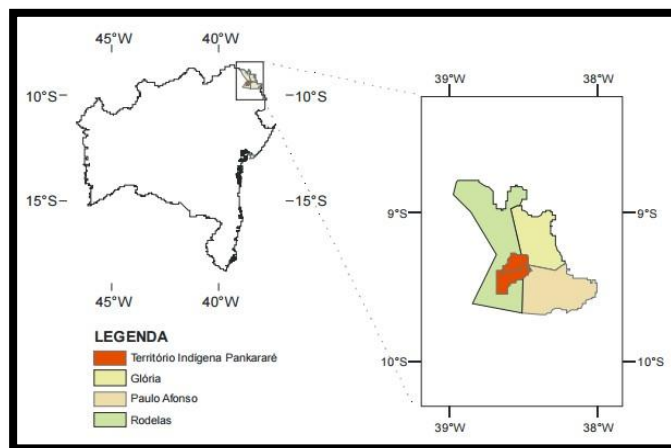
Em relação às características botânicas, a espécie possui porte arbustivo ereto, podendo chegar a 2 m de altura. Suas folhas possuem estípulas 4-8 mm de comprimento, inflorescência com bractéolas filiformes, contendo alguns nectários entre as flores e na região axilar das bractéolas em número igual ou maior que dois, suas flores são geniculadas, com pétalas subiguais, unhas 4-8 vezes mais curta que o cálice, 10 estames conatos na base. Seu fruto é indumento hirsuto ou velutino (Figura 5, pág. 45) (CRISTÓBAL, 2006; COLLI-SILVA & ANTAR, 2018).

Figura 5. Detalhes botânicos da espécie *Helicteres Velutina*

Fonte: Adaptado de https://www.flickr.com/photos/c_takeuchi/6819703721; CRISTÓBAL, 2001; <https://www.gbif.org/occurrence/1265887366>.

De acordo com a etnofarmacologia, *H. velutina* é utilizada como repelente de insetos, pela tribo indígena Pankararé da estação ecológica Raso da Catarina na Bahia no quadrilátero formado pelas cidades de Paulo Afonso, Jeremoabo, Canudos e Macururé, cuja vegetação é do tipo caatinga arbórea e arbustiva (Figura 6, pág. 45) (COLAÇO, 2006, FERNANDES, 2017).

Estudos preliminares com o extrato etanólico bruto (EEB) das raízes, caule e partes aéreas da espécie mostram atividade frente a larvas do *Aedes aegypti* (COLAÇO, 2006; SANTOS et al., 2012; FERNANDES et al. 2018). A pesquisa com as partes aéreas desta espécie foi iniciada no mestrado (FERNANDES, 2017), e a sua continuação levou as primeiras publicações (FERNANDES et al, 2018, FERNANDES et al. 2019, FERNANDES et al, 2020a, FERNANDES et al, 2021) (ANEXO B, C, D e E, págs. 245-248).

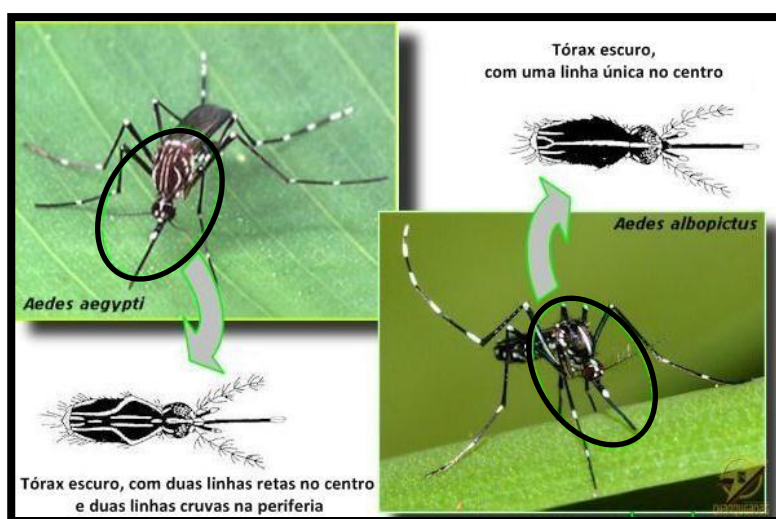
Figura 6. Localização da tribo indígena Pankararé na Bahia

Fonte: COLAÇO, 2006

3.6 Aspectos gerais dos vetores do gênero *Aedes*

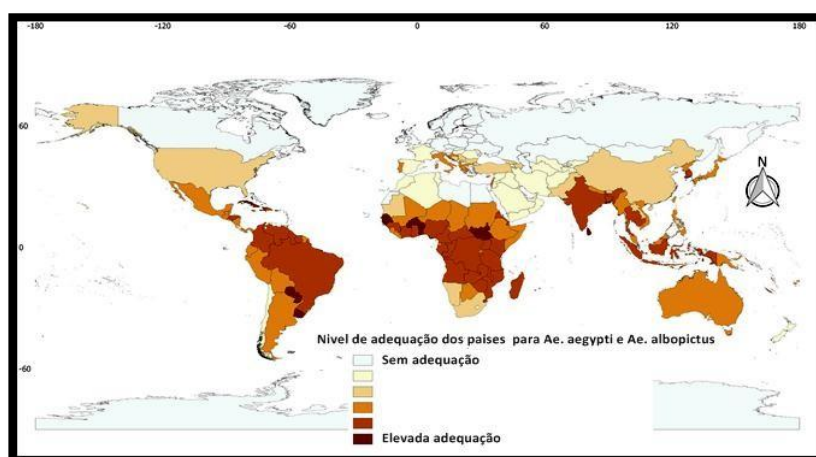
Há duas espécies principais de mosquitos do gênero *Aedes* capazes de transmitir várias doenças em seres humanos e animais: *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Figura 7, pág. 46). Principais vetores de vírus que representam uma ameaça à saúde humana, como dengue, chikungunya, zika e febre amarela, bem como a saúde de bovinos como febre do vale do Rift (Rift Valley Fever-RVF) (Figura 8, pág. 47), considerada uma das mais graves doenças zoonóticas emergentes (MUKANDIWA et al. 2016; LETA et al. 2018).

Figura 7: Características morfológicas do *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*

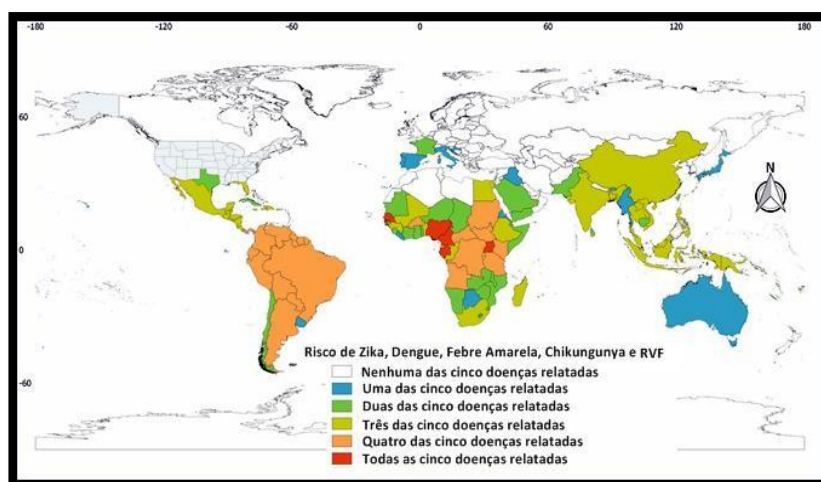


Fonte: Adaptado de <http://www.charqueadas.rs.gov.br>

Globalmente, 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco, especialmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo onde a temperatura e a umidade promovem a proliferação dos vetores (Figura 9, pág. 47) (SOUZA et al. 2011; REEGAN et al. 2014; KRAEMER et al., 2015).

Figura 8: Mapa global da distribuição do *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*

Fonte: Adaptado de LETA et al. 2018.

Figura 9: Mapa global da distribuição das principais arboviroses transmitidas por mosquitos do gênero *Aedes* em humanos e animais

Fonte: Adaptado de LETA et al. 2018.

3.6.1 Principais arboviroses

A dengue (DENV) é considerada a mais importante doença viral transmitida por artrópodes, e inclui os sorotipos 1, 2, 3 e 4 (Den-1, Den-2, Den-3 e Den-4) (MURUGAN et al., 2012; PANNEERSELVAM et al., 2012). É endêmica em pelo menos 100 países da Ásia, Pacífico, Américas, África e Caribe (Figura 10, Pág. 50) (MUKANDIWA et al., 2016). Estima-se que 2,5 bilhões de pessoas correm risco de adquirir infecção viral da dengue, com projeção de mais de 50 milhões de novas infecções anualmente (KUMAR et al., 2012).

A febre amarela (FA) já foi registrada na região central, América do Sul e África Ocidental (Figura 10, pág. 50) (GOVIDARAJAN, 2011). É mantida em um ciclo silvestre envolvendo macacos em florestas tropicais, sendo transmitida para o meio urbano através do *Ae. aegypti* (GUBLER, 2018). Em dezembro de 2015 a doença se espalhou por todo o território de Angola, resultando em 4.347 casos suspeitos ou confirmados e 377 mortes, sendo levada para outros países por viajantes (BRENT et al., 2018). No início de 2016, novos casos foram reportados na América do Sul, uma zona considerada livre da doença a mais de 70 anos (GOMEZ et al., 2018), a OMS recomendou que pessoas que pretendessem viajar para o Brasil fossem vacinadas, pois 777 casos humanos da doença haviam sido registrados em oito estados brasileiros em 2016, resultando em 261 mortes (DONALD et al., 2018).

O Zika vírus (ZIKV) originalmente isolado na Uganda em 1947, surgiu em 2007 fora do seu alcance natural de distribuição, na África e na Ásia. Foi inicialmente relatado na região do Pacífico, em seguida, epidemias ocorreram na Polinésia Francesa em 2013, Nova Caledônia em 2014 e nas Américas em 2015, inicialmente sendo detectado no nordeste do Brasil. Posteriormente, 22 países da América relataram transmissão do ZIKV (Figura 10, pág. 50) (ESCUTIA et al., 2018; VAZEILLE et al., 2017; PETTERSSON et al., 2018; THAM et al., 2018). Os problemas neurológicos associados à infecção por ZIKV incluem complicações na gravidez e microcefalia em recém-nascidos (AGUIAR et al., 2018; NOGUEIRA et al., 2018; REES et al., 2018). No Brasil o número de infecções acumuladas foi estimado entre 440.000 e 1.300.000 até 2018 (RABELO et al., 2018).

A infecção pelo vírus Chikungunya (CHIKV) foi documentada na África, várias ilhas do Oceano Índico, na Ásia e recentemente nas Américas, incluindo os Estados Unidos (Figura 10, pág. 50) (FREITAS, RAO, MAHALINGAM, 2018; MAKIALA-MANDANDA et al., 2018; MERCADO et al., 2018; MEHTA et al., 2018). No geral, a doença tem um quadro febril agudo, seguida em muitos pacientes por inflamação crônica e artrite (AMARAL & SCHOEN, 2018; JAIN et al., 2018). Em 2014 haviam sido registrados 6.328 casos no Haiti e em 16 outros países ou territórios, no Caribe e na América do Sul foram notificados 103.018 casos suspeitos (ROGIER et al., 2018).

Algumas dessas doenças já foram consideradas erradicadas em alguns países, no entanto o descontrole da urbanização, comércio e viagens, levaram a reincidência da doença, aumentando o número de casos notificados (MAKIALA-MANDANDA et al., 2018). São arboviroses clinicamente difíceis de diagnosticar, podendo ser facilmente

confundidas entre si ou com outras doenças virais (KUMAR et al., 2011; KEZIAH et al., 2015).

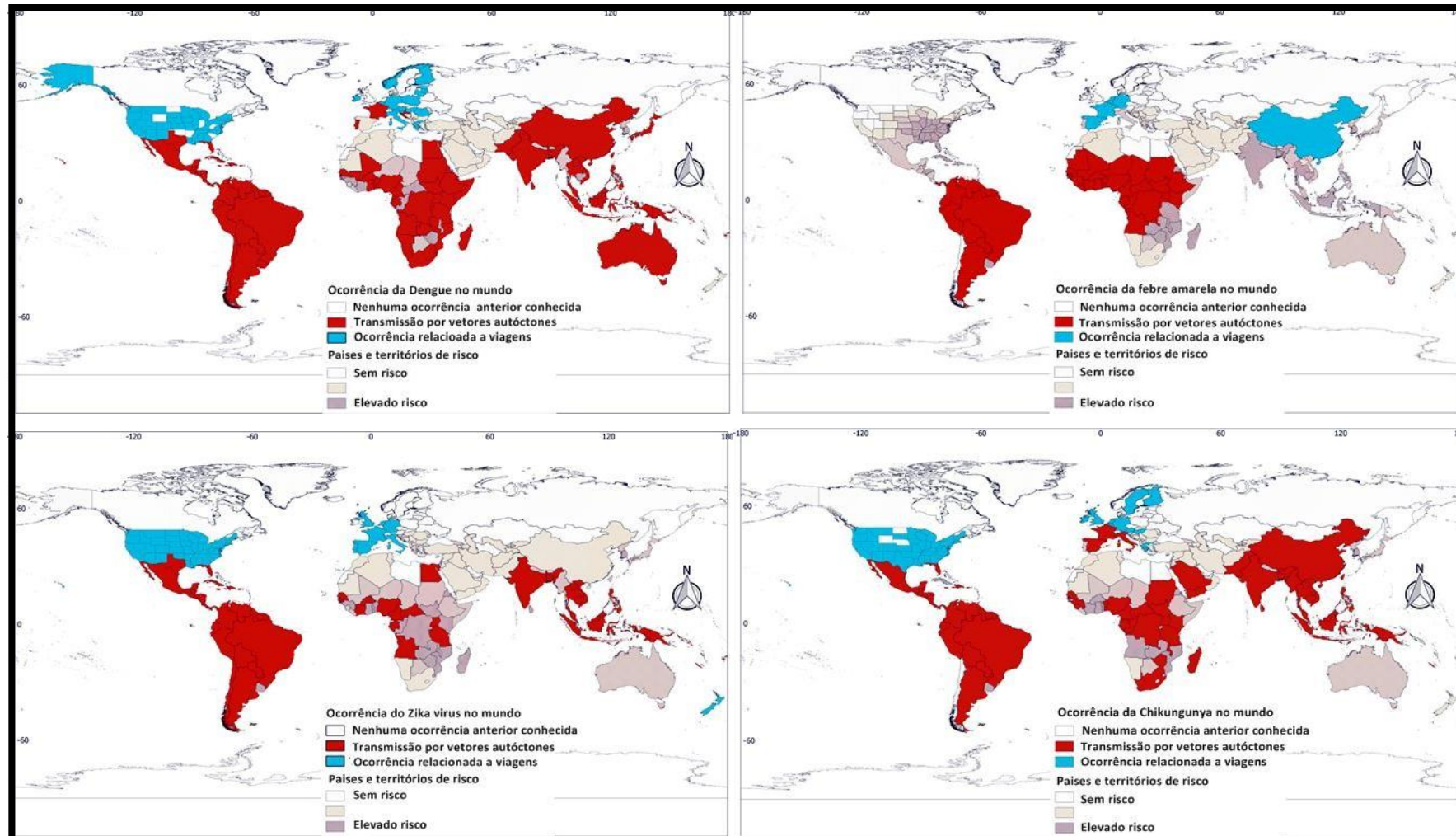
Fatores que podem causar surtos incluem um aumento nos locais de reprodução de vetores, migração de pessoas infectadas em uma área rica em vetores, povoada de indivíduos suscetíveis, chegada de novos vetores eficientes, quebra de medidas de controle de vetores e resistência dos vetores a inseticidas (PLUEMPANUPAT et al., 2012).

No Brasil, o principal vetor é o *Ae. aegypti*, sendo o país caracterizado como de clima tropical e geograficamente grande, várias características que contribuem para a epidemia de doenças transmitidas por mosquitos, o que dificulta o controle dessas doenças (AGUIAR et al., 2018). Segundo o Ministério da Saúde (MS) no período 2017 a 2018 foram registrados no Brasil, 1.127 casos de FA, 443.287 de DENV, 254.428 de CHIKV e 24.278 de ZIKV que acarretaram 328, 263, 208 e 2 óbitos, respectivamente, dados estes que se mostraram inferiores aos registrados no período de 2014 a 2016 quando se iniciou os surtos dessas doenças, entretanto muito ainda precisa ser feito para que possamos erradicar essas arboviroses do nosso país (BRASIL, 2018a; BRASIL, 2018b). O MS registrou até o dia 28 de maio de 2018, 16.028 casos de microcefalia e/ou alteração do sistema nervoso central sugestivos de infecção congênita, associados a infecção pelo vírus zika, que acarretaram 1.046 óbitos fetais, neonatais ou infantis (BRASIL, 2018c).

O surgimento de novas doenças, como a pandemia por COVID-19, considerada uma calamidade na saúde pública mundial, acabam tirando o foco de doenças já existentes. As doenças tropicais negligenciadas (DTNs), continuam causando vários óbitos ao longo dos anos, afetando principalmente as populações mais carentes, nos países em desenvolvimento, onde os recursos são escassos, é necessário investir em pesquisas em ambas as áreas, para evitar o risco de sindemias (GUTMAN et al., 2020; SEELING et al., 2020; DE SOUZA, 2020). Segundo o MS até março de 2021 foram notificados 72.093, 5.193 e 327 casos prováveis de dengue, chikungunya e zika no Brasil, respectivamente, em comparação com o ano de 2020, houve uma redução de 75% de casos registrados para o mesmo período analisado (BRASIL, 2021).

Um estudo realizado por Leta et al. (2018), teve por objetivo mapear o risco global de transmissão das doenças acima citadas, através da identificação de áreas onde as doenças são notificadas através de surtos ativos de transmissão ou relacionados com viagens, bem como áreas onde as doenças não são relatadas atualmente, mas são adequadas para o vetor (Figura 10, pág. 50).

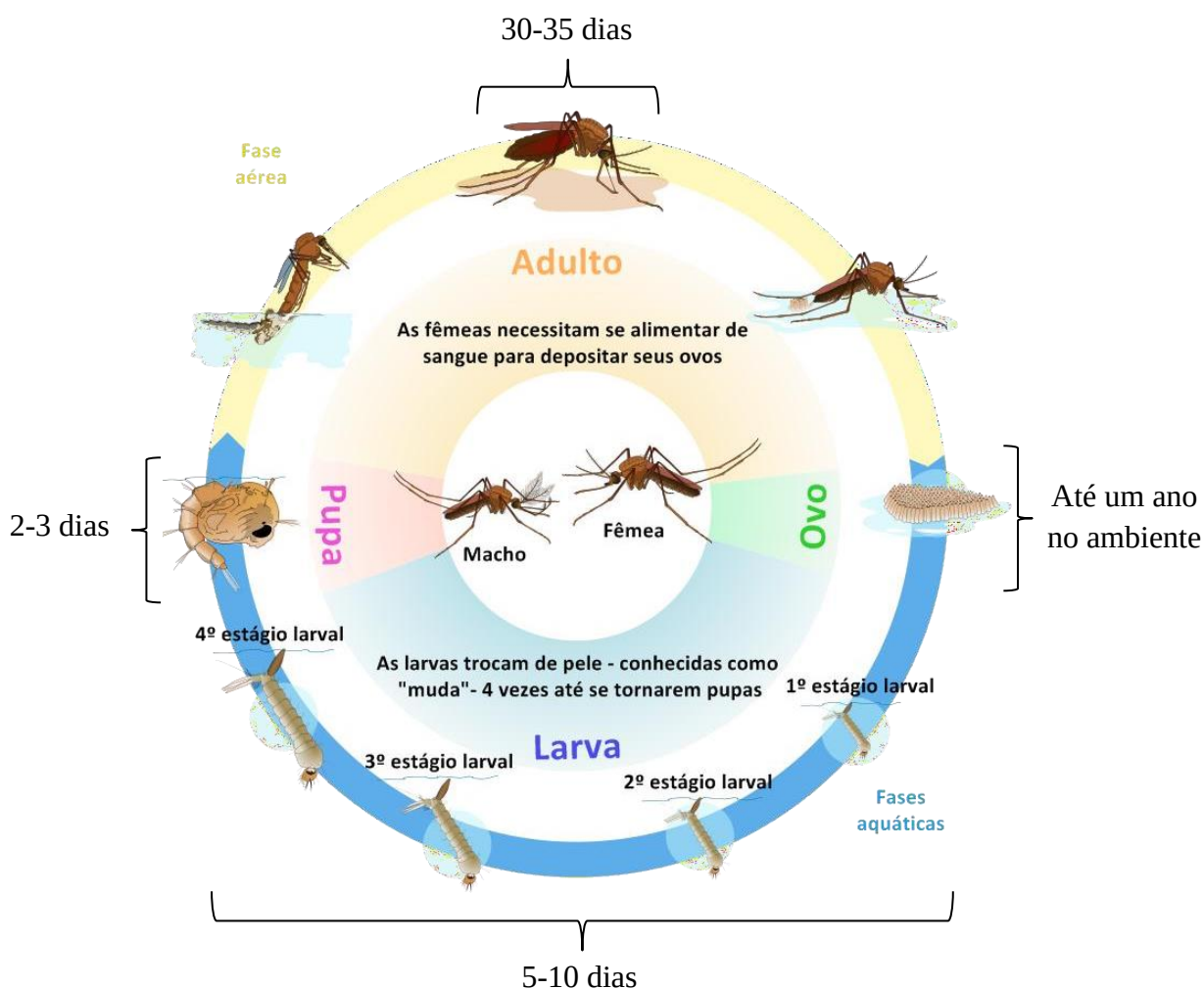
Figura 10: Mapas de distribuição das principais arboviroses no mundo. **A)** Dengue; **B)** Febre amarela; **C)** Zika e **D)** Chikungunya



3.6.2 Características morfológicas do ciclo de vida dos vetores

Aedes aegypti têm um ciclo de vida complexo, com mudanças drásticas na forma, função e habitat, as fêmeas depositam seus ovos nas paredes úmidas dos recipientes com água, os ovos eclodem quando imersos na água, transformando-se nas larvas que por sua vez se alimentam de microrganismos e matéria orgânica, trocando suas peles para poderem crescer do primeiro ao quarto estágio, quando adquirem tamanhos e energia suficientes, as larvas se tornam pupas, estas não se alimentam e abrigam o corpo do mosquito adulto até a sua completa formação, o adulto recém-formado emerge da água após romper a pele da pupa, os mosquitos adultos acasalam, iniciando um novo ciclo (Figura 11, pág. 51) (CDC, 2012; VIANA, 2015).

Figura 11: Ciclo de vida do *Aedes aegypti*



Fonte: Adaptado de <https://www.biogents.com/life-cycle-mosquitoes/>

É possível observar visualmente as diferenças entre machos e fêmeas, devido principalmente ao maior tamanho corporal da segunda. Como regra os machos possuem antenas mais plumosas, geralmente os palpos são mais longos e suas asas mais compridas e finas do que as fêmeas (LORENZ, VIRGINIO, BREVIGLIERI, 2018). O adulto de ambos os sexos se alimenta de soluções açucaradas como fonte de nutrientes, contudo as fêmeas desta espécie necessitam de proteínas presentes no sangue do hospedeiro para que ocorra a maturação dos ovos e realizam repasto sanguíneo preferencialmente nos horários diurnos (AMARAL, 2018).

A fêmea faz a postura de ovos após cada repasto sanguíneo, em cada postura são liberados cerca de 50 a 70 ovos, distribuídos aos poucos em diferentes criadouros. Este tipo de comportamento irá aumentar as chances de sobrevivência dos seus descendentes, garantindo o sucesso reprodutivo e a dispersão do *Ae. aegypti* (OLIVA, 2011).

Como um dos mosquitos mais bem caracterizados, *Ae. aegypti* é considerado um organismo modelo para estudos sobre a biologia reprodutiva regulada por hormônios, carboidratos e metabolismo de lipídios. Além disso, *Ae. aegypti* pode ser facilmente criado no laboratório, permitindo a realização de estudos sobre a fisiologia, biologia e reprodução do vetor (WANG et al., 2017).

3.6.3 Formas de combate: controle mecânico, biológico, químico e alternativas naturais

Devido à ausência de uma vacina eficaz contra as arboviroses transmitidas pelo *Ae. aegypti*, a principal forma de combater doenças como a dengue, zika, chikungunya e febre amarela, é erradicar o vetor, que pode ser feito inicialmente por meio do controle mecânico, que consiste em eliminar os depósitos de ovos e locais de desenvolvimento (Figura 12, pág. 54) (SOUZA et al., 2011; MUKANDIWA et al., 2016). Atualmente, o mosquito é altamente dependente dos recipientes manufaturados pelo homem, localizados normalmente em quintais, pátios e jardins (VIANA, 2015; FERNANDES, 2017).

O controle biológico por sua vez, consiste no uso de bactérias do gênero *Bacillus* spp., que não são tóxicas para humanos, não afetam o meio ambiente, e suas múltiplas toxinas minimizam resistência a insetos. Contudo, há relatos de que a radiação solar pode reduzir a duração da atividade larvicida dessas toxinas para apenas duas semanas, o que é um problema sério, especialmente em regiões tropicais. Além disso, casos de resistência do *Ae. aegypti* para *Bacillus sphaericus* estão surgindo desde a última década (SOUZA et al. 2011).

Inseticidas químicos continuam sendo a primeira linha de defesa contra doenças transmitidas por mosquitos, devido sua ação rápida e fácil aplicação, atualmente, existem apenas quatro classes aprovadas de inseticidas, nomeadamente organofosfatos, piretróides, carbamatos e organoclorados (MURUGAN et al., 2012; REEGAN et al., 2014). A abordagem convencional envolve o uso de inseticidas contra os estágios adulto e larval. As desvantagens associadas ao uso em longo prazo destes compostos, como perturbação do equilíbrio ecológico, efeitos nocivos em organismos não-alvo, desenvolvimento de resistência fisiológica e seleção de cepas resistentes, especialmente entre organismos-alvo, levaram à busca de novos inseticidas alternativos (RAVINDRAN et al., 2012; REEGAN et al., 2014; ROJAS-PIZON et al., 2018; VIVEKANANDHAN et al., 2017).

Portanto, novos ingredientes ativos baseados em novos modos de ação ou compostos inseticidas atuando em novos sítios de ligação são necessários para retardar o início da resistência aos inseticidas disponíveis (MUKANDIWA et al., 2016).

Uma alternativa para produtos químicos e biológicos é o uso de produtos naturais de plantas, o que se espera que minimize o impacto sobre meio ambiente. Nos últimos anos, vários estudos se concentraram em produtos vegetais para controlar o *Ae. aegypti* como larvicidas e inseticidas, ou repelentes para proteção pessoal (SOUZA et al., 2011).

Os produtos naturais têm sido usados tradicionalmente por comunidades em muitas partes do mundo contra os vetores e espécies de insetos (MURUGAN et al., 2007). As plantas são uma fonte potencial inestimável de novos agentes repelentes devido ao grande número de compostos inseticidas encontrados nas mesmas. A maioria produz naturalmente compostos que são úteis na prevenção do ataque de insetos. Estes compostos podem ser classificados como repelentes, toxinas ou reguladores de crescimento (MUKANDIWA et al., 2016).

Certas espécies de plantas já provaram eficácia como larvicidas, adulticidas, ovicidas e repelentes contra diferentes espécies de mosquitos (KOVENDAN et al., 2013; MURUGAN et al., 2012; VIVEKANANDHAN et al., 2017). Segundo Vivekanandhan et al. (2017) plantas possuem metabólitos secundários e óleos essenciais que possuem várias propriedades farmacêuticas e inseticidas e, portanto, são candidatos ideais para pesquisa, que tem foco na toxicidade dos extratos, suas frações e óleos essenciais (GOVINDARAJAN, 2011; MUNUSAMY et al., 2016, FERREIRA et al., 2019). As propriedades repelentes de vários óleos essenciais parecem ser associadas à presença de monoterpenóides e sesquiterpenos (MURUGAN et al., 2012; REEGAN et al., 2015).

Entre as plantas com atividade inseticida destacam-se aquelas do gênero *Nicotiana* (Solanaceae); *Derris*, *Lonchocarpus*, *Tephrosia* e *Mundulea* (Leguminosae); *Chrysanthemum* (Asteraceae) e *Azadirachta* (Meliaceae) (QUIRINO, 2010). Compostos bioativos à base de plantas são biodegradáveis, ecologicamente corretos, alvo específico e não tóxico para insetos benéficos (KUMAR et al., 2011; RAVINDRAN et al., 2012). Estudos anteriores relataram a eficácia da azadiractina, piretrinas, rotenona, nicotina e toosendanina, fitoquímicos que atuam como inseticidas biológicos promissores (PLUEMPANUPAT et al., 2012; REEGAN et al., 2014; VIVEKANANDHAN et al., 2017).

No Brasil e em outras partes do mundo, extratos de plantas (medicinais, nativas e adaptadas) e seus derivados, têm sido testados para o controle de diferentes vetores de doenças, incluindo *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, avaliando principalmente a ação larvicida (CHAGAS, 2016).

Figura 12: Formas de controle: **A)** Mecânico; **B)** Biológico; **C)** Químico e **D)** Alternativas naturais.



Fonte: Adaptado de http://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/en/

Uma abordagem comumente defendida para prevenir picadas de mosquito é proteção pessoal. Este método permite que um indivíduo selecione (ou combine) técnicas de prevenção, exclusão de mosquitos com barreiras físicas e químicas, tratamento de tecidos com substâncias tóxicas e o uso de repelentes tópicos (pele) (KEZIAH et al., 2015).

Numerosos repelentes de mosquitos sob uma variedade de marcas estão atualmente disponíveis comercialmente para consumidores em todo o mundo. A maioria deles contém DEET (N, N-dietil-m-toluamida), que possui atividade de amplo espectro e repele a maioria dos mosquitos conhecidos, sendo considerado o mais eficaz disponível para uso humano. Atualmente, o DEET é formulado em aerossóis, sprays, loções, cremes, líquidos, bastões, rollons e lenços impregnados, com concentrações variando de 5 a 100%. No entanto, o DEET mostrou efeitos adversos quando aplicado conforme as instruções. Os problemas mais comuns estão associados a irritação local da pele, anafilaxia, e muitas pessoas que aplicaram altas concentrações de DEET diariamente desenvolveram efeitos adversos mais graves devido à exposição crônica, que incluíram insônia, câibras musculares, distúrbios do humor, e erupções cutâneas. Por esta razão, extratos de várias plantas têm sido estudadas como possíveis repelentes de mosquitos revelando a existência de repelentes naturais com boa eficácia (KEZIAH et al., 2015; POSSEL, 2019).

Repelentes têm um lugar importante em proteger o homem das picadas de insetos e na interrupção da transmissão da doença. Um composto repelente deve ser tóxico, não irritante e de longa duração. Amidas, imidas, ésteres e outros compostos polifuncionais são conhecidos por serem bons repelentes. Plantas podem ser uma fonte alternativa para repelentes de mosquitos, porque eles constituem um potencial fonte de produtos químicos bioativos e normalmente são livres de efeitos nocivos. Por isso, muito interesse tem sido focado em extratos de plantas, ou óleos essenciais como agentes potencialmente repelentes de mosquitos (MURUGAN et al., 2007).

Estudos têm demonstrado a importância de estudos biomonitorados com espécies vegetais na busca de substâncias ativas frente ao *Ae. aegypti* (LIMA, 2008; SILVA, 2010; CRUZ, 2011).

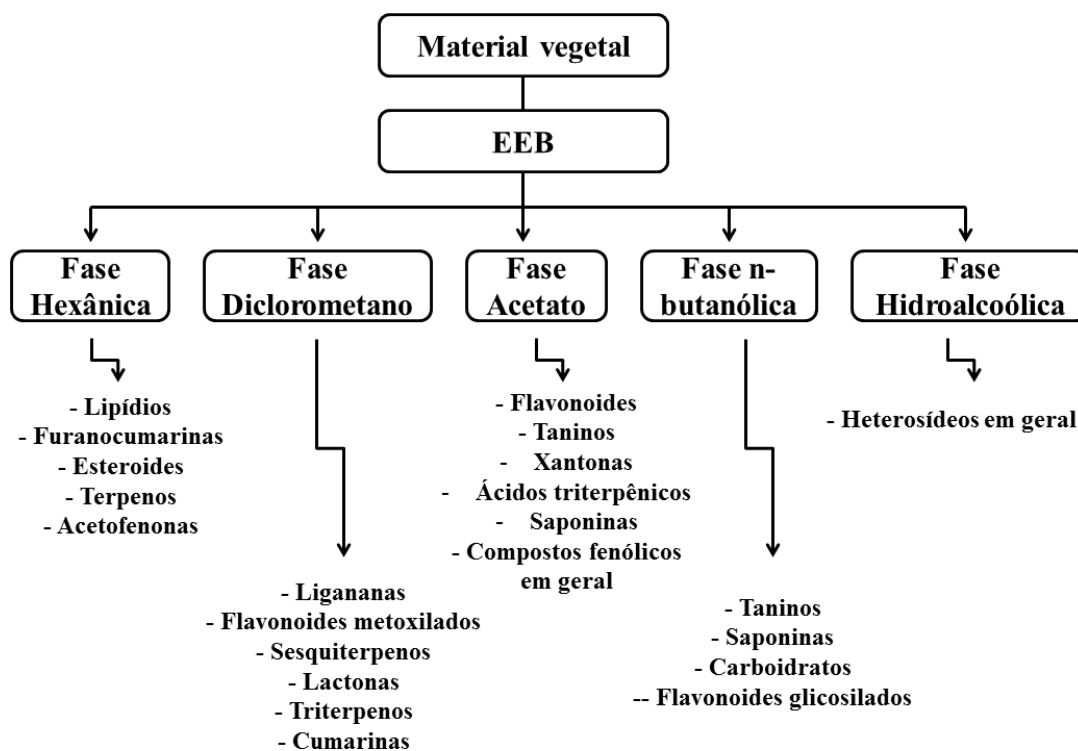
3.7. Estudo fitoquímico biomonitorado

O processo de desenvolvimento de um fitomedicamento, envolve a seleção da planta a ser estudada, a mesma deve ser selecionada com base na literatura científica, características etnobotânicas ou etnofarmacológicas de interesse, quimiotaxonomia da família, além de estudos farmacológicos prévios. O passo seguinte diz respeito à coleta, identificação botânica e extração dos constituintes químicos. A partir dos extratos, empregando-se métodos cromatográficos e espectroscópicos, podem ser obtidos

compostos isolados e caracterizados estruturalmente. Nessa fase, são realizados testes de atividade biológica e de toxicidade. A identificação da estrutura do composto permite realizar estudos subsequentes da síntese total ou parcial do constituinte ativo, preparação de derivados e/ou análogos, modulação da atividade biológica e definição da relação estrutura-atividade (HEINZMANN & BARROS, 2007).

O estudo fitoquímico biomonitorado, tem o intuito de encontrar substâncias ativas presentes nos extratos de plantas que possam ser utilizadas como alternativas no combate aos organismos alvo. Para tanto, inicialmente devem ser testadas as fases obtidas após cromatografia líquido-líquido do extrato, com o intuito de avaliar em quais destas podem estar os constituintes de interesse, para auxiliar na triagem inicial, tendo em vista que existem composições químicas diferentes em cada uma dessas fases de acordo com sua polaridade (CECHINEL FILHO & YUNES, 1997; SANTOS, 2008). Essa composição química é muito variável, mas em geral segue o modelo do esquema abaixo (Esquema 2, pág. 56).

Esquema 2: Obtenção de extratos e prováveis classes de metabólitos extraídos:

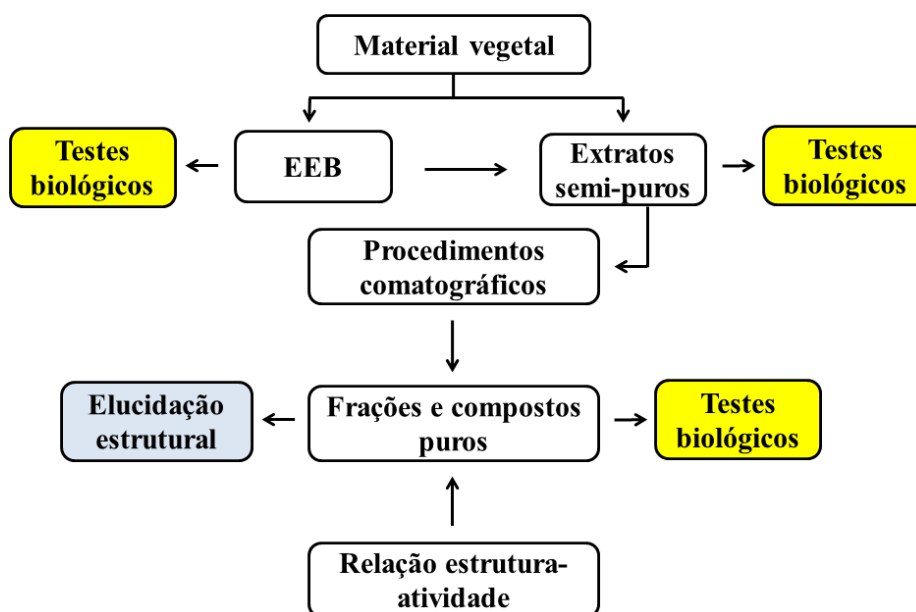


Fonte: Adaptado de CECHINEL FILHO & YUNES, 1997; SANTOS, 2008.

Como se pode observar no esquema anterior, existem constituintes químicos que são mais prováveis de serem encontrados a depender da fase com que se trabalha, possibilitando uma extração dos compostos de acordo com suas polaridades. De acordo com Cechinel Filho & Yunes (1997), no sentido de localizar os princípios ativos, todas as fases semi-puras devem ser testadas e aquela que apresentar efeito biológico de interesse, deverá ser submetida aos procedimentos cromatográficos para o isolamento e a purificação dos compostos (SILVA et al., 2010). (Esquema 3, pág. 57).

Estudos relatam que em alguns casos a atividade biológica dos extratos brutos, podem ser superior ao das substâncias isoladas e isso se deve a ação sinérgica dos diversos constituintes presentes no mesmo (COSTA et al., 2013), que dependendo da espécie, do solvente utilizado e das concentrações utilizadas pode variar significativamente.

Esquema 3: Etapas propostas para um estudo biomonitorado



Fonte: Adaptado de CECHINEL FILHO & YUNES, 1997.

3.8. Triagem virtual na química medicinal

A busca por novas espécies químicas obtidas de produtos naturais é muito importante dada a sua diversidade e complexidade estrutural. A partir da década de noventa, com o advento da química combinatória, a indústria farmacêutica conseguiu otimizar a busca por moléculas bioativas (PAIXÃO & PITA, 2016; NEWMAN & CRAGG, 2020).

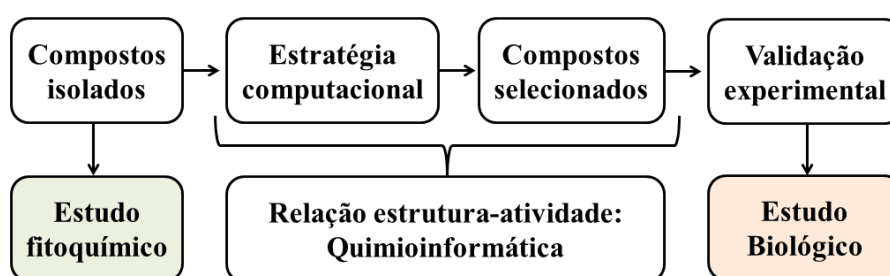
A triagem virtual que aplica técnicas *in silico* (computacional) representa um dos maiores avanços na atual era de planejamento de fármacos, através dela inúmeras estratégias distintas, são capazes de direcionar a seleção de moléculas com as características químicas desejadas para modular a atividade biológica dos mais diversos e atrativos alvos moleculares conhecidos na atualidade (Esquema 4, pág. 58) (RODRIGUES et al., 2012).

A bioinformática e a quimioinformática têm um papel essencial na seleção e desenvolvimento racional de compostos candidatos a fármacos antes de partir para análises clínicas (DOMINGUES, 2013). Modelos farmacofóricos têm sido amplamente utilizados no processo de triagem virtual de ligantes, permitindo selecionar ligantes que contenham as propriedades físico-químicas essenciais em um arranjo espacial adequado para desencadear suas atividades. Essas propriedades são obtidas a partir da avaliação das interações similares identificadas de complexos receptor-ligante conhecidos (QUEVEDO, 2016).

Além da identificação de novas moléculas potencialmente ativas, a triagem objetiva a remoção de moléculas identificadas como potencialmente tóxicas ou que possuam propriedades farmacodinâmico-farmacocinéticas desfavoráveis (BARROS, 2017).

A docagem molecular (*molecular docking*) tem o objetivo de identificar moléculas com elevado potencial de interagirem com proteínas alvo, selecionando uma pequena fração dessas moléculas que apresentem um conjunto favorável de interações intermoleculares, com base em um determinado mecanismo e modo de ligação, para posterior avaliação bioquímica *in vitro* (FERREIRA et al., 2011). Acoplada a análises em modelagem molecular, pode-se prever a atividade destes compostos, reduzindo assim os gastos com a síntese e testes biológicos de moléculas candidatas a fármacos (LIMA et al., 2013).

Esquema 4: Etapas da triagem virtual





4. Metodologia



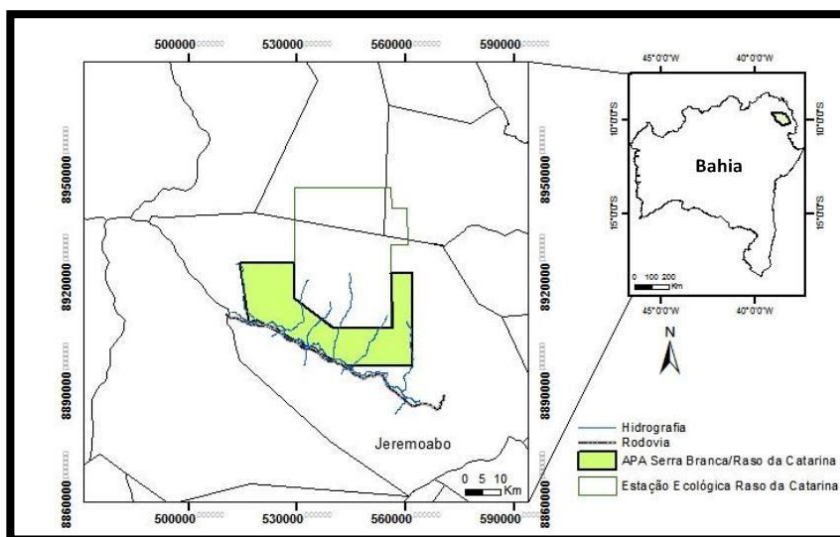
4.1 Levantamento bibliográfico

O levantamento bibliográfico foi realizado, no decorrer de todo o estudo, no *Chemical Abstracts*, *Biological Abstracts*, através de anais de eventos nacionais e internacionais, portal periódicos CAPES, *SciFinder*, *Web of Science*, além de outras fontes disponíveis na Internet.

4.2 Coleta e identificação do material botânico

As partes aéreas da espécie *Helicteres velutina* K. Schum foram coletadas em fevereiro de 2015 e abril de 2017 na Área de Proteção Ambiental Serra Branca/Raso da Catarina, localizada no município de Jeremoabo, nordeste da Bahia, cujas coordenadas são 09°53'15.5" a 09°44'34.6" S e 38°49'36,1" a 38°52'20.4" W (VARJÃO, JARDIM, CONCEIÇÃO, 2013) (Figura 13, pág. 60). Durante o processo de coleta, foram preparadas exsicatas para identificação do material coletado.

Figura 13. Localização da APA Serra Branca-BA destacado na área em verde do mapa



Fonte: LIMA, 2017.

O material botânico, partes aéreas, da espécie *Helicteres velutina*, foi coletado, identificado e cedido pela Prof.^a Dr.^a Adilva de Souza Conceição/UNEB, sendo uma exsicata depositada no Herbário da Universidade do Estado da Bahia (HUNEB, Coleção Paulo Afonso), sob o código 28709-1. Esta pesquisa foi registrada no Sistema Nacional

de Gerenciamento de Recursos Genéticos e de Conhecimento Tradicional Associado (SisGen – A568B8A).

4.3 Estudo fitoquímico

O estudo fitoquímico das partes aéreas de *H. velutina* foi realizado nas dependências do Laboratório de Fitoquímica Prof. Dr. Raimundo Braz Filho; Laboratório de Análises Farmacêuticas e Moleculares (LAFAM); Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA), pertencentes ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos/CCS/UFPB e também no Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), por meio de uma parceria com a Prof^a Dr^a Tânia Maria Sarmento.

4.3.1 Isolamento e purificação dos constituintes químicos de *Helicteres velutina*

O isolamento e identificação dos constituintes químicos foi realizado através de métodos cromatográficos, como: Cromatografia em Coluna com sílica gel 60 (Merck), sílica flash e/ou sephadex LH-20 (Merck), tendo como suportes colunas de vidro cilíndricas com dimensões variando de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada, Cromatografia Líquida de Média Pressão (CLMP) e Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP). Como fase móvel foram utilizados solventes PA. Na Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplado a espectrometro de massas foi utilizado solvente grau HPLC.

A Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) foi empregada para a análise do perfil cromatográfico dos compostos obtidos em todos os processos, foram evidenciadas pelo uso de radiação ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm, que exibem substâncias insaturadas e reveladas por meio de impregnação das placas em cubas de vidro saturadas por vapores de iodo, além do NP (difenilboriloxietilamina) para compostos fenólicos e Anisaldeído para terpenos e esteroides.

4.3.2 Caracterização estrutural das substâncias isoladas

A identificação ou elucidação estrutural das substâncias isoladas foi realizada através de métodos espectroscópicos, tais como: Infravermelho e Ressonância Magnética

Nuclear de Hidrogênio e Carbono treze (RMN ^1H e RMN ^{13}C , respectivamente), uni e bidimensionais e espectrometria de massas de alta resolução (HRMS), bem como através de comparações com modelos da literatura.

- *Infravermelho*

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos na UFPB em aparelho Perkin-Elmer, FT-IR-1750, com frequência medida em cm^{-1} , utilizando-se 1,0 mg da amostra em pastilhas de KBr.

- *Ressonância Magnética Nuclear*

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear das substâncias isoladas foram obtidos utilizando o espectrômetro BRUKER-ASCEND a 400 MHz (^1H) e 100 MHz (^{13}C) e VARIAN-SYSTEM a 500 MHz (^1H) e 125 MHz (^{13}C) do LMCA-UFPB. Os solventes utilizados na dissolução das amostras foram clorofórmio, dimetilsulfóxido e acetona deuterados (CDCl_3 , $\text{DMSO}-d_6$ e CD_3COCD_3 respectivamente), Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

- *Análises por UPLC-DAD-QTOF-MS*

Os experimentos analíticos de LC-HRMS foram realizados utilizando um cromatógrafo líquido de ultra eficiência ACQUITY UPLC H-Class (Waters Corporation, Milford, MA, EUA), acoplado a um espectrômetro de massa Quadrupolo- Tof (Xevo G2-XS QToF, Waters, EUA) com ionização por eletrospray (ESI).

As separações cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna ACQUITY UPLCTM BEH C_{18} (2,1 x 50 mm, 1,7 μm , Waters, EUA) a 40°C. A fase móvel binária consistiu em água com 0,1% de ácido fórmico (Fase móvel A) e acetonitrila 0,1% de ácido fórmico (fase móvel B). O fluxo foi de 0,4 mL/min e o volume de injeção foi de 10,0 μL . Foram utilizados num modo de gradiente como resumido na Tabela 1 (pág. 63). O detector de Arranjos de Fotodiodos (DAD) detectou as absorbâncias nos comprimentos de onda de 210 a 500 nm. O espectrômetro de massas foi operado em modo negativo

(ESI⁻) no modo sensibilidade. A detecção foi implementada no modo centroe MSE em uma faixa de massa de 100-1200 Da. A voltagem capilar foi ajustada em 0,8 kV para ESI.

Tabela 1. Método de gradiente usado no LC-HRMS

Tempo (min)	A%	B%	Tempo (min)	A%	B%
0,0 a 8,0	90-50	10-50	9,0 a 9,1	5-10	95-90
8,0 a 9,0	50-5	50-95	9,1 a 11,0	90	10

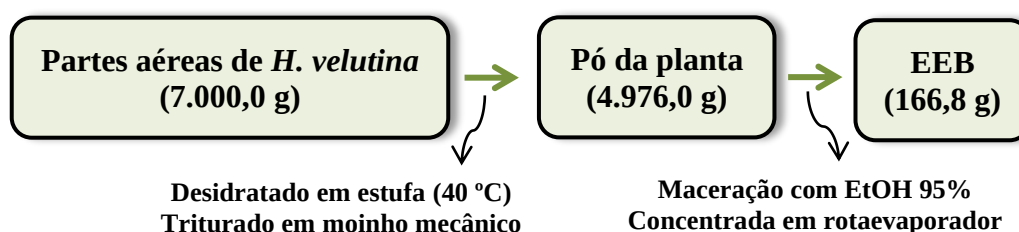
4.3.3 Processamento da planta

O material botânico (7.000,0 g) da espécie *Helicteres velutina* foi desidratado em estufa com ar circulante à 40°C durante 72 horas. Em seguida, o material seco foi triturado com auxílio de moinho mecânico, fornecendo 4.976,0 g do pó.

4.3.4 Obtenção do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Helicteres velutina*

O pó da planta (4.976,0 g) foi submetido à maceração durante 72 horas, utilizando-se como líquido extrator etanol a 95%, sendo tal processo repetido cinco vezes, até extração dos seus constituintes químicos. A solução extrativa resultante foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida, obtendo-se 166,8 g do extrato etanólico bruto (Esquema 5, pág. 63).

Esquema 5. Obtenção do EEB de *Helicteres velutina*.

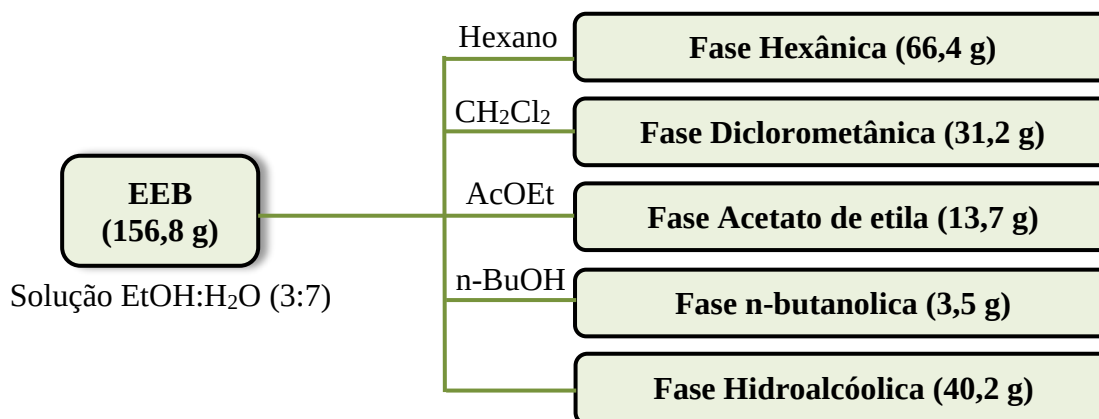


4.3.5 Fracionamento do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Helicteres velutina*

O extrato etanólico bruto das partes aéreas de *H. velutina* (156,8 g) foi solubilizado em uma solução de EtOH:H₂O (7:3), obtendo-se uma solução hidroalcoólica que foi submetida sequencialmente a um fracionamento com hexano, diclorometano,

acetato de etila e n-butanol. As soluções foram concentradas sob pressão reduzida, fornecendo suas respectivas fases, além da fase hidroalcóolica (Esquema 6, pág. 64).

Esquema 6. Cromatografia líquido-líquido do EEB de *Helicteres velutina*



4.4 Processamento cromatográfico da fase hexânica do EEB das partes aéreas de *H. velutina*

A fase hexânica (11,0 g) foi submetida a uma filtração em funil de placa porosa, utilizando sílica flash como fase fixa, e como fase móvel hexano, acetato de etila e metanol sozinhos ou em misturas binárias (Quadro 1, pág. 66). Este processo forneceu 10 frações que foram concentradas em rotaevaporador e reunidas através da semelhança do perfil cromatográfico em CCDA (Esquema 7, pág. 65).

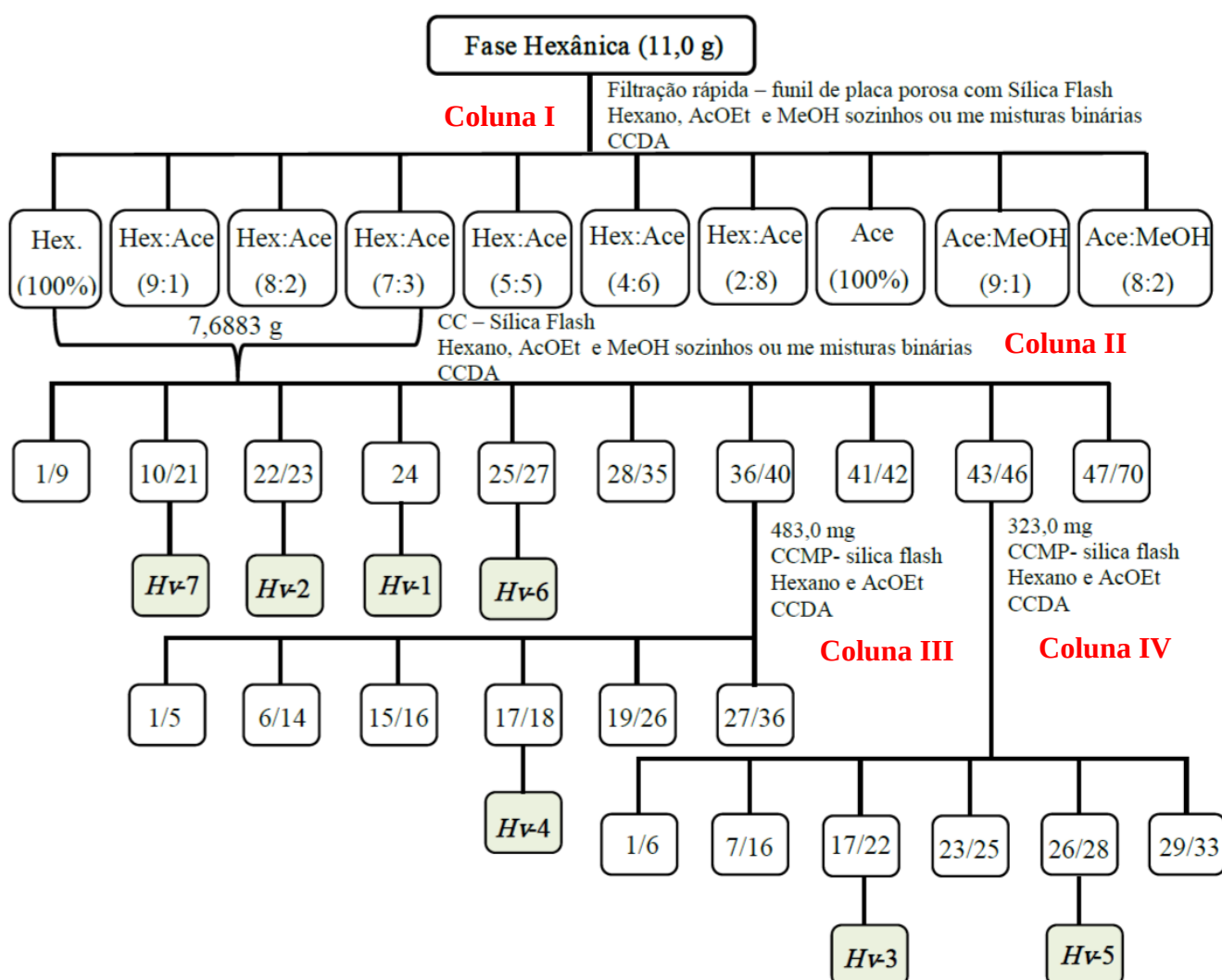
As quatro frações de menor polaridade, resultantes da coluna I (Esquema 7, pág. 65), foram reunidas (7,6 g), sendo submetidas a uma cromatografia em coluna com sílica flash (coluna II), adotando o sistema de solvente utilizado no processo cromatográfico anterior, resultando em 70 frações de 100 mL que foram concentradas em rotaevaporador, analisadas por CCDA e reunidas em 10 sub-frações, a sub-fração 22/23 (6,0 mg) e 24 (13,0 mg) foram obtidos na forma de óleo branco, codificados como **Hv-1** e **Hv-2**, respectivamente. As sub-frações 10/21 (7,0 mg) e 25/27 (22,0 mg), foram obtidos na forma de cristais brancos, que foram consideradas puras por análise em CCDA com vários sistemas de solventes e codificadas como **Hv-7** e **Hv-6**, respectivamente.

A sub-fração 36/40 (483,0 mg) da coluna II foi submetida a uma cromatografia de média pressão (CLMP) com sílica flash (coluna III) como fase fixa e como fase móvel: hexano e acetato de etila sozinhos ou em misturas binárias (Quadro 2, pág. 66),

resultando em 36 frações de 50 mL cada, que foram concentradas em rotaevaporador, sendo reunidas em 6 frações a partir de comparações em CCDA, destas, a fração 17/18 (30,0 mg) com aspecto verde escuro, foi codificada como **Hv-4** (Esquema 7 pág. 57).

A sub-fração 43/46 (323,0 mg), proveniente da coluna II, foi submetida a mesma metodologia descrita anteriormente em CLMP (coluna IV) (Quadro 3, pág. 67), fornecendo 33 frações, que foram concentradas e reunidas a partir de CCDA em seis frações, destas a fração 17/22 (30,0 mg) e 26/28 (12,0 mg), mostrou-se na cor verde escuro, foram consideradas puras e codificadas como **Hv-3** e **Hv-5**, respectivamente (Esquema 7, pág. 65).

Esquema 7. Fracionamento cromatográfico da fase Hexânica do EEB de *H. velutina*



Quadro 1: Eluentes utilizados e frações obtidas no primeiro fracionamento cromatográfico da fase hexânica de *Helicteres velutina* (Esquema 7, pág. 65)

ELUENTE	FRAÇÕES (100 mL)	ELUENTE	FRAÇÕES (100 mL)
Hexano	1 – 4	Hexano:AcOEt (4:6)	51 – 55
Hexano:AcOEt (98:2)	5 – 10	Hexano:AcOEt (3:7)	56 – 58
Hexano:AcOEt (95:5)	11 – 25	Hexano:AcOEt (1:9)	59 – 61
Hexano:AcOEt (9:1)	26 – 30	AcOEt	62 – 64
Hexano:AcOEt (8:2)	31 – 35	AcOEt: MeOH (9:1)	65 – 66
Hexano:AcOEt (7:3)	36 – 44	AcOEt: MeOH (8:2)	67 – 68
Hexano:AcOEt (6:4)	45 – 57	AcOEt: MeOH (7:3)	69 – 70
Hexano:AcOEt (1:1)	48 – 50		

FRAÇÕES REUNIDAS				
1 – 9	22 – 23	25 – 27	36 – 40	43 – 46
10 – 21	24	28 – 35	41 – 42	47 – 70

Quadro 2: Eluentes utilizados e frações obtidas no fracionamento cromatográfico da subfração 36/40 da fase hexânica de *Helicteres velutina* (Esquema 7, pág. 65)

ELUENTE	FRAÇÕES (100 mL)	ELUENTE	FRAÇÕES (100 mL)
Hexano	1 – 5	Hexano:AcOEt (9:1)	19 – 22
Hexano:AcOEt (98:2)	6 – 7	Hexano:AcOEt (8:2)	23 – 26
Hexano:AcOEt (96:4)	8 – 10	Hexano:AcOEt (7:3)	27 – 32
Hexano:AcOEt (94:6)	11 – 14	Hexano:AcOEt (6:4)	33 – 34
Hexano:AcOEt (92:8)	15 – 18	Hexano:AcOEt (5:5)	35 – 36

FRAÇÕES REUNIDAS		
1 – 5	15 – 16	19 – 26
6 – 14	17 – 18	27 – 36

Quadro 3: Eluentes utilizados e frações obtidas no fracionamento cromatográfico da subfração 43/46 da fase hexânica de *Helicteres velutina* (Esquema 7, pág. 65)

ELUENTE	FRAÇÕES (100 mL)	ELUENTE	FRAÇÕES (100 mL)
Hexano	1 – 2	Hexano:AcOEt (8:2)	24 – 26
Hexano:AcOEt (98:2)	3 – 4	Hexano:AcOEt (7:3)	27 – 28
Hexano:AcOEt (95:5)	5 – 10	Hexano:AcOEt (5:5)	29 – 30
Hexano:AcOEt (92:8)	11 – 16	AcOEt	31 – 33
Hexano:AcOEt (9:1)	17 – 23		

FRAÇÕES REUNIDAS		
1 – 6	17 – 22	26 – 28
7 – 16	23 – 25	29 – 33

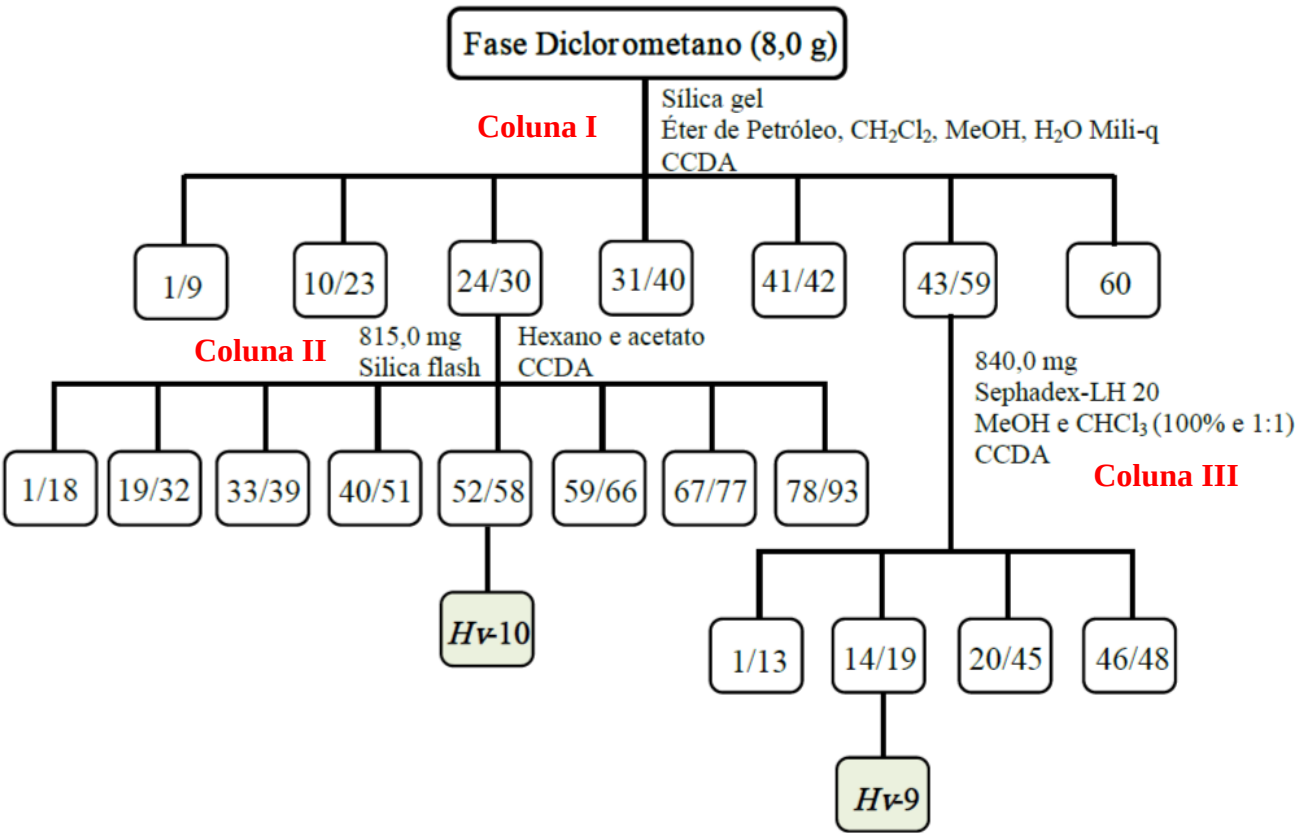
4.5 Processamento cromatográfico da fase diclorometano do EEB das partes aéreas de *H. velutina*

A fase diclorometano (8,0 g) foi submetida a uma CC em sílica flash (coluna I) e eluída com éter de petróleo, diclorometano, metanol e água mili-q sozinhos ou em misturas binárias em grau crescente de polaridade (Quadro 4, pág. 68), de onde foram coletadas 60 frações de 70 mL cada, que foram concentradas em rotaevaporador e reunidas através de análise em CCDA, segundo semelhança do perfil cromatográfico (Esquema 8, pág. 68).

A fração resultante 24/30 (815,0 mg), foi analisada em CCDA e se mostrou promissora, devido observação de manchas isoladas, sendo submetida à processo cromatográfico em sílica flash (coluna II), cujo sistema de eluição foi hexano, acetato de etila e metanol. Este fracionamento resultou em 152 frações de 15 mL cada, que foram concentradas em rotaevaporador, analisadas por CCDA e reunidas de acordo com seu perfil cromatográfico em 8 sub-frações (Esquema 8, pág. 68; Quadro 5, pág. 69). A sub-fração 52/58 (8,0 mg), apresentou-se em forma de pó amarelo-escuro, considerada pura quando analisada por CCDA em vários sistemas de solventes, passando a ser identificada como **Hv-10**.

A fração 43/59 (840,0 mg), oriunda da coluna I, foi submetida a cromatografia em coluna com sephadex LH-20 (coluna III) e eluida com metanol e MeOH:CHCl₃ (1:1) (Quadro 6, pág. 69), obtendo-se 48 frações de 20 mL cada, que foram reunidas em 4 grupos de acordo com suas semelhanças de eluição na CCDA. O grupo 14/19 (15,0 mg), apresentou-se na forma de pó amarelo, sendo posteriormente identificada como mistura e codificada como **Hv-9** (Esquema 8, pág. 68).

Esquema 8. Fracionamento cromatográfico da fase Diclorometano do EEB de *H. velutina*



Quadro 4: Eluentes utilizados e frações obtidas no primeiro fracionamento cromatográfico da fase diclorometano de *Helicteres velutina* (Esquema 8, pág. 68)

ELUENTE	FRAÇÕES (70 mL)	ELUENTE	FRAÇÕES (70 mL)
Éter de petróleo	1 – 4	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	25 – 59
Éter de petróleo: CH ₂ Cl ₂	5 – 20	H ₂ O Mili-q	60
CH ₂ Cl ₂	21 – 24		

FRAÇÕES REUNIDAS		
1 – 9	24 – 30	41 – 42
10 – 23	31 – 40	43 – 59

Quadro 5: Eluentes utilizados e frações obtidas no fracionamento cromatográfico da fração 24/30 da fase diclorometano de *Helicteres velutina* (Esquema 8, pág. 68)

ELUENTE	FRAÇÕES (50 mL)	ELUENTE	FRAÇÕES (50 mL)
Hexano	1 – 8	Hexano:AcOEt (65:35)	51 – 59
Hexano:AcOEt (92:8)	9 – 20	Hexano:AcOEt (6:4)	60 – 67
Hexano:AcOEt (95:5)	21 – 28	Hexano:AcOEt (55:45)	68 – 71
Hexano:AcOEt (9:1)	29 – 33	Hexano:AcOEt (5:5)	72 – 79
Hexano:AcOEt (85:15)	34 – 37	Hexano:AcOEt (45:55)	80 – 82
Hexano:AcOEt (8:2)	38 – 41	Hexano:AcOEt (4:6)	83 – 89
Hexano:AcOEt (75:25)	42 – 47	Hexano:AcOEt (3:7)	90 – 93
Hexano:AcOEt (7:3)	48 – 50		

FRAÇÕES REUNIDAS			
1 – 18	33 – 39	52 – 58	67 – 77
19 – 32	40 – 51	59 – 66	78 – 93

Quadro 6: Eluentes utilizados e frações obtidas no fracionamento cromatográfico da fração 43/59 da fase diclorometano de *Helicteres velutina* (Esquema 8, pág. 68)

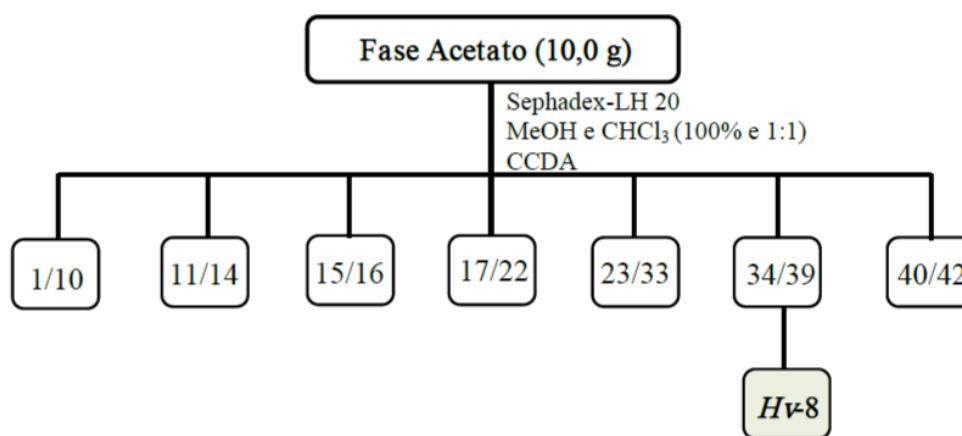
ELUENTE	FRAÇÕES (70 mL)	ELUENTE	FRAÇÕES (70 mL)
Hexano	1 – 3	Hexano:CH ₂ Cl ₂ (4:6)	20 – 23
Hexano:CH ₂ Cl ₂ (9:1)	4 – 5	Hexano:CH ₂ Cl ₂ (3:7)	24 – 27
Hexano:CH ₂ Cl ₂ (8:2)	6 – 8	Hexano:CH ₂ Cl ₂ (2:8)	28 – 32
Hexano:CH ₂ Cl ₂ (7:3)	9 – 11	Hexano:CH ₂ Cl ₂ (1:9)	33 – 36
Hexano:CH ₂ Cl ₂ (6:4)	12 – 15	CH ₂ Cl ₂	37 – 42
Hexano:CH ₂ Cl ₂ (5:5)	16 – 19	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (9:1)	43 – 48

FRAÇÕES REUNIDAS	
1 – 13	20 – 45
14 – 19	46 – 48

4.6 Processamento cromatográfico da fase acetato do EEB das partes aéreas de *H. velutina*

A fase acetato de etila (10,0 g) foi submetida a uma CC-Sephadex LH-20 e fase móvel metanol que forneceu as frações de 1/33 e metanol:clorofórmio (1:1), frações de 34/42, a sub-fração 34/39 (32,0 mg), com aspecto de pó amarelo, foi considerada pura em análise de CCDA eluída em diversos sistemas de solventes, sendo codificado como **Hv-8** (Esquema 9, pág. 70).

Esquema 9. Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila do EEB de *H. velutina*



4.7 Bioensaios

A análise exploratória da atividade inseticida e repelente de *H. velutina* frente ao *Ae. aegypti* foi realizada nas dependências do Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Parasitas e Vetores (LAPAVET), com co-orientação da Prof^a Dr^a Fabíola da Cruz Nunes, no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba.

4.7.1 Obtenção e manutenção do ciclo de vida do *Aedes aegypti*

Os insetos da linhagem Rockefeller João Pessoa, foram obtidos de uma colônia cíclica mantida a mais de sete anos no LAPAVET. As populações da cepa Rockefeller, são caracterizadas como uma linhagem padrão de mosquito, suscetível á classe de inseticidas químicos derivados de produtos naturais. Estes são utilizados como referência em estudos de monitoramento de resistência comparados com os mosquitos existentes nas cidades brasileiras (FRANÇA, 2015; FONSECA et al., 2019).

O ciclo do *Ae. aegypti* é mantido dentro de uma câmara climatizada do tipo Biological Oxygen Demand (BOD), sob condições de temperatura controlada de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar $75 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 12 horas de claro e escuro (WHO, 2013; IMAM et al. 2014; NUNES et al. 2015). A utilização de condições normalizadas de manutenção do ciclo de vida do mosquito para ensaios laboratoriais é essencial para garantir a confiabilidade e reprodutibilidade dos dados (WHO, 2013). Foram utilizados nos experimentos, ovos, larvas no quarto estágio de desenvolvimento (L4), pupas e mosquitos adultos de *Ae. aegypti*.

Inicialmente foram realizados testes preliminares de atividade larvicida com as fases hexânica, diclorometano, acetato de etila, n-butanólica e hidroalcóolica obtidas após partição do EEB das partes aéreas de *H. velutina*, as fases que apresentaram melhor atividade larvicida, foram utilizadas para explorar o potencial ovicida, pupicida e adulticida.

As substâncias isoladas dessas fases que se mostraram mais promissoras após análise *in sílico* frente a proteínas alvos do mosquito, foram avaliadas quanto a sua capacidade larvicida, buscando-se entender o mecanismo de ação envolvidos nas atividades desses compostos.

4.7.2 Ensaio da atividade larvicida

Papeis filtros contendo ovos de *Ae. aegypti* foram imersos em uma bandeja plástica, com cerca de um litro de água destilada, a qual acrescentou-se 0,5 g de ração triturada para auxiliar no desenvolvimento das larvas, que se alimentam de constituintes presentes no meio aquático. Após a eclosão, as larvas foram acompanhadas até que atingisse o quarto estágio de desenvolvimento (L4), o que leva cerca de quatro a cinco dias até que elas atinjam o tamanho ideal para os ensaios, optou-se por trabalhar com larvas L4 pela maior facilidade de visualização e por serem mais resistentes em relação aos estágios mais imaturos de vida do mosquito (PEREIRA et al., 2014).

A atividade larvicida frente ao *Ae. aegypti* das fases hexânica, diclorometano, acetato de etila, n-butanólica e hidroalcóolica foi avaliada de acordo com a metodologia descrita pela WHO (2005). Vinte larvas (L4) de *Ae. aegypti*, foram transferidas do insetário, com auxílio de pipetas Pasteur de plástico, para tubos Falcon contendo 10 mL de solução, as substâncias testes em diferentes concentrações foram diluídas em 30 mL de água destilada (fases n-butanólica e hidroalcóolica) e 29,4 mL de água destilada e 0,6

mL de DMSO 1% (hexano, diclorometano e acetato de etila), sendo a mortalidade analisada após 24 h (Figura 14, pág. 72). A concentração de DMSO foi escolhida para os ensaios, após um teste preliminar para avaliar uma concentração que não fosse tóxica para as larvas do controle, assim como feito em outros estudos (GUARIDO, 2009; OLIVEIRA, 2013; SILVA et al. 2014; BELLÉ, 2017).

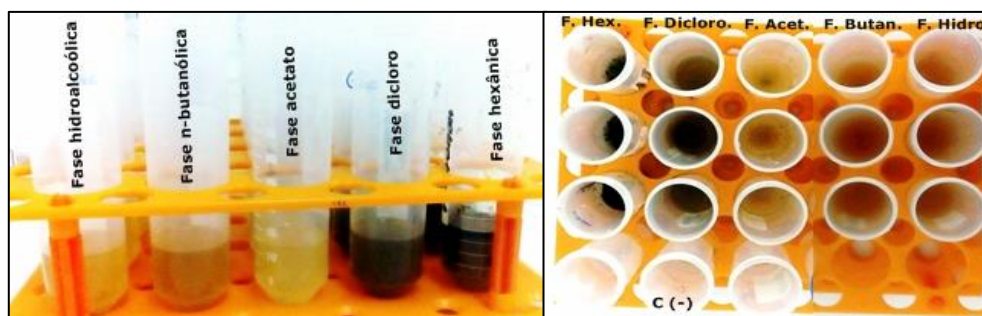
O grupo controle negativo foi dividido em dois grupos, um grupo com água destilada e DMSO 1% e outro apenas com água destilada, ambos contendo 20 larvas L4. O grupo controle positivo foi composto por 20 larvas L4 expostas ao inseticida com composição: Imiprotrina 0,02%, Permetrina 0,05% e Esbiotrina 0,1% (NUNES et al. 2015). As larvas permaneceram em condições ideais de temperatura, umidade relativa e fotoperíodo.

A atividade das substâncias testadas foi estabelecida com base na percentagem média de mortalidade das larvas após 24 horas (> 75% [resultado promissor], 50-75% [parcialmente promissor], 25-50% [fracamente promissor], e <25% [inativo]) (SANTOS, 2012), seguindo a equação 1 (pág. 72).

Equação 1: Determinação da atividade larvicida

$$\text{Porcentagem de mortalidade larval} = \frac{\text{Número de larvas mortas}}{20} \times 100$$

Figura 14: Ensaio larvicida, com fases obtidas do EEB de *H. velutina*



Fonte: FERNANDES, 2018.

O tempo de sobrevivência das larvas foi avaliado nos intervalos de 0, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas. Foram utilizadas concentrações conhecidas, capazes de matar 100% das larvas expostas, a comparação entre as curvas de análises de sobrevivência foi feita

usando os testes de Log Rank (Mantel-cox) e o Chi square através do programa Prisma.

4.7.3 Ensaio de eclodibilidade dos ovos

Com base nos resultados obtidos para atividade larvívora, optamos por dar continuidade aos bioensaios com as fases mais promissoras. A atividade ovívora das frações hexano e diclorometano foi estudada seguindo o método de Reegan et al. (2015).

Discos de papel filtro contendo 30 ovos recém-coletados do insetário, foram expostos a diferentes concentrações das substâncias teste, solubilizados em água destilada e DMSO 1%, colocados em coletores universais (Figura 15, pág. 74). Os ovos foram mantidos nas condições ideais de desenvolvimento e observados ao longo de 600 horas (5°, 10°, 15°, 20° e 25° dias) para contagem de ovos eclodidos, considerando-se como inviáveis os ovos que após 25 dias não eclodiram. Após a eclosão, as larvas foram observadas para avaliar sua sobrevivência e desenvolvimento até a pupação. Os testes foram realizados em triplicata.

O controle negativo (água e DMSO 1%) foi mantido separadamente e a eclodibilidade dos ovos foi observada. Inseticida com composição: Imiprotrina 0,02%, Permetrina 0,05% e Esbiostrina 0,1% foi utilizado como controle positivo. A porcentagem da atividade ovívora foi avaliada conforme a equação 2 (pág. 73).

Equação 2: Determinação da atividade ovívora

$$\text{Porcentagem da atividade ovívora} = \frac{\text{Número de ovos inviáveis}}{30} \times 100$$

4.7.4 Ensaio da atividade pupívora

O teste de atividade pupívora foi avaliado de acordo com o método aplicado pela WHO (2005). Foram utilizadas 20 pupas de *Ae. aegypti* recém-emergidas, com no máximo 24 horas de vida, para cada grupo experimental, as pupas foram transferidas para um copo plástico com volume de 250 mL, contendo 10 mL das frações hexânica ou diclorometânica de *H. velutina* em diferentes concentrações, dissolvidas em água destilada e DMSO 1% (Figura 15, pág. 74). Estes copos foram cobertos com uma tela,

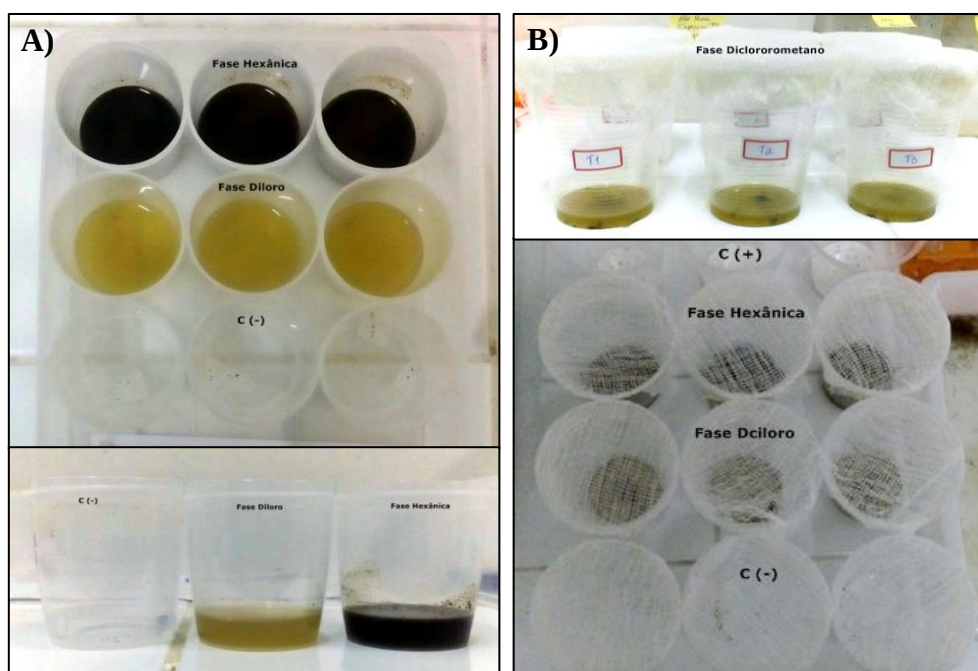
para avaliar a possível emergência de adultos. Cada tratamento foi repetido três vezes e a mortalidade das pupas e emergência dos mosquitos foram registradas após 24, 48 e 72 horas.

O grupo controle negativo consistiu em uma solução de água destilada e DMSO 1%. O controle positivo foi composto por 20 pupas expostas ao inseticida com composição: Imiprotrina 0,02%, Permetrina 0,05% e Esbiotrina 0,1% (NUNES et al. 2015). Para determinar a atividade foi utilizada a equação 3, pág. 74.

Equação 3: Determinação da atividade pupicida

$$\text{Porcentagem de pupas mortas} = \frac{\text{Número de pupas mortas}}{20} \times 100$$

Figura 15: Ensaio das atividades, **A)** ovicida e **B)** pupicida.



Fonte: FERNANDES, 2018.

4.7.5 Ensaio da atividade adulticida

A atividade adulticida das frações de *H. velutina* foi realizada através de testes de contato tarsal e corporal (NUNES et al., 2019a). Para o contato tarsal, a solução teste foi embebida em algodão e passada por toda a parede do copo de plástico de 250 mL, simulando a aplicação intradomiciliar de inseticidas e seu poder residual nas paredes dos

ambientes (Figura 16, pág. 76). Os mosquitos adultos de *Ae. aegypti* (5-6 dias de idade), foram transferidos para esses recipientes previamente tratados com substância teste e observados por 24 e 48 horas.

O teste de contato corporal foi determinado pela aplicação tópica do inseticida nos mosquitos adultos, seguindo versões ligeiramente modificadas dos protocolos padrão da WHO (2009). Os mosquitos foram previamente anestesiados pelo frio e posteriormente receberam 10 µL das soluções das frações hexano ou diclorometano dissolvidas em água destilada e DMSO 1%, em diferentes concentrações, a substância foi aplicada com uma pipeta automática no corpo dos mosquitos, para simular a aplicação direta de inseticidas. Após o contato com a substância-teste, os insetos foram colocados em recipientes plásticos cobertos e observados por 24 e 48 horas (Figura 16, pág. 76).

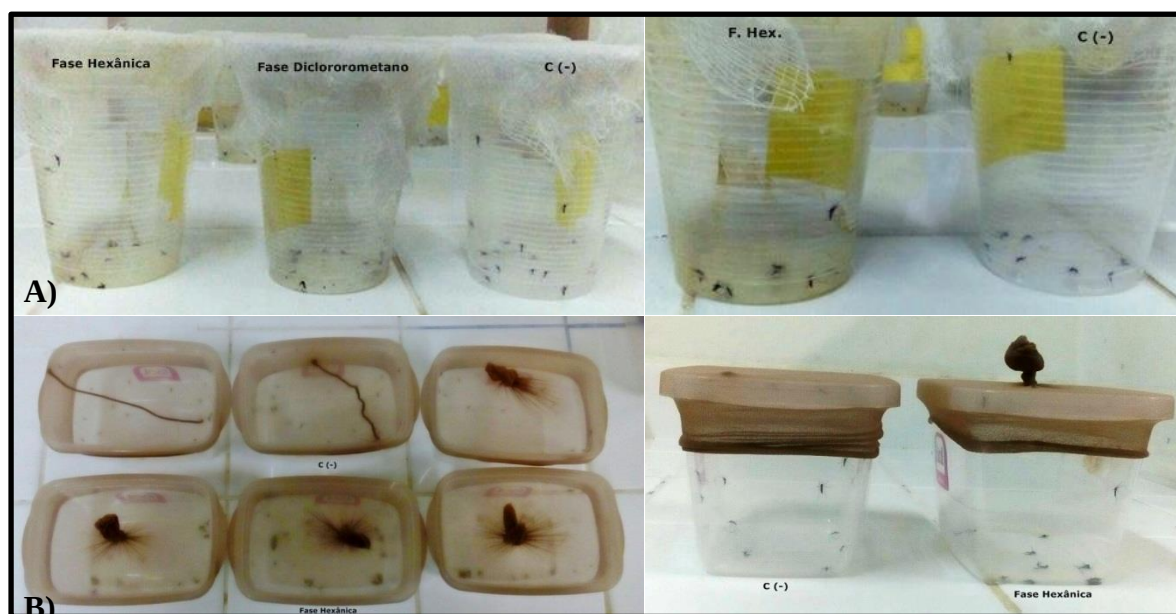
Em ambos os testes, 20 mosquitos foram utilizados e os testes foram realizados em triplicata. Após a aplicação, os mosquitos em todos os grupos foram mantidos em condições ideais de desenvolvimento em recipientes plásticos. No final do período de recuperação de 24 e 48 horas, os mosquitos foram considerados mortos se não apresentassem nenhum sinal de movimento, deitados no fundo do recipiente plástico e não respondendo à estimulação mecânica (CHOOCHOTE et al. 2006).

No grupo controle negativo, as paredes do copo foram tratadas com água destilada e DMSO 1% e no outro receberam individualmente 10 µL da mesma solução. O controle positivo foi composto por 20 mosquitos adultos expostos ao inseticida com composição: Imiprotrina 0,02%, Permetrina 0,05% e Esbiotrina 0,1% (NUNES et al. 2015).

Para determinar as atividades tarsal e corporal foi utilizada a fórmula apresentada na equação 4, pág. 75.

Equação 4: Determinação da atividade aduicida

$$\text{Porcentagem de mosquitos mortos} = \frac{\text{Número de mosquitos mortos}}{20} \times 100$$

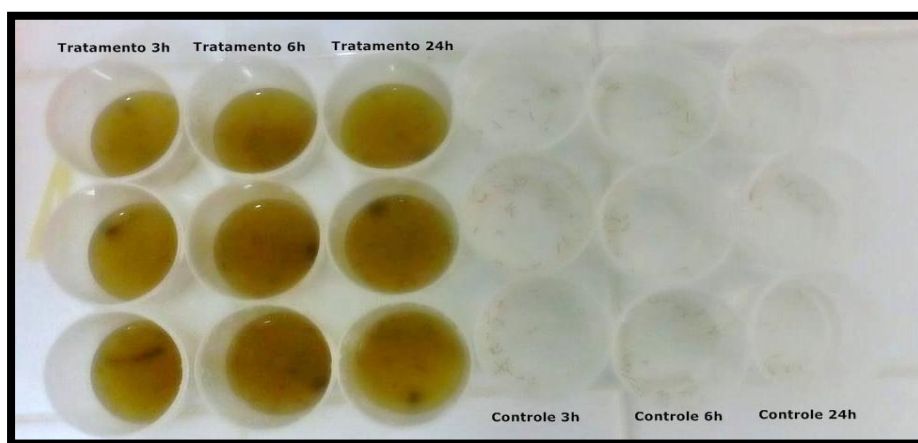
Figura 16: Ensaio da atividade adulticida, **A)** tarsal e **B)** corporal.

Fonte: FERNANDES, 2018.

4.7.6 Determinação da produção de Óxido Nitrico (NO)

A produção de NO pelas larvas expostas as substâncias testes de *H. velutina*, foi determinada com base no reagente de Griess (GREEN *et al.*, 1981). Foram realizadas comparações das concentrações do íon nitrito (NO_2^-) no pool de hemolinfa coletada (conforme descrito no item 4.7.7) nos intervalos de 3, 6 e 24 h após tratamento com a CL_{50} da substância em estudo (Figura 17, pág. 77). Nos grupos controle, as larvas foram expostas a água destilada e DMSO 1%. Os ensaios foram realizados em triplicata. Cada amostra foi composta pela hemolinfa de 20 larvas (L4), diluída em 1,5 mL de tampão PBS. Após centrifugação refrigerada (4 °C) a 1500 rpm durante 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para cubetas de quartzo contendo uma solução de PBS e reagente de Griess (naftilenamida 0,1 % p/v, em ácido ortofosfórico 5% v/v, e 10 μL sulfanilamida 1%) na proporção 1:1.

Para determinar as concentrações de NO_2^- , uma alíquota de cada amostra/intervalo/tratamento foi analisada através da espectrofotometria, a absorbância foi medida analisando-se os comprimentos de onda individuais de cada substância teste, com varredura de 190 a 562 nm. O NO foi quantificado usando uma curva padrão de NaNO_2 como referência.

Figura 17: Determinação da produção de NO

Fonte: FERNANDES, 2018.

4.7.7 Ensaio de citotoxicidade

Para estudar os mecanismos de ação envolvidos na atividade inseticida da *H. velutina* foram realizados ensaios de citotoxicidade com hemócitos (NUNES et al. 2015). Larvas de *Ae. aegypti* (L4) foram expostas a CL₅₀ das substâncias teste durante 24 h. Após esse período em capela asséptica de fluxo laminar, provida de lâmpada UV, vinte larvas vivas foram lavadas em tampão PBS e colocadas sob refrigeração (1-2 minutos) para imobilização. As larvas então foram colocadas em placa de petri, sob uma lupa, onde tiveram a cabeça decapitada com o auxílio de uma lâmina de bisturi e a hemolinfa coletada com o auxílio de um microcapilar de vidro e acondicionada em um microtubo de 1,5 mL contendo 100 µL de tampão PBS.

O pool de hemolinfa foi então centrifugado sob-refrigeração (4 °C) a 1500 rpm durante 10 minutos, posteriormente 20 µL do botão celular foram transferidos para outro microtubo contendo 160 µL de PBS e adicionou-se 20 µL de iodeto de propídio, completando o volume de 200 µL, em seguida incubou-se por 15 minutos no escuro. Com ajuda de uma micropipeta colocou-se uma alíquota de 10 µL da amostra na câmara de Neubauer, a integridade e viabilidade celular foram analisadas com o auxílio de um microscópio de fluorescência, utilizando a objetiva de 20x (SILVA, 2007).

O software ImageJ foi utilizado para auxiliar a medir o diâmetro e área das células, que auxiliam no processo de caracterização das mesmas (ARAÚJO, 2011).

A concentração total das células é dada pela somatória do número de células viáveis (não coradas) mais o número de células não viáveis (coradas) e multiplicado pelo

fator de diluição. As equações 5, 6, 7 e 8 (pág. 78) apresentam os cálculos da concentração total de células, bem como a concentração e porcentagem de células viáveis e necrosadas.

Equação 5. Concentração total de células:

$$(n_V + n_D) \times D \times 10^4 = \text{células/mL}$$

Equação 6. Concentração de células viáveis:

$$n_V \times D \times 10^4 = \text{células/mL}$$

Equação 7. Porcentagem de células viáveis:

$$\frac{n_V}{n_V + n_D} \times 100 = \% \text{ células viáveis}$$

Equação 8. Número de células necrosadas

$$\frac{n_V + n_D}{n_C} \times D \times 10^4 = \text{cells/mL}$$

Onde, n_V = número total de células viáveis; n_D = número total de células não viáveis; n_C = número de quadrantes contados na câmara de Neubauer ($n_C=4$) e D = fator de diluição (no caso descrito $D=10$)

4.7.8 Avaliação da atividade repelente

A repelência contra as fêmeas adultas do *Ae. aegypti* foi avaliada, por meio olfatômetro em Y (Figura 18, pág. 80), construído de acordo com o protocolo da OMS com modificações (WHO, 2013). Foi colocado em cada braço do tubo Y do olfatômetro uma câmara (12 x 8 x 8 cm) com um neonato de rato da linhagem Wistar, obtidos por meio de aprovação no comitê de ética animal (ANEXO F, pág. 249). No braço teste foi aplicado 100 µL da CL₅₀ ou CL₁₀₀ da substância teste no corpo do neonato. No braço controle foi aplicado 100 µL de uma solução de água destilada e DMSO 1%. Como

controle positivo foi utilizado 100 µL do repelente comercial “OFF” que tem como princípio ativo DEET 15% (NUNES et al. 2019a).

Vinte fêmeas vivas em 24h de jejum, foram colocadas no corpo do olfatômetro, em seguida, foram observadas no intervalo de 2 min para registro do braço de escolha (Nunes et al., 2019b). Os testes foram realizados em triplicata. Sendo avaliada a eficácia do repelente ao longo de um período de 4 h com a avaliação nos tempos: 0 min, 30 min, 120 min, e 240 min após aplicação (RODRIGUEZ et al. 2015).

Para avaliarmos o índice de repelência espacial (IRE), foram registrados os mosquitos que optaram por um dos braços, e os que ficaram no eixo do Y-tubo, sendo utilizada a seguinte fórmula, equação 9, pág.79:

Equação 9: Determinação do índice de repelência espacial

$$IRE = \frac{(Bc - Bt)}{(Bc + Bt)} \times \frac{(Bc + Bt)}{(N)}$$

Onde, IRE: Índice de repelência espacial; Bc: Número de mosquitos que optaram pela caixa controle; Bt: Número de mosquitos que optaram pela caixa tratamento e N: Número de mosquitos inseridos inicialmente (20).

Os valores obtidos variam de -1 a 1, valores próximos a -1 indicam atração pela caixa que contém o neonato com tratamento, zero indica que não houve repelência ou atração significativa e 1 indica maior atração pelo braço controle e consequentemente maior atividade repelente das substâncias teste (WHO, 2013).

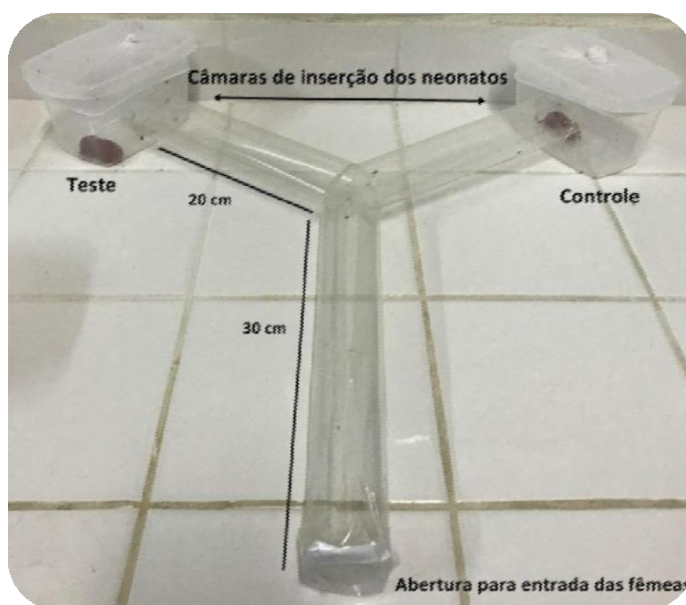
Também foram contabilizados o número de mosquitos que pousaram nos neonatos durante os intervalos, para calcularmos a porcentagem de inibição de pouso proporcionada pelas substâncias testes (Equação 10, pág. 79).

Equação 10: Determinação da inibição de pouso:

$$\text{Inibição do pouso} = \frac{(Pc - Pt)}{(Pc)} \times 100$$

Onde, Pt corresponde ao número de pousos no tratamento e Pc o número de pousos no controle.

Figura 18: Olfatômetro utilizado para teste de repelência



Fonte: FERNANDES, 2018.

4.7.9 Análise estatística

A análise estatística e o cálculo da CL_{50} foram realizados usando o programa GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Diferenças significativas entre os grupos foram analisadas por ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0.05$).

4.8 Química Computacional

4.8.1 Banco de dados

A partir do ChEMBL database, foi selecionado um conjunto de estruturas químicas para a construção do modelo preditivo. O conjunto continha 161 estruturas químicas diversas, que haviam sido estudadas (*in vitro*) para inibir larvas de *Aedes aegypti*. Os compostos foram classificados a partir da pIC_{50} ($-\log IC_{50}$ (mol/l)), tornando possível dividi-los em 85 ativos ($pIC_{50} \geq 4.15$) e 76 inativos ($pIC_{50} < 4.15$). Ressaltando que a IC_{50} representa a concentração necessária para uma inibição de 50% de larvas de *Ae. aegypti*. Através de uma busca bibliográfica, foram ainda acrescentados neste banco 11

flavonoides e o ácido palmítico (Tabela 2, pág. 81) com atividade conhecida contra larvas de *Ae. aegypti*, ficando com um total de 173 moléculas.

Outro banco de dados de moléculas isoladas da espécie *Helicteres velutina* foi construído a partir do estudo fitoquímico dessa espécie.

Para todas as estruturas foram utilizados códigos SMILES como dados de entrada para o Marvin 18.10.0, 2018, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>). Usou-se ainda o software Standardizer [JChem 17.29.0, 2017; ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>)] o qual converte as diversas estruturas químicas em representações canônicas personalizadas. Esta padronização é de suma importância para criar bibliotecas de compostos consistentes, além de obter as estruturas em formas canônicas, adicionar hidrogênios, aromatizar, gerar o 3D e salvar os compostos em formato SDF.

Tabela 2: Substâncias com atividade conhecida para *Aedes aegypti*

Flavonoide	pIC ₅₀ mol/l	Atividade	Referências
1) Poncirin	6.761362846	Ativo	RAJKUMAR, 2008
2) Rhoifolin	6.832901704	Ativo	RAJKUMAR, 2008
3) Naringin	6.67747157	Ativo	RAJKUMAR, 2008
4) Marmesin	6.47758355	Ativo	RAJKUMAR, 2008
5) Karanjin	4.257748484	Ativo	PERUMALSAMY et al. 2015
6) Karanjachromene	4.210512175	Ativo	PERUMALSAMY et al. 2015
7) Dihydrochalcone			
Flavonoid Pongamol	4.057401472	Inativo	PERUMALSAMY et al. 2015
8) Rotenoid Flavonoid			
Pongarotene	3.888135168	Inativo	PERUMALSAMY et al. 2015
9) Quercetin	3.247352956	Inativo	GIKONYO et al. 1998
10) 2', 6'-dihydroxy-4'-methoxy-			
dihydrochalcone	3.252725316	Inativo	GIKONYO et al. 1998
11) Palmitic acid	3.775894398	Inativo	PERUMALSAMY et al. 2015
12) Rutin	2.785700607	Inativo	GUARDA et al. 2016

4.8.2 Descritores Dragon

Foram utilizados descritores moleculares para prever propriedades biológicas e físico-químicas das moléculas dos dois bancos de dados. O cálculo dos descritores é gerado quando as moléculas são transformadas em uma representação molecular que permite o tratamento matemático.

O software Dragon 7.0 (TALETE, 2016) tem a capacidade de calcular 5.270 descritores moleculares, abrangendo várias abordagens teóricas. Estes descritores estão distribuídos em 30 blocos lógicos.

4.8.3 Modelo de Predição

O software Knime 3.1.0 (Knime 3.1.0 the Konstanz Information Miner Copyright, 2003-2014, www.knime.org) foi utilizado para realizar as análises e gerar o modelo *in silico*. Os bancos de moléculas com os descritores calculados foram importados do software Dragon, e para cada um, os dados foram divididos utilizando uma ferramenta “Partitioning” com a opção de “Amostra estratificada”, separando em Treino e Teste, representando 80% e 20% de todos os compostos, respectivamente, onde foram selecionados aleatoriamente, mas mantendo a mesma proporção de substâncias ativas e inativas, em ambos os bancos de dados.

Para a validação interna fez-se uso da validação cruzada, onde foram separados 10 grupos estratificados, selecionados aleatoriamente, mas distribuídos de acordo com a variável da atividade em todos os grupos de validação. Com os descritores selecionados, o modelo foi gerado usando o conjunto de treinamento utilizando o “Random Forest” (RF) algoritmo para construção de árvores de decisão (SALZBERG, 1994), empregado no software WEKA (Waikato Environment for Knowledge Analysis) (HALL, et al., 2009). Os parâmetros selecionados para RF foram de 100 o número total de árvores para construir e de 1 semente (seed) na geração de números aleatórios para o modelo.

As performances dos testes internos e externos dos modelos foram analisadas quanto à sensibilidade (taxa de verdadeiros positivos, ou seja, a taxa ativa), especificidade (verdadeira taxa de negativos, ou seja, a taxa de inativos) e precisão (previsibilidade geral). Além disso, a sensibilidade e especificidade da curva “Receiver Operating Characteristic” (ROC), foi utilizada para descrever o verdadeiro desempenho do modelo, com mais clareza do que precisão.

Foi utilizado ainda o domínio de aplicabilidade baseado nas distâncias euclidianas a fim de sinalizar compostos no conjunto teste para os quais as previsões podem ser não confiáveis. São utilizadas medições de similaridade para definir o domínio de aplicabilidade do modelo com base nas distâncias euclidianas entre todos os compostos de treinamento, teste e da triagem virtual. A distância de um composto teste ao seu vizinho mais próximo no conjunto de treinamento é comparada com o limite de domínio de aplicabilidade predefinido, se a similaridade estiver além desse limite, a previsão é considerada não confiável (ZHANG et al., 2006).

Para o cálculo do domínio de aplicabilidade é utilizada equação 11, pág. 83:

Equação 11: Domínio de aplicabilidade

$$APD = d + Z\sigma$$

Onde, APD: domínio de aplicabilidade; d: distâncias euclidianas para os compostos do conjunto de treinamento; σ : desvio padrão, para os compostos do conjunto de treinamento; Z: valor de corte empírico ($Z = 0,5$).

4.8.4 Docking molecular

As proteínas alvo de *Aedes aegypti* 1YIY (HAN et al., 2005), 1PZ4 (DYER et al., 2003) e 3UQI (RAJAN et al., 2012), com seus respectivos ligantes inibidores foram baixados do Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), detalhes de cada enzima podem ser visualizado na Tabela 3 (pág. 84). As moléculas isoladas da espécie *H. velutina* foram submetidas a acoplagem molecular usando o Molegro Virtual Docker v. 6.0.1 (MVD). Todas as moléculas de água foram excluídas das estruturas de cada enzima. As enzimas e os compostos foram preparados utilizando parâmetros predefinidos no mesmo software. Para procedimento de acoplamento (ligante – enzima) foi utilizada uma grade de 15 Å de raio e 0,30 de resolução que cobre o local do sítio de ligação, definido através de um ligante conhecido para cada enzima. Foi gerado o modelo para realizar o encaixe com características esperadas entre o ligante e a enzima, utilizando o algoritmo Moldock score (GRID- Mapas de grade) com a função de pontuação e o algoritmo de busca foi o Moldock (THOMSEN E CRISTENSEN, 2006).

Tabela 3: Proteínas alvo para *Aedes aegypti*.

Proteína ID	Classificação	Ligantes	Localização
<i>Aedes aegypti</i> kynurenine aminotransferase (1YIY)	Transferase	4'-Deoxy-4'-Aminopyridoxal-5'-Phosphate	Mosquito
Sterol Carrier Protein-2 (1PZ4)	Proteína de ligação de lipídio	Ácido Palmítico	Larva
AaFKBP12 (3UQI)	Isomerase	3 [n-morpholino]propane sulfonic acid	Mosquito

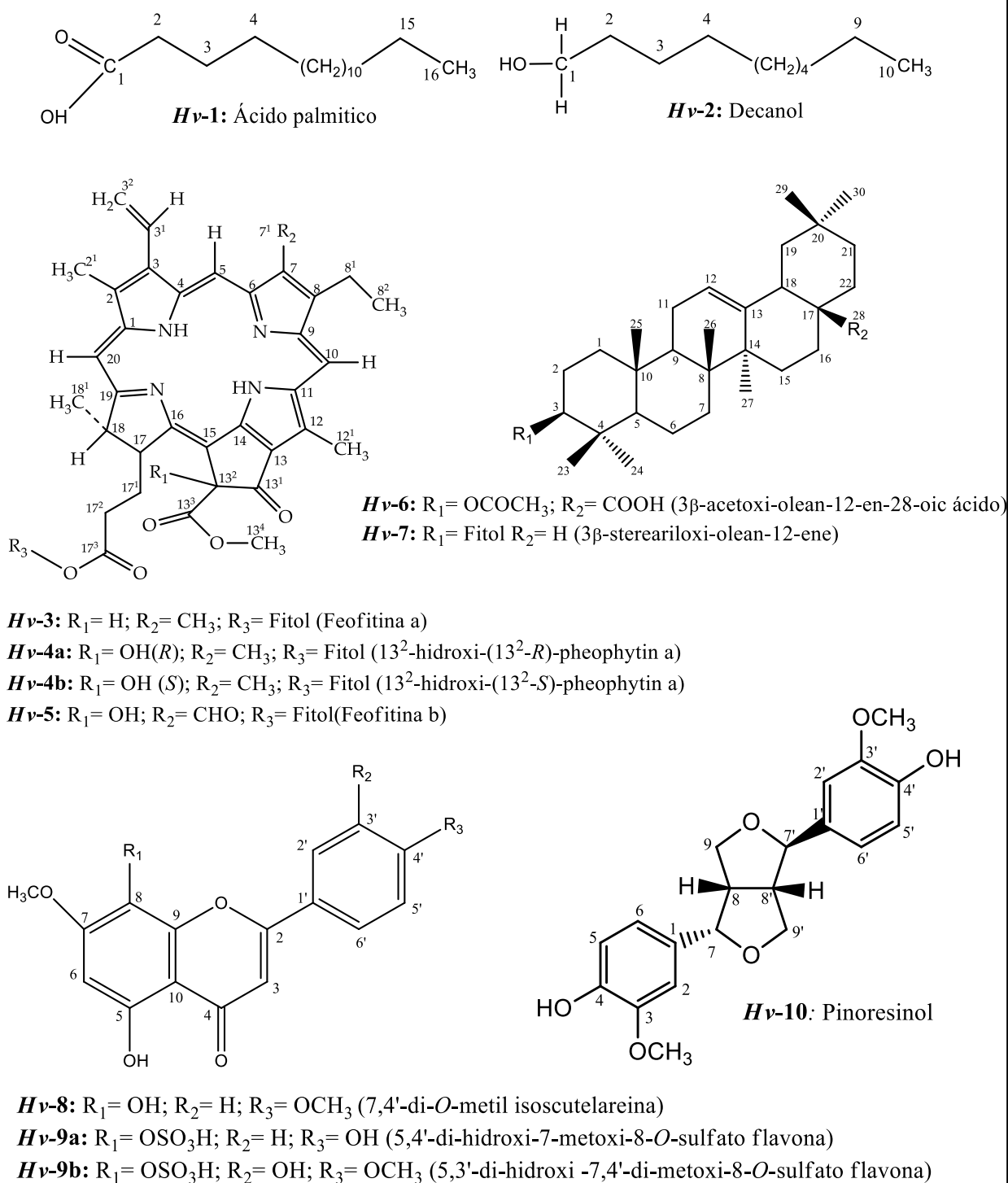
5. Resultados e Discussão



5.1. Substâncias isoladas das partes aéreas de *Helicteres velutina* K. Schum

O estudo fitoquímico das partes aéreas de *Helicteres velutina* conduziu ao isolamento e identificação de 12 constituintes químicos (Quadro 7, pág. 86).

Quadro 7: Substâncias isoladas das partes aéreas de *Helicteres velutina* K. Schum (FERNANDES et al., 2018)



5.2. Caracterização estrutural das substâncias isoladas de *H. velutina* K. Schum

5.2.1. Caracterização estrutural de *Hv*-1

A substância identificada como *Hv*-1 apresentou-se com aspecto de sólido branco ceroso, o que levou a propor tratar-se de um ácido graxo.

Seu espectro de infravermelho (Figura 19, pág. 89) registrou bandas intensas nas regiões de 2.953 cm^{-1} a 2848 cm^{-1} , característico de ligação C-H de grupos metínicos, metilênicos e metílicos. Absorções entre 1.472 cm^{-1} e 1.300 cm^{-1} sugerem que a molécula possui grupo C-H sp^2 . Ainda foi possível observar uma absorção na região de 3.500 cm^{-1} e 1.707 cm^{-1} característica de OH e C=O de ácido, respectivamente, permitiram propor que a substância em questão possui uma função ácido carboxílico insaturado (PAVIA et al., 2010).

O espectro de RMN ^1H de *Hv*-1 (Figura 20, pag. 90) mostrou sinais para hidrogênios ligados a carbonos sp^3 . Um tripleto em $\delta_{\text{H}} 2,34$ ($J=7,48\text{ Hz}$) característico de grupo CH_2 ligado à função ácido carboxílico. A existência de uma metila terminal na estrutura foi sugerida pela presença de um tripleto em $\delta_{\text{H}} 0,87$ (Figura 21, pág. 90). Absorções entre $\delta_{\text{H}} 1,65$ e $1,59$ revela a presença de grupos metilênicos. Integrações para 31 hidrogênios de carbono sp^3 entre $\delta_{\text{H}} 2,34$ e $0,87$ (Tabela 4, pag. 88) juntamente com as bandas para grupo ácido proposto pelo IV, permitiram sugerir que *Hv*-1 tratar-se-ia do ácido palmítico (LASSEN et al. 1995; RAGONA et al. 2000).

O espectro de RMN ^{13}C de *Hv*-1 e sua expansão (Figuras 22 e 23, pág. 91) fortaleceram a proposta de que a substância em análise se tratava do ácido palmítico, ao exibir absorções para carbonila de ácido em $\delta_{\text{C}} 178,64$, um grupo metila terminal em $\delta_{\text{C}} 14,27$ e 14 grupos metilênicos (Tabela 4, pág. 88) (BRITO-FILHO et al. 2017).

Após análise dos espectros de IV e RMN ^1H e ^{13}C unidimensionais, além da comparação com modelos da literatura (Tabela 4, pág. 88), permitiram identificar *Hv*-1 como sendo o ácido palmítico, substância relatada anteriormente nas espécies *Pilosocereus pachycladus* (BRITO-FILHO et al. 2017) e *Helicteres isora* (DAYAL et al., 2015) e descrita pela primeira vez na espécie *H. velutina*.

Diversos estudos com o ácido palmítico provam que ele atua como ligante em proteínas do *Aedes aegypti* (DYER et al. 2003; SINGARAPU et al. 2010; MA et al. 2015). Plantas ricas em ácidos graxos têm apresentado atividade contra insetos (MARANGONI, MOURA, GARCIA, 2012; GARCEZ et al. 2013).

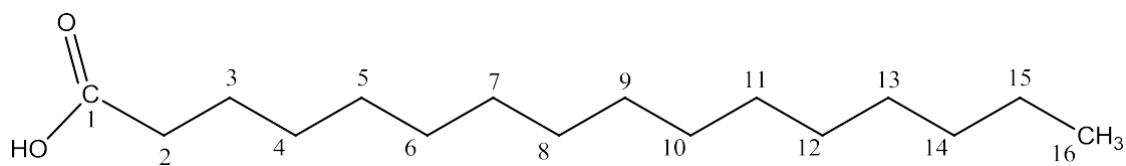
Hv-1: Ácido palmítico

Tabela 4. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de Hv-1 (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz) com modelo da literatura Mo-1 (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz) (BRITO-FILHO et al. 2017).

Mo-1 (Ácido palmítico)			Hv-1	
C	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	180,2	-	178,6
2	2,34 (t, $J= 7,4$ Hz, 2H)	34,0	2,34 (t, $J= 7,4$ Hz, 2H)	33,9
3	-	24,6	-	24,8
4	-	31,9	-	32,0
5	-	29,6	-	29,8
6	-	29,4	-	29,7
7	1,25 (sl, 24H)	29,3	1,25 (sl, 24H)	29,5
8	-	29,2	-	29,4
9	-	29,0	-	29,2
10	-	29,0	-	29,2
11	-	29,5	-	29,5
12	-	29,6	-	29,8
13	-	29,6	-	29,8
14	-	29,6	-	29,8
15	1,59 (q, 2H)	22,6	1,63 (q, 2H)	22,8
16	0,87 (t, $J= 6,4$ Hz, 3H)	14,1	0,87 (t, $J= 6,6$ Hz, 3H)	14,2

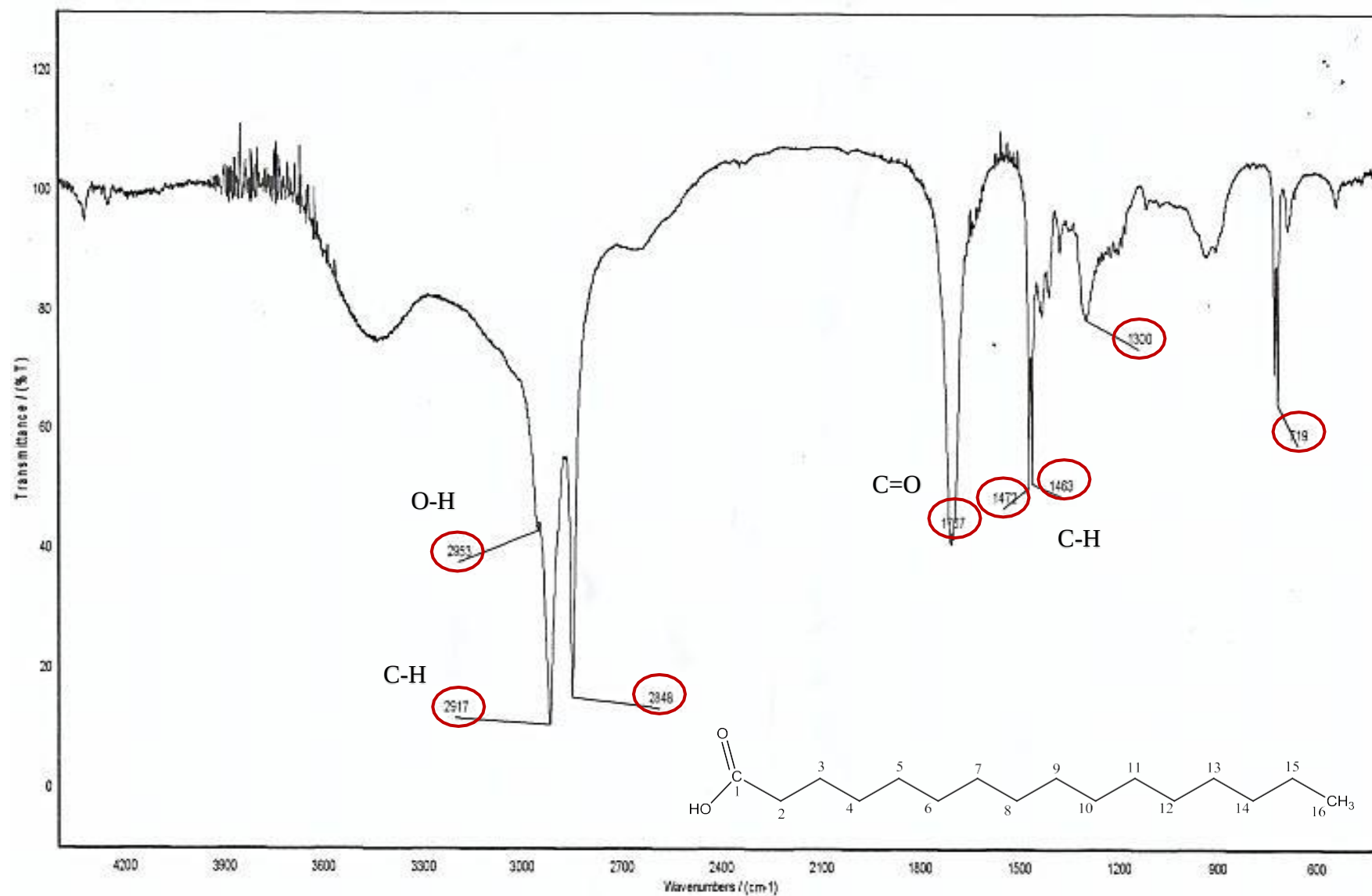
Figura 19. Espectro de IV (cm^{-1} , KBr) de *Hv-1*

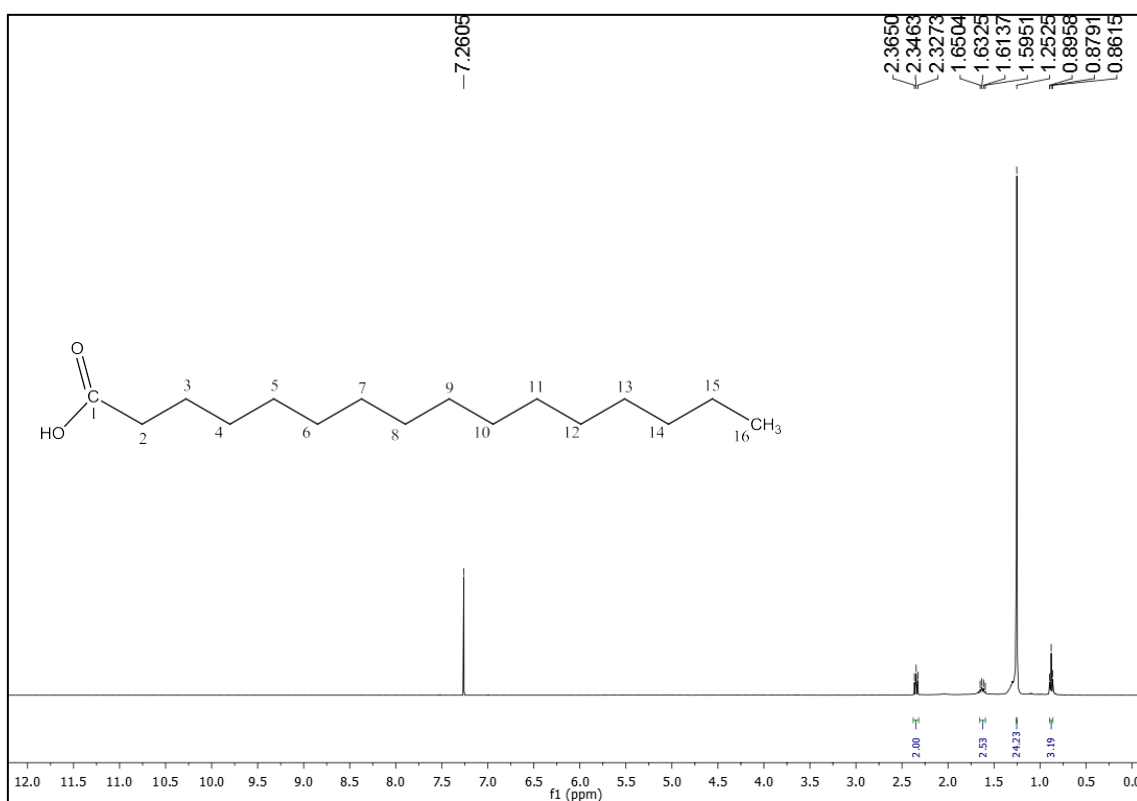
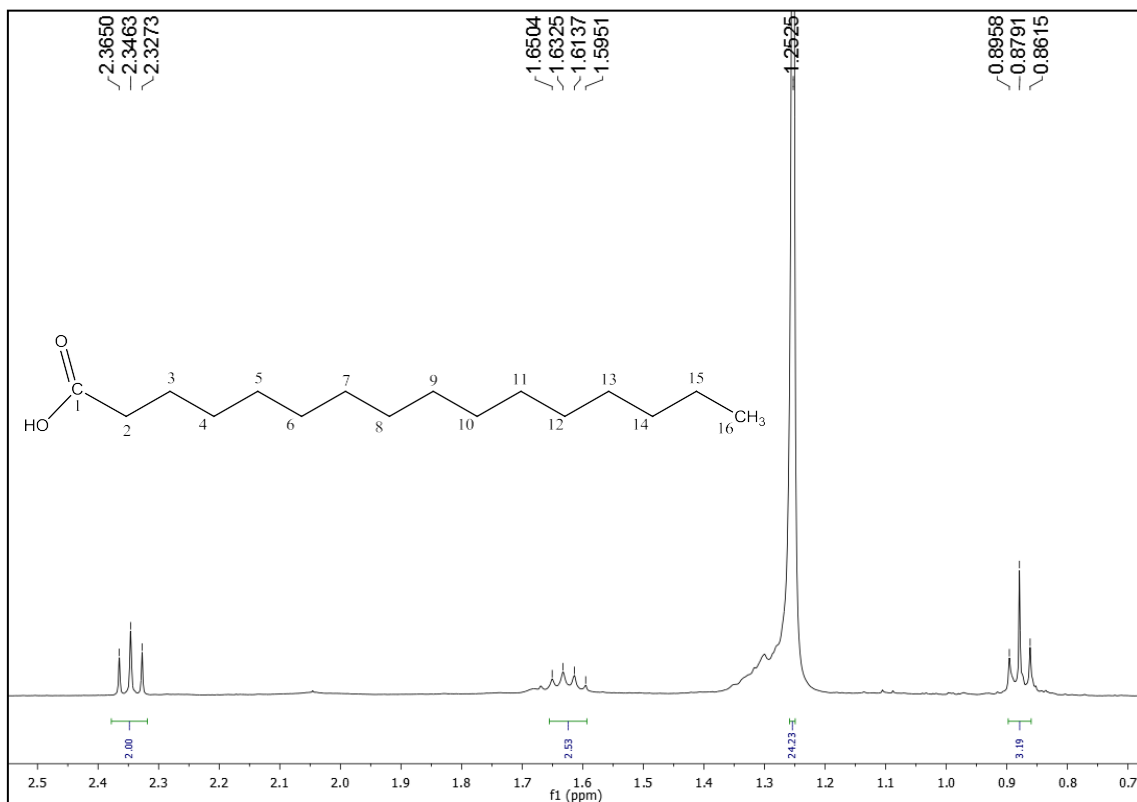
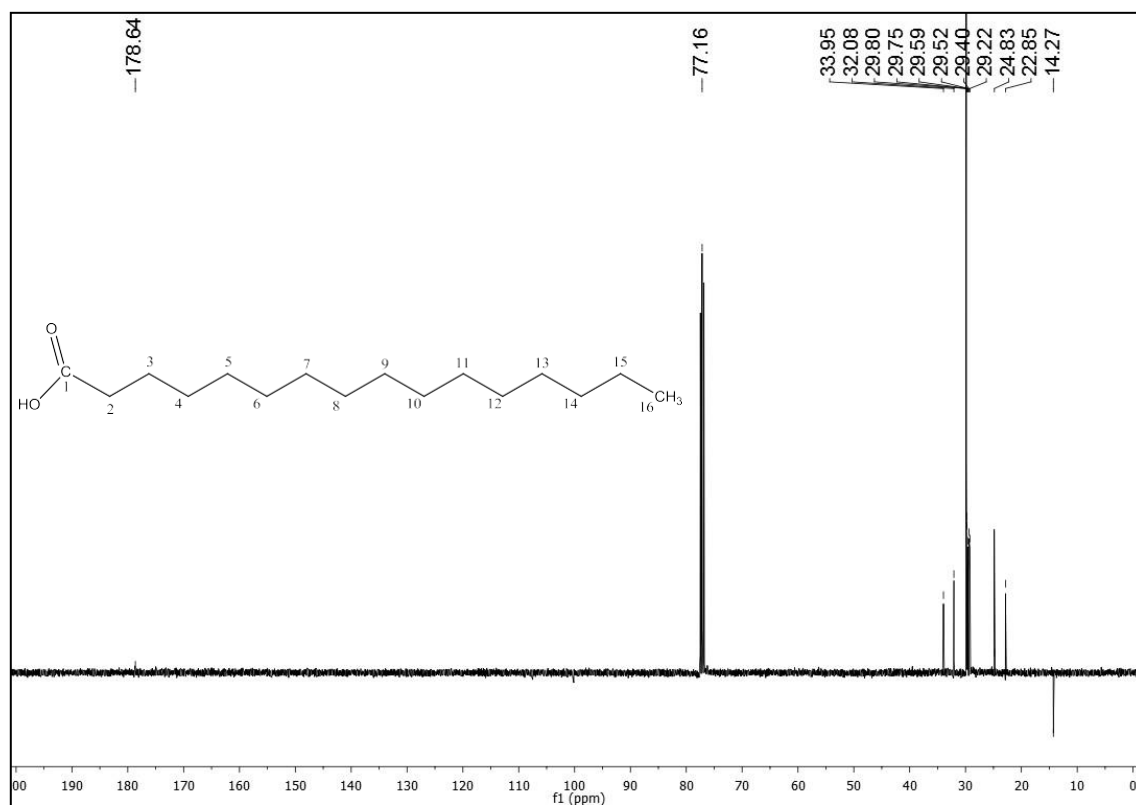
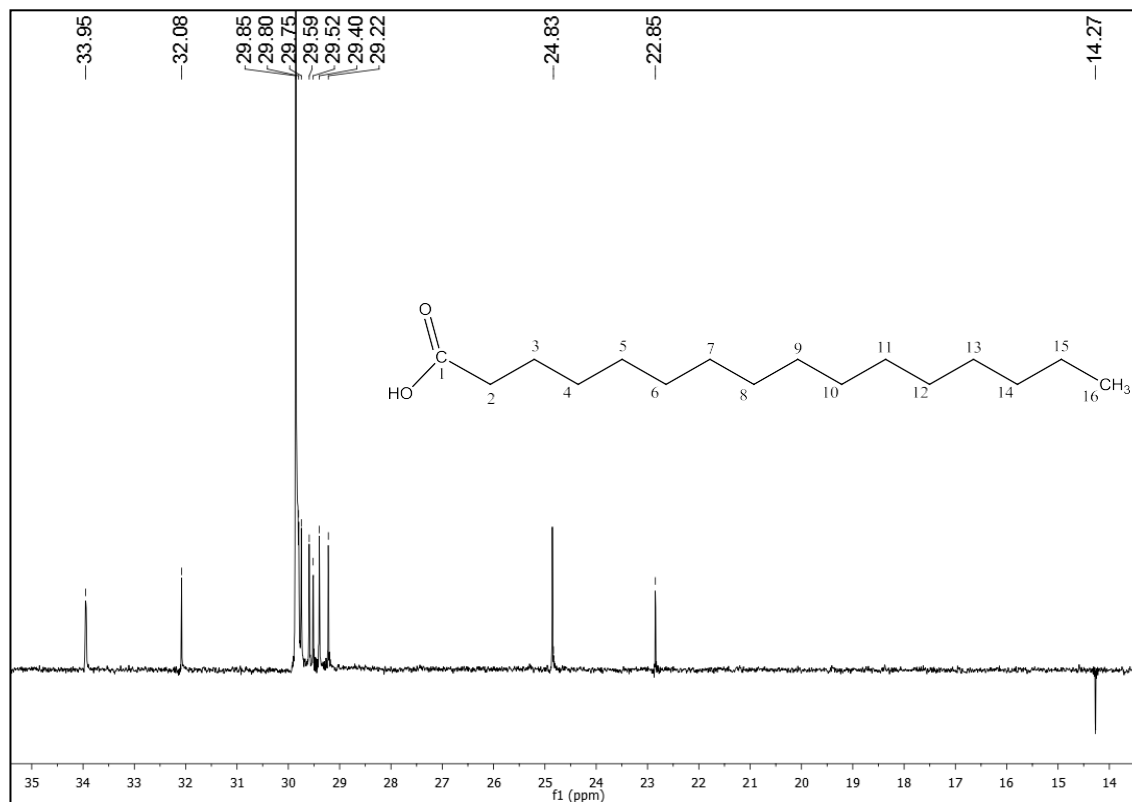
Figura 20. Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de *Hv*-1**Figura 21.** Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de *Hv*-1

Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de *Hv*1**Figura 23.** Expansão do Espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de *Hv*-1

5.2.2. Caracterização estrutural de *Hv*-2

A substância *Hv*-2 de aspecto sólido branco ceroso semelhante a *Hv*-1, nos levou a propor que esta substância também trataria-se de um ácido graxo. todavia seu espectro de IV (KBr) (Figura 24, pág. 94) eliminou essa ideia quando não exibiu bandas para OH e C=O de ácido, mostrou semelhanças com o espectro de *Hv*-1 ao exibir absorções para C-H de carbono sp^3 em 2.954 cm^{-1} a 2848 cm^{-1} . Absorções na região de 1.472 cm^{-1} sugeriu que a molécula possui grupo C-H sp^2 . Ainda foi possível observar uma absorção em 3.500 cm^{-1} e outra em 1082 cm^{-1} típica de estiramento e deformação angular de OH de álcool, levou a propor que a substância em análise se refere a um álcool primário alifático (PAVIA et al., 2010).

O espectro de RMN ^1H de *Hv*-2 (Figura 25, pág. 95) mostrou sinais para hidrogênios ligados a carbono do tipo sp^3 . Um tripleto em $\delta_{\text{H}} 3,63$ (t, $J=6,64\text{ Hz}$) propôs a existência de hidrogênio oximetilênico que acopla com hidrogênios de um grupo CH_2 , fortalecendo a proposta do espectro no IV da existência de uma OH em sua molécula. A existência de uma metila terminal na estrutura foi sugerida pela presença de um tripleto em $\delta_{\text{H}} 0,87$ ($J=6,72\text{ Hz}$). Absorções entre $\delta_{\text{H}} 1,25$ e $1,59$ revela a presença de grupos metilênicos (Figura 26, pág. 95). As integrações para os hidrogênios de carbonos sp^3 levam a propor que *Hv*-2 possui oito grupos CH_2 . Estas absorções quando acrescidas de duas referentes a um grupo metila e uma condizente com CH_2OH , permitiram propor que *Hv*-2 trata-se do decanol (BRITO-FILHO et al. 2017).

O espectro de RMN ^{13}C de *Hv*-2 e sua expansão (Figuras 27 e 28, pág. 96) fortaleceram a proposta de que a substância em análise tratava-se do álcool alifático decanol, ao exibir absorções para dez átomos de carbono, sendo oito metilênicos entre $\delta_{\text{C}} 22,8$ e $\delta_{\text{C}} 32,9$, um carbono oximetilênico $\delta_{\text{C}} 63,2$ e um metílico $\delta_{\text{C}} 14,2$. A compilação dos dados espectrais de IV, RMN ^1H , RMN ^{13}C e dados da literatura (Tabela 5, pág. 93) permitiram propor que *Hv*-2 tratava-se do álcool alifático decanol, substância relatada anteriormente nas espécies *Nicotiana tabacum* (EFSA, 2010) e *Pilosocerus pachycladus* (BRITO-FILHO et al. 2017), sendo descrita pela primeira vez no gênero *Helicteres*.

Essa substância é produzida por plantas com relevância ecológica, podendo ser obtida de folhas de *Nicotiana tabacum* ('tobacco'), família Solanaceae, atuando como regulador de crescimento e comercialmente usado como pesticida (EFSA, 2010). Também há relatos da sua utilização na composição de alguns pesticidas utilizados no controle de artrópodes, produtos estes que renderam patentes (PERRY, 2014; XIE, 2018).

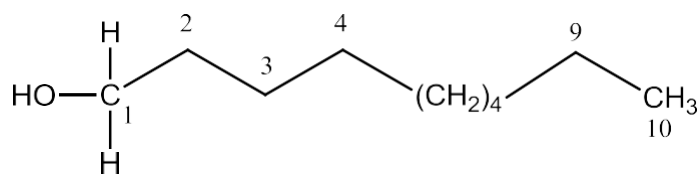
Hv-2: Decanol

Tabela 5. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de Hv-2 (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz) com modelo da literatura Mo-1 (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz) (BRITO-FILHO et al. 2017)

Mo-1 (Álcool alifático decanol)			Hv-2	
C	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
CH₂	3,63 (t, $J=6,56$ Hz, 2H)	63,0	3,63 (t, $J=6,64$ Hz, 2H)	63,2
1	-	32,7	-	32,9
2	-	25,7	-	25,8
3	-	29,3	-	29,5
4	-	29,4	-	29,5
5	1,24-1,69 (m)	29,6	1,25-1,59 (m)	29,8
—	-	29,7	-	29,7
—	-	31,9	-	32,0
—	-	22,6	-	22,8
—	0,87 (t, $J=6,26$ Hz, 3H)	14,1	0,87 (t, $J=6,72$ Hz, 3H)	14,2
CH₃	3,63 (t, $J=6,56$ Hz, 2H)	63,0	3,63 (t, $J=6,64$ Hz, 2H)	63,0

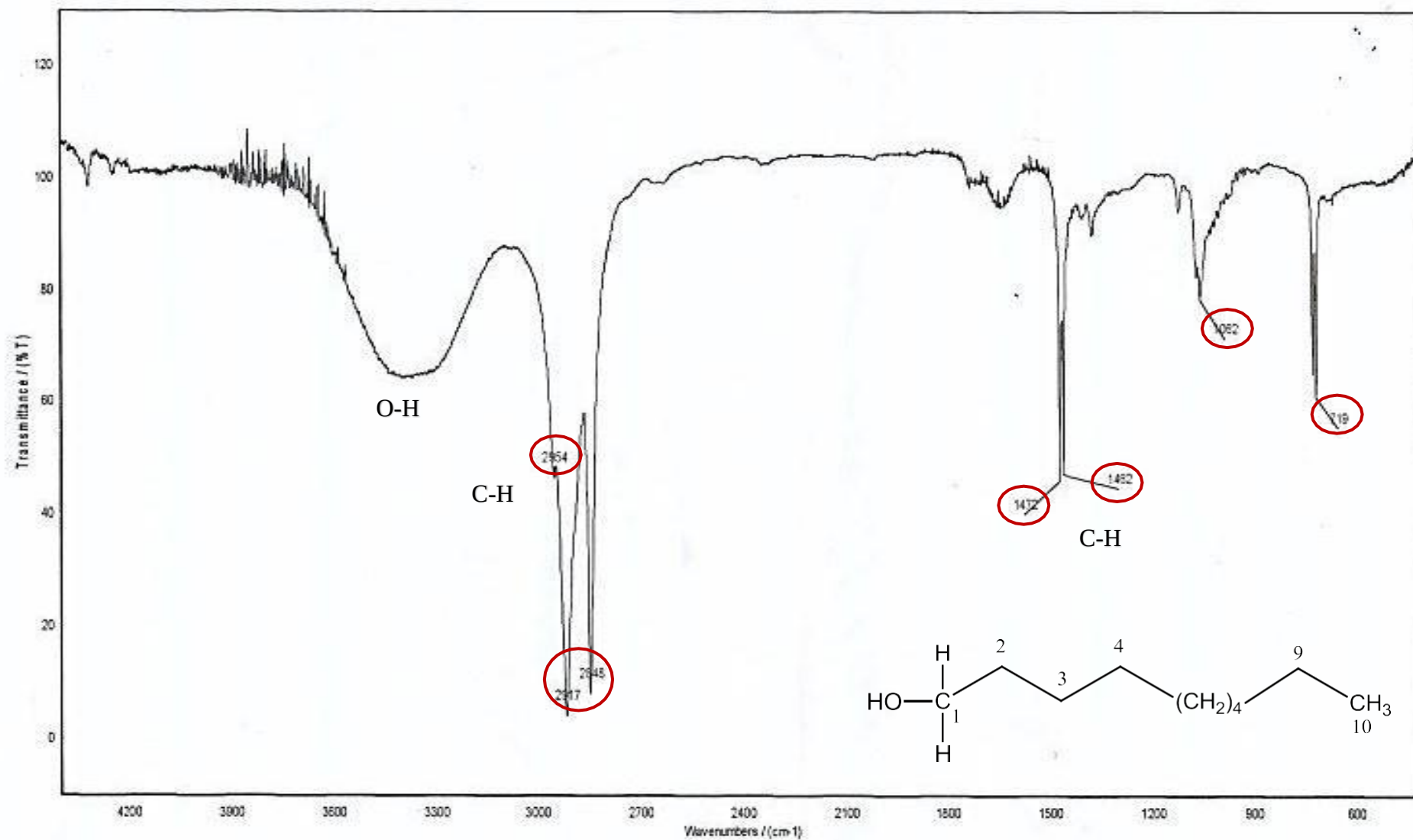
Figura 24. Espectro de IV (cm^{-1} , KBr) de *Hv-2*

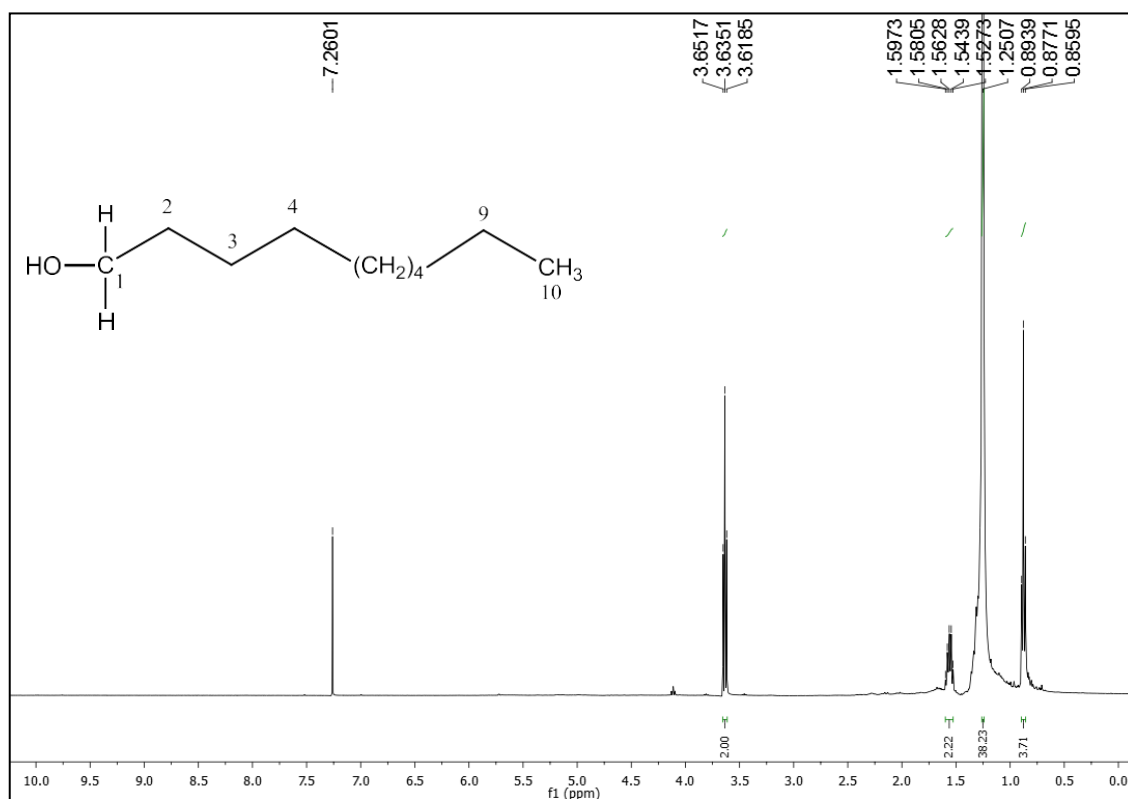
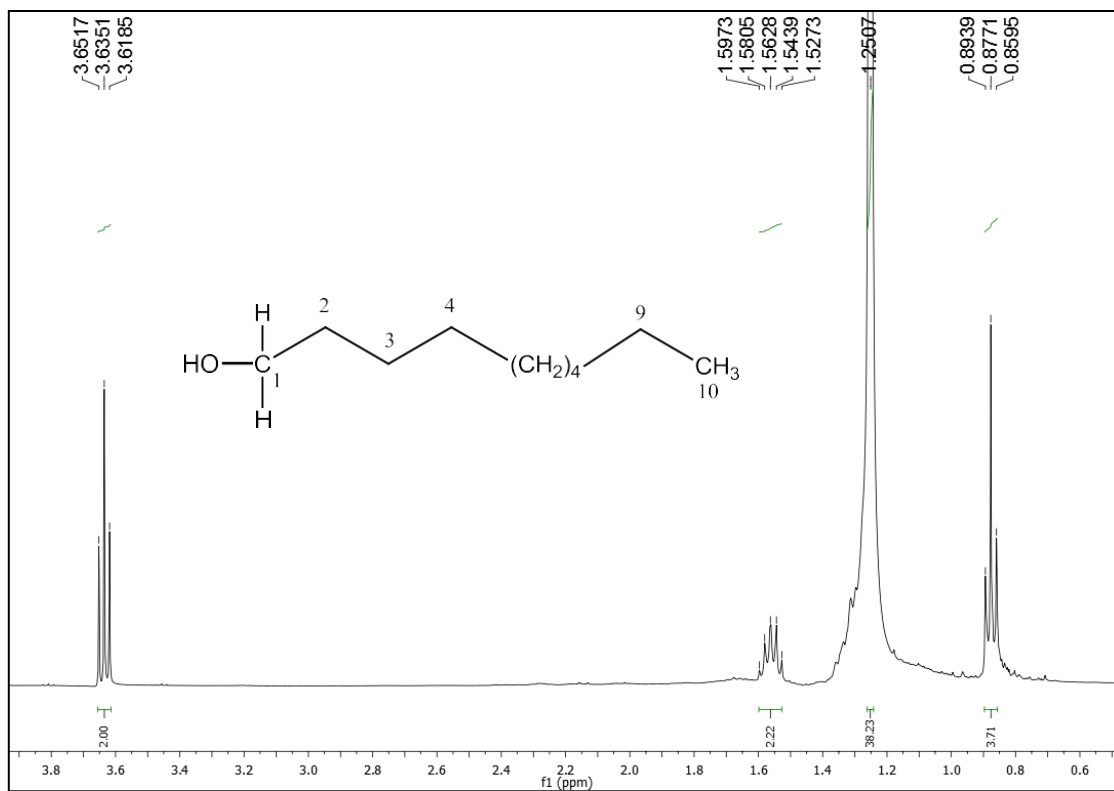
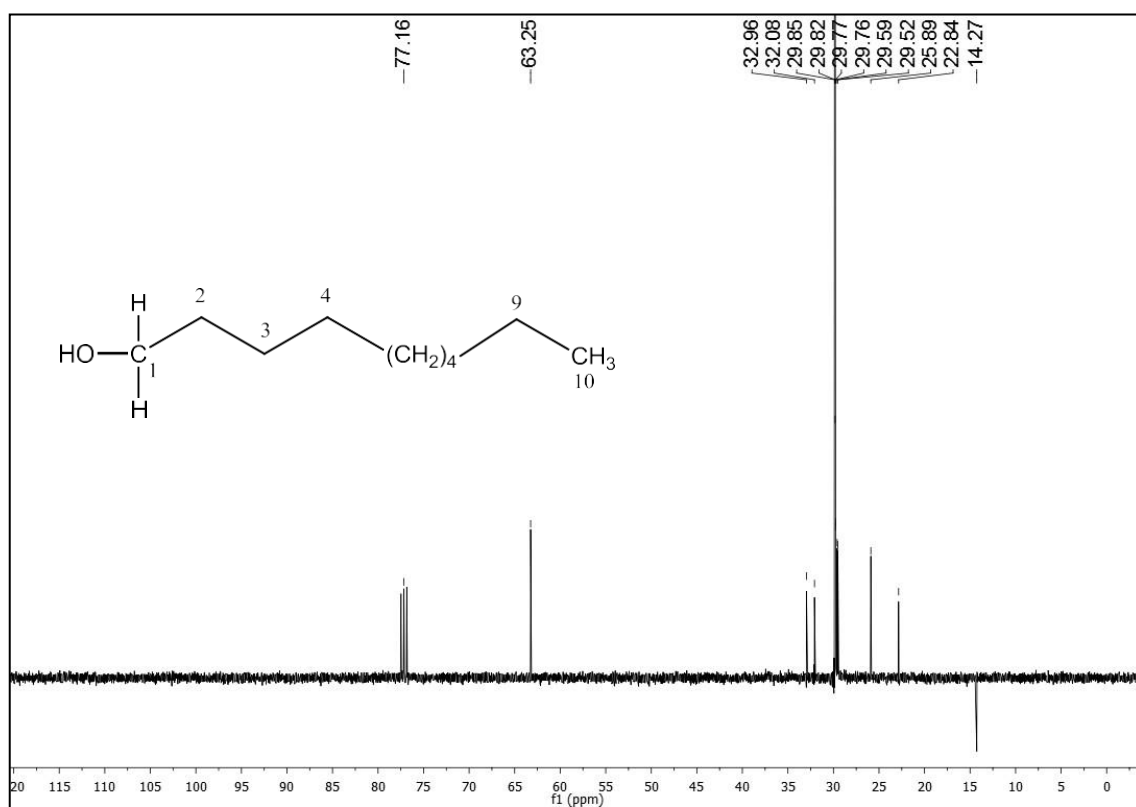
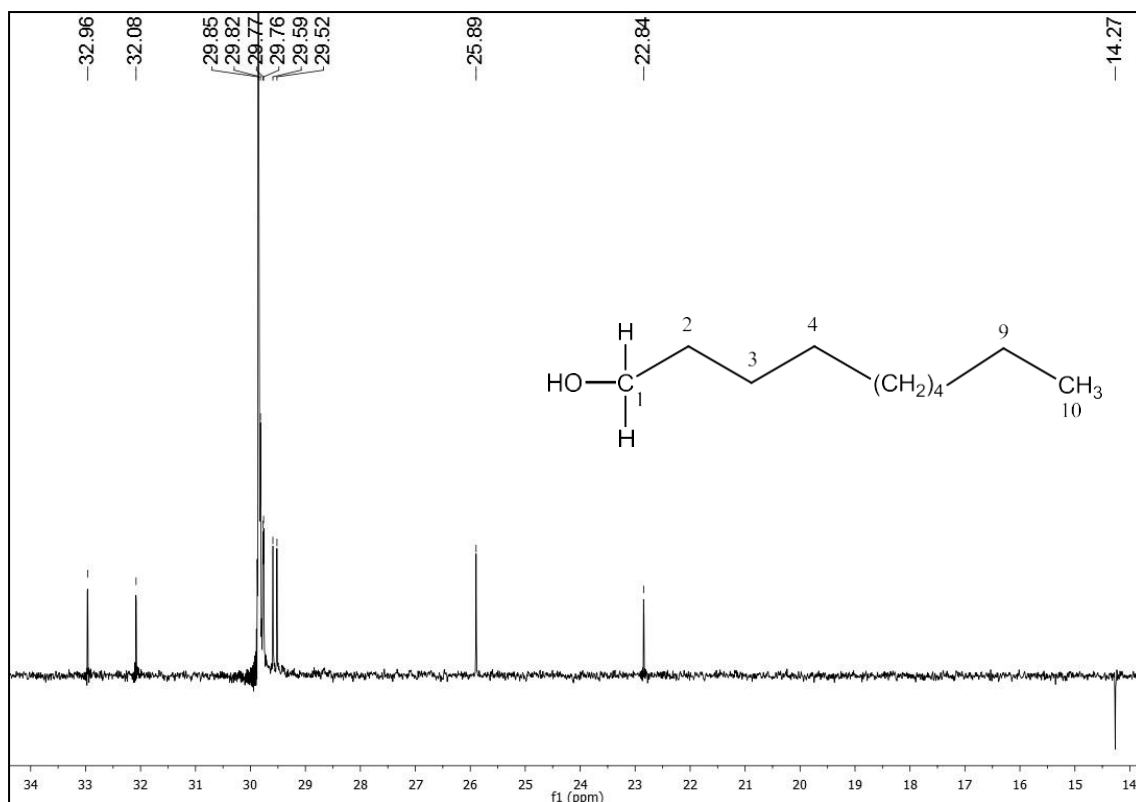
Figura 25. Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de *Hv-2***Figura 26.** Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de *Hv-2*

Figura 27. Espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de *Hv*-2**Figura 28.** Expansão do espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de *Hv*-2

5.2.3. Caracterização estrutural de *Hv*-3

A substância codificada como *Hv*-3 apresentou-se como um sólido amorfo verde escuro. O espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Figura 29, pág. 101) de *Hv*-3 e suas expansões (Figuras 30 a 33, págs. 101 a 103) exibiram absorções que levam a sugerir que está substância possui um núcleo porfirínico. Esta sugestão foi fortalecida pelos sinais para quatro metilas de anéis pirrólicos em δ_{H} 3,82 ($\text{CH}_3\text{-}12^1$); 3,38 ($\text{CH}_3\text{-}2^1$); 3,19 ($\text{CH}_3\text{-}7^1$) e 1,80 ($\text{CH}_3\text{-}18^1$), correspondendo às metilas dos anéis III, I e II, IV do núcleo porfirínico, respectivamente (Tabela 6, pág. 99). O sinal em δ_{H} 3,19 atribuído ao $\text{CH}_3\text{-}7^1$ permitiu propor que *Hv*-3 trata-se da feofitina a, uma vez que a feofitina b possui em C-7 1 um grupo aldeído (BRITO-FILHO et al., 2014; TELES et al. 2014).

Ainda analisando o espectro de RMN ^1H e suas expansões se fortalece a proposta do núcleo porfirínico ao observar sinais para hidrogênios vinílicos *Ha* - 3 1 em δ_{H} 7,96 (dd, $J=17,96$ Hz e 11,28 Hz) que acopla *trans* com *Hc* - 3 2 em δ_{H} 6,28 (dd, $J=17,8$ Hz) e *cis* com *Hb* - 3 2 em δ_{H} 6,16 (dd, $J=11,56$ Hz e 3,0 Hz). Este por sua vez acopla geminado com *Hc* - 3 2 ($J=3,0$ Hz) (Figuras 30 e 31, págs. 101 e 102). Foram ainda observados sinais para três hidrogênios olefínicos em δ_{H} 9,33, δ_{H} 9,48 e δ_{H} 8,55 condizentes com os hidrogênios H-5, H-10 e H-20 respectivamente, do núcleo porfirínico das feofitinas (Figura 30, pág. 101) (CHAVES et al. 2013; FERNANDES et al. 2013; TELES et al. 2015a). Um singlete largo em δ_{H} 3,89 (H-13 4) com integração para três hidrogênios é característico de metoxila. Um tripleto em δ_{H} 1,62 (Figura 33, pág. 103) condiz com hidrogênios do grupo CH_3 , da posição C-8 2 . Um singlete em δ_{H} 6,27 condizente com o hidrogênio da posição 13 2 , indicando que o referido núcleo porfirínico seria hidrogenado naquela posição (Figura 31, pág. 102).

Foi possível sugerir que a substância em análise possui em sua estrutura o grupo fitil éster em C-17 3 . Esta sugestão baseou-se na existência de um envelope referente a sinais para hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos entre δ_{H} 0,8 e 2,0 (BRITO-FILHO et al., 2017). A localização do grupo fitil éster no C-17 3 de *Hv*-3 fundamentou-se também quando comparados os dados desta molécula com o 17 3 - etoxifeoforbídeo (CHAVES et al. 2013), que não possui o referido grupo (Tabela 6, pág. 99). A compilação destes dados em consonância com os dados da literatura (Tabela 6, pág. 99) levaram a sugerir que *Hv*-3 possui o núcleo porfirínico e um grupo fitila (Tabela 7, pág. 100) podendo tratar-se da feofitina a.

A análise dos espectros de RMN ^{13}C -APT (Figuras 34 a 36, págs. 103 e 104, Tabelas 6 e 7, págs. 99 e 100) revelou picos para 55 átomos de carbono, onde pôde-se definir 19 não hydrogenados, 11 metínicos, entre os quais um vinílico em δ_{C} 129,0 (C-3¹), 14 metilênicos, com destaque também para um carbono vinílico em δ_{C} 122,8 (C-3²) e 11 metílicos com um sinal em δ_{C} 52,9, típico de CH₃ de metoxila de éster, que fortalece a sugestão do RMN¹H para a existência desse grupo em *Hv*-3 (Tabela 6, pág. 99). Um envelope de sinais com 17 absorções referentes aos carbonos metínicos, metilênicos e metílicos foram atribuídos ao radical fitila. Outros dados que fortaleceram a presença do referido radical em *Hv*-3 foram três sinais: um em δ_{C} 61,6 atribuído ao carbono oximetilênico (CH₂-P₁) e dois referentes aos carbonos olefínicos (CH-P₂) em δ_{C} 117,8 e (CH-P₃) em δ_{C} 142,1 (Tabela 7, pág. 100).

Os demais assinalamentos de carbonos no que diz respeito à cadeia lateral de fitol foram determinados com base em comparação com dados da literatura (TELES et al. 2014) (Tabela 7, pág. 100), permitindo identificar a substância *Hv*-3 como sendo a Feofitina a, descrita anteriormente nas espécies *Sida rhombifolia* (CHAVES et al. 2013) e *H. isora* (BAI, 1954) e pela primeira vez na espécie *H. velutina*.

A clorofila *a* pode ser considerada como o pigmento mais recorrente desta classe de compostos (75% dos pigmentos verdes presentes nas plantas), sendo empregada em várias composições farmacêuticas, como cosméticos, materiais de higiene bucal, em dietas, culinária e até mesmo em alguns detergentes (MAESTRIN et al. 2009).

***Hv*-3: Feofitina a**

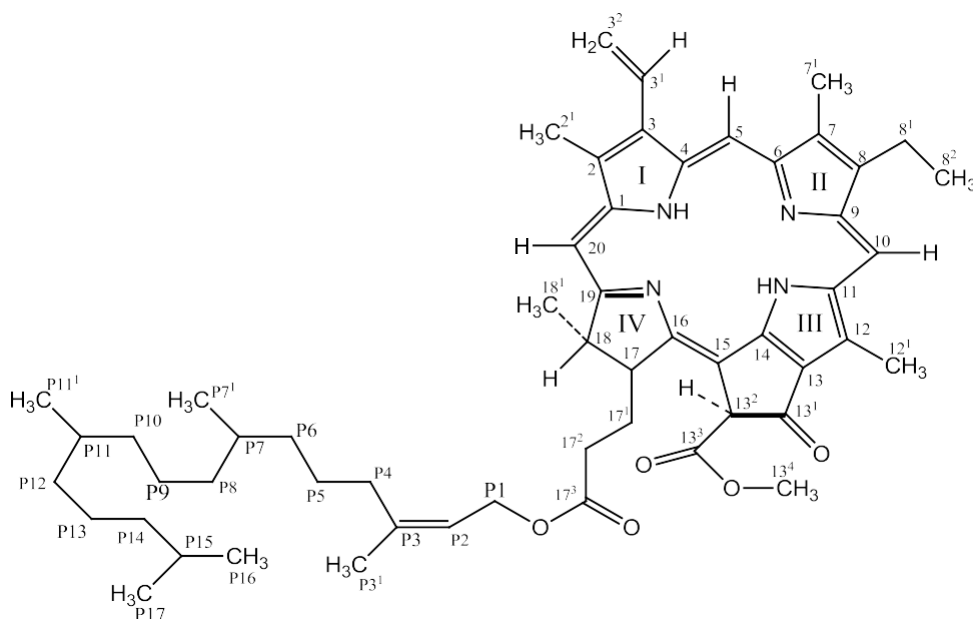
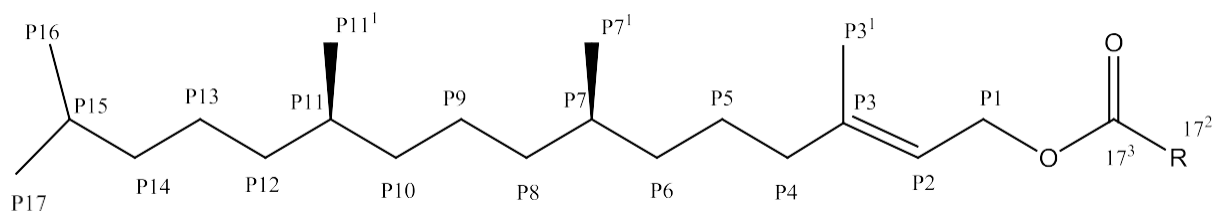


Tabela 6. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de *Hv-3* (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz) com os modelos Mo-1 (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz) (BRITO-FILHO et al., 2017) e Mo-2 (δ , CDCl_3 , 500 e 125 MHz) (CHAVES et al., 2017).

	Mo-1 (13²-hidroxi-feofitina a)		Mo-2 (17³-etoxi-feoforbídeo a)		<i>Hv-3</i>	
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	142,7	—	141,9	—	142,9	—
2	132,0	—	131,7	—	131,9	—
2 ¹	12,0	3,40 (s)	12,0	3,33 (s)	12,1	3,38 (s)
3	136,6	—	136,0	—	138,6	—
3 ¹	129,0	7,98 (dd- $J=17,81$ e $11,51$ Hz)	128,8	7,79 (dd, $J=17,87$ e $11,55$ Hz)	129,0	7,96 (dd- $J=17,96$ e $11,28$ Hz)
3 ²	122,9	6,28 (trans) (dd- $J=17,78\text{Hz}$) e 6,17(Cis) (dd- $J=11,51$ e $1,0$ Hz)	122,5	6,16 (d, $J=17,87$ Hz) e 6,08 (d, $J=11,55$ Hz)	122,8	6,28 (trans) (dd- $J=17,8\text{Hz}$) e 6,16(Cis) (dd- $J=11,56$ e $3,0$ Hz)
4	136,4	—	136,3	—	136,3	—
5	97,5	9,38 (s)	97,3	9,09 (s)	97,6	9,33 (s)
6	155,5	—	155,4	—	155,7	—
7	135,8	—	135,9	—	136,2	—
7 ¹	11,2	3,21 (s)	10,9	3,00 (s)	11,3	3,19 (s)
8	145,0	—	144,9	—	145,3	—
8 ¹	19,4	3,68 (s, 2H)	19,2	3,43 (q)	19,8	3,67 (s, 2H)
8 ²	16,2	1,69 (t) $J=7,55\text{Hz}$	17,2	1,60 (t, $J=7,6$ Hz)	17,5	1,62 (t)
9	150,0	—	150,8	—	159,7	—
10	104,4	9,53 (s)	104,1	9,30 (s)	104,5	9,48 (s)
11	138,0	—	137,8	—	138,0	—
12	129,1	—	128,8	—	129,1	—
12 ¹	12,0	3,82 (s)	11,9	3,65 (s)	12,2	3,82 (s)
13	129,1	—	128,8	—	129,1	—
13 ¹	189,5	—	189,6	—	189,7	—
13 ²	64,7	6,27 (s)	64,7	6,31 (s)	64,8	6,27 (s)
13 ³	169,4	—	172,9	—	169,7	—
13 ⁴	52,8	3,88 (s)	52,8	3,95 (s)	52,9	3,89 (s)
14	150,0	—	149,6	—	151,1	—
15	105,6	—	105,2	—	105,3	—
16	161,3	—	161,2	—	161,3	—
17	51,3	4,16 (m)	51,2	4,26 ($J=8,3$ Hz)	51,2	4,16 (m)
17 ¹	29,6	—	29,8	1,29 (sl)	29,8	—
17 ²	31,2	—	31,3	2,25-2,39 (m)	31,3	—
17 ³	173,8	—	172,1	—	173,0	—
18	50,1	4,47 (m)	60,5	4,09 (m)	50,2	4,48 (m)
18 ¹	23,0	1,81 (d)	14,1	1,17 ($J=7,0$ Hz)	23,2	1,81 (d)
19	172,8	—	50,1	4,51 (m)	172,3	—
20	93,5	8,58(s)	23,1	1,88 (d, $J=7,35$ Hz)	93,2	8,55(s)

Tabela 7. Dados comparativos de RMN ^{13}C da cadeia fitil éster de *Hv-3* (δ , CDCl_3 , 100 MHz) com o modelo Mo-1 (TELES, 2015).



	Mo-1	<i>Hv-3</i>
C	δ_{C}	δ_{C}
P1	62,07	61,60
P2	117,62	117,85
P3	142,84	142,95
P4	39,74	40,82
P5	25,58	26,54
P6	37,32	37,51
P7	32,70	32,88
P8	37,25	37,38
P9	24,37	24,59
P10	37,19	37,04
P11	32,55	32,73
P12	37,25	37,44
P13	24,82	24,89
P14	39,30	39,50
P15	27,92	28,11
P16	22,67	23,58
P17	22,55	22,82
P11 ¹	19,62	19,78
P7 ¹	19,68	19,84
P3 ¹	16,25	17,53

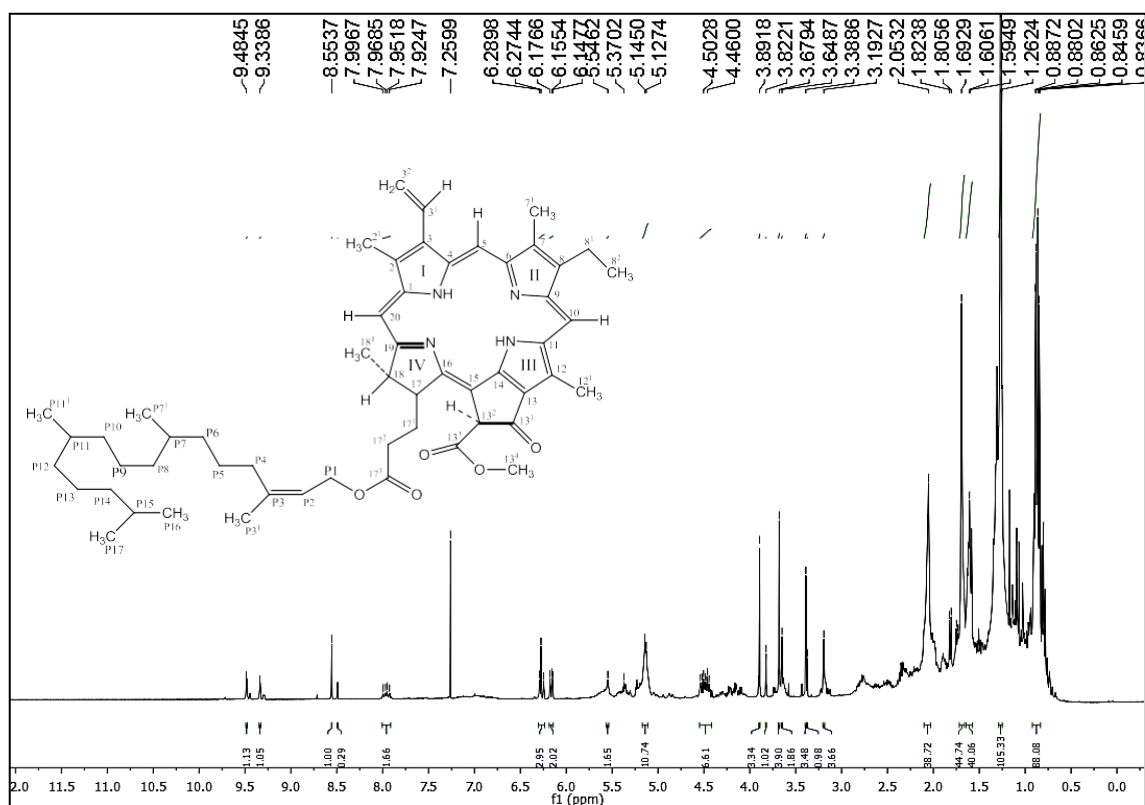
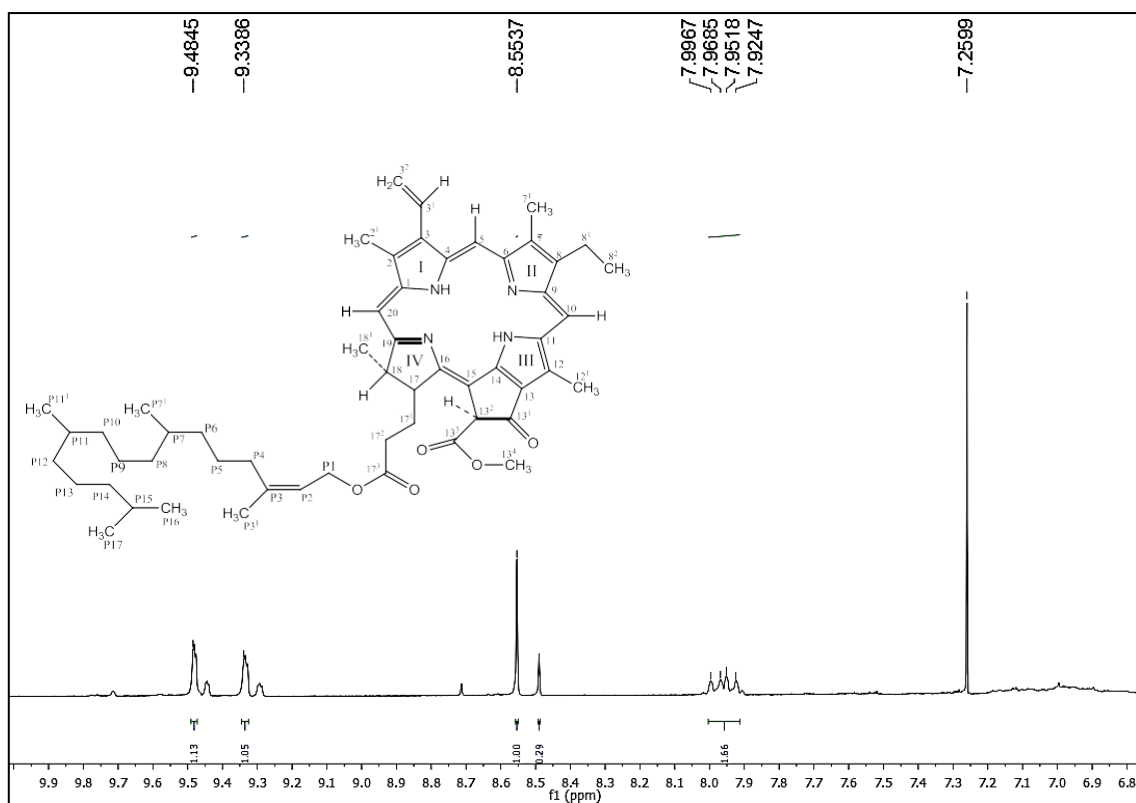
Figura 29. Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de *Hv*-3**Figura 30.** Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 6,80 e 9,90 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de *Hv*-3

Figura 31. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 4,10 e 6,70 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de *Hv-3*

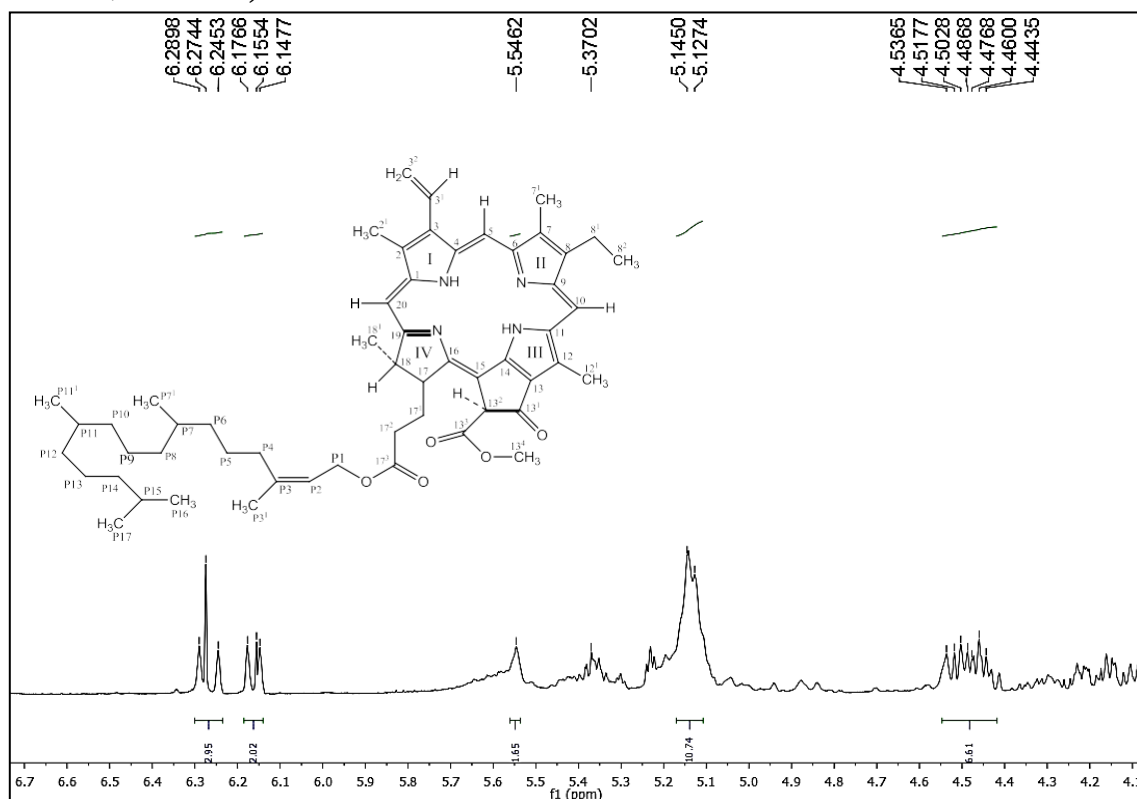


Figura 32. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 2,95 e 4,20 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de *Hv-3*

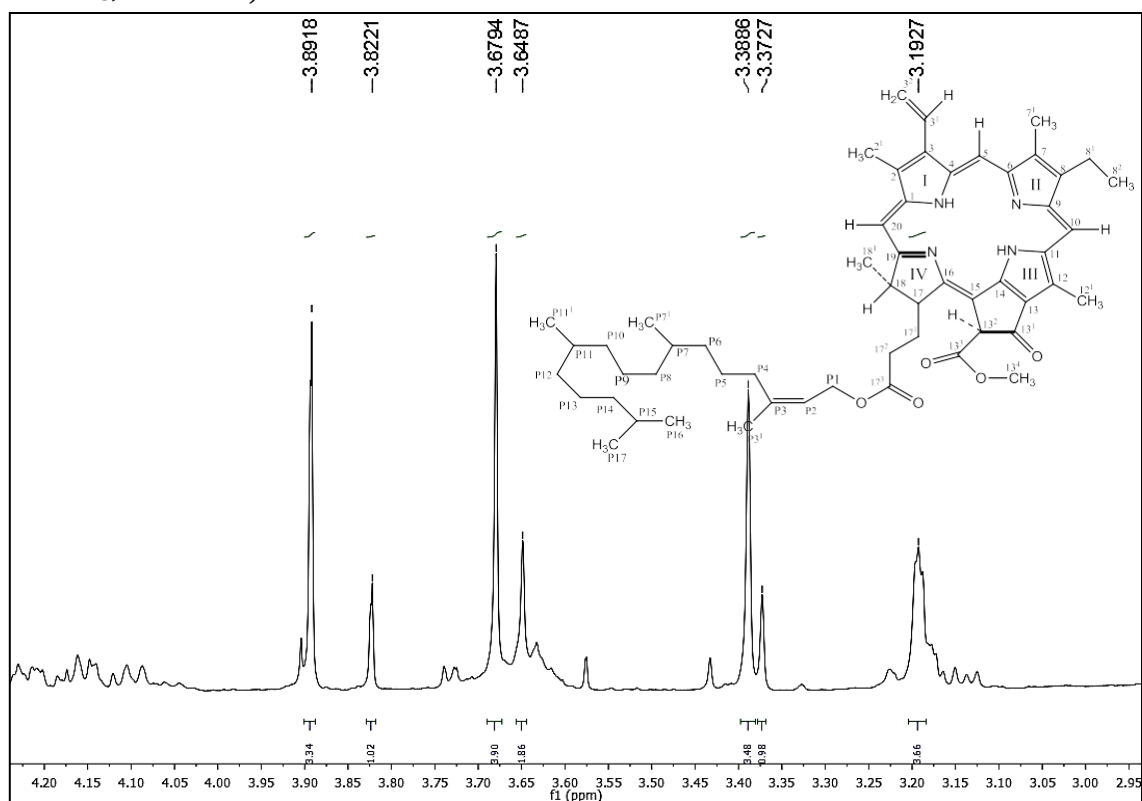


Figura 33. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 0,60 e 2,80 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de *Hv-3*

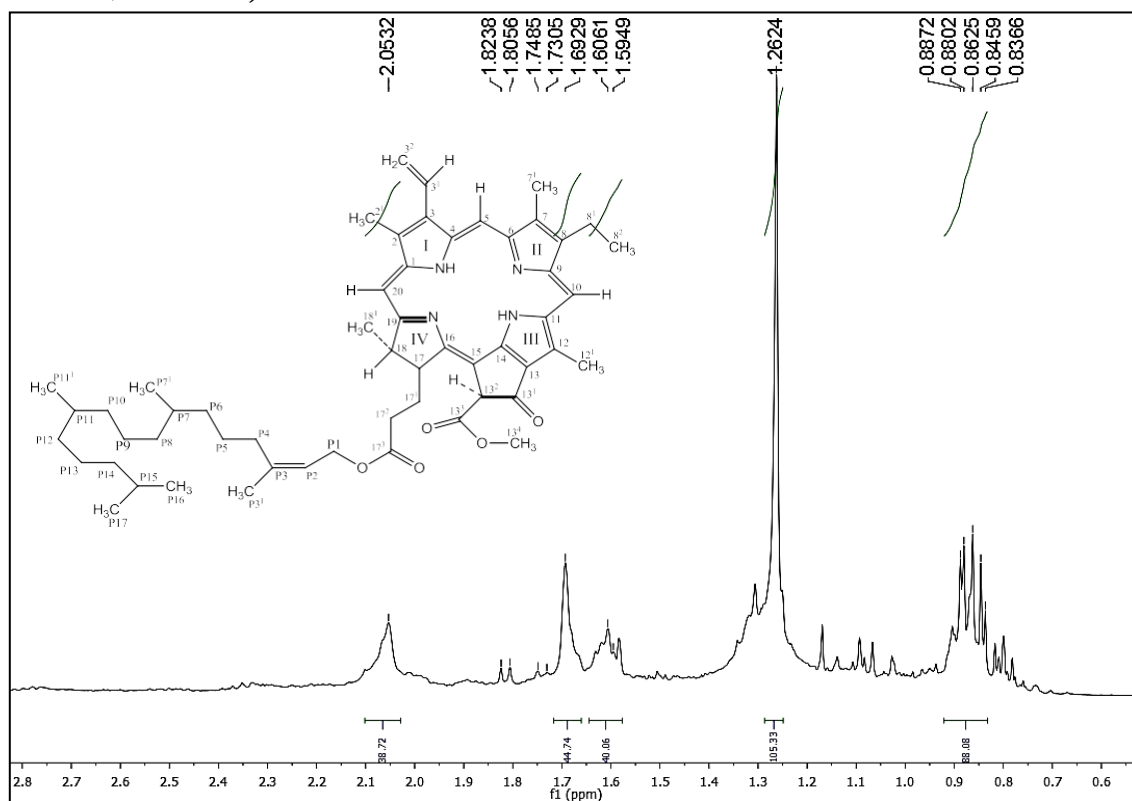


Figura 34. Espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de *Hv-3*

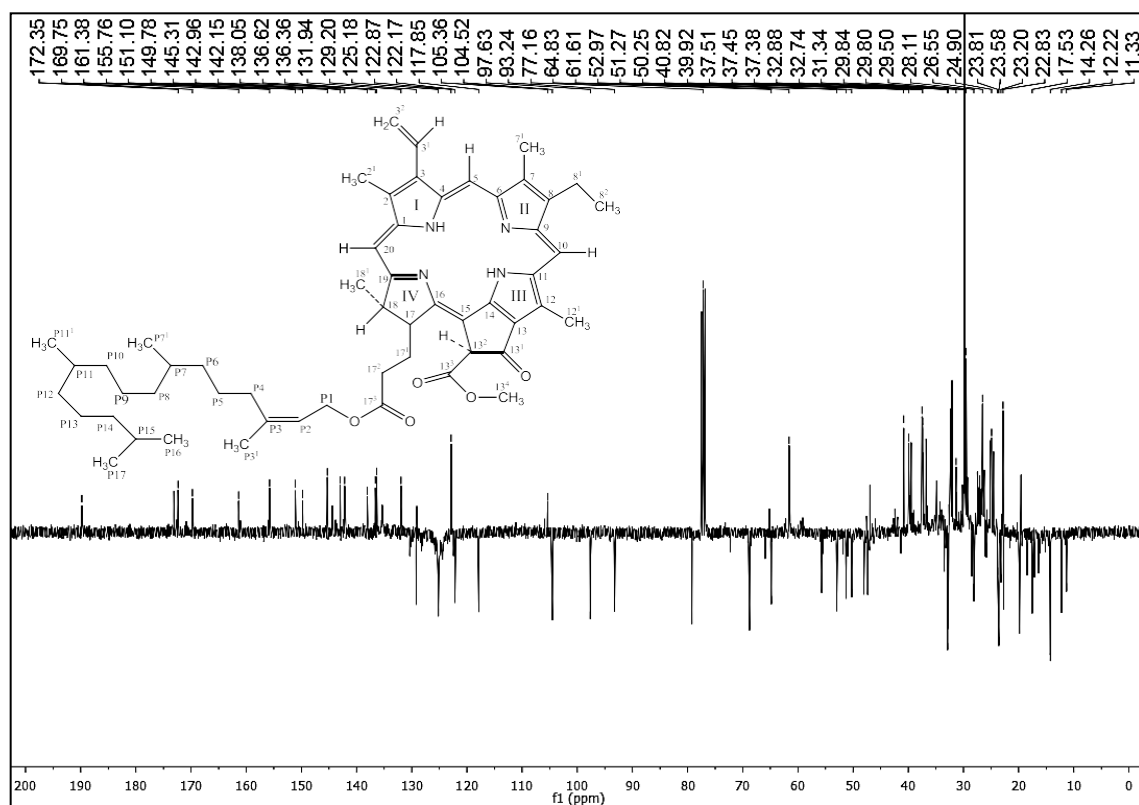


Figura 35. Expansão do espectro de RMN ^{13}C na região entre δ_{C} 90,0 e 190,0 ppm (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de *Hv*-3

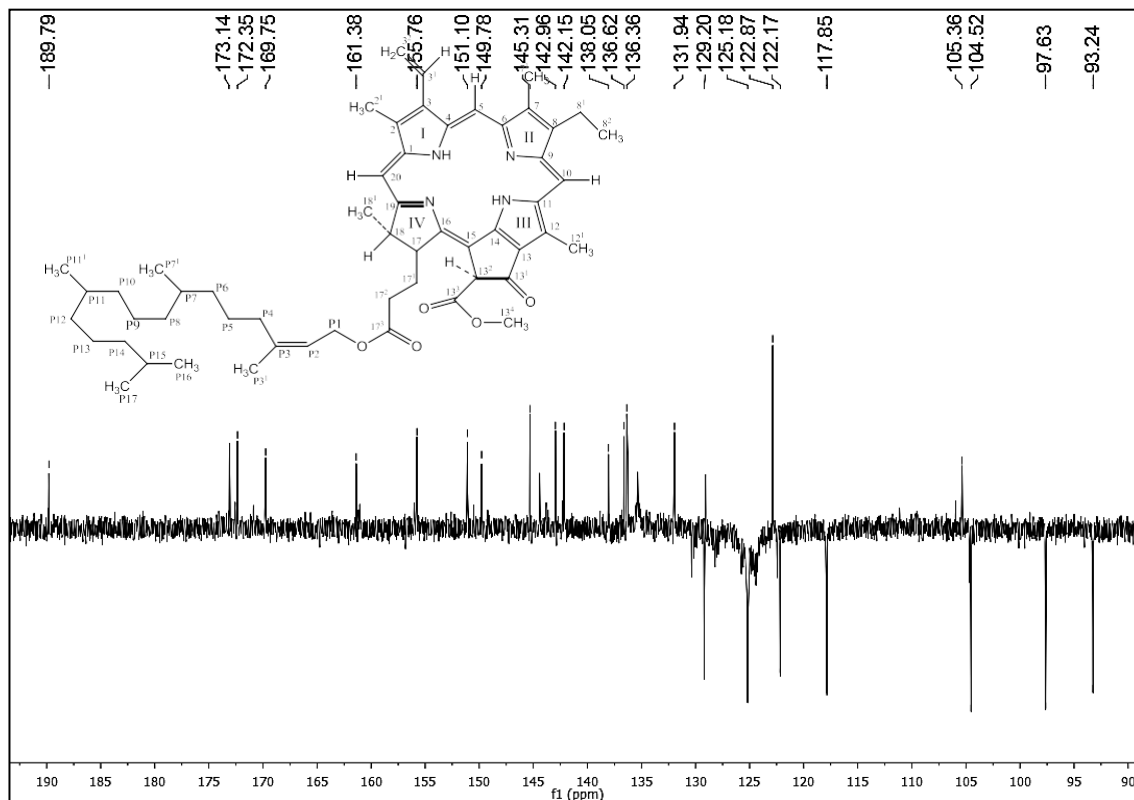
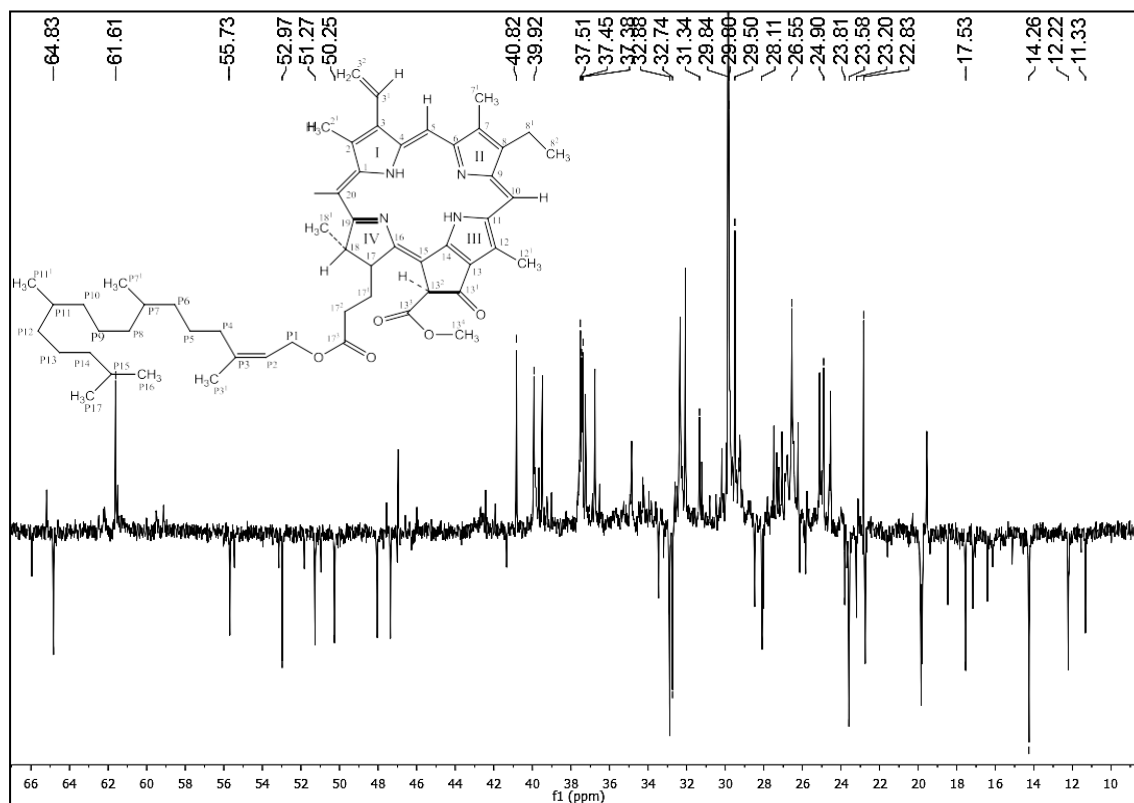


Figura 36. Expansão do espectro de RMN ^{13}C na região entre δ_{C} 10,0 e 66,0 ppm (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de *Hv*-3



5.2.4. Caracterização estrutural de *Hv-4*

A substância codificada como *Hv-4* apresentou-se com aspecto de sólido amorfo verde escuro. Seu espectro de RMN ^1H (Figura 37, pág. 111) e suas expansões (Figuras 38 a 41, págs. 111 a 113), apresentaram sinais característicos de substâncias com núcleo porfirínico, encontrando-se os mesmos duplicados, o que nos levou a propor que *Hv-4* tratava-se de uma mistura de duas substâncias, ambas apresentando o referido núcleo. Sendo possível identificar os sinais referentes a este esqueleto, com destaque para seis singletos atribuídos a hidrogênios olefínicos em δ_{H} 9,49 e 9,53 (H-10 de *Hv-4a* e *Hv-4b*, respectivamente), δ_{H} 9,34 e 9,37 (H-5 de *Hv-4a* e *Hv-4b*, respectivamente), δ_{H} 8,60 e 9,63 (H-20 de *Hv-4a* e *Hv-4b*, respectivamente), todos integrando para um hidrogênio cada.

Hidrogênios vinílicos foram observados nas Figuras 38 e 39, págs. 111 e 112, em δ_{H} 7,98 (H-3') (dd, $J = 17,68$ e $11,44$ Hz), δ_{H} 6,27 (dd, $J = 17,80$ Hz), δ_{H} 6,17 (dd, $J = 11,56$ Hz) compatíveis com os hidrogênios ligados aos carbonos da posição 3 de ambos os derivados (H-3 1 , e 3 $^2_{(trans)}$ e 3 $^2_{(cis)}$, respectivamente), das feofitinas (CHAVES et al. 2013). Também foram observados seis singletos atribuídos aos hidrogênios das seis metilas olefínicas δ_{H} 3,72 e 3,69 para os H-12 1 de *Hv-4a* e *Hv-4b*, respectivamente), δ_{H} 3,40 e 3,39 para os H-2 1 de *Hv-4a* e *Hv-4b*, respectivamente), δ_{H} 3,17 e 3,16 (H-7 1 de *Hv-4a* e *Hv-4b*, respectivamente), todos integrando para três hidrogênios cada (LIRA, 2012), sendo os dois últimos sinais características dos hidrogênios do grupo metila C-7 1 do núcleo porfirínico do tipo *a* (TELES, 2015).

O envelope de absorções na região de hidrogênios metílicos e metilênicos δ_{H} 0,76 e 1,70 (Figura 41, pág. 113) também sugerem a presença da cadeia fitil éster (- C $_{20}$ H $_{39}$) na molécula, fortalecendo a proposta da substância se tratar de um derivado da feofitina *a*. A ausência de um simpleto em δ_{H} 6,25 referente ao H-13 2 em *Hv-3* no espectro de RMN ^1H da molécula em análise permitiu sugerir que a diferença entre *Hv-4* e *Hv-3* encontra-se na posição C-13 2 e que esse hidrogênio pode ter sido substituído por uma hidroxila em *Hv-4* (NOGUEIRA et al. 2013; BRITO-FILHO et al, 2017).

Os dados de RMN de ^{13}C utilizando a técnica APT e suas expansões (Figuras 42 a 49, págs. 113 a 117), apresentaram sinais intensos e outros duplicados confirmando as suposições de uma mistura de duas substâncias de núcleo porfirínico para *Hv-4*. A semelhança dos sinais e valores entre *Hv-3* e *Hv-4* permitiram propor que *Hv-4* trata-se da Feofitina-*a*, porém a ausência do sinal em δ_{C} 64,8, referente ao carbono oximetínico C-13 2 presente em *Hv-3* corrobora a hipótese de que *Hv-4* refere-se a feofitina *a* hidroxilada (GOMES et al. 2015; BRITO-FILHO et al., 2017).

Além dos sinais atribuídos ao sistema porfirínico, foi observado também a presença de outros sinais que confirmam a presença da cadeia fitilica nas duas substâncias, sendo aqueles em δ_C 61,72 e 61,52 de C-P1 de *Hv-4a* e *Hv-4b*, respectivamente, δ_C 117,99 e 117,85 de C-P2 de *Hv-4a* e *Hv-4b*, respectivamente, δ_C 143,01 e 142,91 de C-P3 de *Hv-4a* e *Hv-4b*, respectivamente (Tabela 9, pág. 110).

Derivados porfirínicos geralmente são encontrados na natureza apresentando a carbonila cetônica na posição C-13¹ e apresenta deslocamento químico e aproximadamente δ_C 190,0-192,0 (FERNANDES et al. 2013). O sinal para carbono C-13² pode variar conforme o tipo de substituinte que possui, sendo aproximadamente δ_C 89,1 quando se trata de um carbono não hidrogenado e hidroxilado ou δ_C 64,8 quando ele é um carbono metínico não hidroxilado (TELES et al. 2014).

Os sinais em δ_C 192,27 e 192,24 (C-13¹ de *Hv-4a* e *Hv-4b*, respectivamente) (Figura 43, pág. 114), bem como, aqueles em δ_C 89,27 e 89,15 (C-13² de *Hv-4a* e *Hv-4b*, respectivamente), (Figura 46, pág. 115) permitiram propor uma estrutura do tipo ciclopentanona com hidroxila em C-13² dos dois derivados porfirínicos dessa mistura (TELES et al. 2014; GOMES et al. 2015; MACIEL et al 2016; BRITO-FILHO et al, 2017).

A presença de dois dupletos largos em δ_H 4,57 ($J=6,5$ Hz) e 4,17 ($J=9,8$ Hz), característicos de H-17 para isômeros R e S, respectivamente, confirmaram a existência destes dois compostos isoméricos (Figura 39, pág. 112) (GOMES et al. 2015).

Como todos os deslocamentos químicos desta mistura de feofitinas ora apresentavam-se intensos ora duplicados, a análise dos dados dos espectros de RMN ¹H e ¹³C e comparações com dados da literatura (Tabela 8 e 9, págs. 108 a 110), permitiram identificar *Hv-4* como uma mistura dos isômeros ópticos R e S: 13²-hidroxi-(13²-R)-feofitina *a*, 13²-hidroxi-(13²-S)-feofitina *a*. Elas já foram isoladas de *Plagiochila ovalifolia* (MATSUO et al. 1996) e de *Sargassum polyceratuium* (LIRA, 2012), sendo essa mistura relatada pela primeira vez na família Sterculiaceae (FERNANDES et al., 2018).

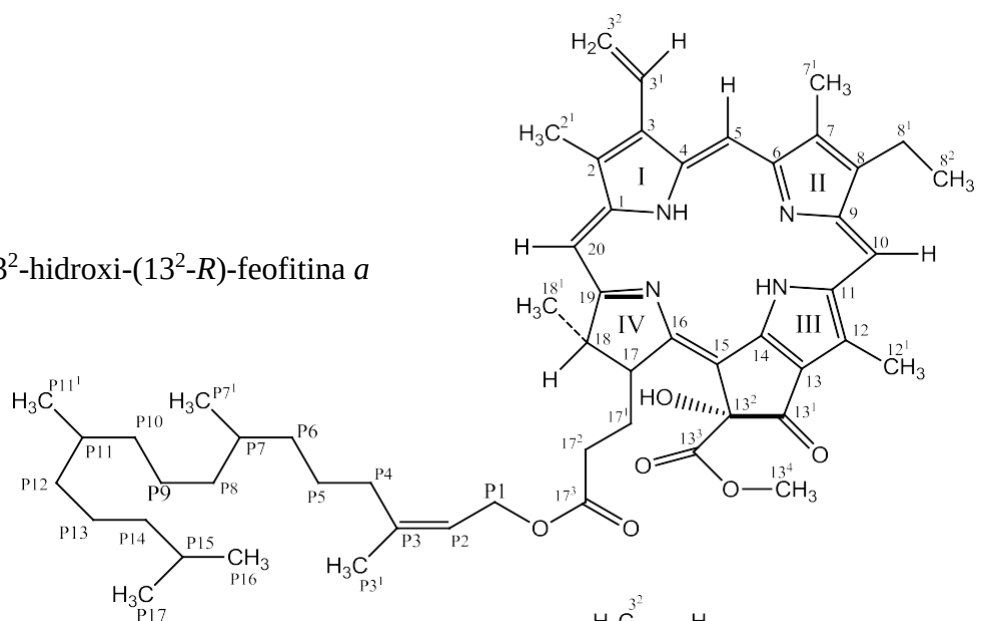
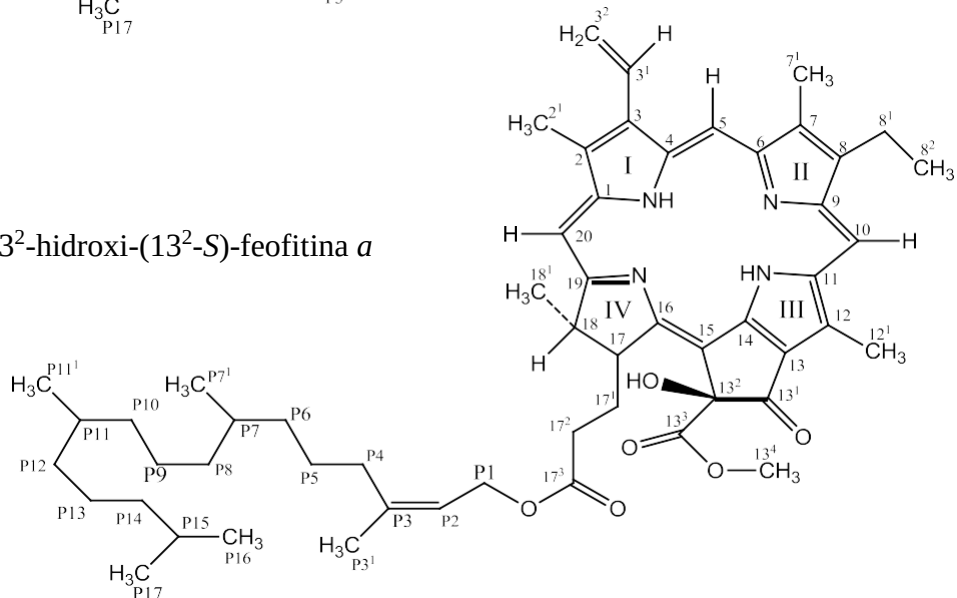
Hv-4:**13²-hidroxi-(13²-R)-feofitina *a*****13²-hidroxi-(13²-S)-feofitina *a***

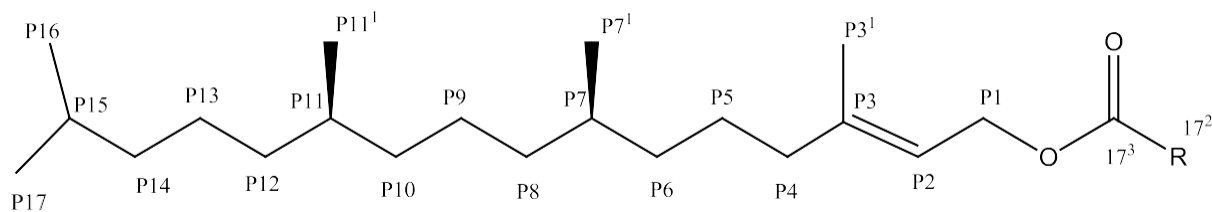
Tabela 8. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de *Hv-4* (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz) com os modelos Mo-1 (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz) (LIRA, 2012) e Mo-2 (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz) (LIRA, 2012).

Mo-1 (13^2 -hidroxi-(13^2 - <i>R</i>)- feofitina <i>a</i>)			<i>Hv-4a</i>		Mo-2 (13^2 -hidroxi-(13^2 - <i>S</i>)- feofitina <i>a</i>)			<i>Hv-4b</i>	
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	
1	142,0	—	142,2	—	141,9	—	142,1	—	
2	131,7	—	132,0	—	131,5	—	131,8	—	
2 ¹	12,0	3,40 (s, 3H)	12,2	3,40 (s, 3H)	12,0	3,40 (s, 3H)	12,2	3,39 (s, 3H)	
3	136,2	—	136,5	—	136,2	—	136,5	—	
3 ¹	128,8	7,99 (dd- <i>J</i> =18,0 e 12,0 Hz, 1H)	129,1	7,98 (dd, <i>J</i> = 17,6 e 11,4 Hz, 1H)	128,8	7,99 (dd- <i>J</i> =18,0 e 12,0 Hz, 1H)	129,1	7,98 (dd, <i>J</i> = 17,6 e 11,4 Hz, 1H)	
3 ²	122,6	6,28 (<i>trans</i>) (d- <i>J</i> =18,0 Hz) e 6,17(<i>cis</i>) (d- <i>J</i> =12,0 Hz, 1H)	122,9	6,27 (<i>trans</i>) (d- <i>J</i> =17,8 Hz) e 6,17 (<i>cis</i>) (d- <i>J</i> =11,5 Hz, 1H)	122,6	6,28 (<i>trans</i>) (d- <i>J</i> =18,0 Hz, 1H) e 6,17 (<i>cis</i>) (d- <i>J</i> =12,0 Hz, 1H)	122,9	6,27 (<i>trans</i>) (d- <i>J</i> =17,8 Hz) e 6,17(<i>cis</i>) (d- <i>J</i> =11,5 Hz, 1H)	
4	136,0	—	136,4	—	136,0	—	136,3	—	
5	97,6	9,42 (s, 1H)	98,0	9,37 (s, 1H)	97,6	9,45 (s, 1H)	97,9	9,34 (s, 1H)	
6	155,1	—	155,6	—	155,0	—	155,4	—	
7	135,9	—	136,3	—	135,9	—	136,3	—	
7 ¹	10,9	3,23 (s, 3H)	11,3	3,17 (s, 3H)	10,9	3,23 (s, 3H)	11,2	3,16 (s, 3H)	
8	144,8	—	145,3	—	144,8	—	145,2	—	
8 ¹	19,7	3,66 (sl, 3H)	19,8	3,65 (sl, 3H)	19,7	3,66 (sl, 2H)	19,7	3,62 (sl, 3H)	
8 ²	16,3	1,70 (d, <i>J</i> =8,0Hz, 3H)	16,4	1,70 (m)	16,2	1,70 (d, <i>J</i> =8,0Hz, 3H)	16,3	1,70 (m)	
9	150,7	—	151,1	—	150,7	—	151,0	—	
10	103,9	9,57 (s, 1H)	104,3	9,53 (s, 1H)	103,9	9,59 (s, 1H)	104,3	9,49 (s, 1H)	
11	137,5	—	137,9	—	137,6	—	137,8	—	
12	129,3	—	129,6	—	129,1	—	129,4	—	
12 ¹	12,2	3,70 (s, 3H)	12,4	3,72 (s, 3H)	12,2	3,72 (s, 3H)	12,4	3,69 (s, 3H)	

Tabela 8 (Continuação). Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de *Hv-4* (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz) com os modelos Mo-1 (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz) (LIRA, 2012) e Mo-2 (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz) (LIRA, 2012).

Mo-1 (^{13}C -hidroxi-(^{13}C - <i>R</i>)- feofitina <i>a</i>)			<i>Hv-4a</i>		Mo-1 (^{13}C -hidroxi-(^{13}C - <i>S</i>)-feofitina <i>a</i>)		<i>Hv-4b</i>	
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
13	126,1	—	127,0	—	126,8	—	126,3	—
13^1	192,0	—	192,2	—	192,0	—	192,2	—
13^2	89,0	—	89,2	—	88,9	—	89,1	—
13^3	173,4	—	173,5	—	172,7	—	172,9	—
13^4	53,8	3,61 (s, 3H)	53,9	3,65 (s, 3H)	53,4	3,59 (s, 3H)	53,5	3,62 (s, 3H)
14	149,7	—	149,9	—	150,1	—	150,3	—
15	107,5	—	107,8	—	107,6	—	107,8	—
16	161,8	—	162,0	—	162,3	—	162,6	—
17	51,7	4,68 (dl, $J=8,0$ Hz, 1H)	51,9	4,57 (m, $J=6,5$ Hz, 1H)	51,7	4,14 (dl, $J=8,0$ Hz, 1H)	51,9	4,17 (dl, $J=9,8$ Hz, 1H)
17^1	31,6	—	32,0	—	31,6	—	31,7	—
17^2	31,1	—	31,3	—	31,1	—	31,2	—
17^3	173,0	—	172,1	—	173,6	—	173,0	—
18	50,1	—	50,4	—	50,3	—	50,3	—
18^1	22,6	1,57 (d, $J=8,0$ Hz, 3H)	22,8	1,60 (m)	22,6	1,57 (d, $J=8,0$ Hz, 3H)	22,7	1,60 (m)
19	172,7	—	50,1	—	172,3	—	172,3	—
20	93,3	8,59 (s, 1H)	93,7	8,60 (s, 1H)	93,5	8,62 (s, 1H)	93,5	8,63 (s, 1H)

Tabela 9. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de *Hv-4* (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz) com os modelos Mo-1 (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz) (LIRA, 2012) e Mo-2 (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz) (LIRA, 2012).



	Mo-1	Hv-4a	Mo-2	Hv-4b
C	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
P1	61,35	61,51	61,57	61,72
P2	117,65	117,84	117,82	117,99
P3	142,87	143,01	142,77	142,91
P4	39,80	39,95	39,80	39,91
P5	24,97	25,13	24,97	25,10
P6	36,61	36,77	36,61	36,74
P7	32,72	32,88	32,72	32,86
P8	37,34	37,51	37,34	37,49
P9	24,39	24,54	24,39	24,52
P10	37,21	37,44	37,21	37,41
P11	32,59	32,75	32,59	32,72
P12	37,21	37,38	37,21	37,36
P13	24,74	24,89	24,74	24,89
P14	39,30	39,47	39,30	39,47
P15	27,93	28,08	27,93	28,08
P16	22,54	22,78	22,64	22,78
P17	22,55	22,74	22,55	22,74
P11 ¹	19,17	19,84	19,17	19,78
P7 ¹	22,70	22,83	22,70	22,83
P3 ¹	17,33	17,53	17,33	17,53

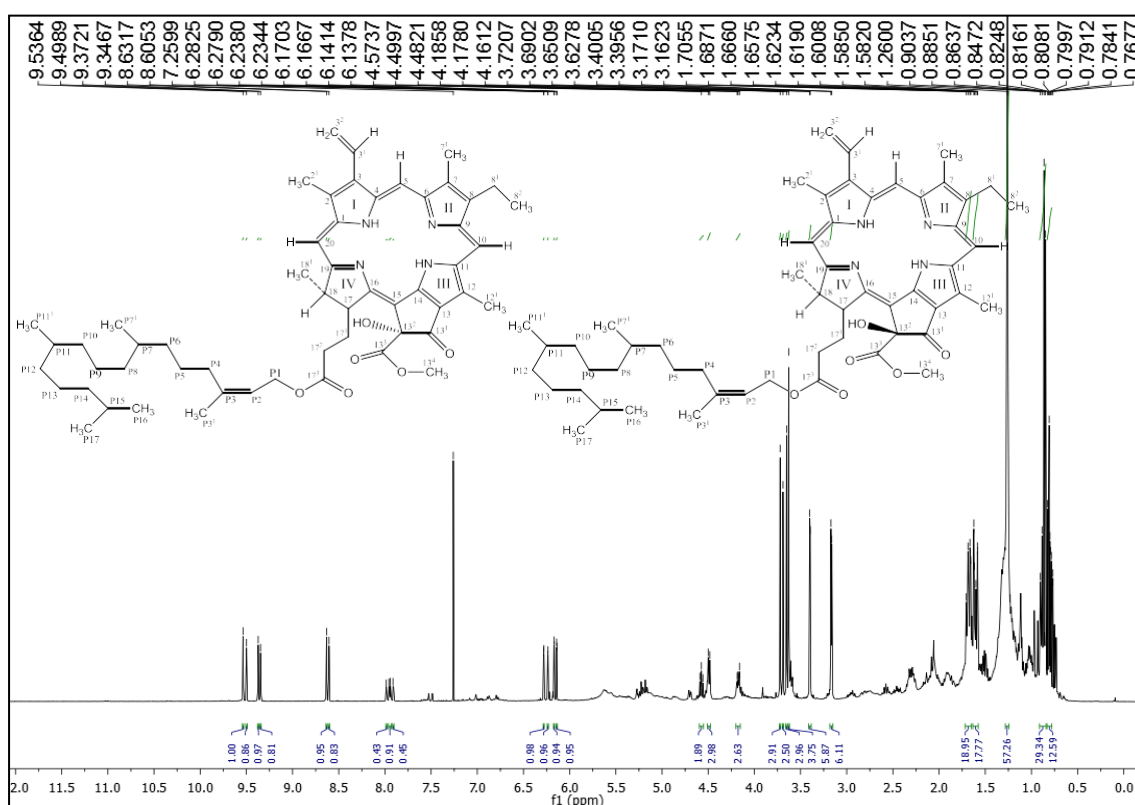
Figura 37. Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de *Hv*-4

Figura 39. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 3,90 e 6,70 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de Hv-4

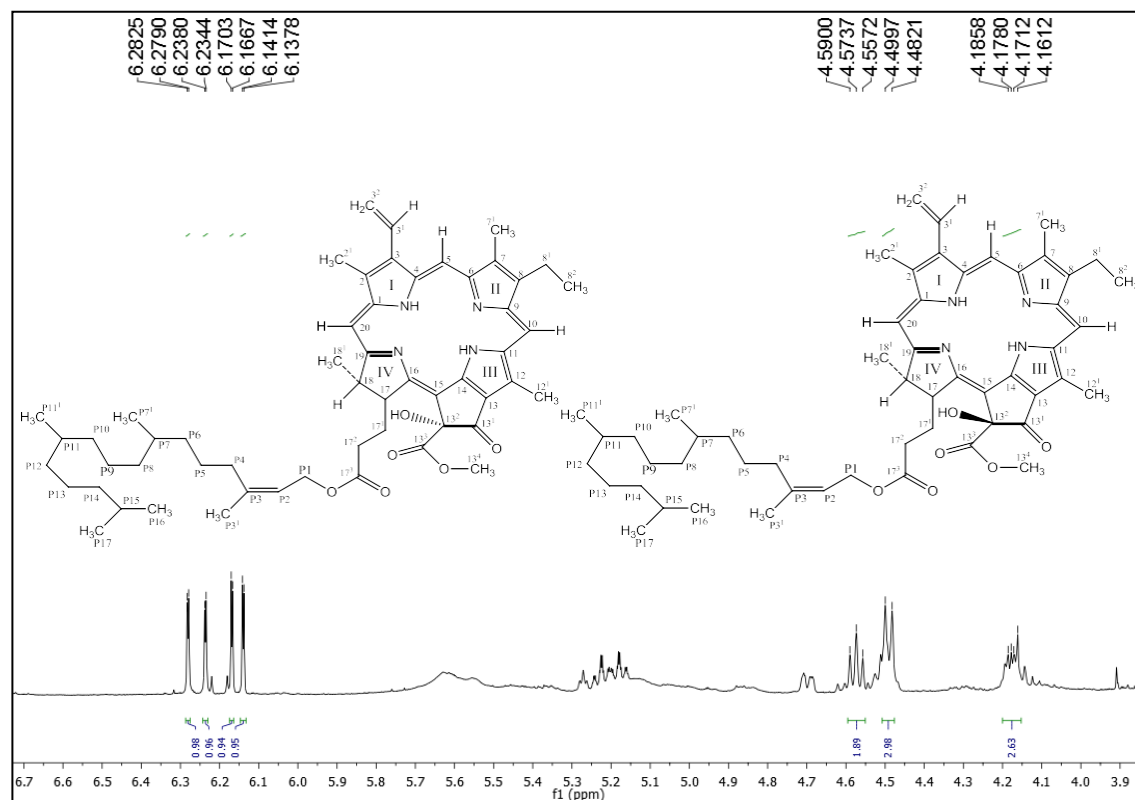


Figura 40. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 3,10 e 3,75 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de Hv-4

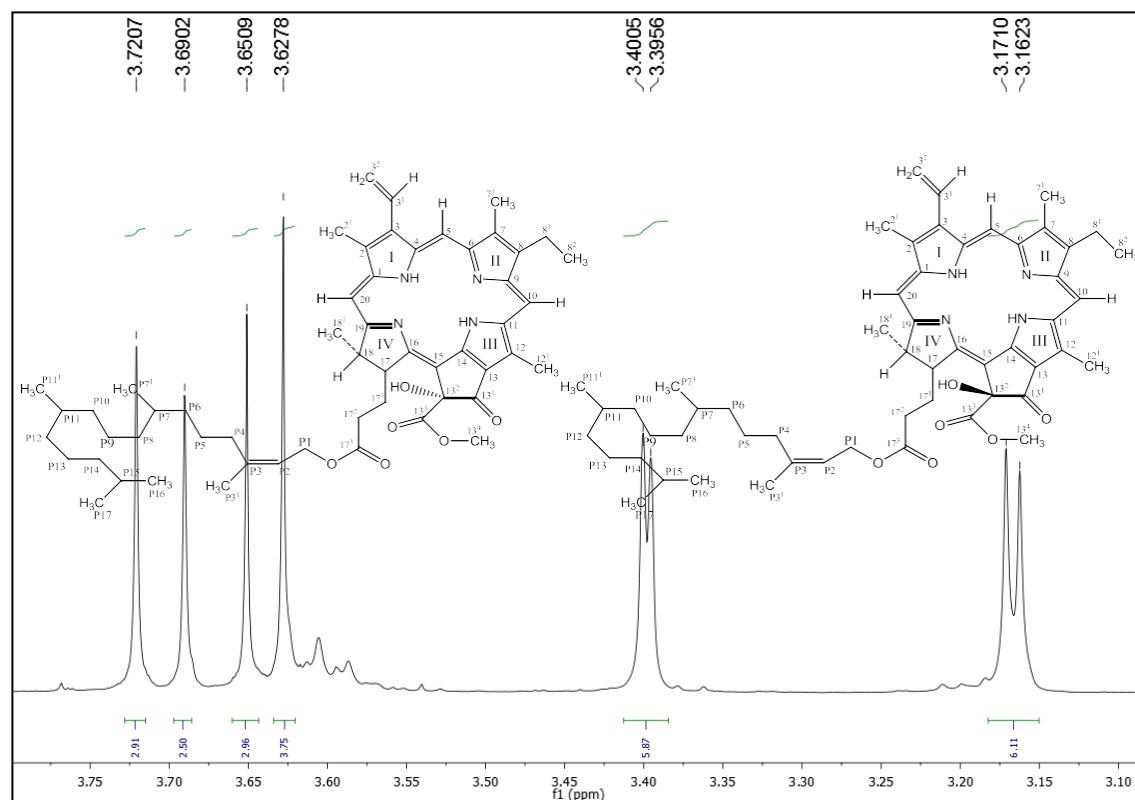


Figura 41. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 0,65 e 1,85 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de *Hv-4*

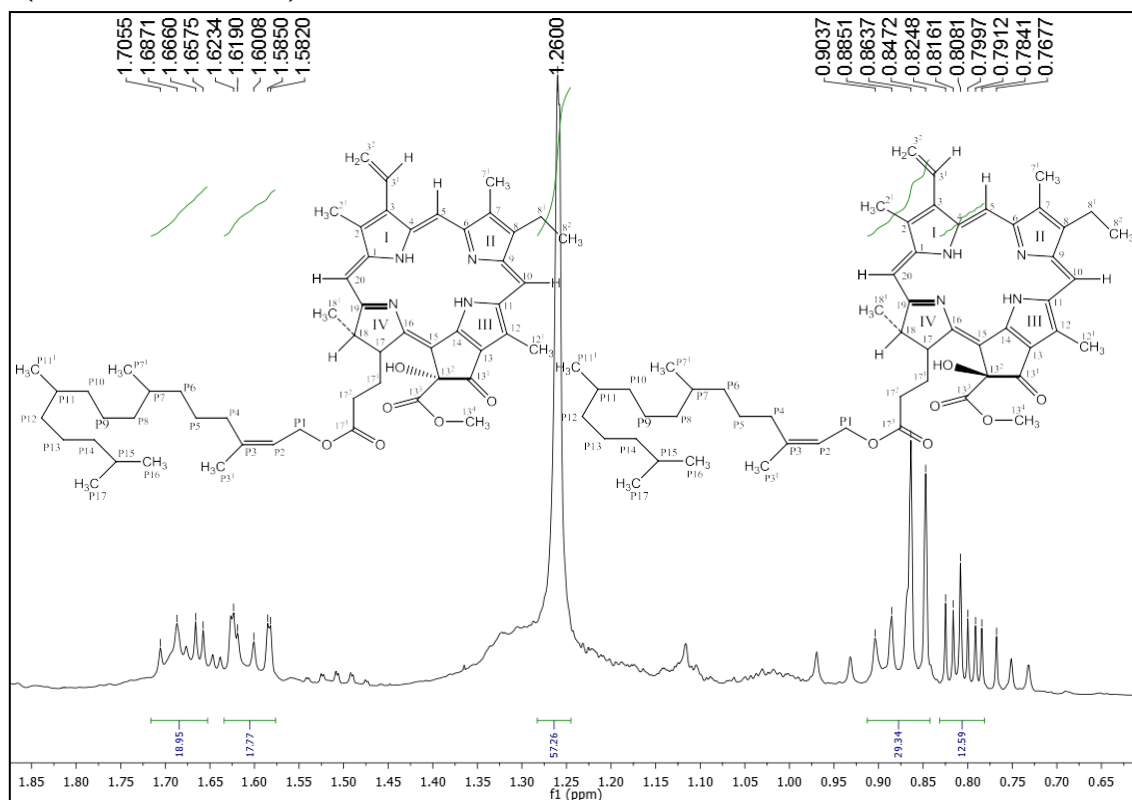


Figura 42. Espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de *Hv-4*

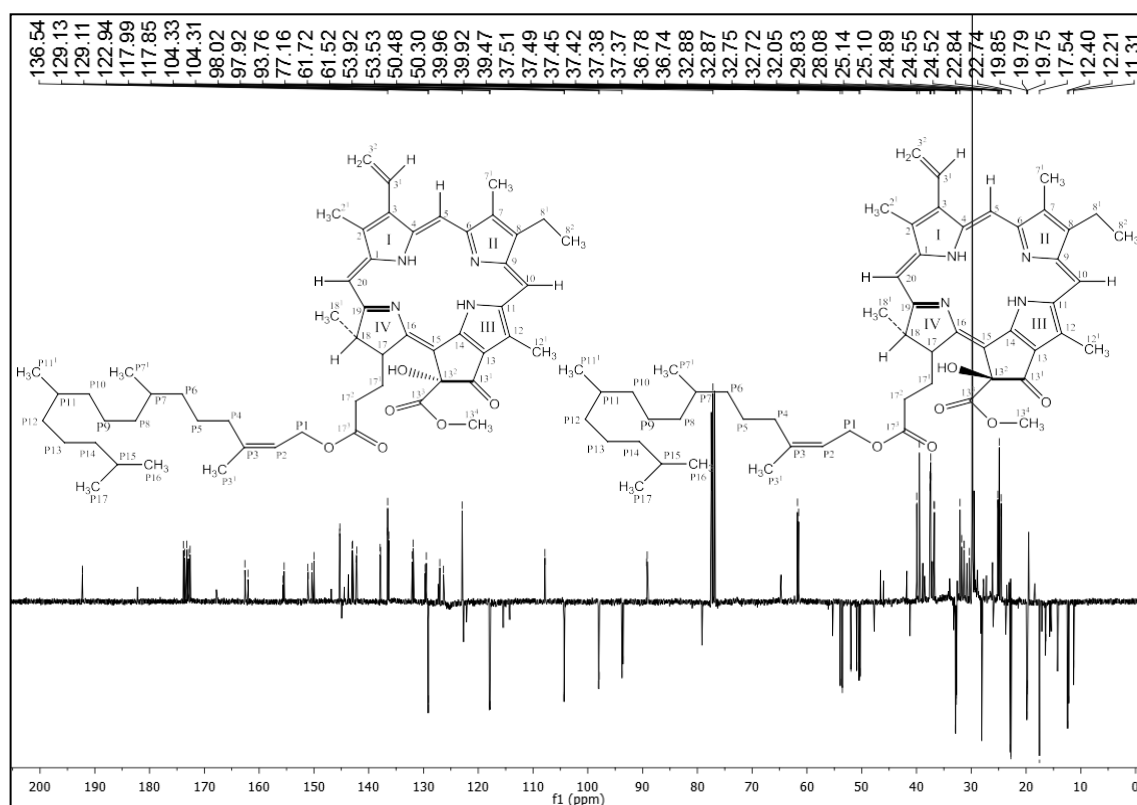


Figura 43. Expansão do espectro de RMN ^{13}C na região entre δ_{C} 172,0 e 193,0 ppm (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de Hv-4

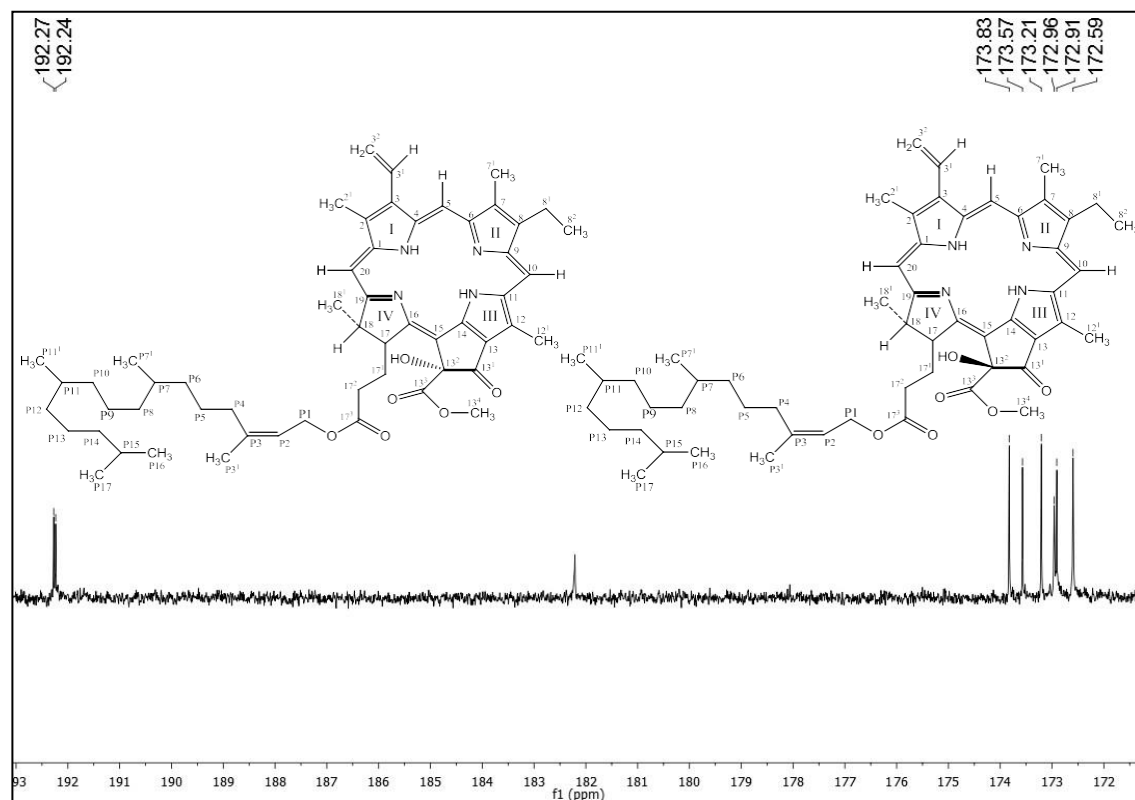


Figura 44. Expansão do espectro de RMN ^{13}C na região entre δ_{C} 142,0 e 163,0 ppm (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de Hv-4

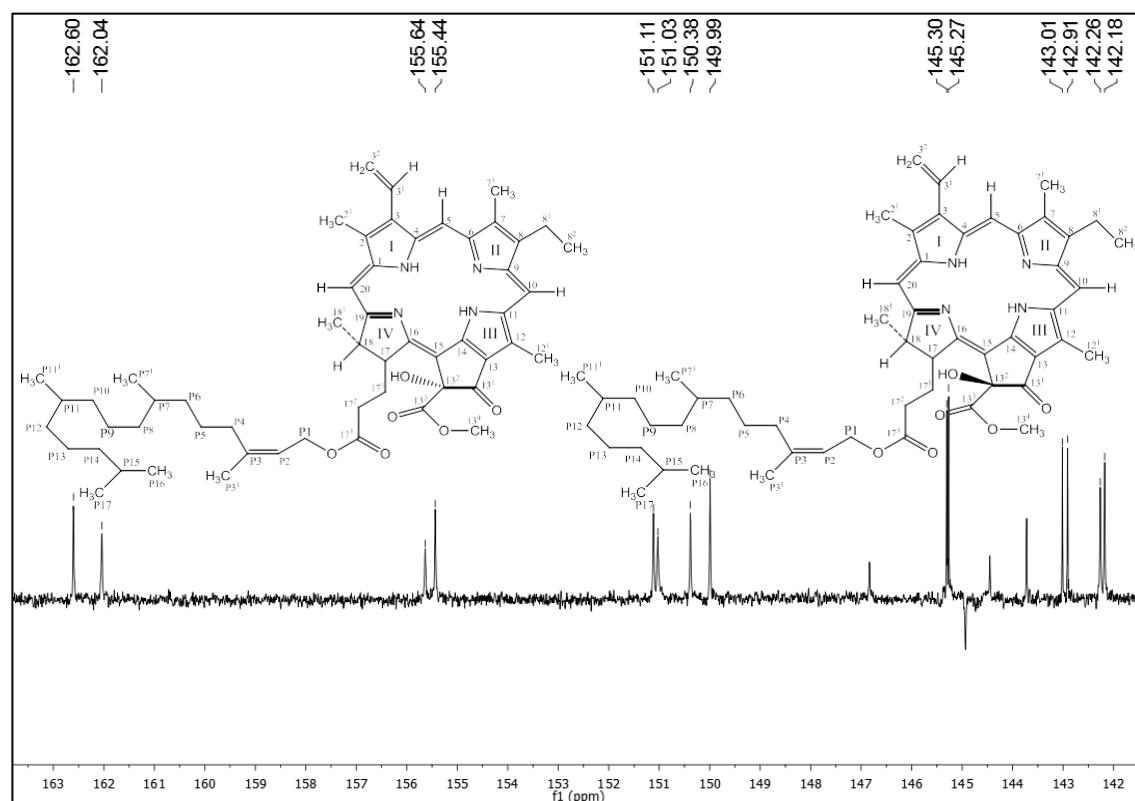


Figura 45. Expansão do espectro de RMN ^{13}C na região entre δ_{C} 123,0 e 138,0 ppm (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de *Hv-4*

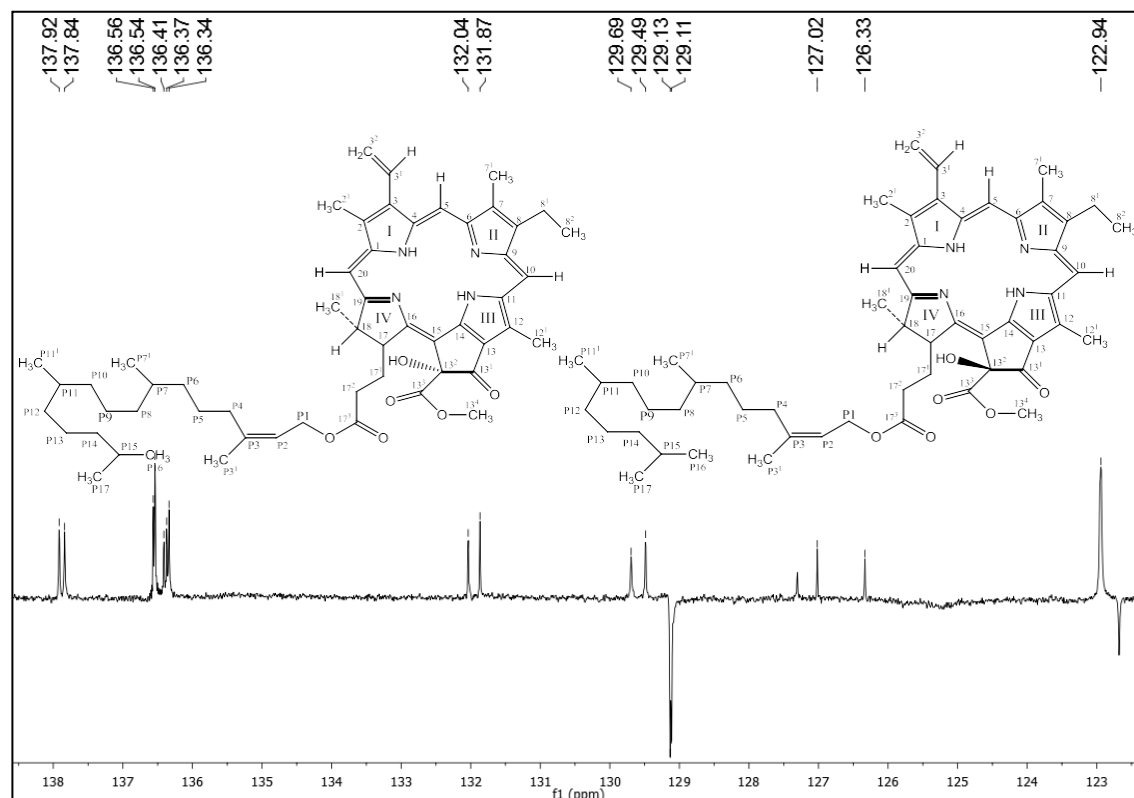


Figura 46. Expansão do espectro de RMN ^{13}C na região entre δ_{C} 76,0 e 120,0 ppm (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de *Hv-4*

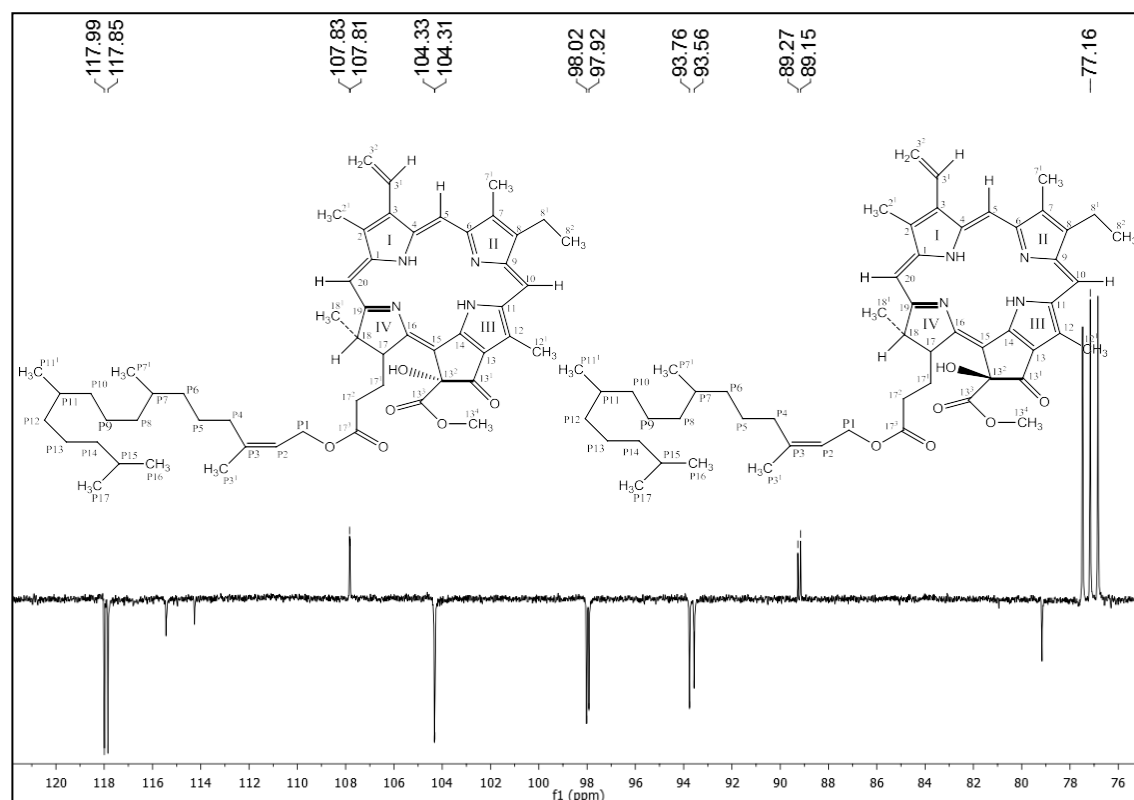


Figura 47. Expansão do espectro de RMN ^{13}C na região entre δ_{C} 34,0 e 62,0 ppm (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de *Hv-4*

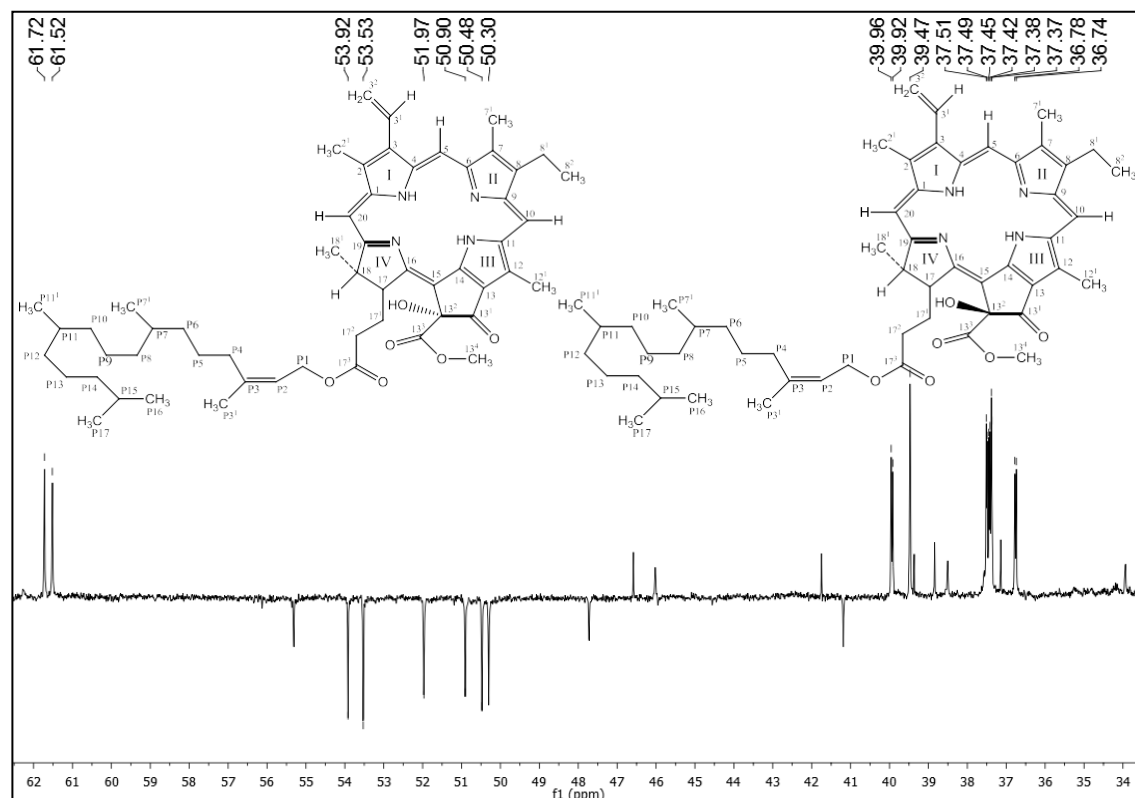


Figura 48. Expansão do espectro de RMN ^{13}C na região entre δ_{C} 22,0 e 34,0 ppm (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de *Hv-4*

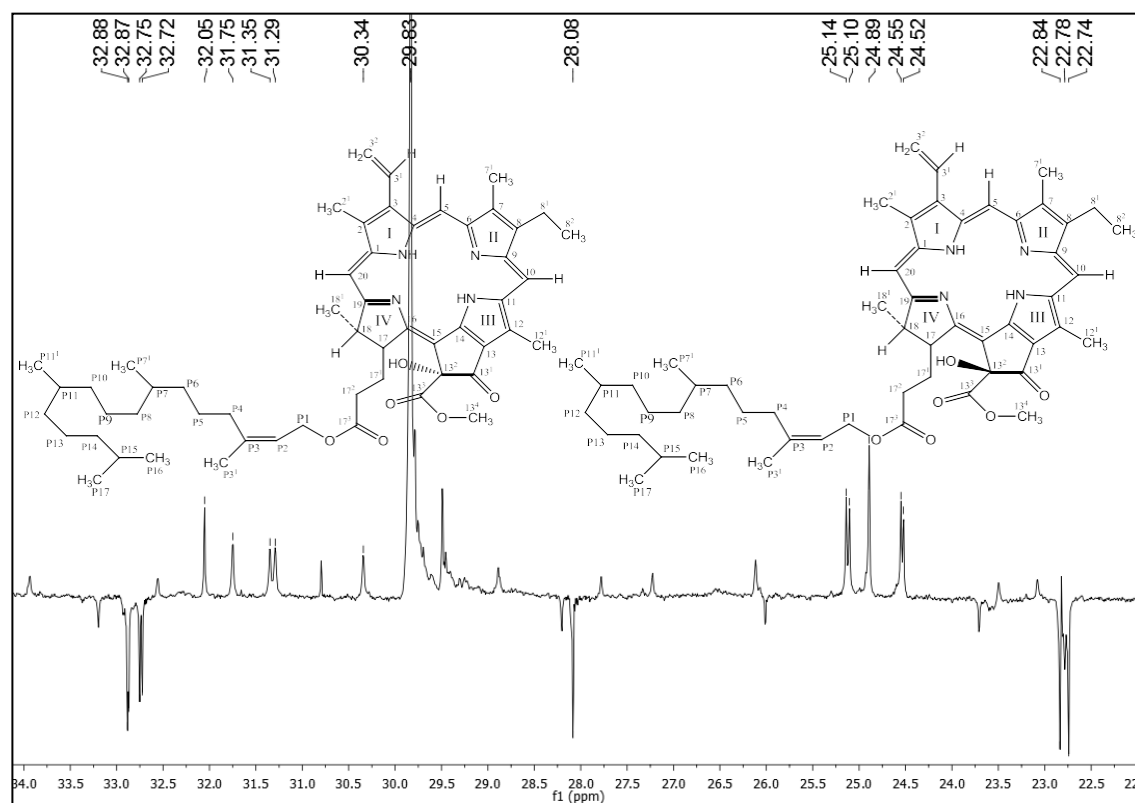
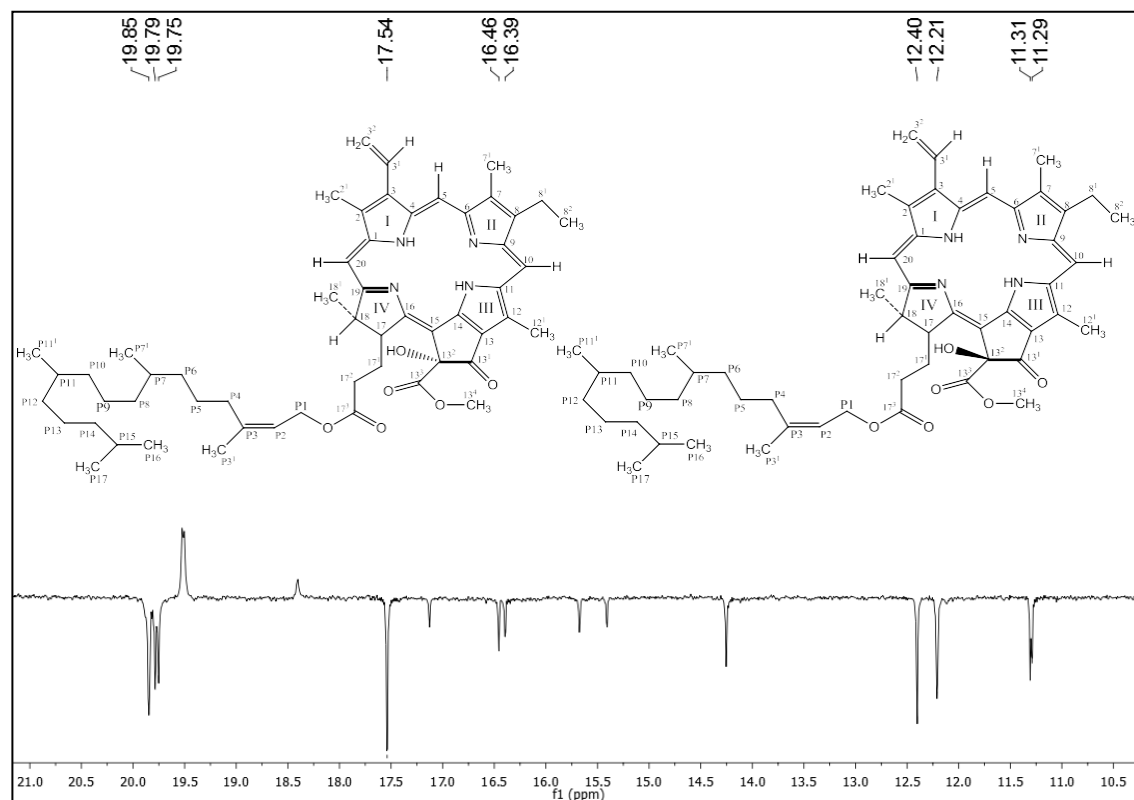


Figura 49. Expansão do espectro de RMN ^{13}C na região entre δ_{C} 10,5 e 21,0 ppm (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de *Hv-4*



5.2.5. Caracterização estrutural de *Hv-5*

A substância *Hv-5*, assim como *Hv-3* e *Hv-4*, apresentou-se na forma de sólido amorfo verde escuro. O espectro de RMN ^1H (Figura 50, pág. 121) de *Hv-5* e suas expansões (Figuras 51 a 53, págs. 121 e 122), exibiram semelhanças com as outras feofitinas relatadas (Figuras 29 a 37, págs. 101 a 111), sugerindo a presença do núcleo porfirínico, no entanto um singlete em δ_{H} 11,20 (Figura 51, pág. 121) de *Hv-5*, característico de hidrogênios de grupo aldeído (PAVIA, et al., 2010) corrobora a proposta desse grupo na estrutura a ser definida. Outro dado que favorece a proposta do grupo aldeído em *Hv-5* é a ausência do singlete na região δ_{H} 3,15-3,20 referente aos hidrogênios da metila C-7¹ em *Hv-3* (Figura 52, pág. 122). Essa ausência permitiu sugerir que o grupo aldeído na molécula de *Hv-5* encontra-se no C-7 (CHAVES et al. 2013).

A ausência de um singlete em δ_{H} 6,27 (Figura 51, pág. 121) de *Hv-5* atribuído ao H-13² em *Hv-3* (Figura 31, pág. 102), fortalece a proposta da presença de uma hidroxila no C-13² de *Hv-5* (Tabela 10, pág. 120) (BRITO-FILHO et al. 2017). Esta proposta foi ratificada, no espectro de RMN ^{13}C utilizando a técnica APT (Figura 54, pág. 123), pela ausência do pico δ_{C} 64,8 referente a um grupo CH, visualizado em *Hv-3* (Figura 36, pág. 104), que em *Hv-5* encontra-se em δ_{C} 90,10 (Figura 54, pág. 123) sugestivo da presença de um carbono não hidrogenado, possuindo como substituinte um grupo hidroxila. Esse espectro corrobora a presença do grupo aldeído em *Hv-5* pelo pico em δ_{C} 192,14, condizente com absorção da carbonila pertencente a esse grupo funcional (TELES et al. 2014).

Comparações com *Hv-3* e modelo da literatura *Mo-1* (Tabela 10, pág. 112) permitiram definir a estrutura da 13²-hidroxi-feofitina b para *Hv-5*, substância isolada anteriormente de *Sida rhombifolia* (CHAVES et al. 2013) e *H. isora* (BAI, 1954) e relatada pela primeira vez na espécie *H. velutina*.

Derivados de clorofila como clorofilin e feoforbideo têm sido eficazes contra larvas de vários insetos, incluindo moscas e *Aedes aegypti*, podendo ajudar no controle integrado de doenças transmitidas por esses vetores (AZIZULLAH et al. 2014). Não foram encontrados relatos para atividade inseticida das feofitinas, que são compostos formados quando a clorofila está em meio ácido.

Um estudo realizado por Rebeiz et al. (1988), relatou que a biossíntese de protoporfirina-Mg causa a morte nos insetos tratados, sendo proposto o termo -inseticidas porfíricos para designar esses inseticidas.

Hv-5: Feofitina b

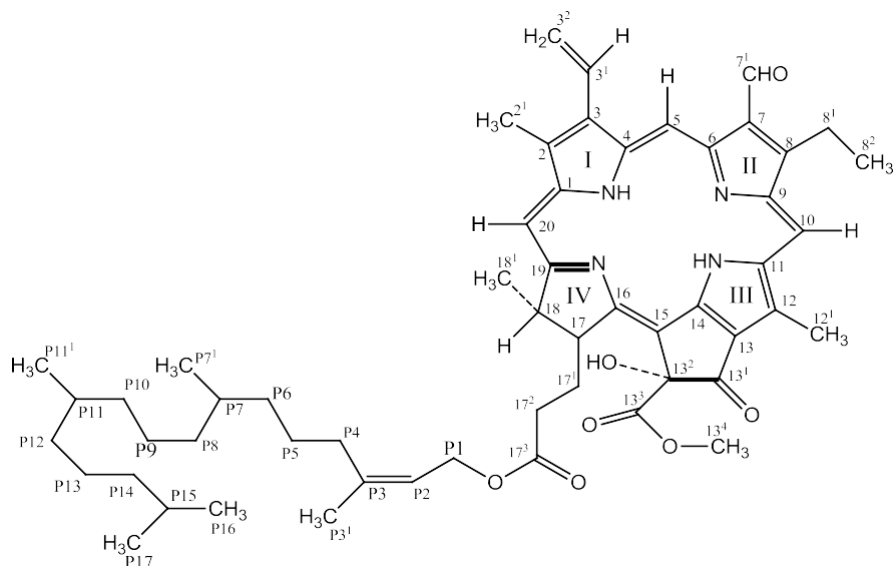


Tabela 10. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de *Hv-5* (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz) com os modelos *Hv-3* (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz) e *Mo-1* (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz) (CHAVES et al., 2013).

	<i>Hv-3</i>	<i>Mo-1</i> (^{13}C -hidroxi-feofitina b)	<i>Hv-5</i>
C	δ_{H}	δ_{H}	δ_{H}
1	—	—	—
2	—	—	—
2 ¹	3,38 (s)	3,59 (s)	3,40 (s)
3	—	—	—
3 ¹	7,96 (dd, $J=17,96$ e $11,28$ Hz)	7,02 (dd, $J=17,15$ e $11,6$ Hz)	8,04 (dd, $J=17,8$ e $11,4$ Hz)
3 ²	6,28 (trans) (dd, $J=17,8$ Hz) e 6,16 (Cis) (dd, $J=11,56$ e $3,0$ Hz)	6,37 (trans) ($J=17,5$ Hz) e 6,22 (Cis) ($J=11,6$)	6,37 (trans) ($J=17,7$ Hz) e 6,22 (Cis) ($J=11,6$)
4	—	—	—
5	9,33 (s)	9,76 (s)	9,78 (s)
6	—	—	—
7	—	—	—
7 ¹	3,19 (s)	11,17 (s)	11,20 (s)
8	—	—	—
8 ¹	3,67 (s, 2H)	4,10 (dl, $J=7,8$ Hz)	4,13 (m)
8 ²	1,62 (t)	1,83 (t, $J=7,5$ Hz)	1,86 (t)
9	—	—	—
10	—	—	—
11	9,48 (s)	10,47 (s)	10,49 (s)
12	—	—	—
12 ¹	—	—	—
13	3,82 (s)	3,71 (s)	3,62 (s)
13 ¹	—	—	—
13 ²	—	—	—
13 ³	6,27 (s)	—	—
13 ⁴	—	—	—
14	3,89 (s)	3,85 (s)	3,74 (s)
15	—	—	—
16	—	—	—
17	—	—	—
17 ¹	4,16 (m)	5,31 (dl, $J=3,4$ Hz)	4,13 (m)
17 ²	—	—	—
17 ³	—	—	—
18	4,48 (m)	4,41 (dd)	—
18 ¹	1,81 (d)	1,57 (d, $J=7,6$ Hz)	1,60 (d, $J=7,3$ Hz)
19	—	—	—
20	8,55(s)	8,58 (s)	8,61 (s)

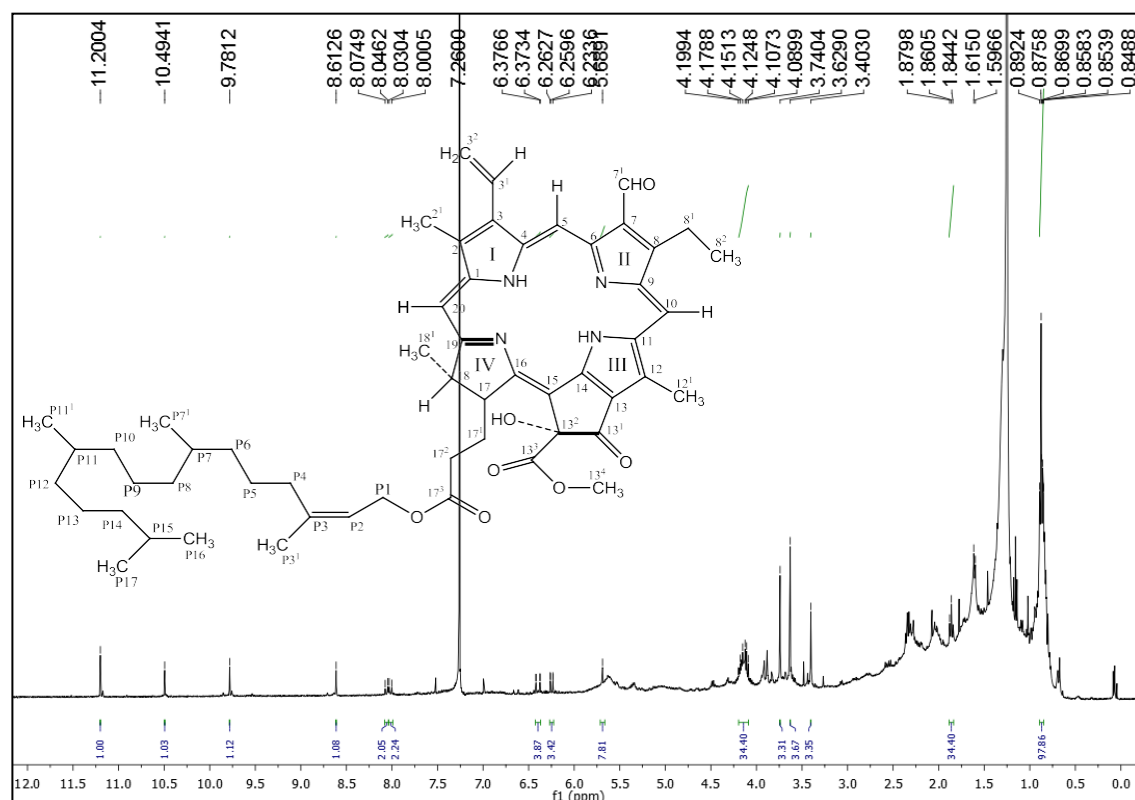
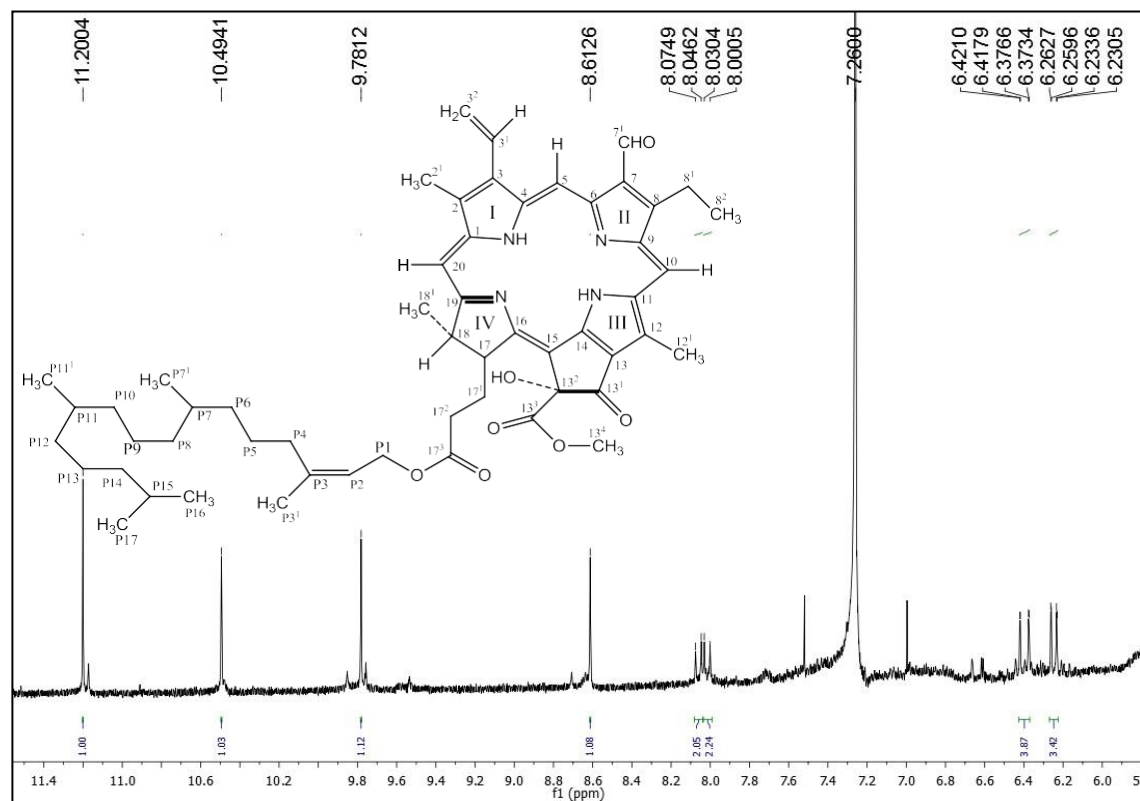
Figura 50. Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de *Hv*-5**Figura 51.** Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 6,0 e 11,4 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de *Hv*-5

Figura 52. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 3,1 e 4,4 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de *Hv*-5

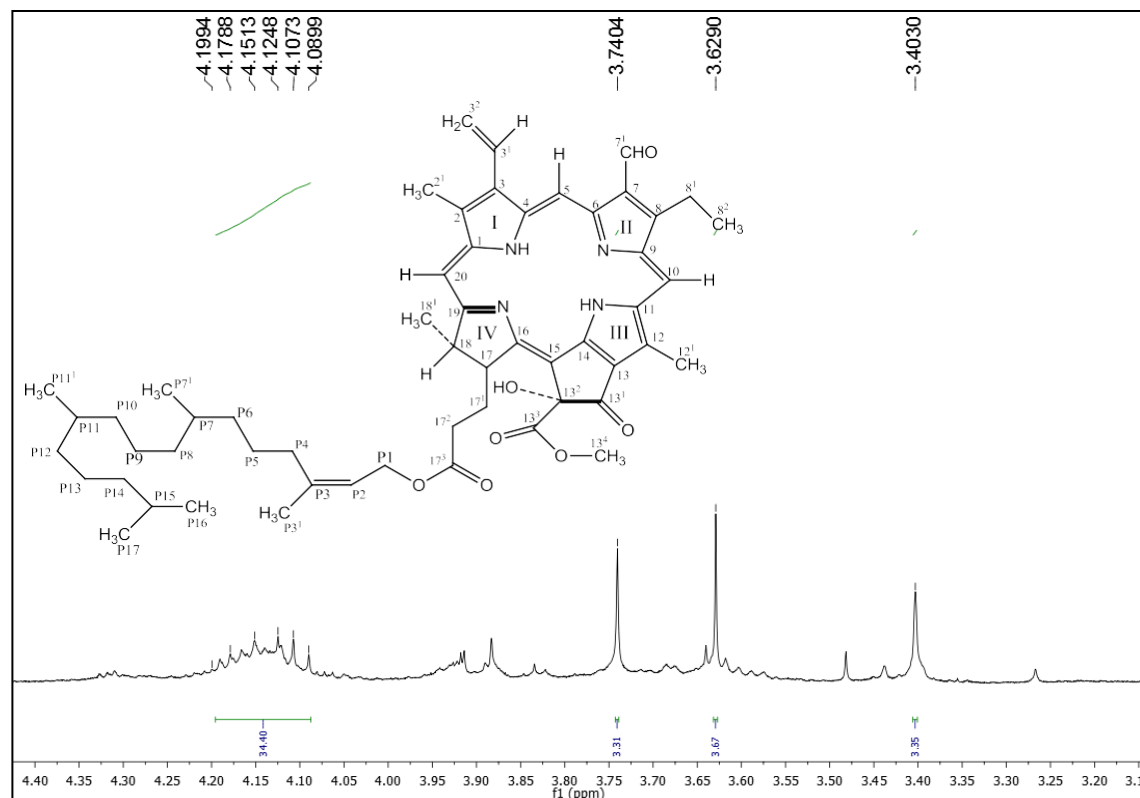


Figura 53. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 0,5 e 2,5 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de *Hv*-5

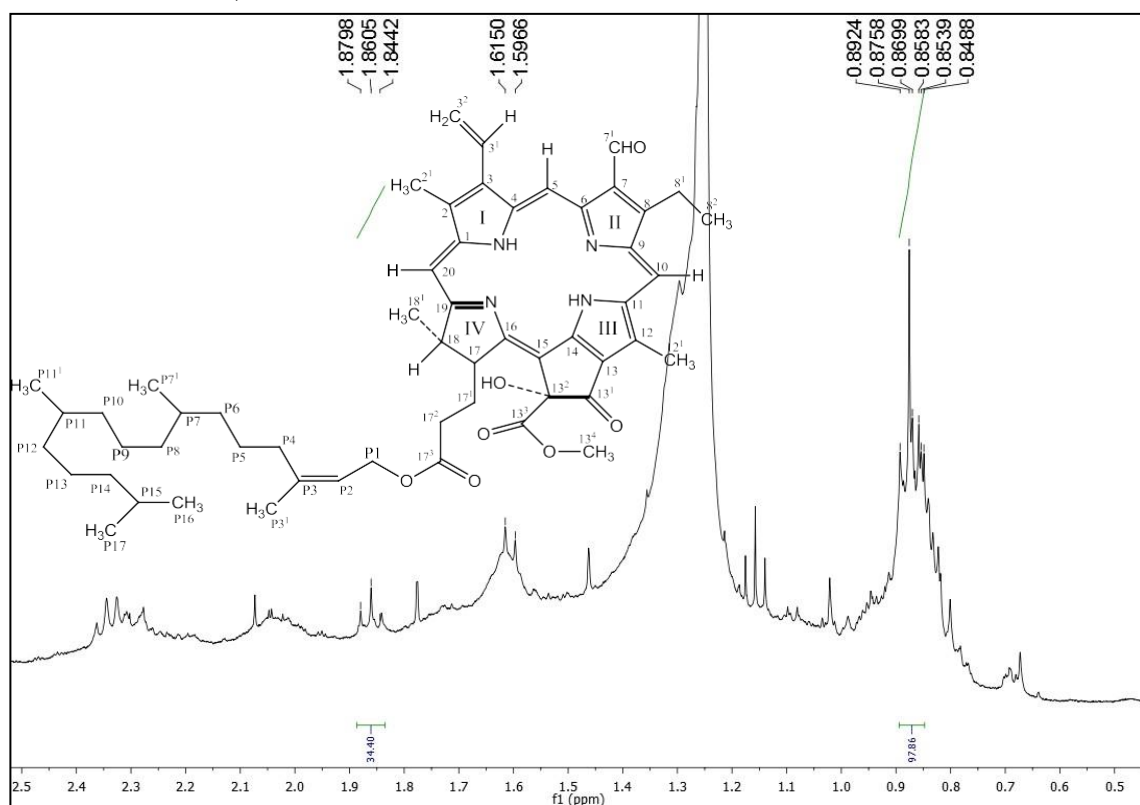
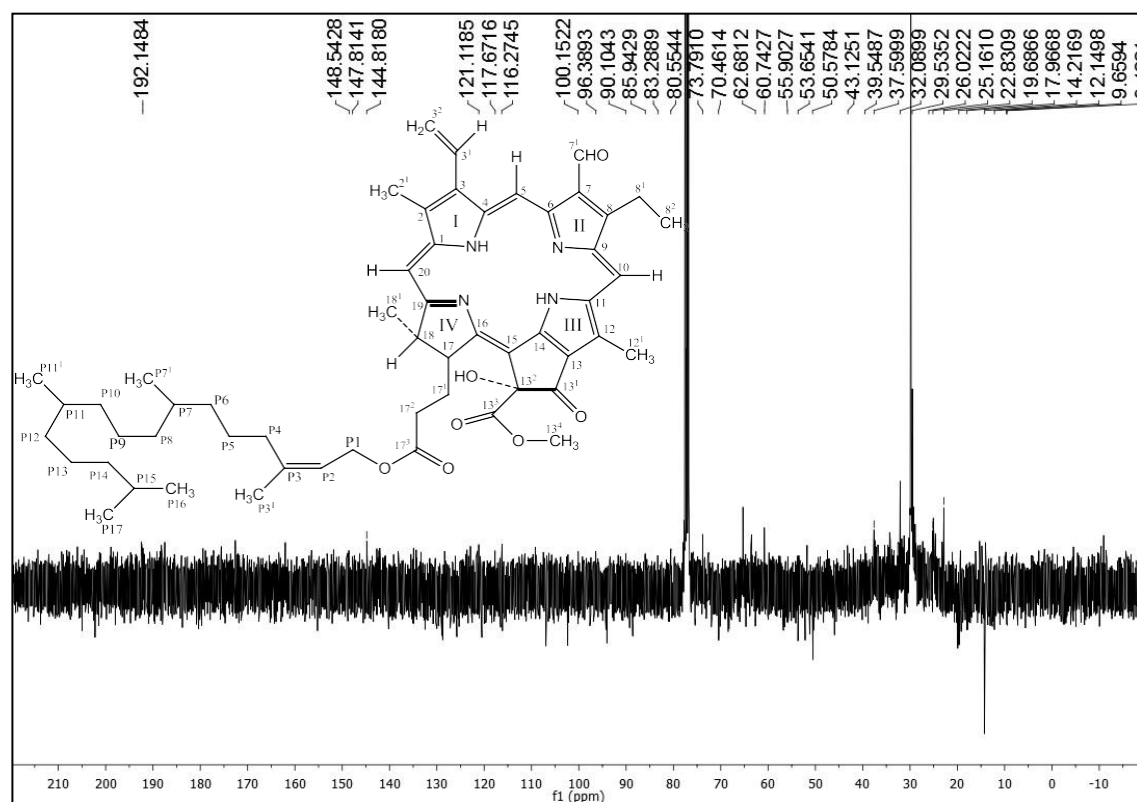


Figura 54. Espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de *Hv-5*

5.2.6. Caracterização estrutural de *Hv-6*

A substância codificada como *Hv-6* foi obtida como sólido amorfo branco. O espectro de RMN de ^1H e suas expansões, obtido em CDCl_3 a 400 MHz (Figuras 55 a 57, págs. 128 e 129), apresentou um envelope de sinais na região de δ_{H} 0,73 a 2,03, característicos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos, sugestivo de substâncias que comportam um esqueleto triterpênico ou esteroidal (SOUZA, 2013). Foram observados sete sinais em δ_{H} 0,73; 0,84; 0,85; 0,89; 0,91; 0,93 e 1,11, condizentes com metilas deste tipo de esqueleto, além de uma metila de acetato com sinal característico em δ_{H} 2,03, levando a sugerir que a substância trataria-se de um triterpeno acetilado (Figura 57, pág. 129).

Ainda avaliando o espectro de RMN ^1H foi possível observar um tripleto em δ_{H} 5,25 condizente com a presença de hidrogênio olefínico, bem como outro tripleto na região de δ_{H} 4,48 atribuído ao hidrogênio metínico, o que reforça a proposta da presença de uma acetoxila equatorial, comum na posição C-3 desse tipo de estrutura (Figura 56, pág. 128).

O espectro de RMN de ^{13}C , obtido pela técnica APT (Figuras 58 e 59, págs. 129 e 130), apresentou sinais para 32 átomos de carbono, sendo nove carbonos não hidrogenados, dez carbonos metilênicos, cinco carbonos metínicos e oito carbonos metílicos, corroborando com os dados até então obtidos, que *Hv-6* trata-se de um triterpeno (ASSIS-JUNIOR et al. 2013).

Ainda observando os espectros de hidrogênio e carbono de *Hv-6*, o tripleto em δ_{H} 5,25, juntamente com os sinais de carbono em δ_{C} 122,7 (C-12) e δ_{C} 143,7 (C-13) corroboram com a proposta inicial, uma vez que caracterizam a dupla ligação entre o carbono C-12 e C-13 de triterpenos da série oleanano (Figura 58, pág. 129). Os sinais em δ_{C} 81,0 e 171,2 confirmam a presença do grupo acetoxi na posição C-3 (Figura 58, pág. 129) (COSTA, 2013). Além do sinal em δ_{C} 184,6 atribuído ao grupo carboxílico C-28, típico de triterpenos ácidos, os demais sinais estão compilados na tabela 11 (pág. 126).

Após análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C unidimensionais, além da comparação com modelos da literatura (Tabela 11, pág. 126), *Hv-6* foi identificada como sendo um triterpeno da série oleanano, o ácido 3 β -acetoxi-oleano-12-en-28-óico (acetato do ácido oleanólico). Substância esta relatada anteriormente nas espécies *Hyptis macrostachys* (COSTA, 2013) e *Macrosiphonia petrae* (ASSIS-JUNIOR et al. 2013), sendo isolada pela primeira vez no gênero *Helicteres*.

Na literatura é descrito que derivados da série oleanano possuem potencial atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante (VECHIA et al. 2009).

Hv-6: Ácido 3 β -acetoxi-oleano-12-en-28-óico (Acetato do ácido oleanólico)

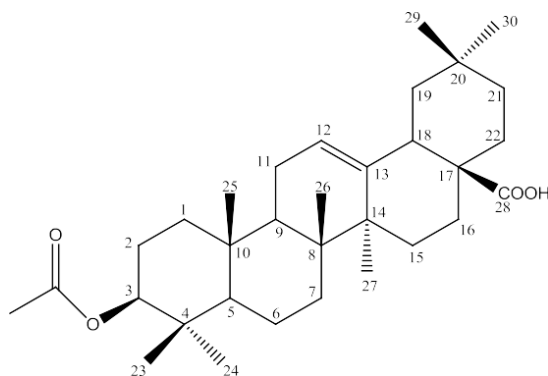


Tabela 11. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de *Hv-6* (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz) com modelo da literatura Mo-1 (δ , CDCl_3 , 500 e 125 MHz) (COSTA., 2013), Mo-2 (δ , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 e 125 MHz) (FERNANDES et al. 2018)

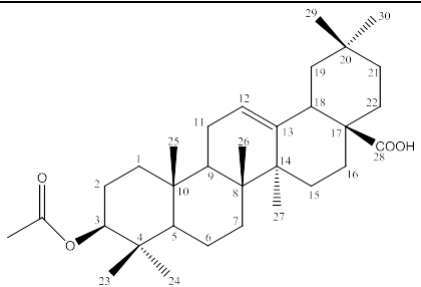
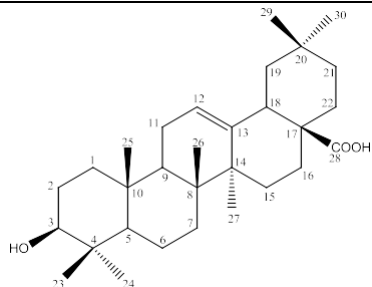
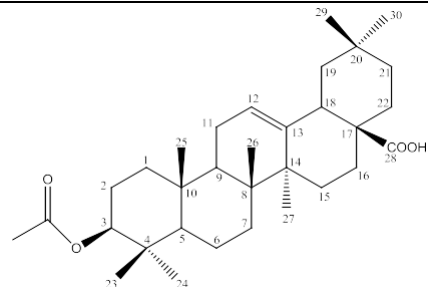
Mo-1 (Acetato do ácido oleanólico)			Mo-2 (Ácido oleanólico)		<i>Hv-6</i>	
						
C	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	38,0	-	38,8	-	38,1
2	-	23,5	-	28,0	-	23,5
3	4,47 (tl, $J= 8,5$ Hz, 1H)	80,9	3,43 (dd, $J= 5,6$ e $10,5$ Hz, 1H)	78,0	4,49 (t, $J= 8,5$ Hz, 1H)	81,0
4	-	37,6	-	39,3	-	37,8
5	-	55,2	-	55,7	-	55,4
6	-	18,1	-	18,7	-	18,3
7	-	32,4	-	33,2	-	32,6
8	-	39,2	-	39,7	-	39,4
9	-	47,5	1,67 (t, $J= 9,0$ Hz, 1H)	48,0	-	47,7
10	-	36,9	-	37,7	-	37,8
11	-	22,8	-	23,6	-	23,0

Tabela 11 (Continuação). Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de *Hv*-6 (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz) com modelo da literatura Mo-1 (δ , CDCl_3 , 500 e 125 MHz) (COSTA., 2013), Mo-2 (δ , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 e 125 MHz) (FERNANDES, 2017)

Mo-1 (Acetato do ácido oleanólico)			Mo-2 (Ácido oleanólico)		<i>Hv</i> -6	
C	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
12	5,22 (sl, 1H)	122,4	5,48 (t, $J= 3,4$ Hz, 1H)	122,5	5,25 (t, $J= 3,4$ Hz, 1H)	122,7
13	-	143,5	-	144,8	-	143,7
14	-	41,5	-	42,1	-	41,7
15	-	27,6	-	28,2	-	27,8
16	-	23,3	-	23,7	-	23,6
17	-	46,5	-	46,6	-	46,7
18	2,79 (dd, 1H)	40,8	3,29 (dd, 1H)	41,9	2,80 (dd, 1H)	41,7
19	-	45,8	-	46,4	-	46,0
20	-	30,6	-	30,9	-	30,8
21	-	33,7	-	34,1	-	33,9
22	-	32,4	-	33,1	-	32,5
23	0,81 (s, 3H)	28,0	1,01 (s, 3H)	28,7	0,84 (s, 3H)	28,2
24	0,83 (s, 3H)	16,6	1,22 (s, 3H)	16,5	0,85 (s, 3H)	16,8
25	0,86 (s, 3H)	15,3	0,93 (s, 3H)	15,5	0,89 (s, 3H)	15,5
26	0,71 (s, 3H)	17,1	0,99 (s, 3H)	17,4	0,73 (s, 3H)	17,3
27	1,09 (s, 3H)	25,8	1,26 (s, 3H)	26,1	1,11 (s, 3H)	26,0
28	-	184,3	-	180,2	-	184,7
29	0,90 (s, 3H)	33,0	0,88 (s, 3H)	33,1	0,91 (s, 3H)	33,2
30	0,91 (s, 3H)	23,5	1,01 (s, 3H)	23,7	0,93 (s, 3H)	23,7
OAc	2,00 (s, 3H)	171,1	-	-	2,03 (s, 3H)	171,3

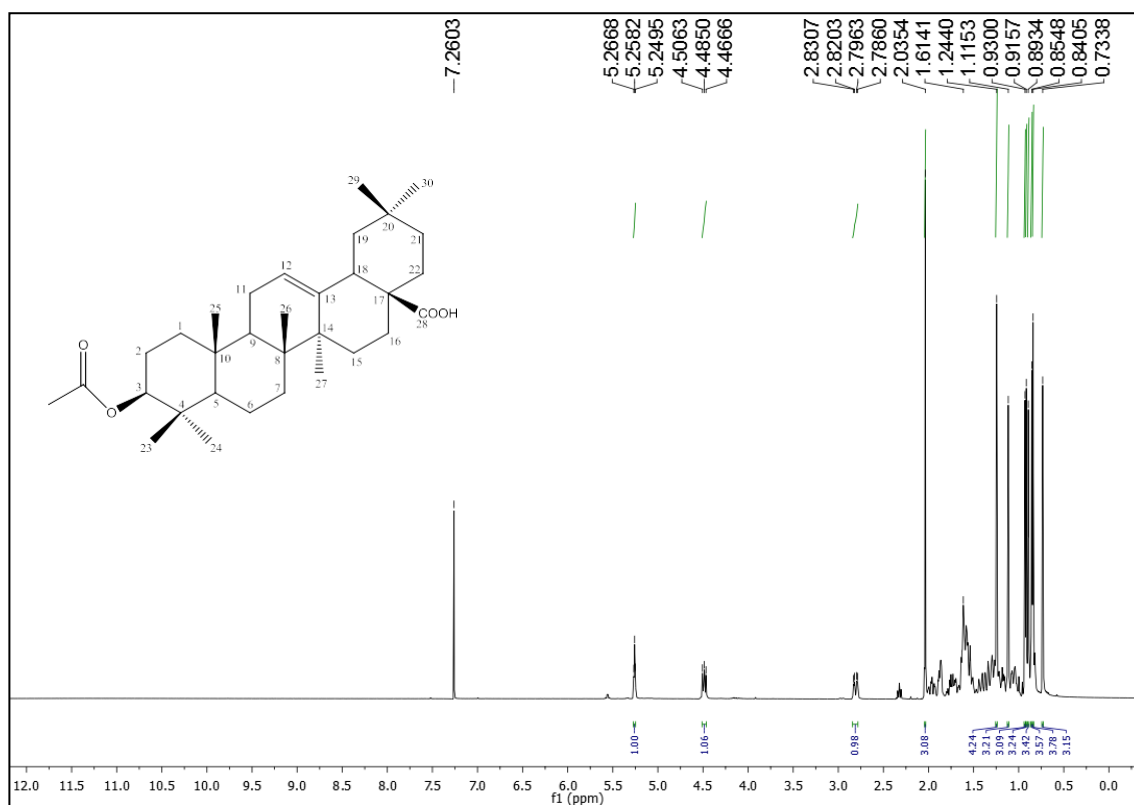
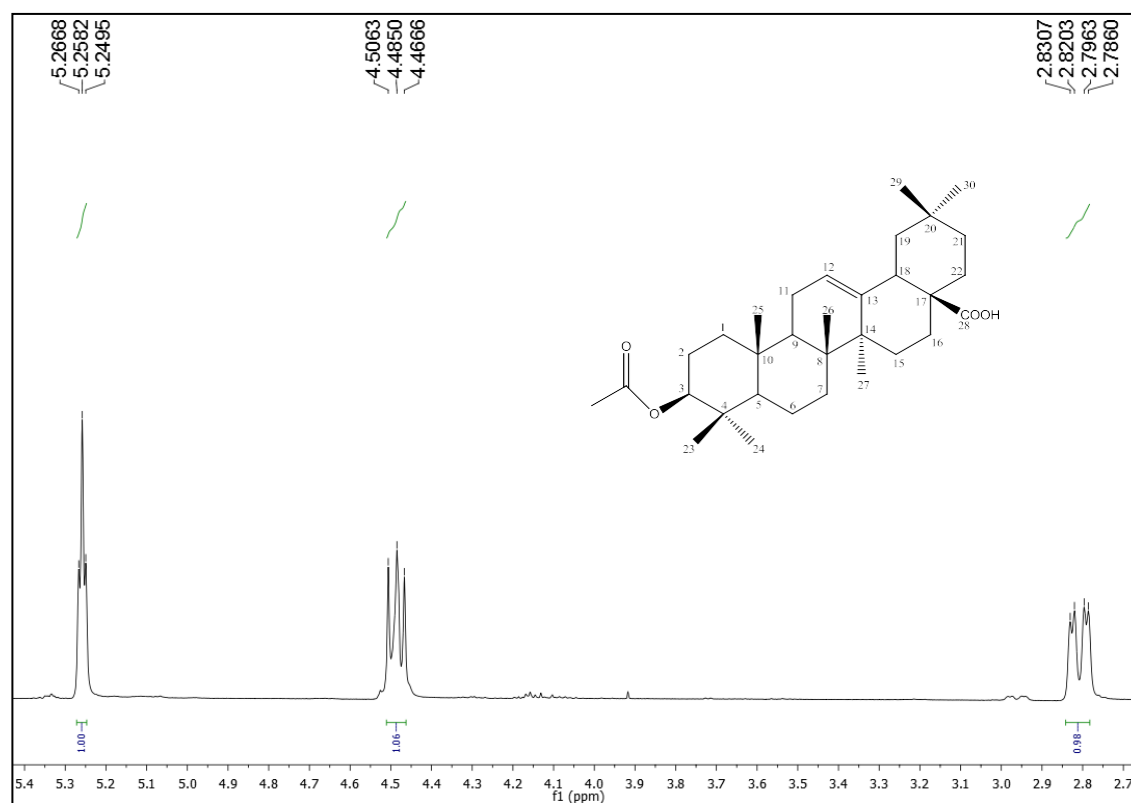
Figura 55. Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de *Hv*-6**Figura 56.** Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 2,7 e 5,4 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de *Hv*-6

Figura 57. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 0,7 e 2,2 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de *Hv-6*

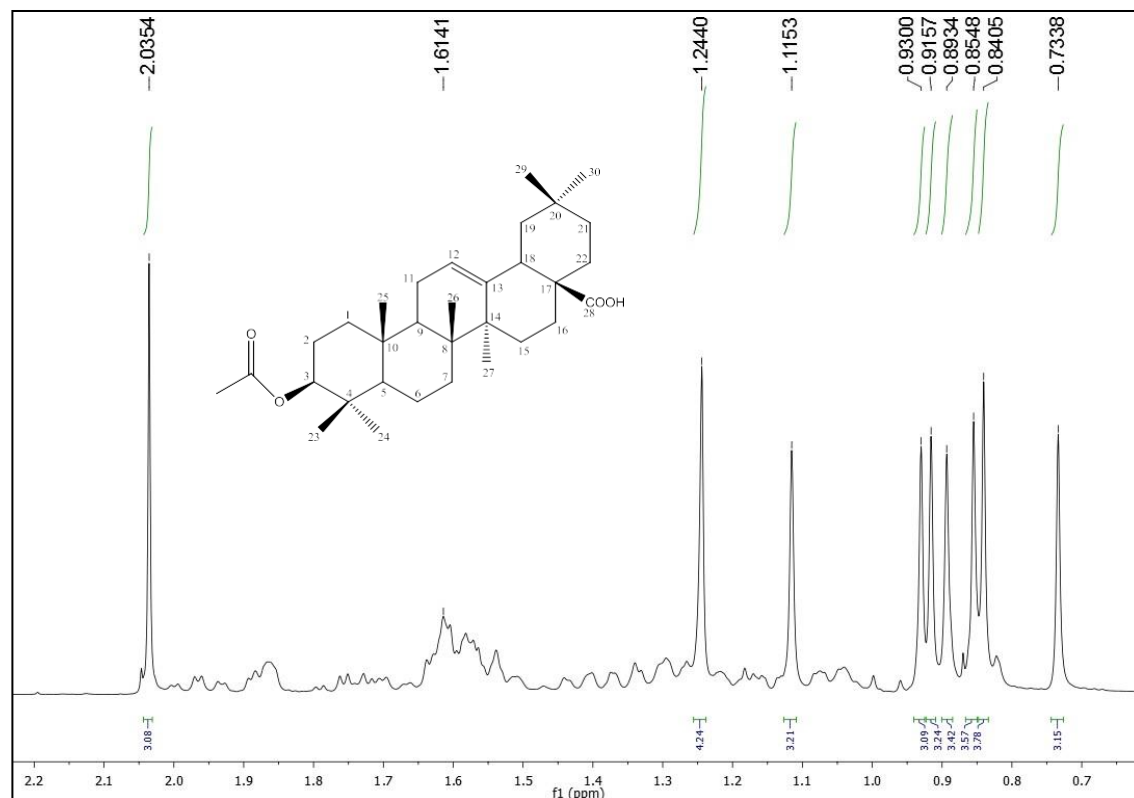


Figura 58. Espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de *Hv-6*

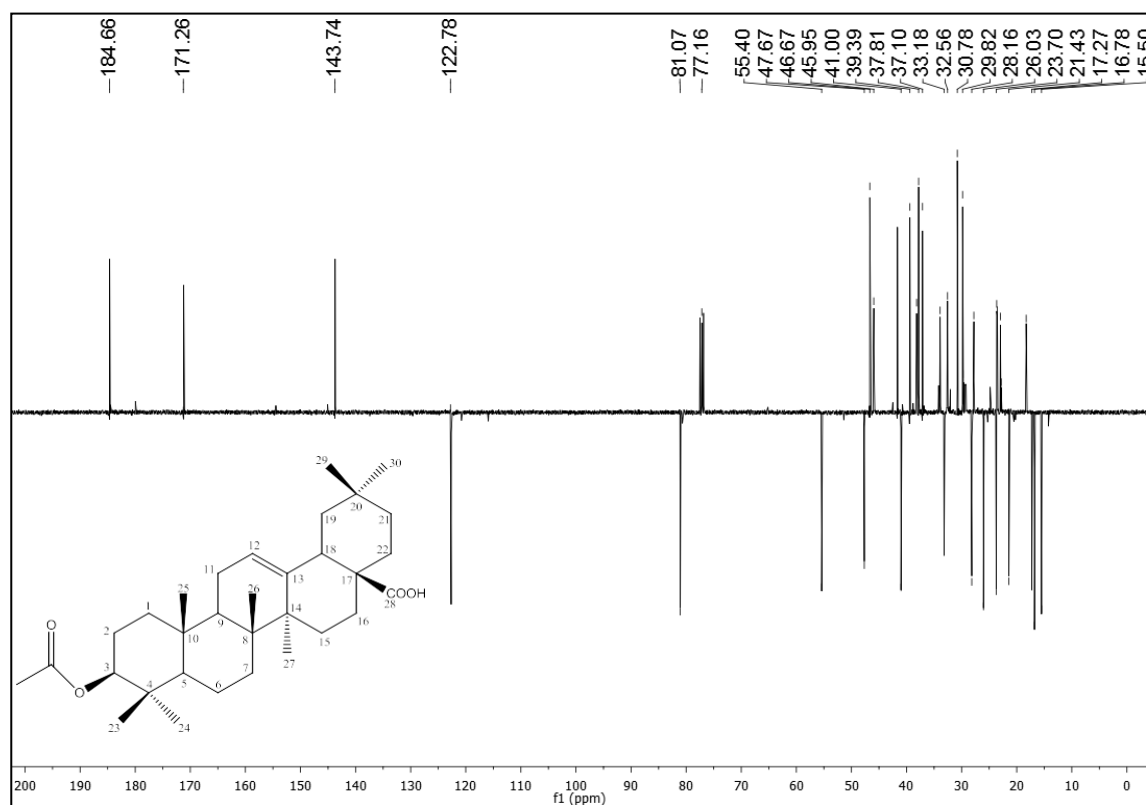
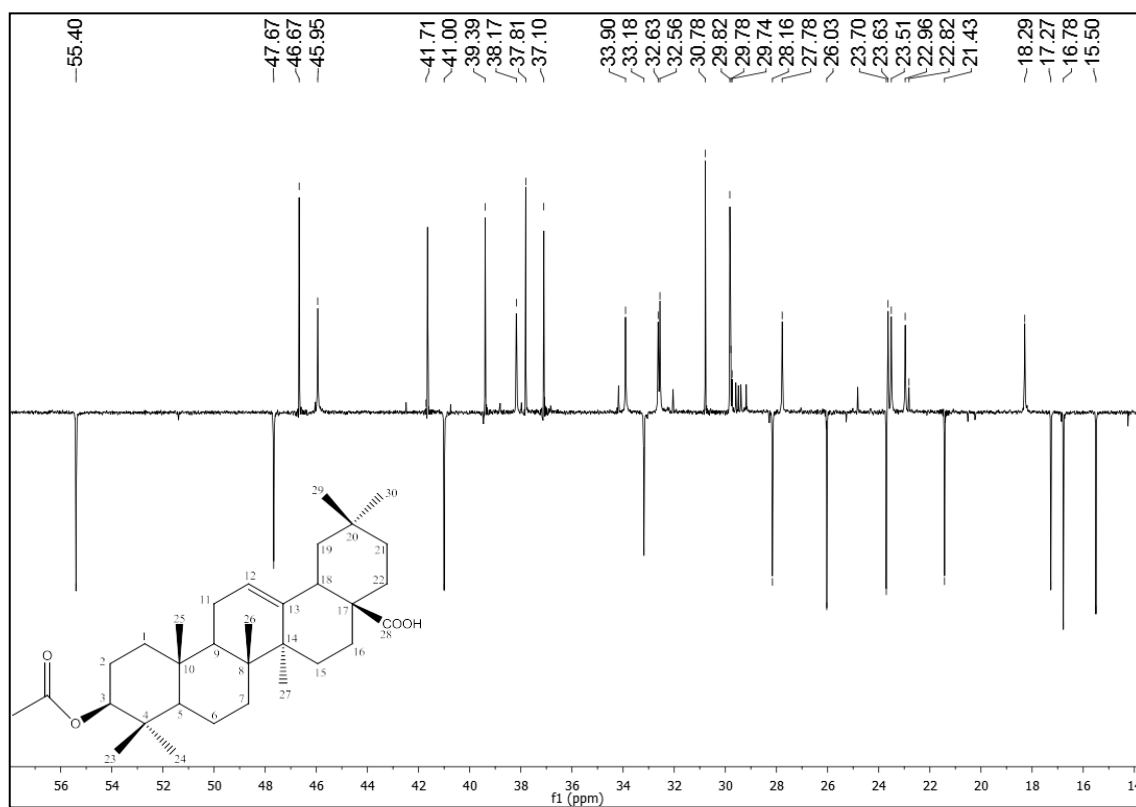


Figura 59. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de *Hv*-6

5.2.7. Caracterização estrutural de *Hv-7*

A substância codificada como *Hv-7* apresentou-se como uma graxa branca, solúvel em hexano e clorofórmio. O espectro de RMN de ^1H (Figura 60, pág. 136) e suas expansões (Figuras 61 e 62, págs. 136 e 137), mostrou sinais referentes a oito metilas com singletos em δ_{H} 0,82; 0,83; 0,87; 0,87; 0,95; 0,96; 1,10 e 1,35 característicos de núcleo triterpênico (SOUZA, 2013). Ainda foi possível revelar a presença de um tripleto em δ_{H} 5,23 (3,6 Hz), que indicou a existência de hidrogênio olefínico. Os sinais entre δ_{H} 4,57-4,43 foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono carbinólico de éster, indicativo de função éster equatorial em C-3. Um tripleto em δ_{H} 2,30 ($J=7,8$ Hz), atribuído aos átomos H-2' e um sinal intenso em δ_{H} 1,25 indicaram a presença de uma cadeia lateral longa ligada ao grupo carbonila da função éster (FERREIRA, 2014).

O espectro de RMN de ^{13}C -APT de *Hv-7* (Figuras 63 e 64, págs. 137 e 138), mostrou 43 sinais, atribuídos a 48 átomos de carbono, sendo 8 carbonos não hidrogenados, 26 carbonos metilênicos, 5 carbonos metínicos e 9 carbonos metílicos. Os sinais referentes a átomos de carbono olefínicos, característicos de 3 β -hidroxiolean-12-eno (δ_{C} 122,16 e 144,52), caracterizam a dupla ligação entre o carbono C-12 e C-13 de triterpenos da série oleanano. Destacou-se ainda os sinais de carbonos metínicos em δ_{C} 55,8 (C-5), δ_{C} 47,9 (C-9) e δ_{C} 47,6 (C-18) compatíveis com triterpenos pertencentes a essa série (MENDES et al. 1999).

Um sinal em δ_{C} 80,65 foi atribuído ao carbono carbinólico em C-3 e um sinal em δ_{C} 173,84 ao carbono carbonílico de éster. Um sinal intenso em δ_{C} 29,85 foi atribuído aos átomos de carbono metilênico da cadeia lateral ligada à carbonila. Esses sinais de RMN ^{13}C e ^1H , corroboram que a substância se tratava de um éster graxo (OLIVEIRA, 2012). A ausência de sinal de ácido δ_{C} 184,60 observado em *Hv-6* (Figura 63, pág. 137), mostrou que *Hv-7* não possui essa função.

Após comparação com dados da literatura (FERREIRA, 2014) (Tabelas 12 e 13, págs. 133 a 135), pode-se concluir que *Hv-7* se trata do 3- β -esterearoxi-olean-12-eno, substância comumente encontrada em espécies do gênero *Maytenus*, tendo sido isolada na forma de mistura nas espécies *Maytenus distichophylla* (FERREIRA, 2014) e *Maytenus acanthophylla* (OLIVEIRA, 2012), relatada pela primeira vez no gênero *Helicteres*.

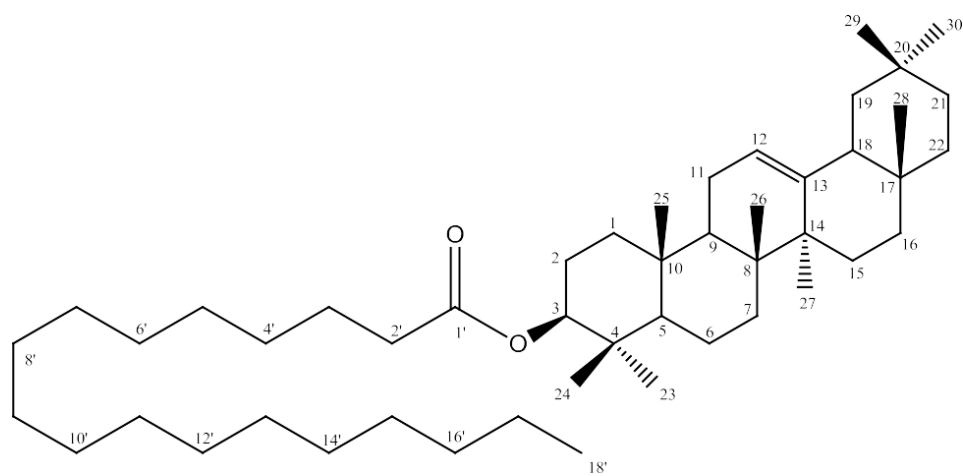
Hv-7: 3- β -esterearloxi-olean-12-eno

Tabela 12. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de *Hv-7* (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz) com modelo da literatura Mo-1 (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz) (FERREIRA., 2014), Mo-2 (δ , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 e 125 MHz) (FERNANDES et al., 2018)

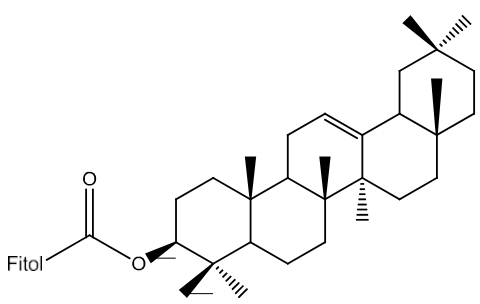
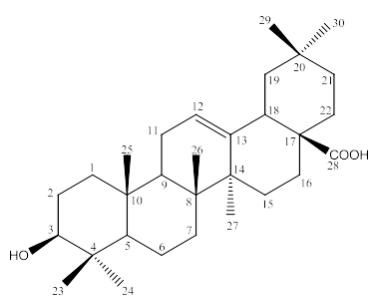
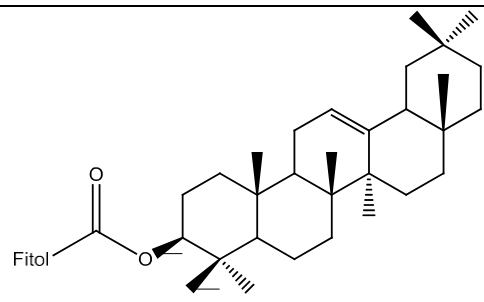
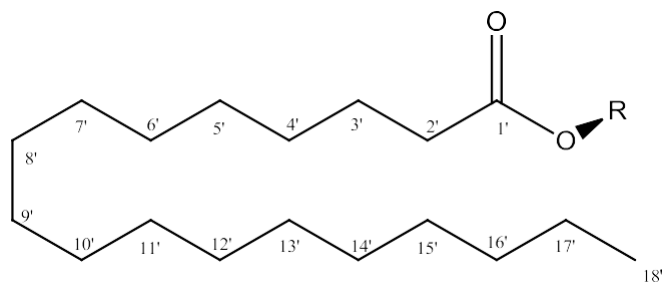
Mo-1 (3- β -esterearoxi-olean-12-eno)			Mo-2 (Ácido oleanólico)		<i>Hv-7</i>	
						
C	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	38,2	-	38,8	-	38,8
2	-	23,3	-	28,0	-	23,6
3	4,50 (dd, $J= 8,0$ Hz, 1H)	80,6	3,43 (dd, $J= 5,6$ e $10,5$ Hz, 1H)	78,0	4,50 (dd, $J= 7,3$ e $4,2$ Hz, 1H)	80,7
4	-	37,7	-	39,3	-	37,3
5	-	55,2	-	55,7	-	55,8
6	-	18,2	-	18,7	-	18,5
7	-	32,6	-	33,2	-	32,6
8	-	39,8	-	39,7	-	40,6
9	-	47,6	1,67 (t, $J= 9,0$ Hz, 1H)	48,0	-	48,0
10	-	36,8	-	37,7	-	36,5

Tabela 12 (Continuação). Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de *Hv-7* (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz) com modelo da literatura Mo-1 (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz) (FERREIRA., 2014), Mo-2 (δ , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 e 125 MHz) (FERNANDES et al. 2018)

Mo-1 (3- β -esterearoxi-olean-12-eno)			Mo-2 (Ácido oleanólico)		<i>Hv-7</i>	
C	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
11	-	23,5	-	23,6	-	23,9
12	5,13 (, $J= 3,4$ Hz, 1H)	121,6	5,48 (t, $J= 3,4$ Hz, 1H)	122,5	5,23 (t, $J= 3,6$ Hz, 1H)	122,2
13	-	145,2	-	144,8	-	144,5
14	-	41,7	-	42,1	-	41,0
15	-	26,1	-	28,2	-	26,2
16	-	26,9	-	23,7	-	27,1
17	-	32,5	-	46,6	-	32,1
18	-	47,5	3,29 (dd, 1H)	41,9	-	47,6
19	-	46,7	-	46,4	-	46,9
20	-	31,0	-	30,9	-	31,2
21	-	34,7	-	34,1	-	34,9
22	-	37,1	-	33,1	-	37,4
23	0,88 (s, 3H)	28,0	1,01 (s, 3H)	28,7	0,95 (s, 3H)	28,0
24	0,91 (s, 3H)	16,7	1,22 (s, 3H)	16,5	1,35 (s, 3H)	16,9
25	0,96 (s, 3H)	15,5	0,93 (s, 3H)	15,5	0,96 (s, 3H)	15,7
26	1,13 (s, 3H)	16,8	0,99 (s, 3H)	17,4	1,10 (s, 3H)	17,2
27	0,97 (s, 3H)	25,9	1,26 (s, 3H)	26,1	0,96 (s, 3H)	26,1
28	0,87 (s, 3H)	28,4	-	180,2	0,87 (s, 3H)	28,5
29	0,83 (s, 3H)	33,3	0,88 (s, 3H)	33,1	0,83 (s, 3H)	33,5
30	0,80 (s, 3H)	23,7	1,01 (s, 3H)	23,7	0,82 (s, 3H)	23,9

Tabela 13. Dados comparativos de RMN ^{13}C da cadeia fitil éster de *Hv-7* (δ , CDCl_3 , 100 MHz) com o modelo Mo-1 (FERREIRA, 2014).



Mo-1			<i>Hv-7</i>	
C	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1'	-	173,6	-	173,8
2'	2,29 (d, J=7,4 Hz, 2H)	34,8	2,30 (d, J=7,8 Hz, 2H)	35,0
3'	-	25,1	-	25,3
4'	1,25 (s)	29,2	1,25 (s)	29,3
5'	-	29,2	-	29,4
6'	-	29,3	-	29,5
7'	-	29,6	-	29,7
8'	-	29,7	-	29,8
9'	-	29,7	-	29,8
10'	-	29,7	-	29,8
11'	-	29,7	-	29,8
12'	-	29,7	-	29,8
13'	-	29,7	-	29,8
14'	-	29,6	-	29,8
15'	-	29,4	-	29,6
16'	-	31,9	-	32,0
17'	1,25 (s)	22,7	1,25 (s)	22,8
18'	0,88 (s)	14,1	0,86 (s, 3H)	14,3

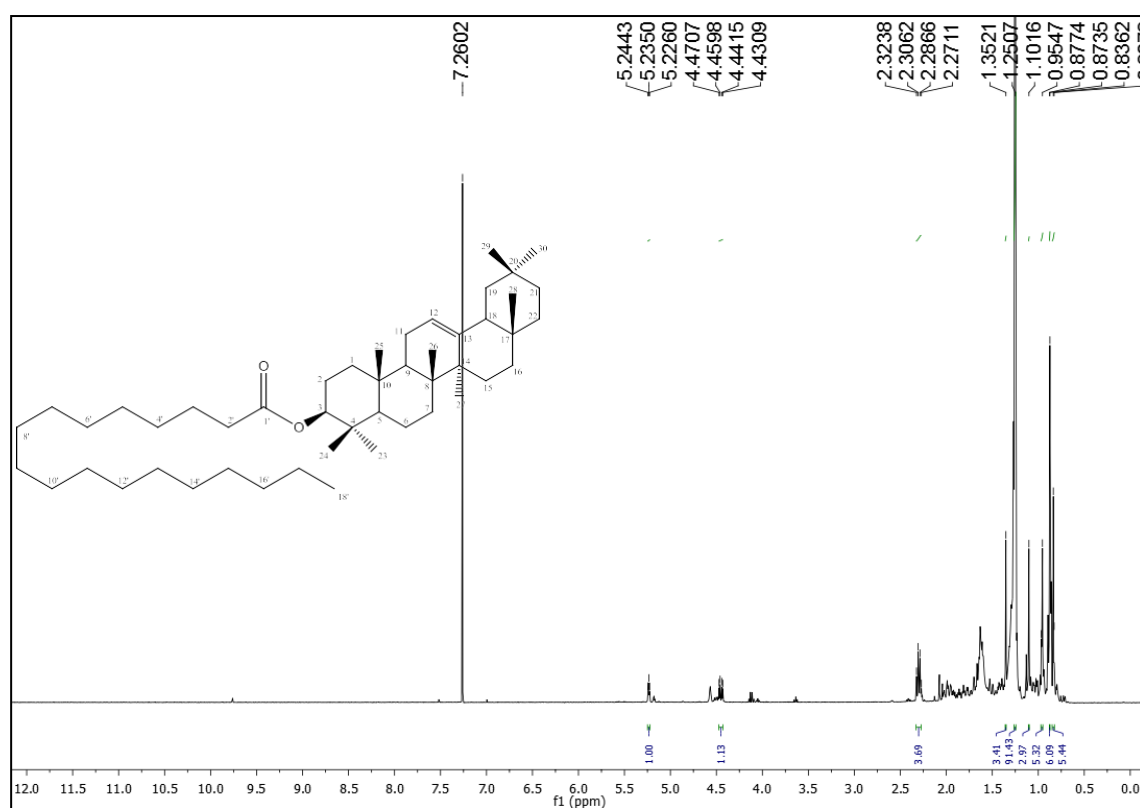
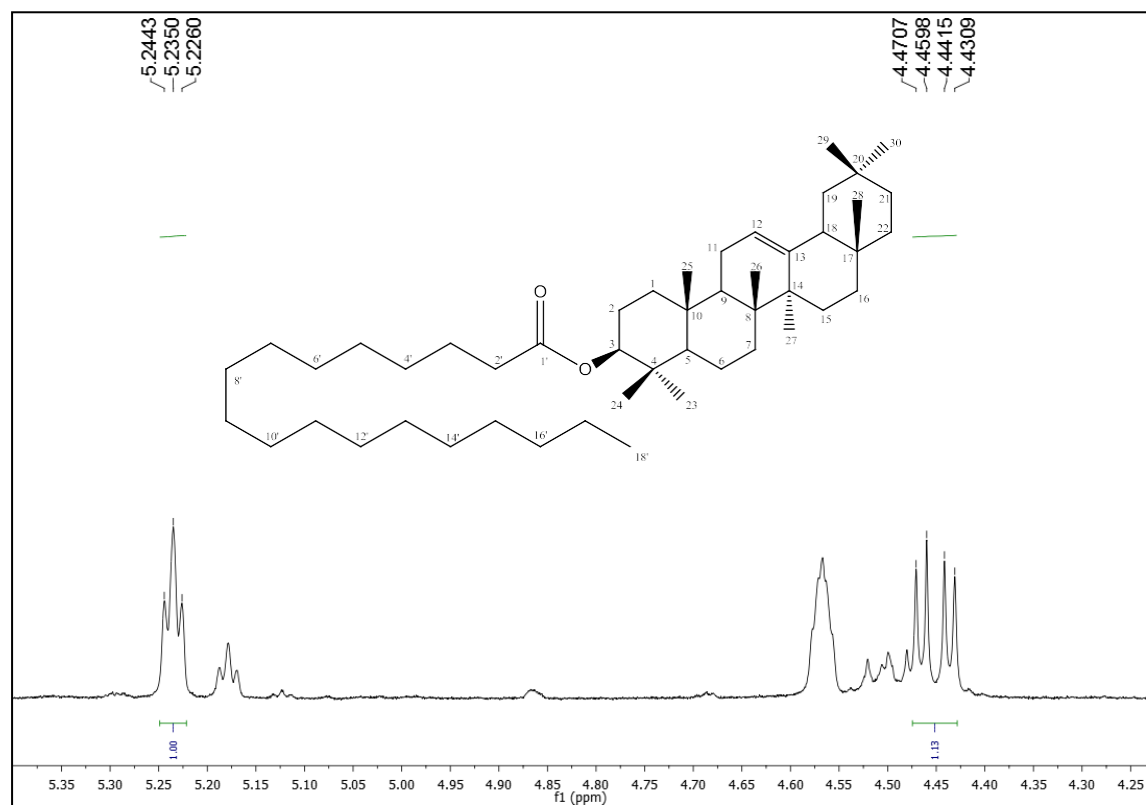
Figura 60. Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de *Hv-7***Figura 61.** Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 4,25 e 5,35 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de *Hv-7*

Figura 62. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 0,8 e 2,4 ppm (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de *Hv*-7

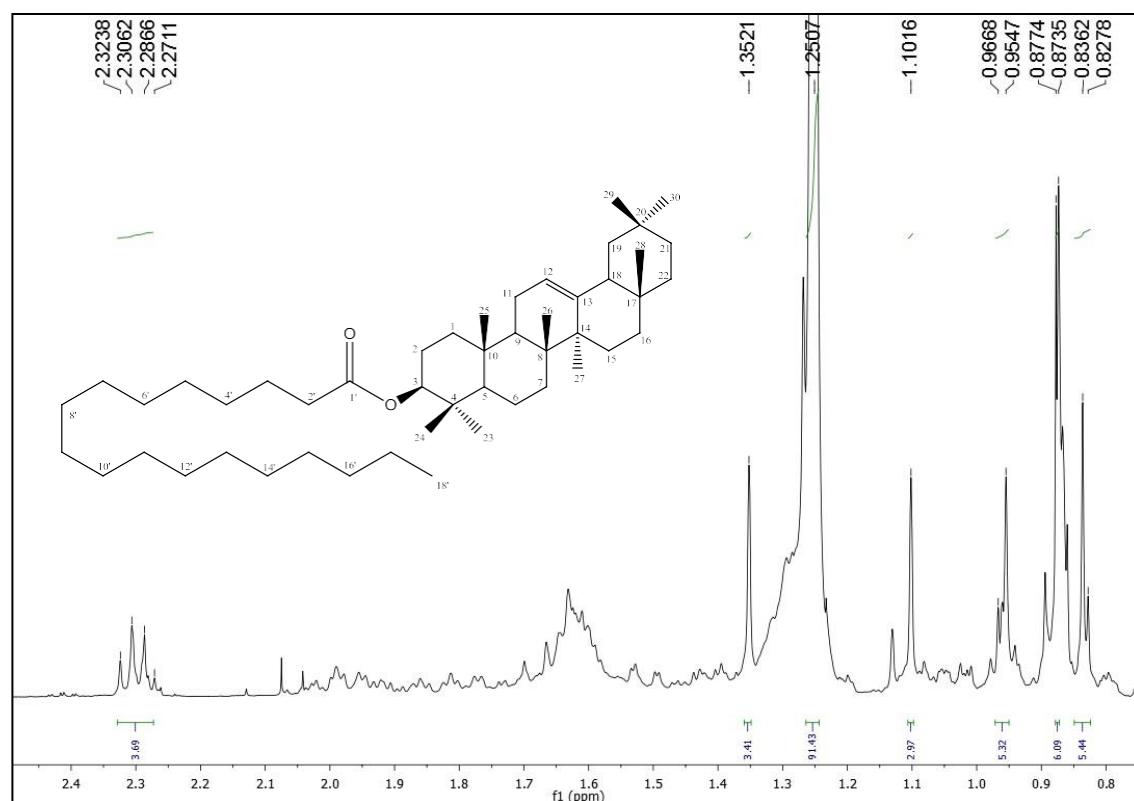


Figura 63. Espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de *Hv*-7

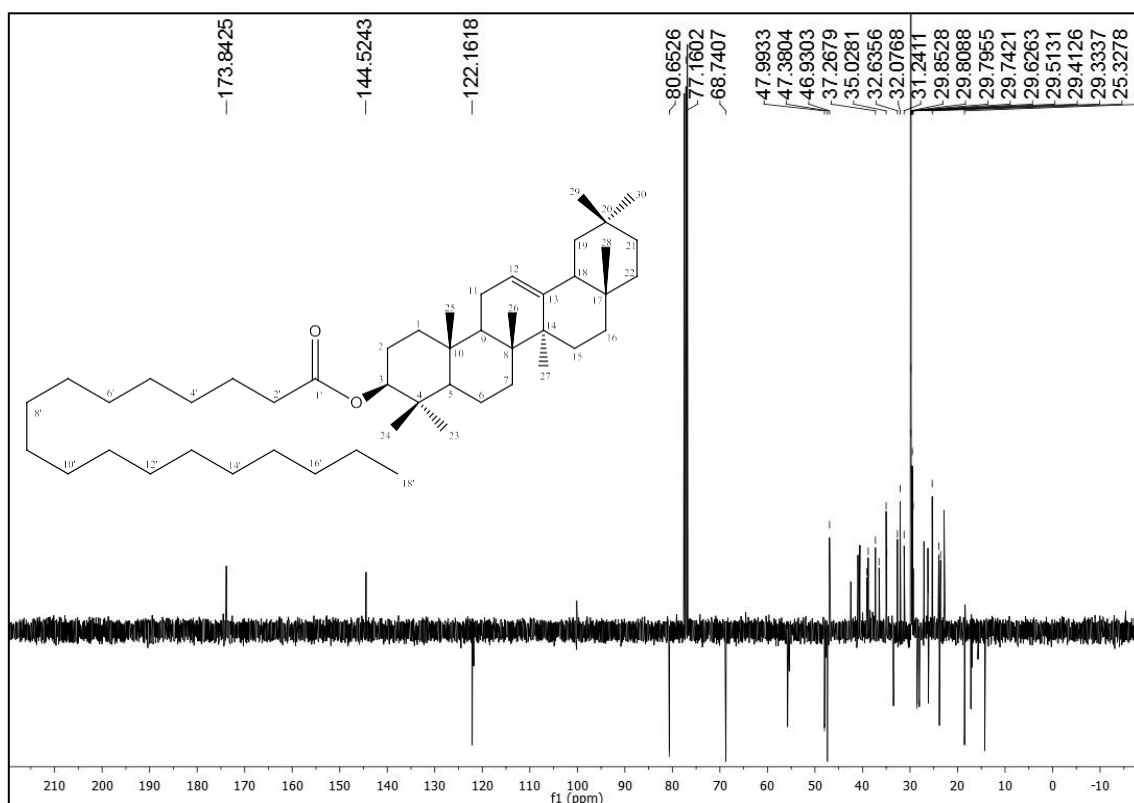
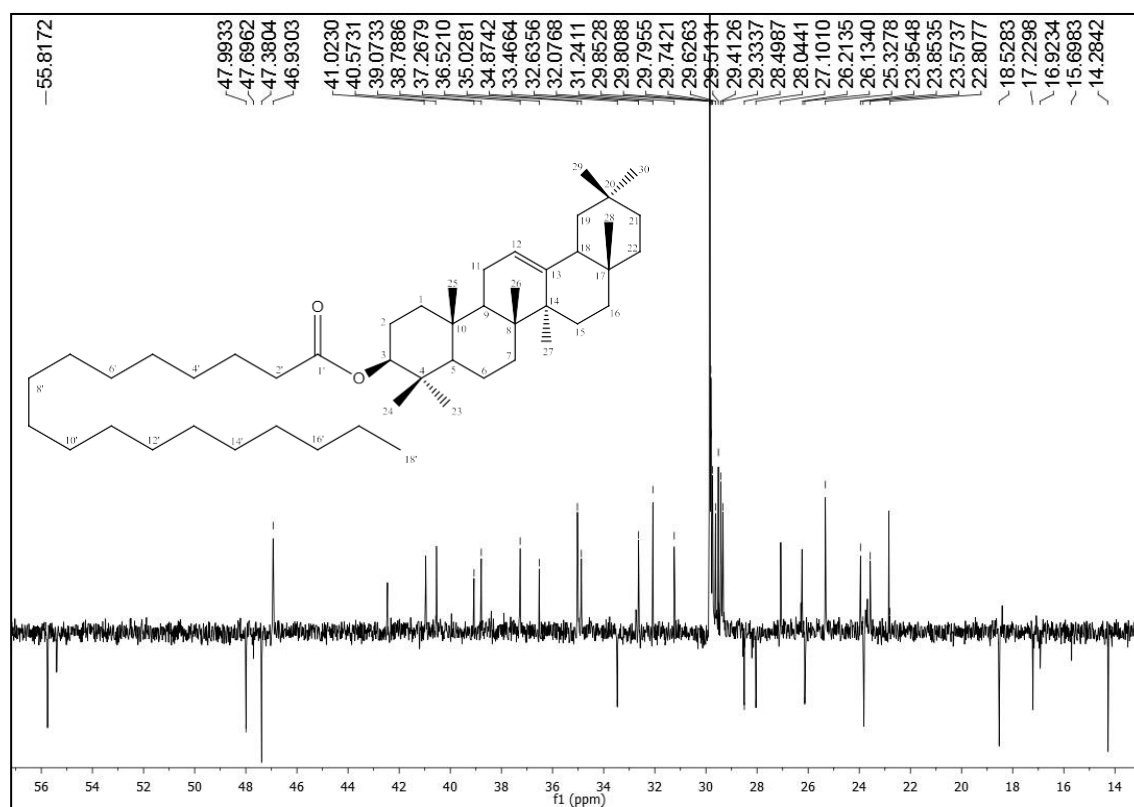


Figura 64. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de *Hv-7*

5.2.8. Caracterização estrutural de *Hv-8*

A substância *Hv-8* apresentou-se na forma de um pó amarelo. A análise do seu espectro de RMN ^1H (δ , 400 MHz, DMSO- d_6) e suas expansões (Figuras 65 a 67, págs. 144 e 145) apresentou absorções para hidrogênios na região de aromáticos entre δ_{H} 6,54 e 8,11 (GOMES et al. 2011). Com destaque para um simpleto em δ_{H} 12,42 característico de hidrogênios em ponte, como ocorre em flavonoides com OH ligados ao C-5. Dois dubletos em δ_{H} 7,13 e δ_{H} 8,10 (Figura 66, pág. 144) com $J=6,9$ e $6,8$ Hz, respectivamente, ambos com integral para 2H cada, indicando acoplamento *orto*, sugerem que *Hv-8* possui um sistema AA'BB' no seu anel B (CHAVES, et al. 2017).

Os sinais observados indicam que a molécula de *Hv-8* possui o anel A trissubstituído, uma vez que não foi observado dupletos para os hidrogênios desse anel, apenas um simpleto em δ_{H} 6,55. Outro simpleto foi evidenciado em δ_{H} 6,85 valor característico do hidrogênio da posição 3 de flavonas (CHAVES et al. 2013). Dois sinais característicos de hidrogênios metoxílicos foram encontrados em δ_{H} 3,85 e 3,89 mostrando que *Hv-8* possui estes grupos como substituintes (Figura 67, pág. 145).

O espectro de RMN ^{13}C e suas expansões (Figuras 68 a 70, págs. 145 e 146) mostraram 15 absorções, incluindo dois carbonos em δ_{C} 55,64 e δ_{C} 56,41 pertencentes às metoxilas. As absorções intensas em δ_{C} 129,5 e 114,6, são referentes aos carbonos equivalentes do anel B H-2'/6' e H-3'/5', respectivamente, confirmando a existência do sistema AA'BB' característico de núcleo flavonoídico (GOMES et al. 2011).

As correlações diretas entre ^{13}C e ^1H podem ser observadas no espectro de HMQC e suas expansões (Figuras 71 a 73, págs. 147 e 148). A análise dos espectros de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (Figuras 74 a 76, págs. 148 e 149) permitiu confirmar que uma metoxila (δ_{H} 3,89) se encontra ligada ao carbono C-7, e a outra metoxila (δ_{H} 3,85) encontra-se ligada ao carbono 4' no anel B, sendo proposta a estrutura da 5,8-diidroxi-7,4'-dimetoxiflavona para *Hv-8*.

A análise dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e comparações com os dados da literatura (Tabelas 14 e 15, págs. 141 a 143) permitiram identificar *Hv-8* como sendo a estrutura 5,8-diidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (7,4'-Di-O-metilisoescutelareína), flavonoide isolado anteriormente de *W. periplocifolia* (GOMES, 2011, TELES et al. 2015b), *H. isora*, *H. angustifolia* e *H. hirsuta* (RAMESH & YUVARAJAN, 1995; CHEN et al., 2006; NGUYEN, et al., 2017), sendo relatada pela primeira vez na espécie *H. velutina*.

Essa substância possui comprovada atividade anti-inflamatória (TELES et al. 2015b) e atua como moduladora na resistência bacteriana (GOMES et al. 2011).

Hv-8: 7,4'-Di-*O*-metilisoescutelareina

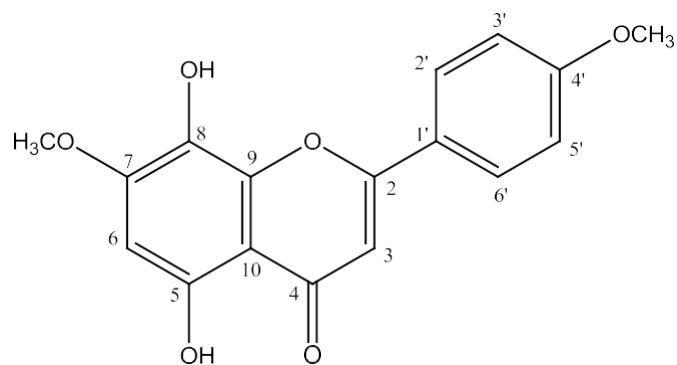


Tabela 14. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de *Hv-8* (δ , DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) com modelo da literatura Mo-1 (δ , DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) (TELES et al., 2015b), Mo-2 (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125 MHz) (GOMES et al., 2011) e Mo-3 (δ , CD $_3$ OD, 500 e 125 MHz) (BARRETO et al., 2013).

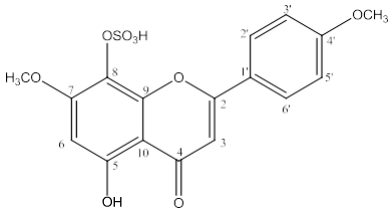
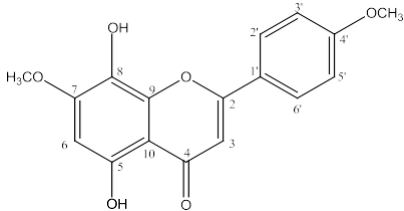
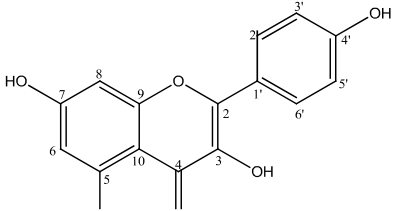
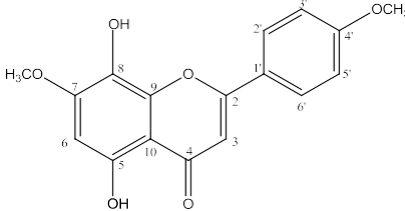
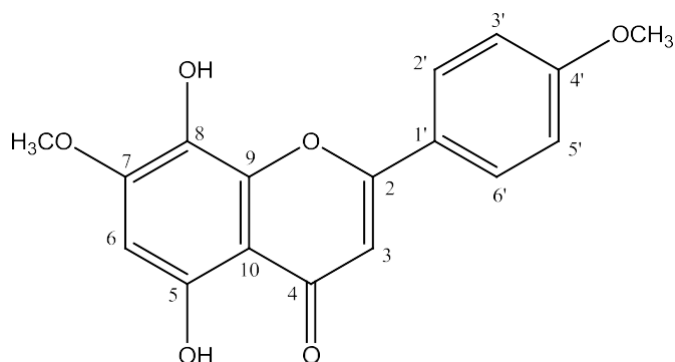
Mo-1 (Isoescutelareina sulfatada)			Mo-2 (7,4'-Di-O-methylisoscutellarein)		Mo-3 (Canferol)		<i>Hv-8</i>	
								
C	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2	-	164,4	-	163,5	-	148,2	-	163,6
3	6,88 (s, 1H)	103,3	6,84 (s, 1H)	103,0	-	137,3	6,85 (s, 1H)	103,1
4	-	182,7	-	182,4	-	177,5	-	182,5
5	-	157,6	-	153,0	-	162,7	-	153,1
6	6,53 (s, 1H)	96,6	6,53 (s, 1H)	95,7	6,17 (d, $J=2,0$ Hz, 1H)	99,4	6,54 (s, 1H)	95,8
7	-	159,7	-	154,3	-	165,7	-	154,4
8	-	123,3	-	126,2	6,39 (d, $J=2,0$ Hz, 1H)	94,6	-	126,3
9	-	149,9	-	144,4	-	158,4	-	144,5
10	-	104,3	-	103,9	-	104,7	-	104,0

Tabela 14 (Continuação). Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de *Hv-8* (δ , DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) com modelo da literatura Mo-1 (δ , DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) (TELES et al., 2015), Mo-2 (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125 MHz) (GOMES et al., 2011) e Mo-3 (δ , CD_3OD , 500 e 125 MHz) (BARRETO et al., 2013)

Mo-1 (Isoescutelareina sulfatada)			Mo-2 (7,4'-Di-O-methylisoscutellarein)		Mo-3 (Canferol)		<i>Hv-8</i>	
C	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1'	-	123,7	-	123,0	-	123,9	-	123,0
2'	8,28 (d, $J=8,0$ Hz, 2H)	129,7	8,09 (dd, $J=7,0$ e 2,0 Hz, 2H)	128,5	8,09 (d, $J=9,0$ Hz, 2H)	130,9	8,10 (dd, $J=6,8$ e 2,1 Hz, 2H)	128,6
3'	7,08 (d, $J=8,7$ Hz, 2H)	114,9	7,12 (dd, $J=7,0$ e 2,0 Hz, 2H)	114,5	6,90(d, $J=9,0$ Hz, 2H)	115,7	7,12 (dd, $J=6,9$ e 2,1 Hz, 2H)	114,6
4'	-	162,8	-	162,4	-	160,7	-	163,6
5'	7,08 (d, $J=8,7$ Hz, 2H)	114,9	7,12 (dd, $J=7,0$ e 2,0 Hz, 2H)	114,5	6,90(d, $J=9,0$ Hz, 2H)	115,7	7,12 (dd, $J=6,9$ e 2,1 Hz, 2H)	114,6
6'	8,28 (d, $J=8,0$ Hz, 2H)	129,7	8,09 (dd, $J=7,0$ e 2,0 Hz, 2H)	128,5	8,09 (d, $J=9,0$ Hz, 2H)	130,9	8,10 (dd, $J=6,8$ e 2,1 Hz, 2H)	128,6
OCH ₃ -4'	3,86 (s, 3H)	56,1	3,85 (s, 3H)	55,6	-	-	3,85 (s, 3H)	55,7
OCH ₃ -7	3,85 (s, 3H)	57,0	3,88 (s, 3H)	56,3	-	-	3,89 (s, 3H)	56,4
OH - 5	12,87 (s, 1H)	-	-	-	-	-	12,42 (s, 1H)	-

Tabela 15. Compilação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C , HMQC e HMBC de *Hv-8* (δ , DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz)



HMQC			HMBC	
C	δ_{H}	δ_{C}	^2J	^3J
2	-	163,6	-	-
3	6,85 (s, 1H)	103,1	C-2, C-4	C-1', C-10
4	-	182,5	-	-
5	-	153,1	-	-
6	6,55 (s, 1H)	95,8	C-5, C-7	C-8, C-10
7	-	154,4	-	-
8	-	126,3	-	-
9	-	144,5	-	-
10	-	104,0	-	-
1'	-	123,0	-	-
2'	8,10 (dd, $J=6,8$ e $2,1$ Hz, 2H)	128,6	-	C-4', C-6', C-2
3'	7,12 (dd, $J=6,9$ e $2,1$ Hz, 2H)	114,6	C-4'	C-1', C-5'
4'	-	163,6	-	-
5'	7,12 (dd, $J=6,9$ e $2,1$ Hz, 2H)	114,6	C-4'	C-1', C-3'
6'	8,10 (dd, $J=6,8$ e $2,1$ Hz, 2H)	128,6	-	C-4', C-2', C-2
OCH ₃ -4'	3,85 (s, 3H)	55,7	-	C-4'
OCH ₃ -7	3,89 (s, 3H)	56,4	-	C-7
OH - 5	12,42 (s, 1H)	-	-	-

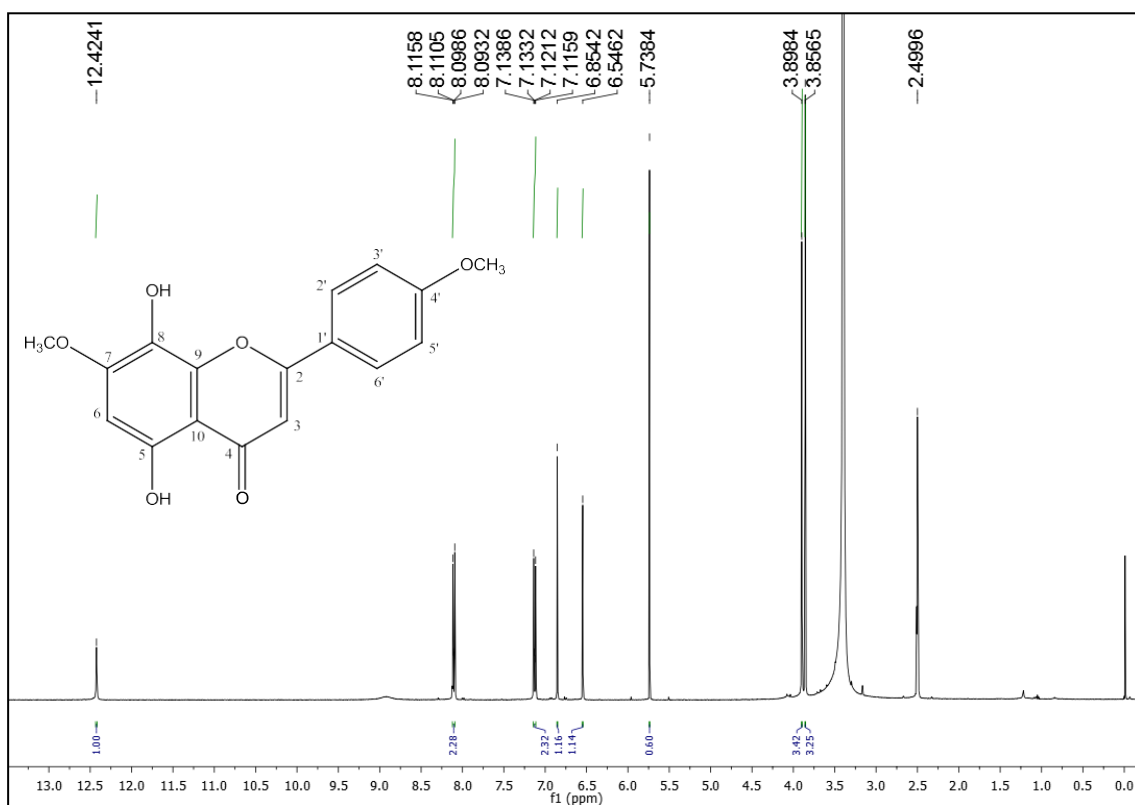
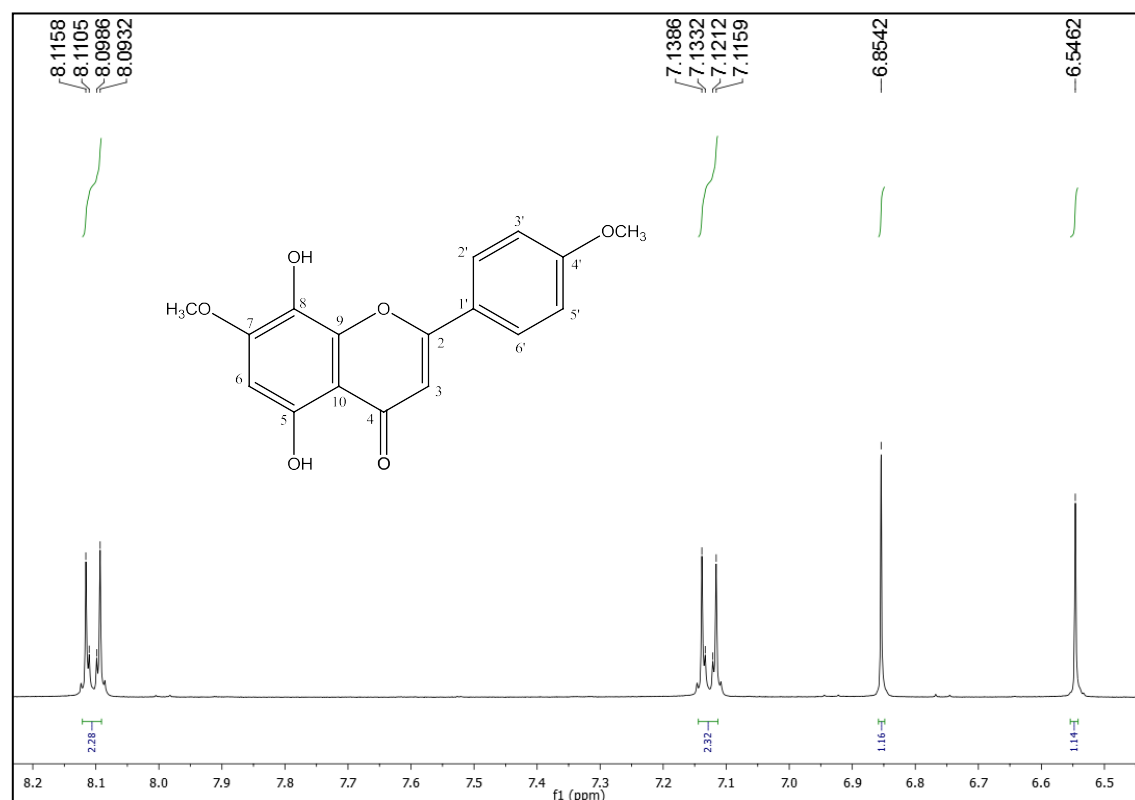
Figura 65. Espectro de RMN ^1H (δ , DMSO- d_6 , 400 MHz) de *Hv-8***Figura 66.** Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 6,5 e 8,2 ppm (δ , DMSO- d_6 , 400 MHz) de *Hv-8*

Figura 67. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 2,4 e 4,2 ppm (δ , DMSO- d_6 , 400 MHz) de *Hv-8*

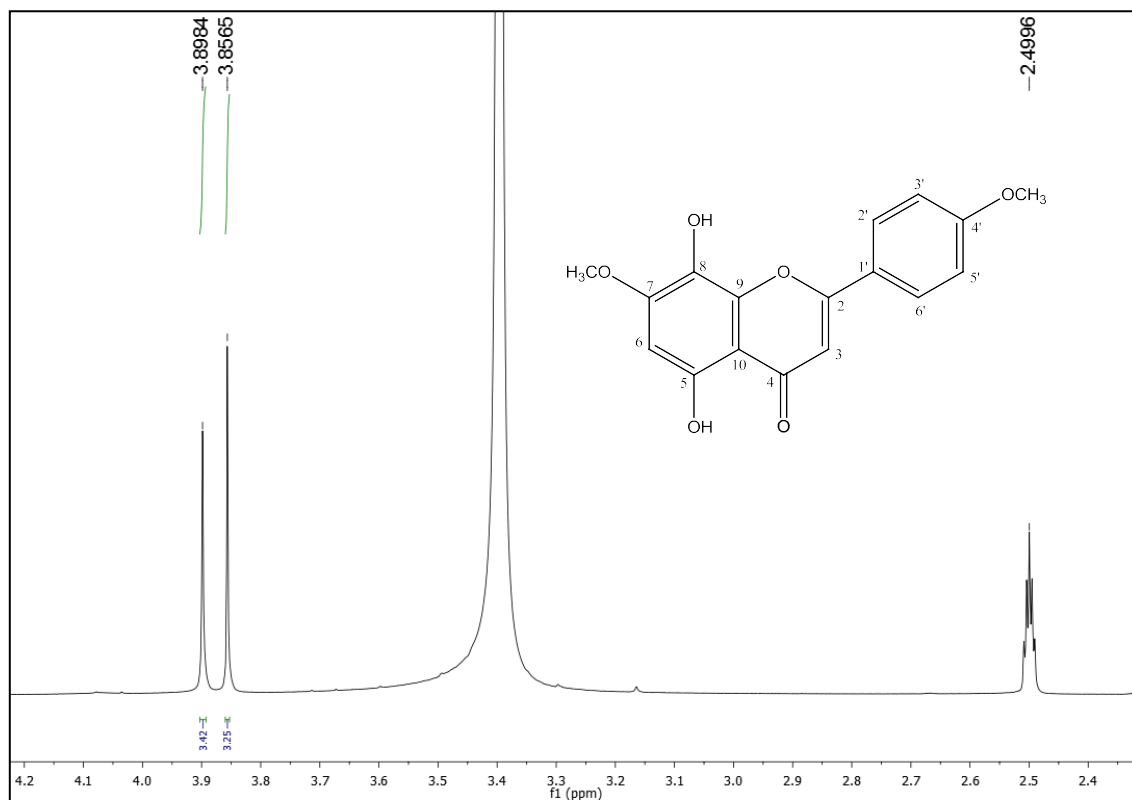


Figura 68. Espectro de RMN ^{13}C (δ , DMSO- d_6 , 100 MHz) de *Hv-8*

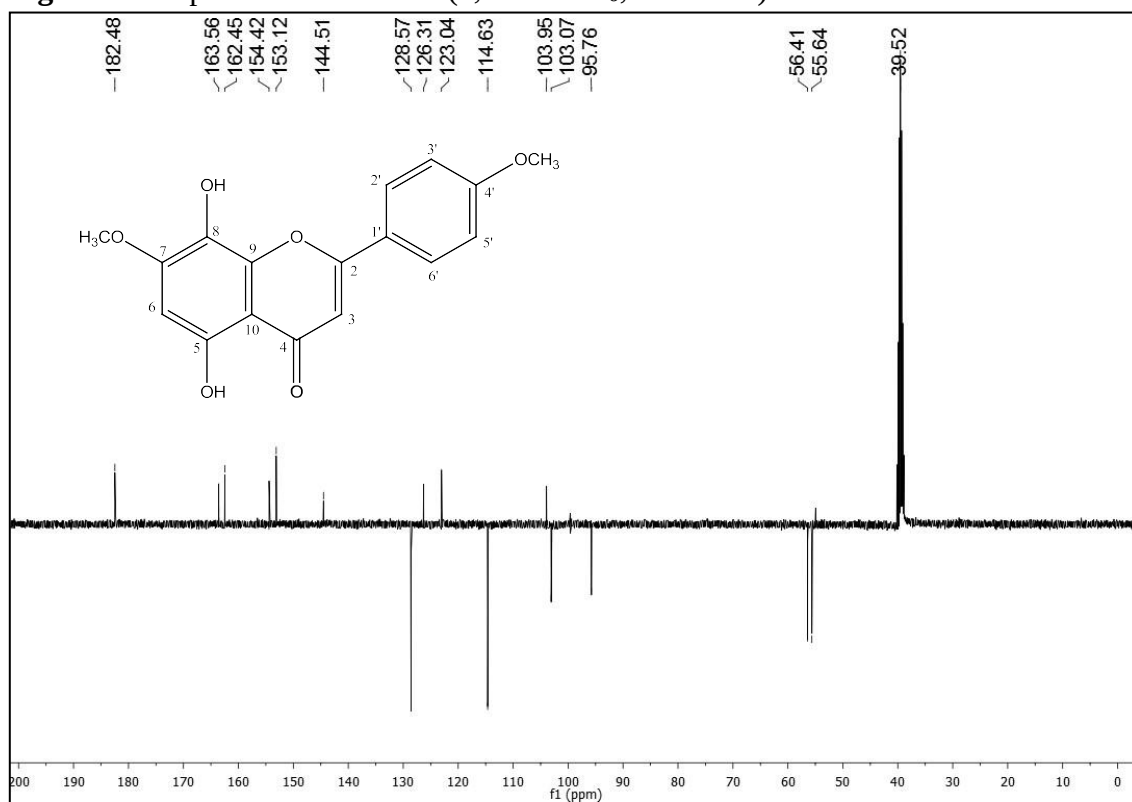


Figura 69. Expansão do espectro de RMN ^{13}C na região entre δ_{C} 110,0 e 185,0 ppm (δ , DMSO- d_6 , 100 MHz) de Hv-8

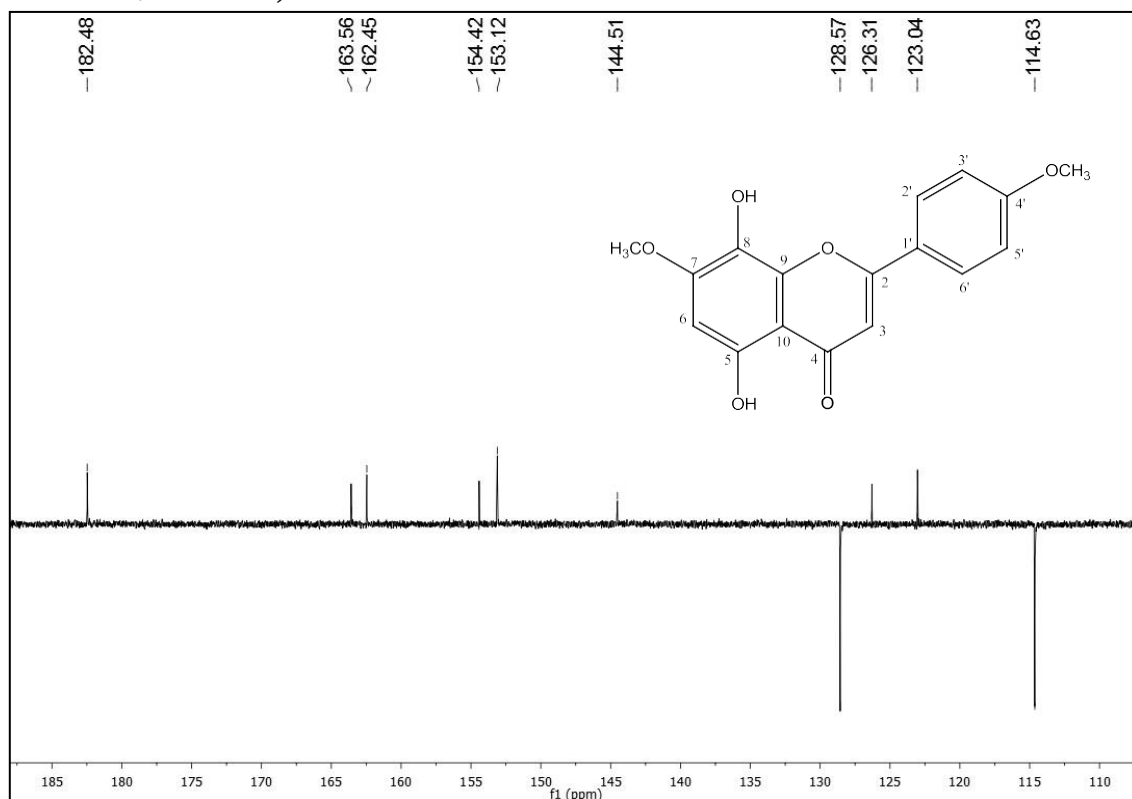


Figura 70. Expansão do espectro de RMN ^{13}C na região entre δ_{C} 40,0 e 115,0 ppm (δ , DMSO- d_6 , 100 MHz) de Hv-8

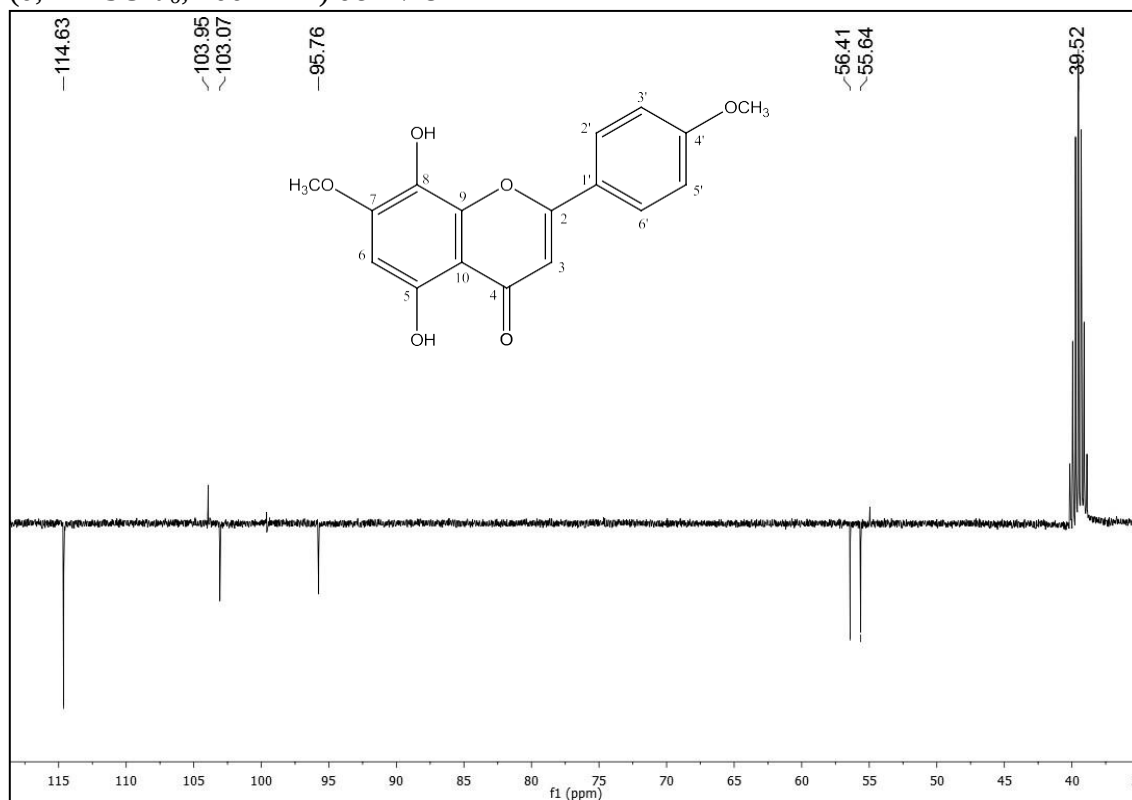


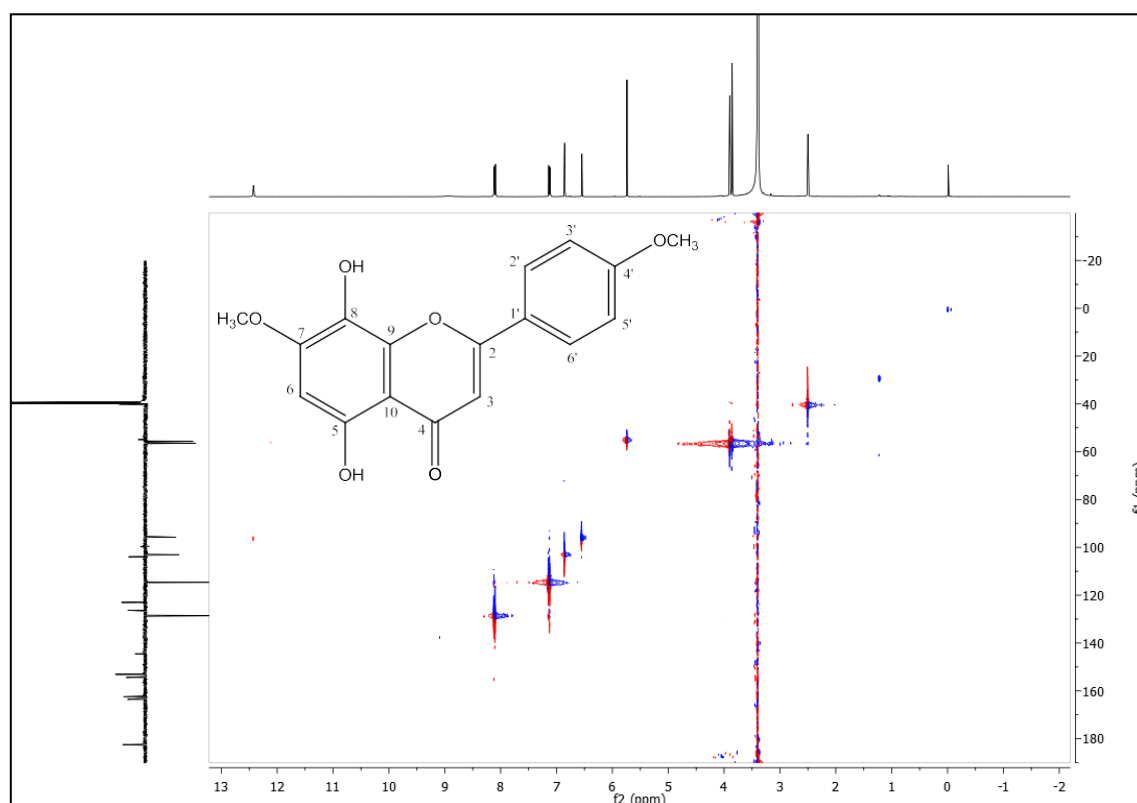
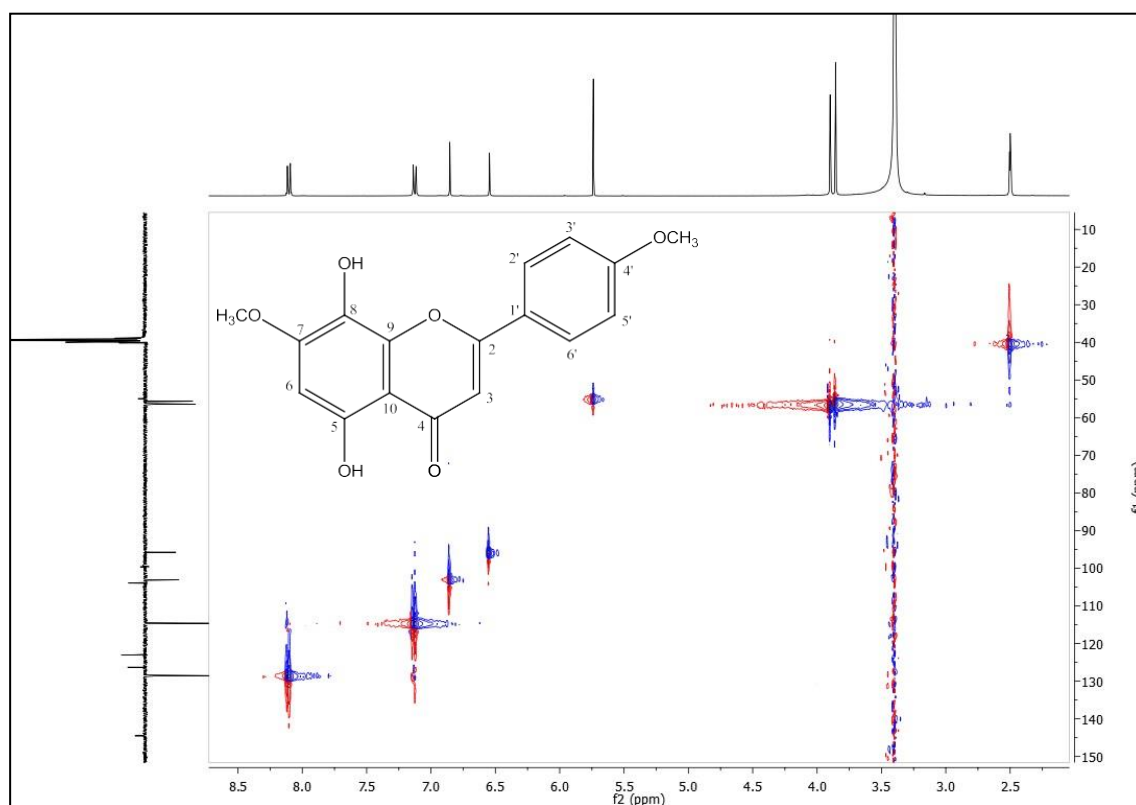
Figura 71. Espectro HMQC (δ , DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) de *Hv-8***Figura 72.** Expansão do espectro HMQC na região entre δ_H 2,5 e 8,5 ppm e entre δ_C 15,0 e 80 ppm (δ , DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) de *Hv-8*

Figura 73. Expansão do espectro HMQC na região entre δ_H 2,8 e 5,0 ppm e entre δ_C 10,0 e 150 ppm (δ , DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) de *Hv-8*

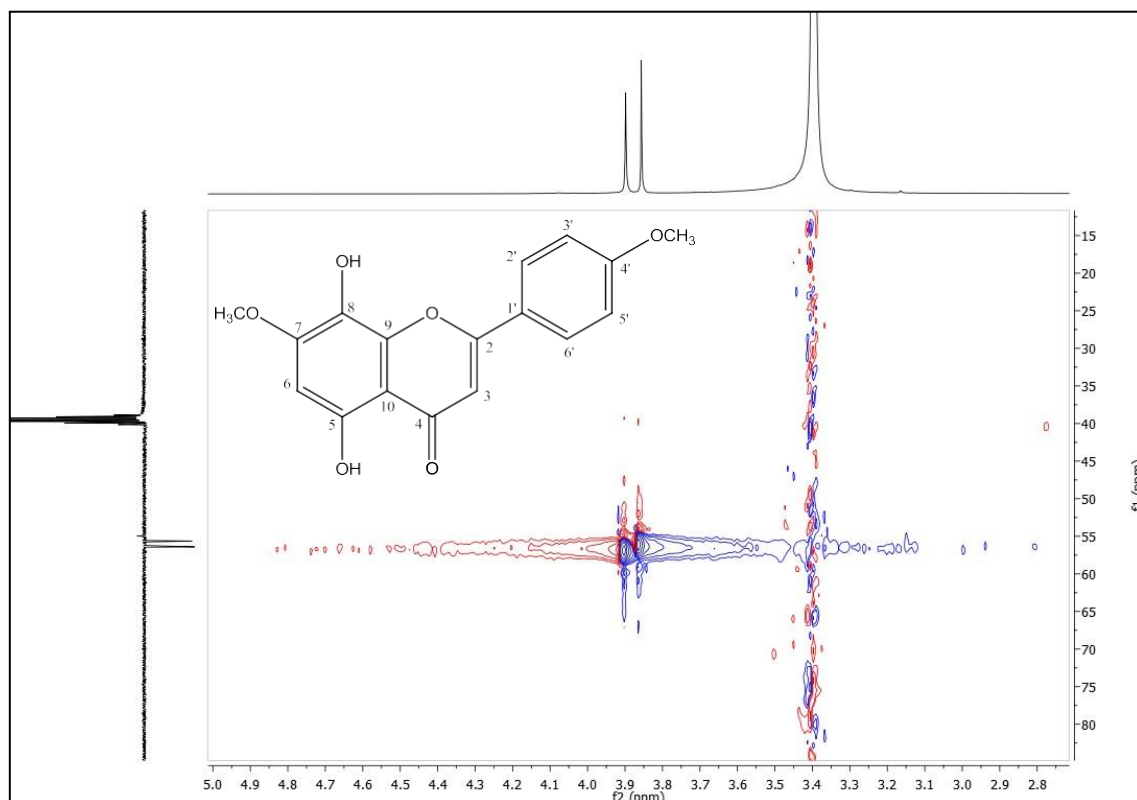


Figura 74. Espectro HMBC (δ , DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) de *Hv-8*

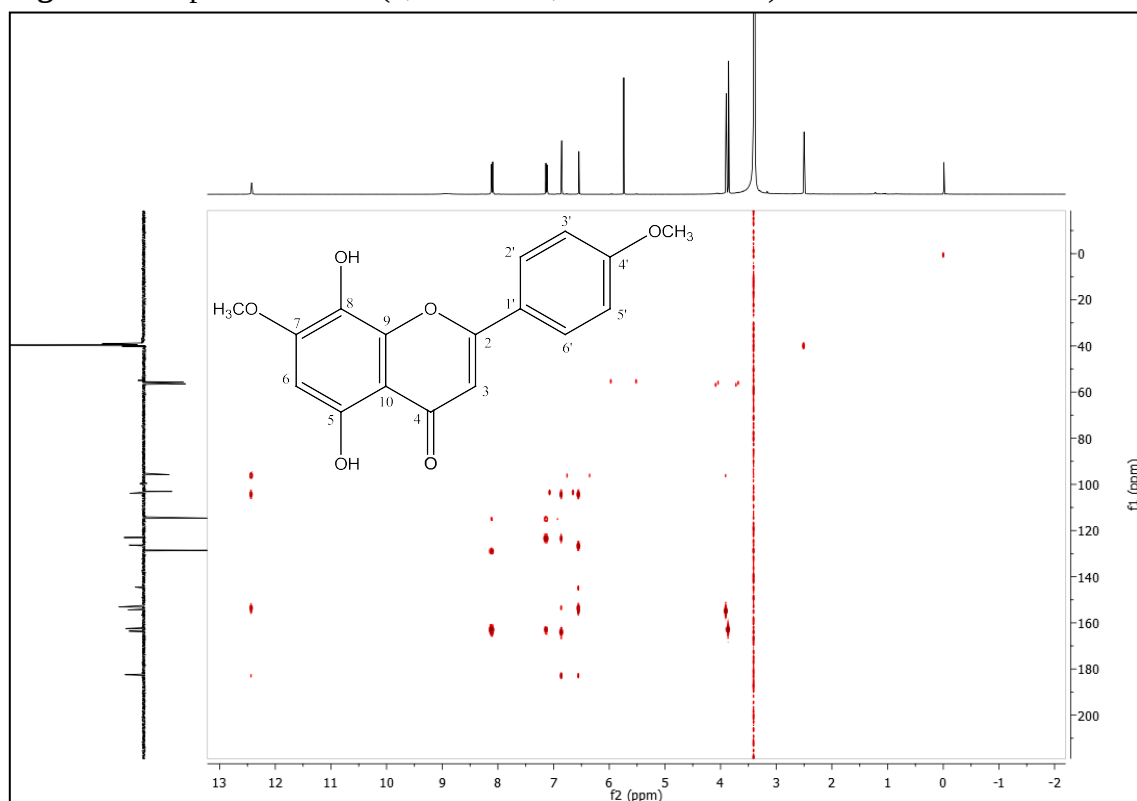


Figura 75. Expansão do espectro HMBC na região entre δ_H 6,5 e 13,0 ppm e entre δ_C 90,0 e 180 ppm (δ , DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) de *Hv-8*

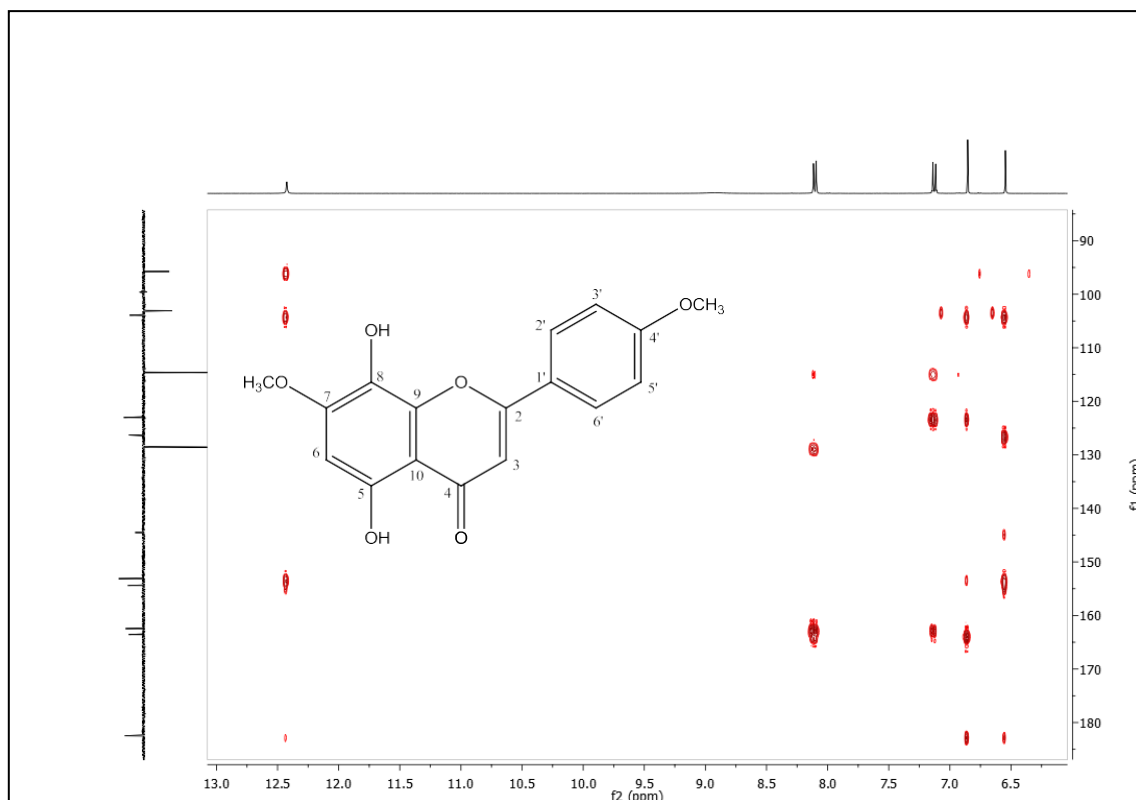
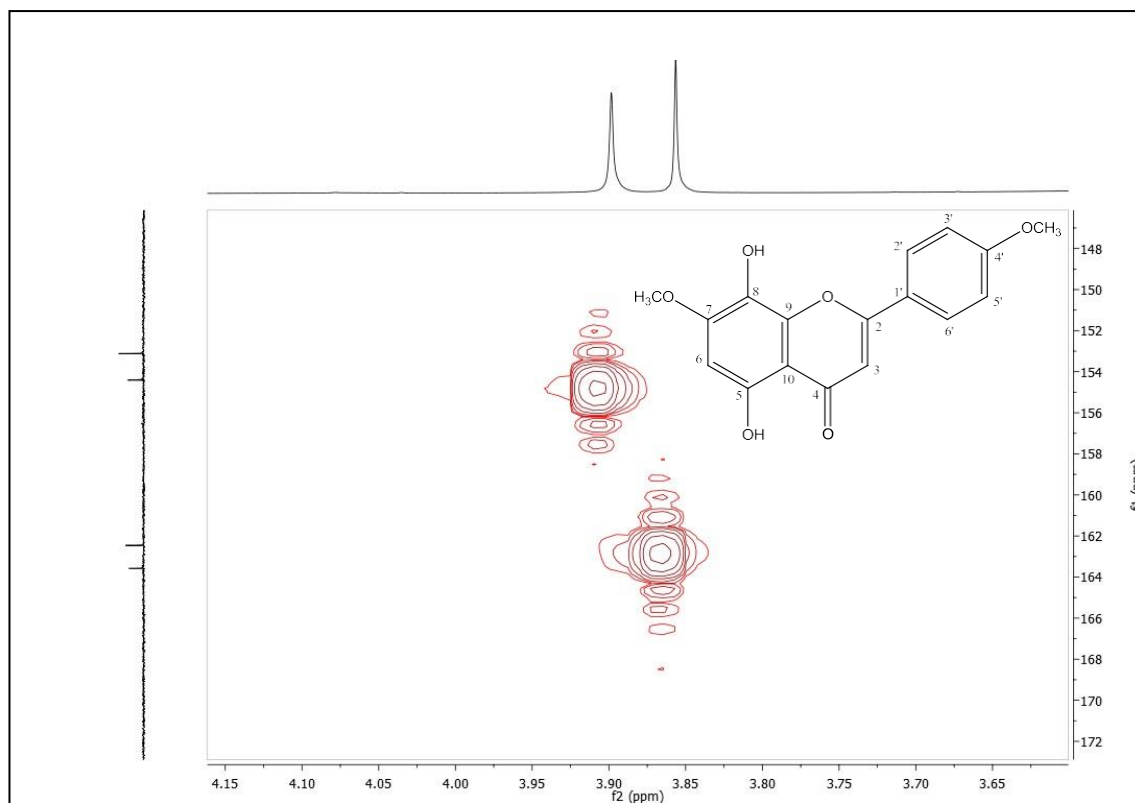


Figura 76. Expansão do espectro HMBC na região entre δ_H 3,65 e 4,15 ppm e entre δ_C 148,0 e 172 ppm (δ , DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) de *Hv-8*



5.2.9. Caracterização estrutural de *Hv*-9

A substância codificada como *Hv*-9 foi obtida como pó amarelo. Seu espectro de Infravermelho (Figura 77, pág. 156), registrou bandas em 3468 cm^{-1} características de deformação axial de hidroxila e na região de 2851 cm^{-1} típicas de ligação C-H (metínico, metilênicos e metílicos) o que pode sugerir a existência de metoxila na molécula (TELES et al., 2015). Ainda foi possível observar absorções em 1606 , 1515 e 1443 cm^{-1} , indicando a presença de ligação C=C atribuída a compostos aromáticos, em 1697 cm^{-1} sugestiva de C=O de cetona conjugada e em ponte presente em flavonoides (PAVIA et al., 2010). As absorções de estiramento assimétrico em 1384 cm^{-1} e estiramento simétrico em 1182 cm^{-1} sugeriram a presença de um grupo S=O e estes juntamente com absorções na região de 1026 a 1001 cm^{-1} atribuídas a uma ligação S-O, nos levaram a propor a existência de um grupo sulfato na estrutura (PAVIA et al., 2010).

Seu espectro de RMN de ^1H , obtido em DMSO- d_6 (Figuras 78 a 80, págs. 157 e 158), exibiu um conjunto de sinais na região de aromáticos, com diferentes intensidades entre $\delta_{\text{H}} 8,27$ e $\delta_{\text{H}} 6,48$, sugerindo que poderia se tratar de uma mistura de compostos. Os sinais em $\delta_{\text{H}} 8,26$ (dd, $J=9,0$ e $1,75\text{ Hz}$, 2H) acoplado com $\delta_{\text{H}} 7,09$ (d, $J=9,0\text{ Hz}$, 2H) e $\delta_{\text{H}} 8,13$ (d, $J=8,9\text{ Hz}$, 2H) com $\delta_{\text{H}} 6,86$ (d, $J=8,8\text{ Hz}$, 2H), sugeriram a presença de dois sistemas AA'BB'. O Primeiro sistema é sugestivo de uma metoxila como substituinte em C-4', desprotegendo as posições H-3'/5' e H-2'/6'. O segundo sistema propõe a presença de um grupo OH-4', que protege o H-3'/5' e H-2'/6'. Os substituintes foram posteriormente confirmados por análise de RMN 2D.

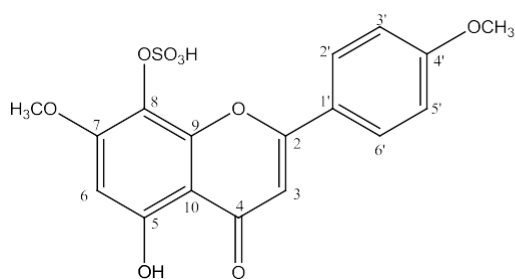
Ainda no espectro de RMN de ^1H os sinais em $\delta_{\text{H}} 7,56$ (d, $J=2,2\text{ Hz}$, 1H), $7,06$ (d, $J=8,5\text{ Hz}$, 1H) e $7,83$ (dd, $J=2,2$ e $8,5\text{ Hz}$, 1H), foram compatíveis com um sistema ABX (TELES et al., 2015b), sugerindo a existência de uma terceira molécula na mistura, os dados espectrais RMN de ^1H e IV sugeriram a presença de uma mistura de três flavonas, renomeadas como substâncias 9, 9a e 9b, respectivamente (Figura 79, pág. 157). Um singleto em $\delta_{\text{H}} 3,82$, com intensidade para três metoxilas em um ambiente quimicamente e magneticamente equivalentes, foi consistente com a presença deste grupo no C-7 do núcleo flavona das três moléculas. O sinal em $\delta_{\text{H}} 3,84$ foi atribuído a metoxila do C-4' de um sistema AA'BB', e o singleto em $3,85$ sugeriu o sistema ABX, com OCH₃-4' e OH-3' (Figura 80, pág. 158), posteriormente confirmado por RMN bidimensional (Figura 84, pág. 160) (TELES et al., 2015b).

O espectro de RMN ^{13}C , obtido pela técnica de APT (Figura 81, pág. 158) exibiu sinais fracos e de pouca intensidade, aliado com os espectros de HMBC, HMQC, COSY e NOESY (Figuras 82 a 91, págs. 159 a 163) foi possível identificar os compostos na mistura e confirmar a posição dos substituintes. Os dados de RMN ^{13}C de *Hv*-9 mostrou carbonos intensos em δ_{C} 129,3/115,9, valores característicos dos carbonos 2'/6' e 3'/5' do anel B *para*-substituído de flavonoides atribuídos ao composto majoritário. Ainda foi possível observar carbonos metoxilicos em δ_{C} 56,4, 56,4 e 55,7.

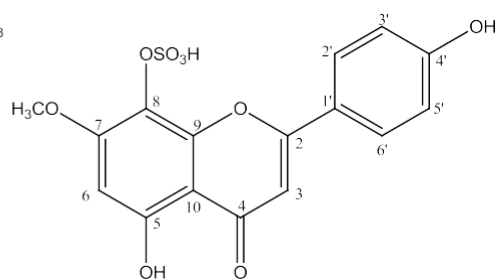
Para confirmar a presença do grupo O-sulfato nas estruturas dos compostos 9, 9a e 9b, foi obtido o espectro de massa de alta resolução dos compostos, através do LC-HRMS. A massa exata (Fórmula molecular) para o composto 9 (composto minoritário) com ion $[\text{M-H}]^-$, encontrado no tempo de retenção (RT) de 4,90 min, foi de 393,0260 ($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_9\text{S}$); para o composto principal 9a, o ion $[\text{M-H}]^-$ (RT: 3,63 min) foi de 379,0129 ($\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_9\text{S}$); e para o composto 9b, o ion $[\text{M-H}]^-$ (RT: 4,07 min) e a massa encontrada de 409,0234 ($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_{10}\text{S}$). Estes resultados confirmam a presença do grupo O-sulfato nas três moléculas da mistura e contribuem para a sua identificação (Figura 92, pág. 164).

Esses dados em comparação com dados da literatura (Tabelas 16 e 17, págs. 153 a 155) permitiram identificar o composto 9 como 7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato-isoescutelarina, relatado anteriormente em *Wissadula periplocifolia* (TELES et al., 2015b) e *Sidastrum micranthum* (BUCHHOLZ, et al. 2007), ambos pertencentes a família Malvaceae, e na espécie *H. velutina* em trabalho anterior realizado pela nossa equipe (FERNANDES, 2017). O composto 9a foi identificado como 5,4'-di-hidroxi-7-metoxi-8-O-sulfato flavona (Mariahine) e o composto 9b identificado como 5,3'-di-hidroxi-7,4'-di-metoxi- 8-O-sulfato flavona (Condadine), ambos relatados pela primeira vez na literatura.

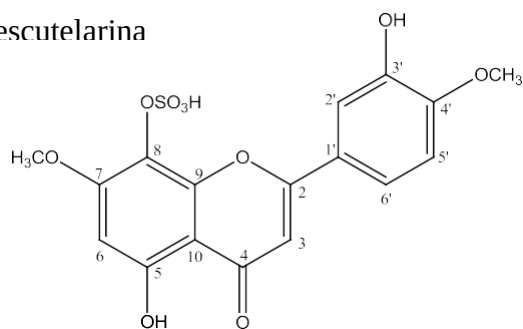
Os flavonoides com grupos O-sulfatos ligados ao esqueleto principal são provavelmente os derivados flavonoidicos mais incomuns, encontrados em poucas famílias vegetais, possuem atividade anticoagulante, anti agregação plaquetária, imunomodulador e efeito antitumoral (TELES et al., 2018). Este é o primeiro relato de flavonoides sulfatados na família Sterculiaceae.

Hv-9:

Hv-9: 7,4'-di-*O*-metil-8-*O*-
sulfato-isoescutelarina



Hv-9a: Mariahine



Hv-9b: Condadine

Tabela 16. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de *Hv-9* (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125 MHz) com modelo da literatura Mo-1 (δ , DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) (TELES et al., 2015b)

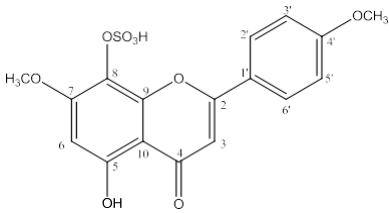
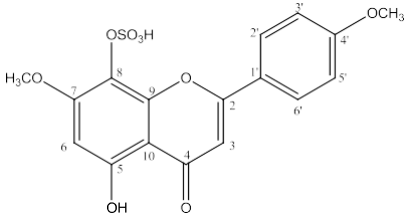
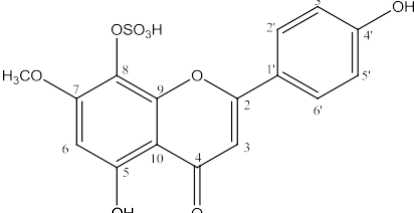
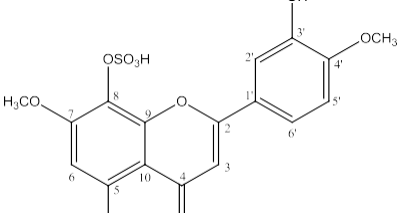
Mo-1 (Isoescutelareina sulfatada)			<i>Hv-9</i>		<i>Hv-9a</i>		<i>Hv-9b</i>	
								
C	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2	-	164,4	-	164,3	-	164,8	-	164,7
3	6,88 (s, 1H)	103,3	6,74 (s, 1H)	101,8	6,74 (s, 1H)	101,8	6,69 (s, 1H)	102,7
4	-	182,7	-	182,6	-	182,6	-	182,6
5	-	157,6	-	-	-	-	-	-
6	6,53 (s, 1H)	96,6	6,48 (s, 1H)	95,8	6,48 (s, 1H)	95,8	6,48 (s, 1H)	95,8
7	-	159,7	-	159,1	-	159,1	-	159,1
8	-	123,3	-	123,2	-	123,2	-	123,2
9	-	149,9	-	148,8	-	148,8	-	148,8
10	-	104,3	-	104,7	-	104,7	-	104,7

Tabela 16 (Continuação). Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de *Hv-9* (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125 MHz) com modelo da literatura *Mo-1* (δ , DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) (TELES et al., 2015b)

Mo-1 (Isoescutelareina sulfatada)			<i>Hv-9</i>		<i>Hv-9a</i>		<i>Hv-9b</i>	
C	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1'	-	123,7	-	123,6	-	121,6	-	123,6
2'	8,28 (d, $J=8,0$ Hz, 2H)	129,7	8,26 (d, $J=9,0$ e 1,75 Hz, 2H)	129,3	8,13 (d, $J=8,9$ Hz, 2H)	129,3	7,56 (d, $J=2,2$ Hz, 1H)	113,8
3'	7,08 (d, $J=8,7$ Hz, 2H)	114,9	7,09 (d, $J=9,0$ Hz, 2H)	116,0	6,86 (d, $J=8,8$ Hz, 2H)	116,0	-	146,8
4'	-	162,8	-	162,7	-	162,3	-	151,6
5'	7,08 (d, $J=8,7$ Hz, 2H)	114,9	7,09 (d, $J=9,0$ Hz, 2H)	116,0	6,86 (d, $J=8,8$ Hz, 2H)	116,0	7,07 (d, $J=8,5$ Hz, 1H)	111,8
6'	8,28 (d, $J=8,0$ Hz, 2H)	129,7	8,26 (d, $J=9,0$ e 1,75 Hz, 2H)	129,3	8,13 (d, $J=8,9$ Hz, 2H)	129,3	7,83 (dd, $J=8,5$ e 2,2 Hz, 2H)	119,8
OCH ₃ -4'	3,86 (s, 3H)	56,1	3,84 (s, 3H)	56,4	-	-	3,85 (s, 3H)	55,7
OCH ₃ -7	3,85 (s, 3H)	57,0	3,82 (s, 3H)	56,4	3,82 (s, 3H)	56,4	3,82 (s, 3H)	56,4
OH - 5	12,87 (s, 1H)	-	12,91 (s, 1H)	-	12,91 (s, 1H)	-	12,91 (s, 1H)	-

Tabela 17. Compilação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C , HMBC de *Hv-9* (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125 MHz)

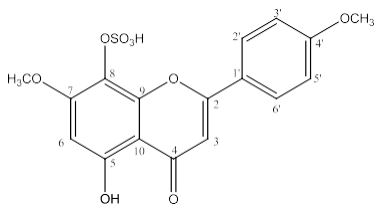
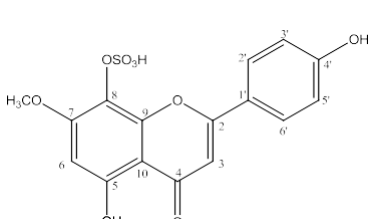
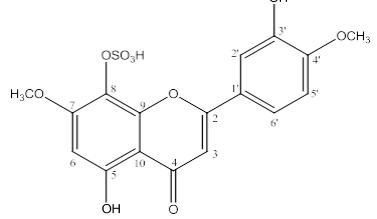
<i>Hv-9</i>		<i>Hv-9a</i>	<i>Hv-9b</i>
			
C	HMBC	HMBC	HMBC
2	-	-	-
3	C-2	C-2, C-1'	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-
1'	-	-	-
2'	C-2, C-4', C-6'	C-2, C-4', C-6'	C-3', C-4', C-6'
3'	C-4', C-1'	C-4', C-1', C-5'	-
4'	-	-	-
5'	C-4', C-1'	C-4', C-1'	C-1'
6'	C-2, C-4'	C-2, C-4'	C-2', C-4'
OCH ₃ -4'	-	-	-
OCH ₃ -7	-	-	-
OH - 5	-	-	-

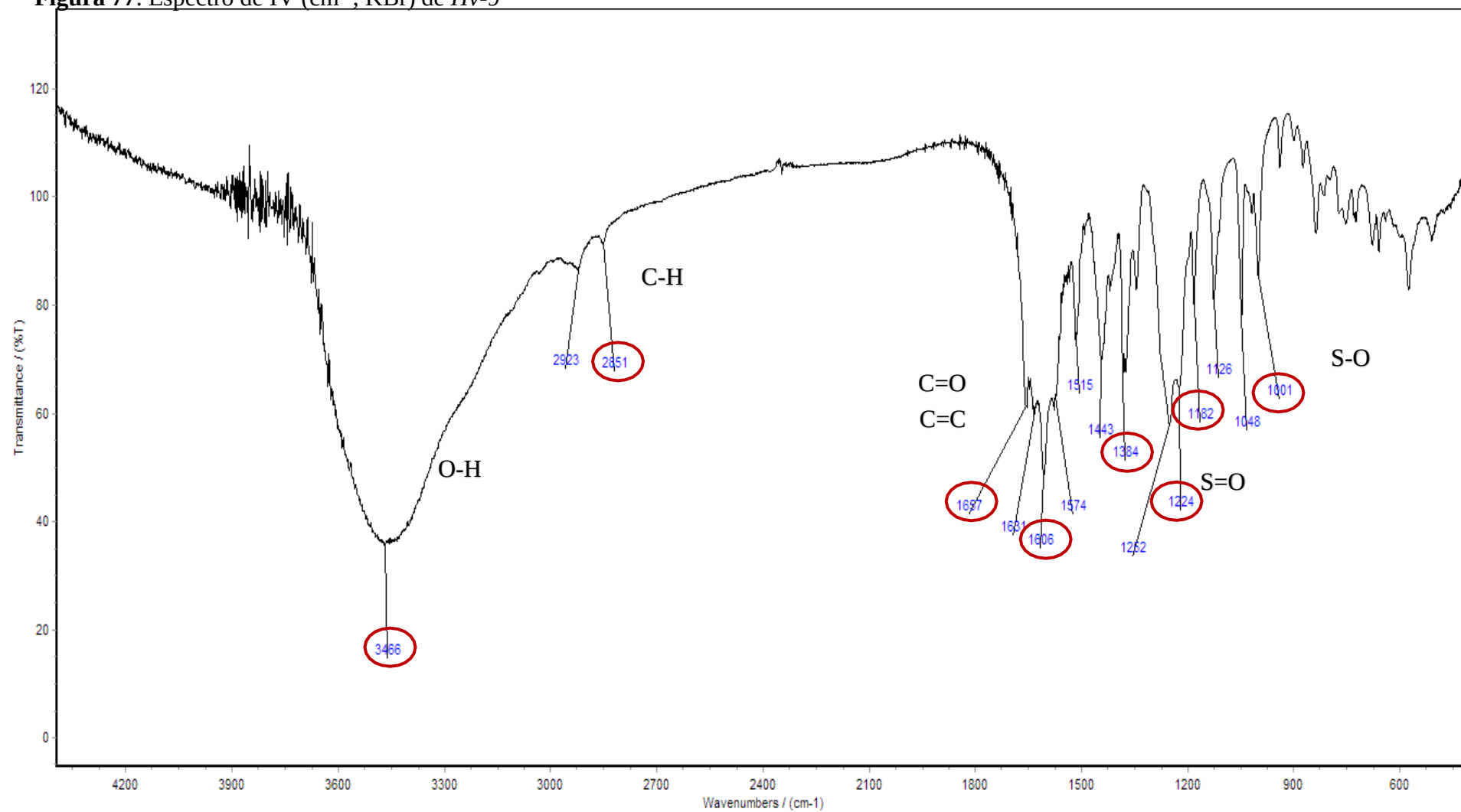
Figura 77. Espectro de IV (cm^{-1} , KBr) de *Hv-9*

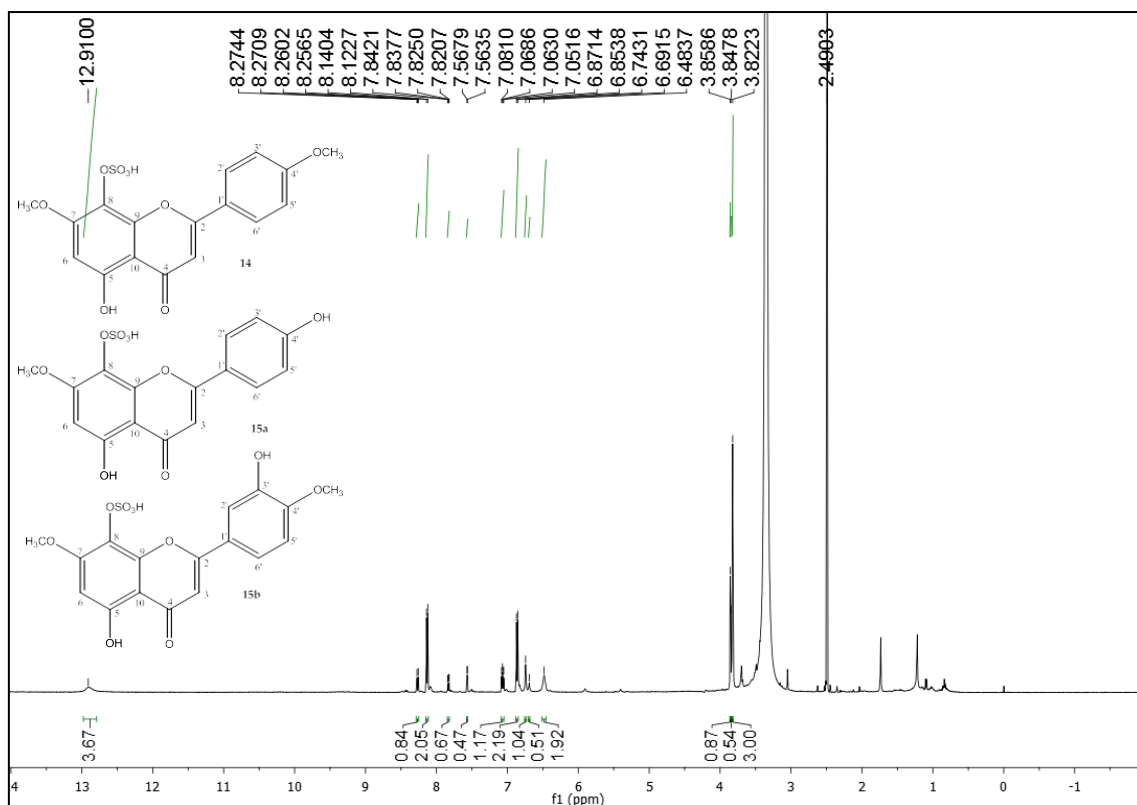
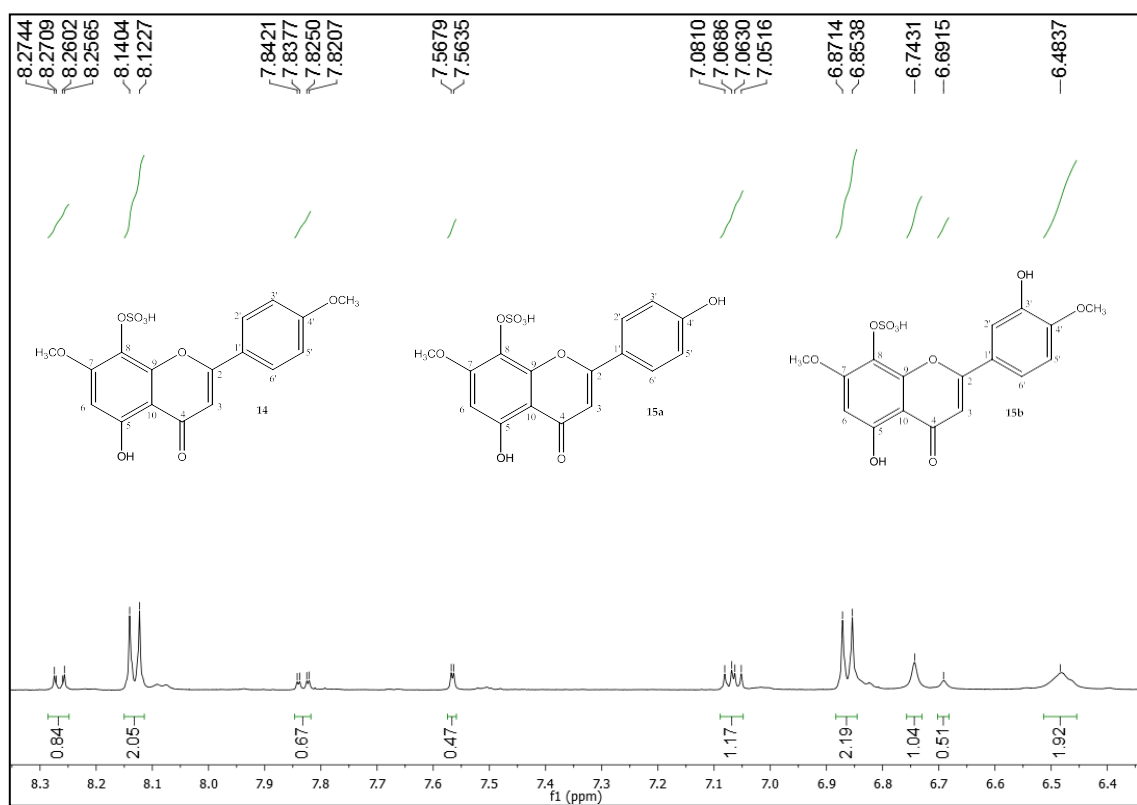
Figura 78. Espectro de RMN ^1H (δ , DMSO- d_6 , 400 MHz) de Hv-9**Figura 79.** Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 6,4 e 8,3 ppm (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz) de Hv-9

Figura 80. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 3,65 e 4,03 ppm (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz) de Hv-9

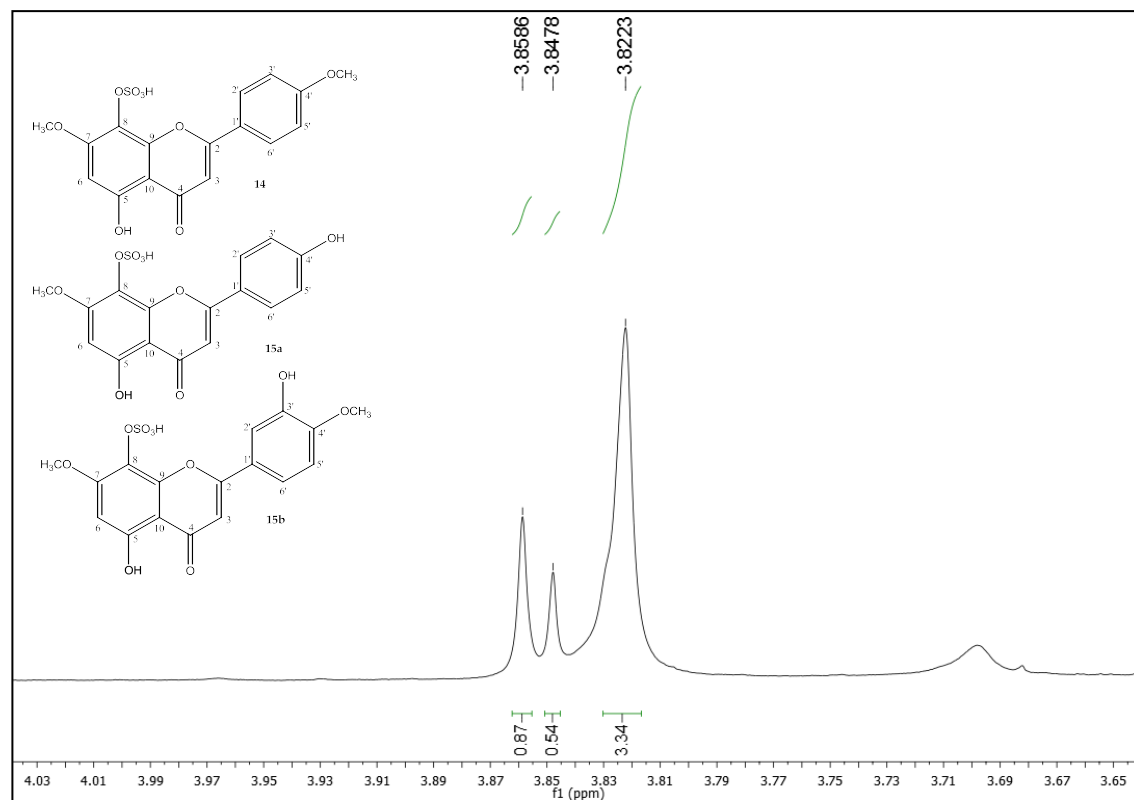


Figura 81. Espectro de RMN ^{13}C (δ , DMSO- d_6 , 125 MHz) de Hv-9

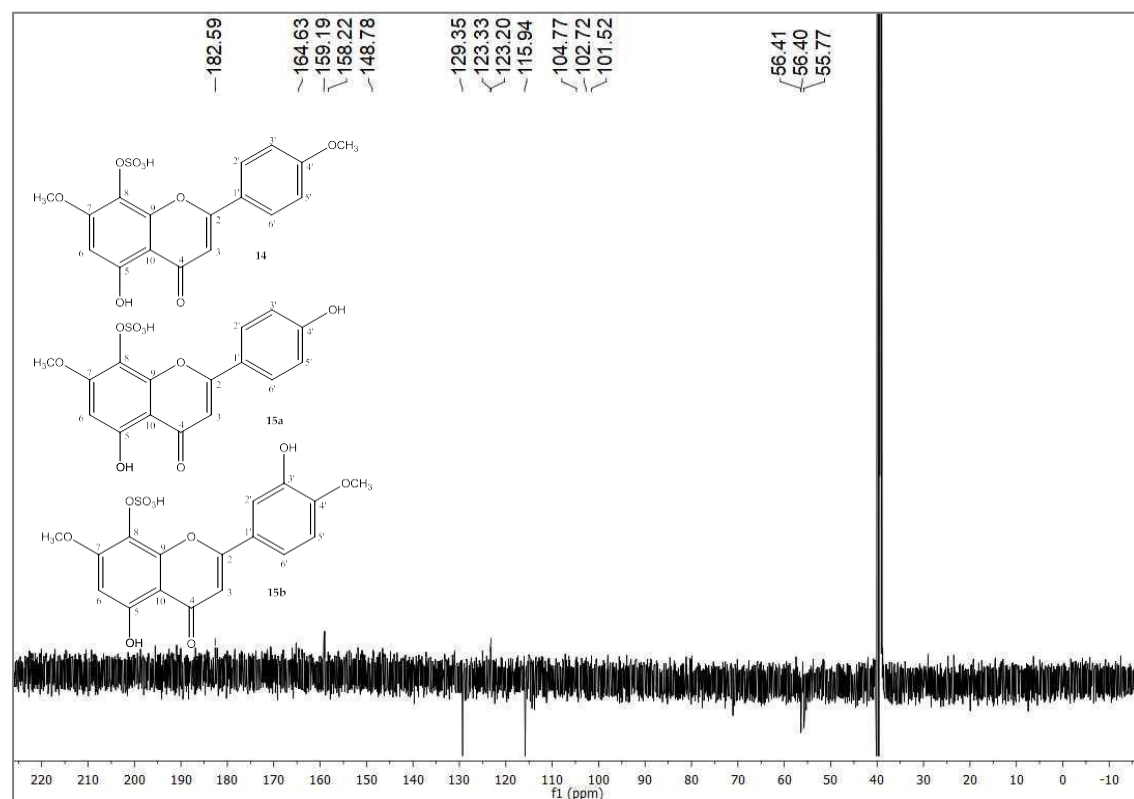


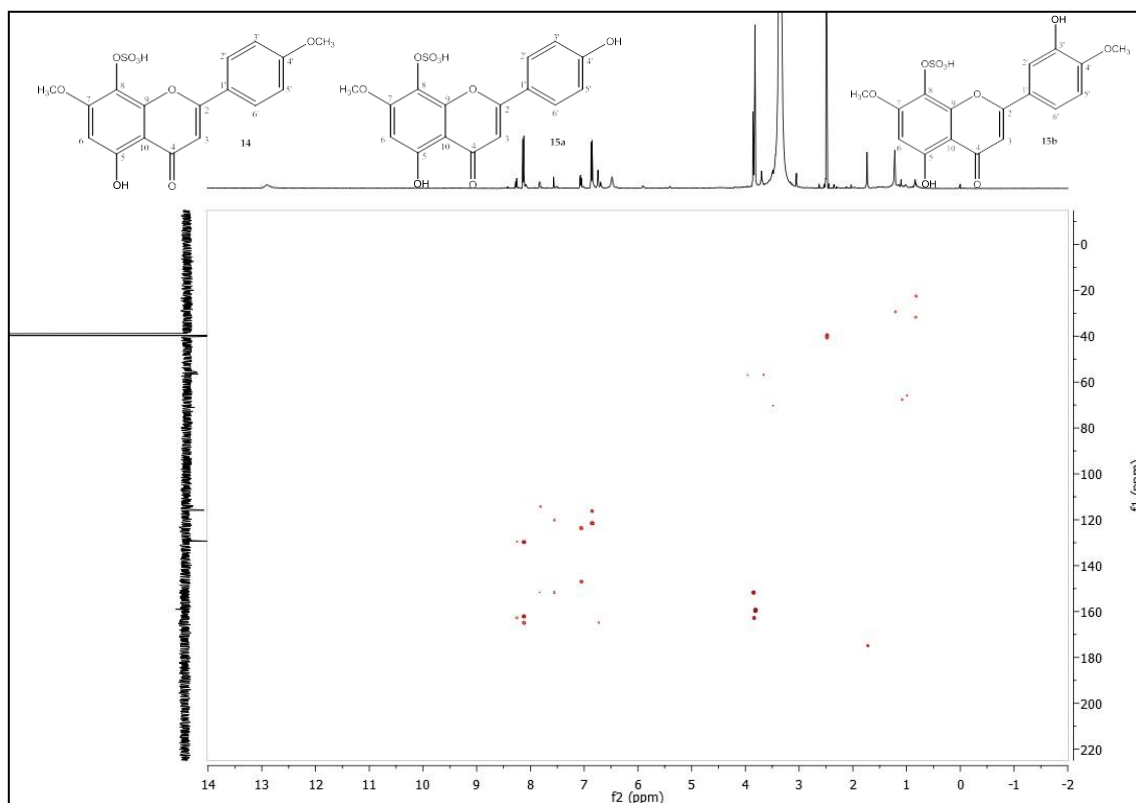
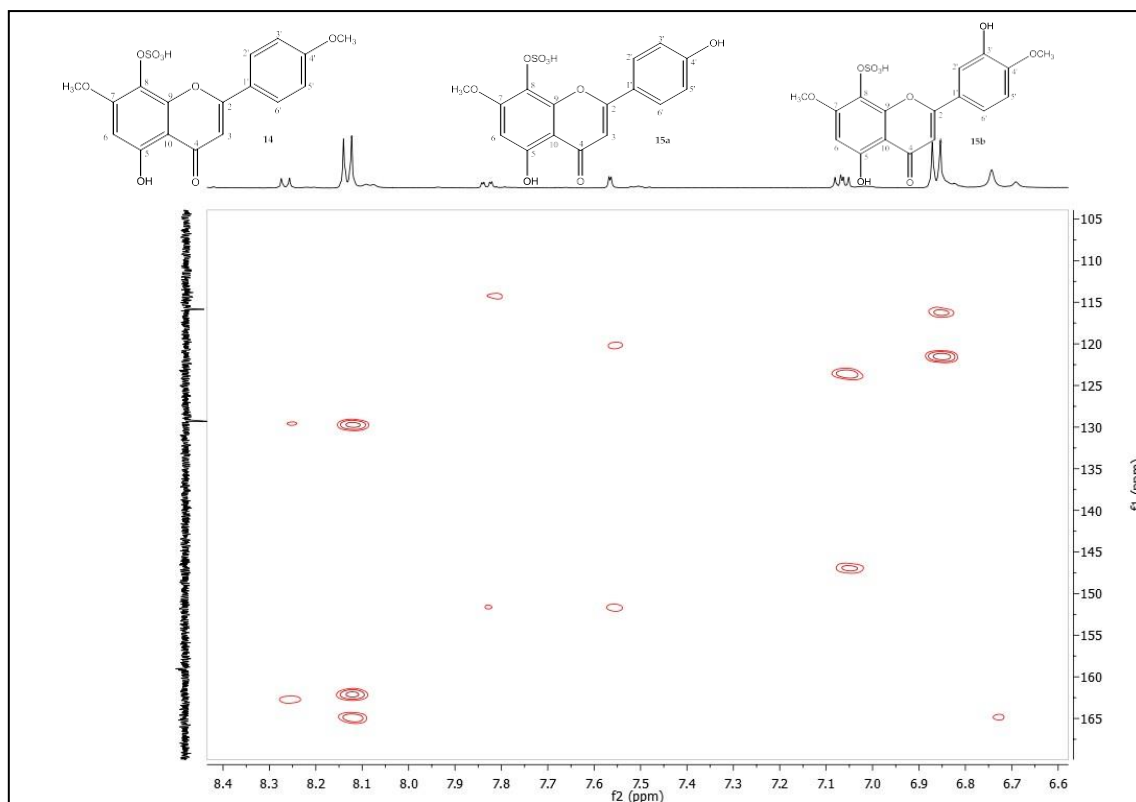
Figura 82. Espectro HMBC (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125 MHz) de *Hv-9***Figura 83.** Expansão do espectro HMBC na região entre δ_{H} 6,6 e 8,4 ppm e entre δ_{C} 105,0 e 165 ppm (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125 MHz) de *Hv-9*

Figura 84. Expansão do espectro HMBC na região entre δ_H 3,78 e 3,89 ppm e entre δ_C 150,0 e 164 ppm (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125 MHz) de Hv-9

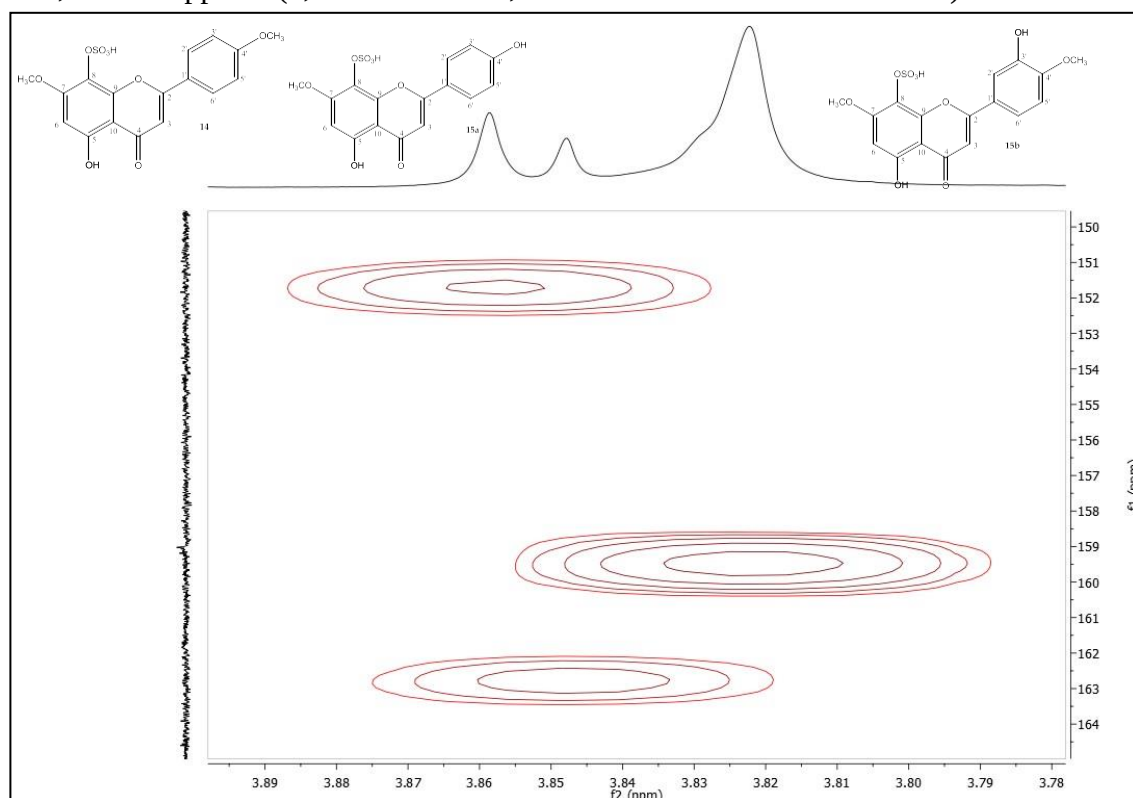


Figura 85. Espectro HMQC (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125MHz) de Hv-9

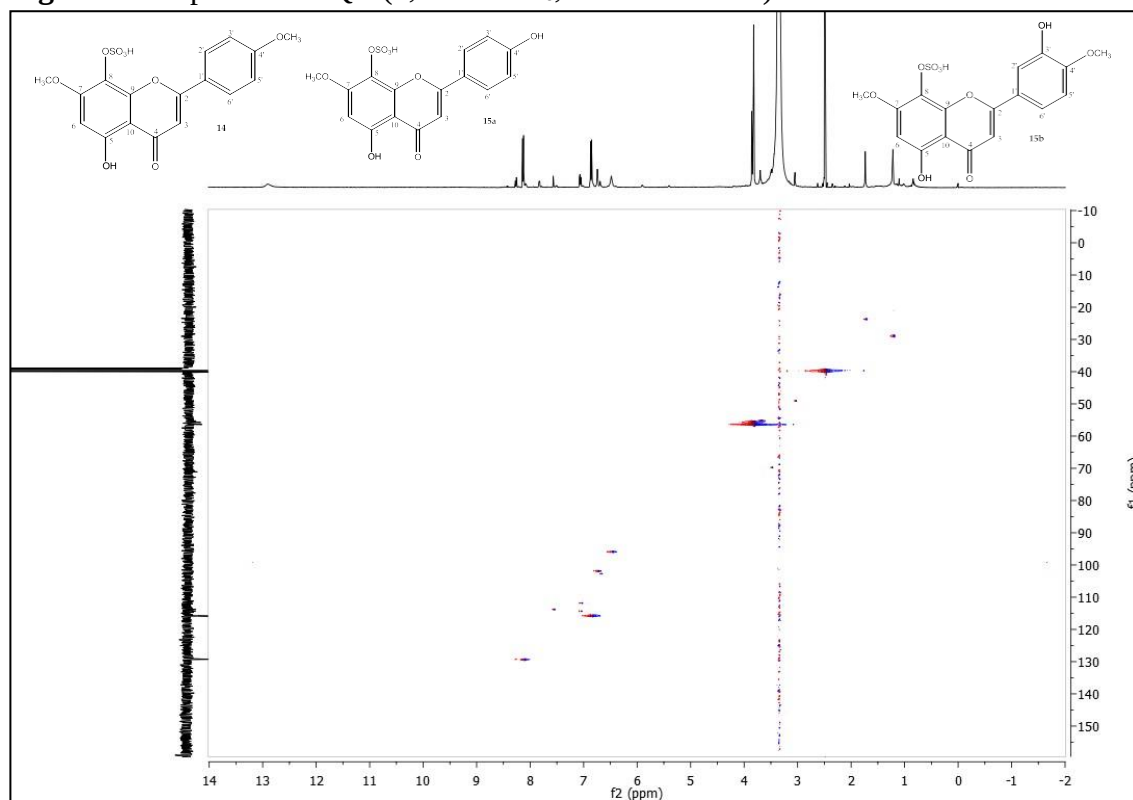


Figura 86. Expansão do espectro HMQC na região entre δ_H 6,4 e 8,4 ppm e entre δ_C 95,0 e 130,0 ppm (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125MHz) de *Hv-9*

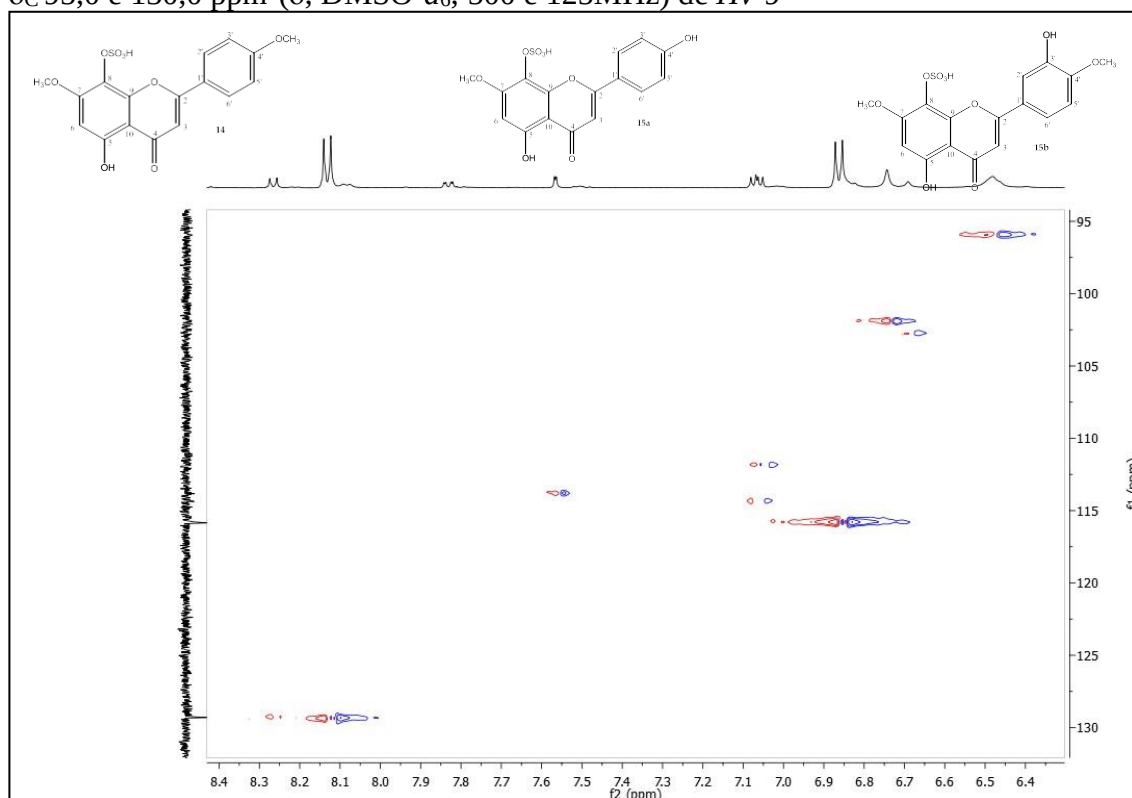


Figura 87. Expansão do espectro HMQC na região entre δ_H 3,25 e 4,25 ppm e entre δ_C 54,0 e 58,0 ppm (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125MHz) de *Hv-9*

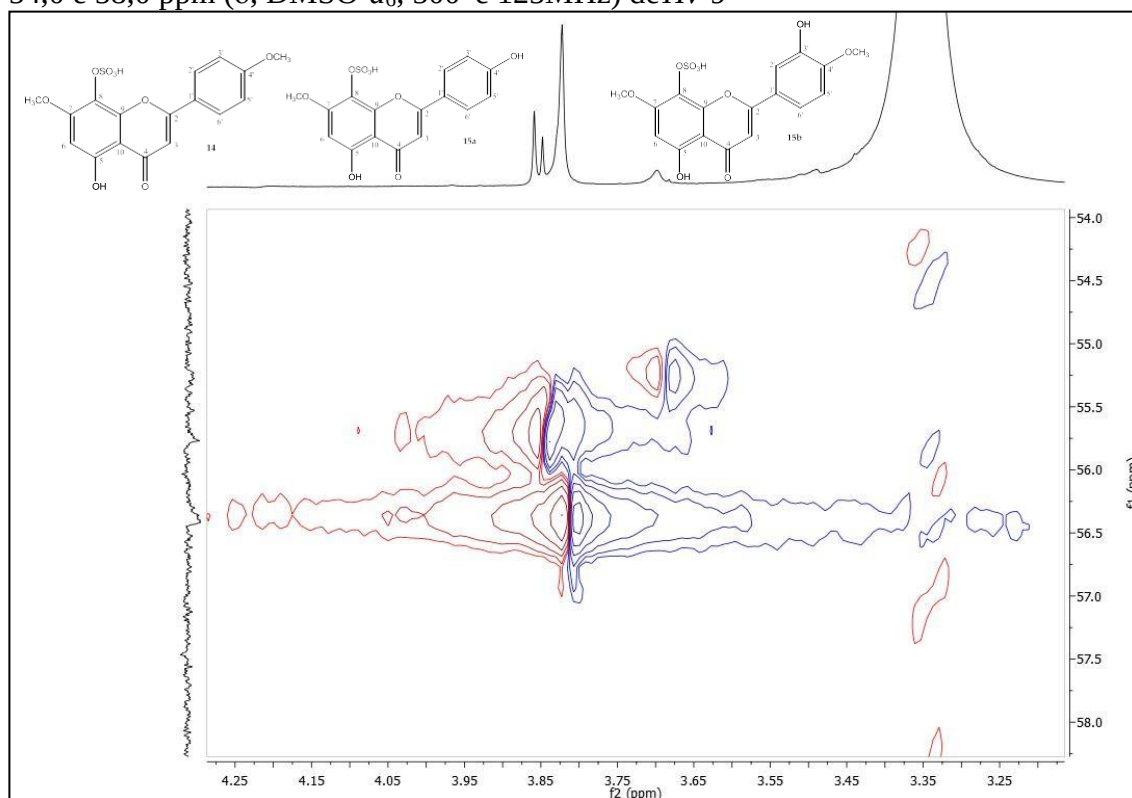


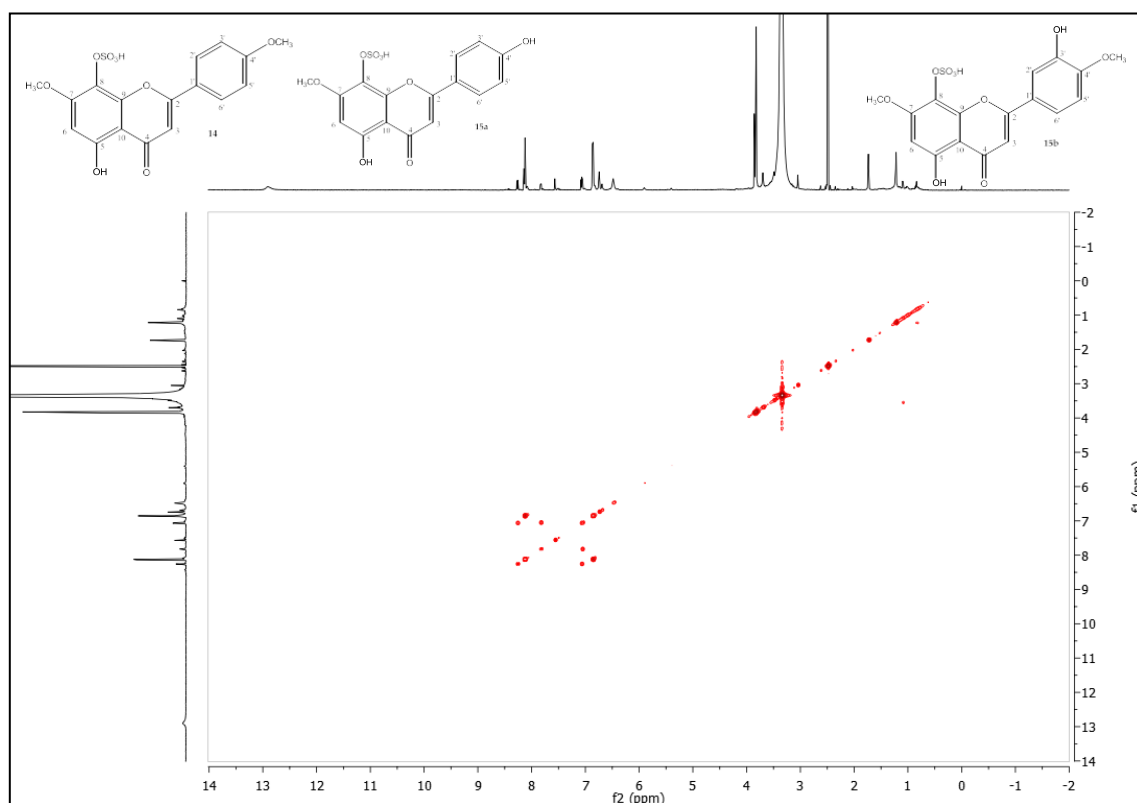
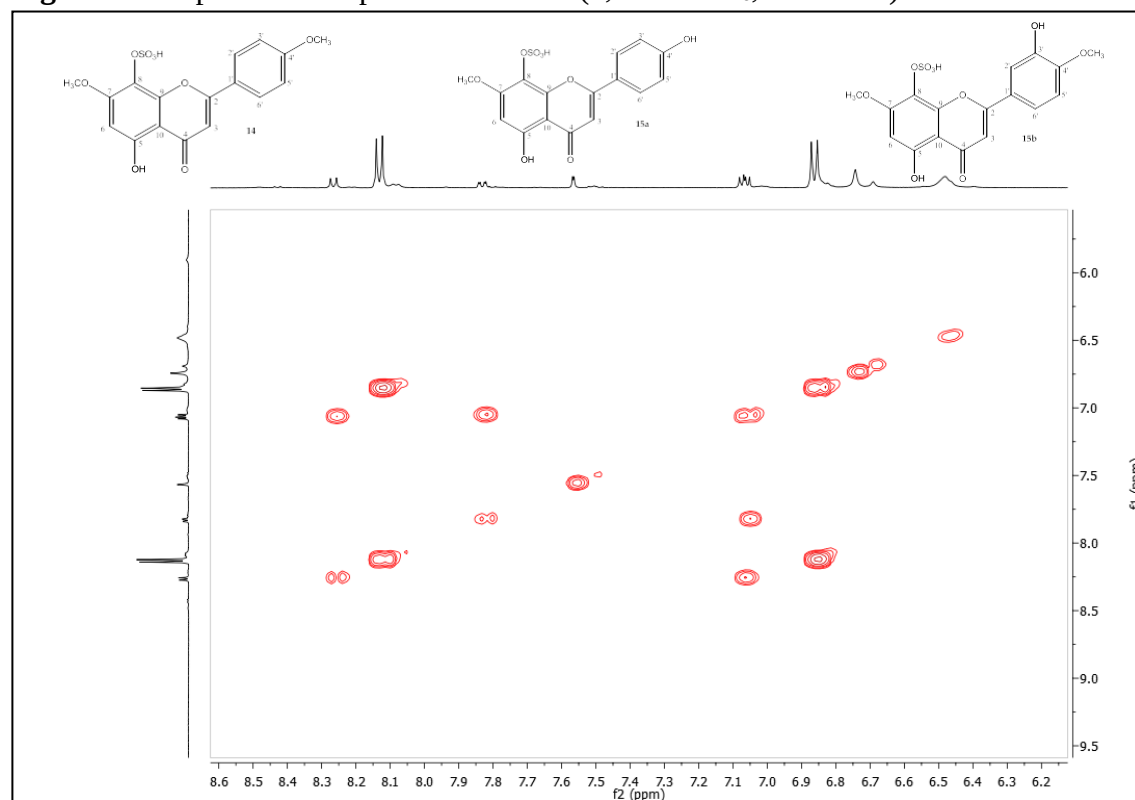
Figura 88. Espectro de COSY (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz) de *Hv-9***Figura 89.** Expansão do espectro de COSY (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz) de *Hv-9*

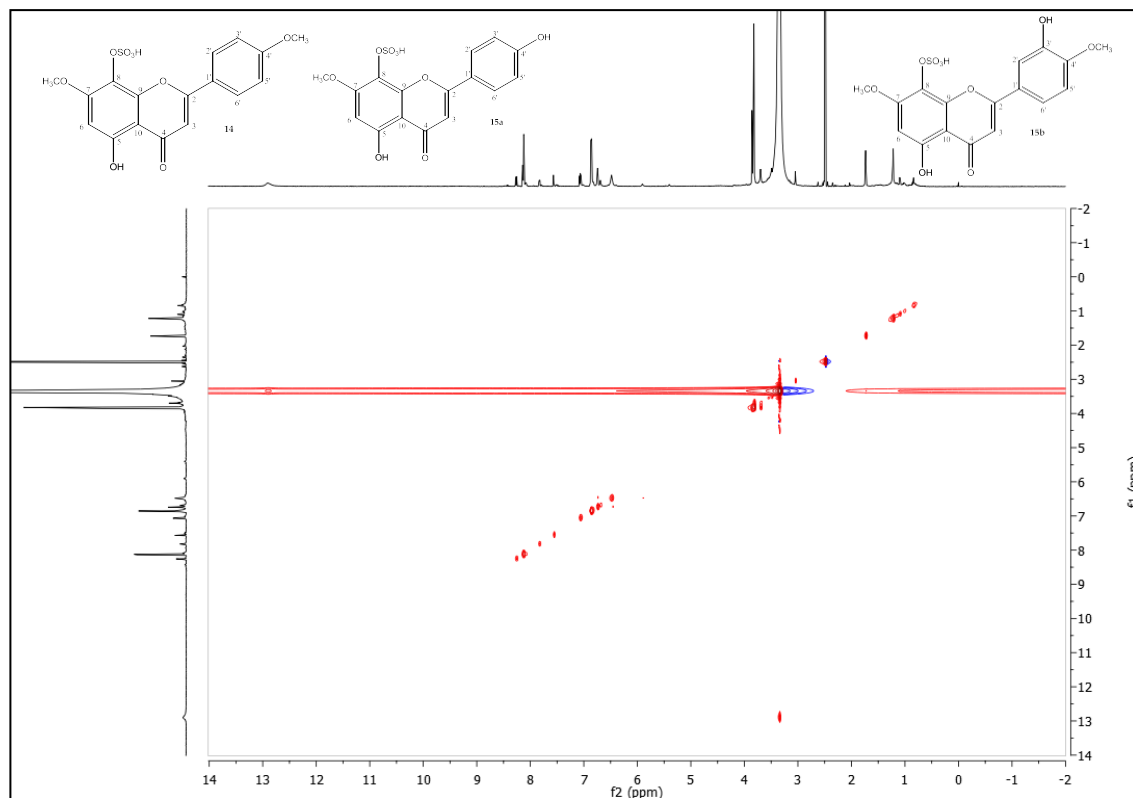
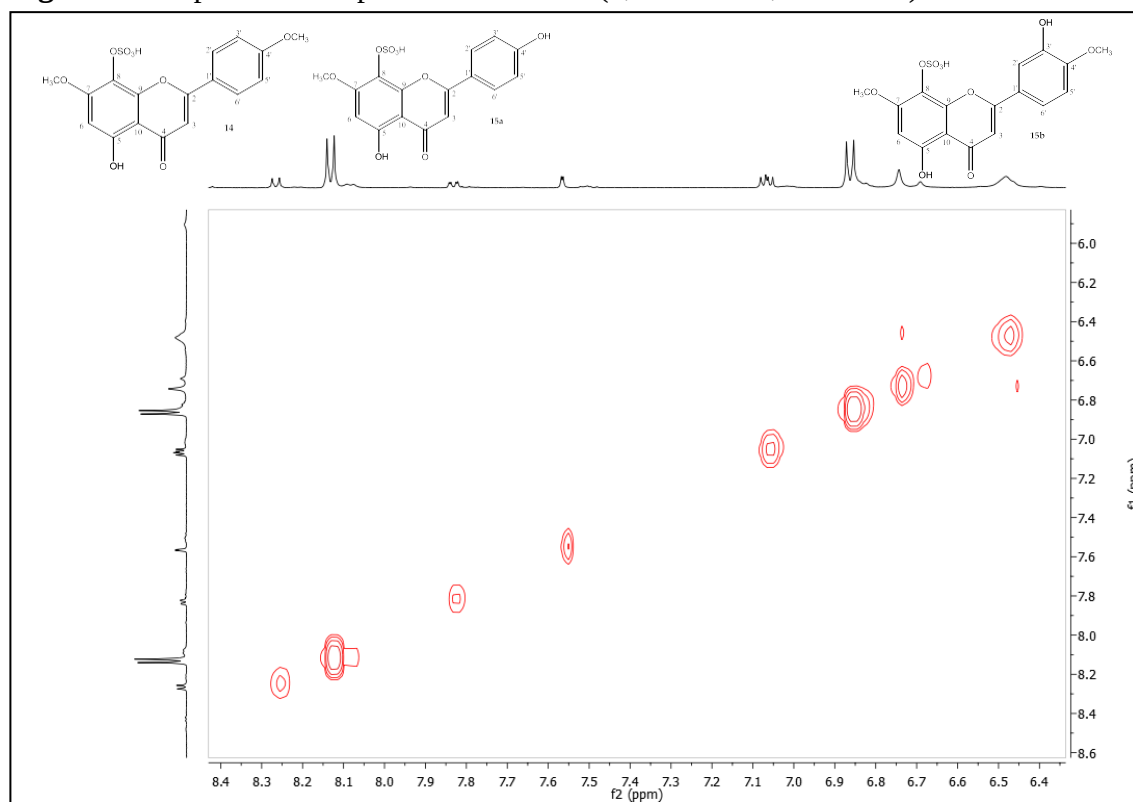
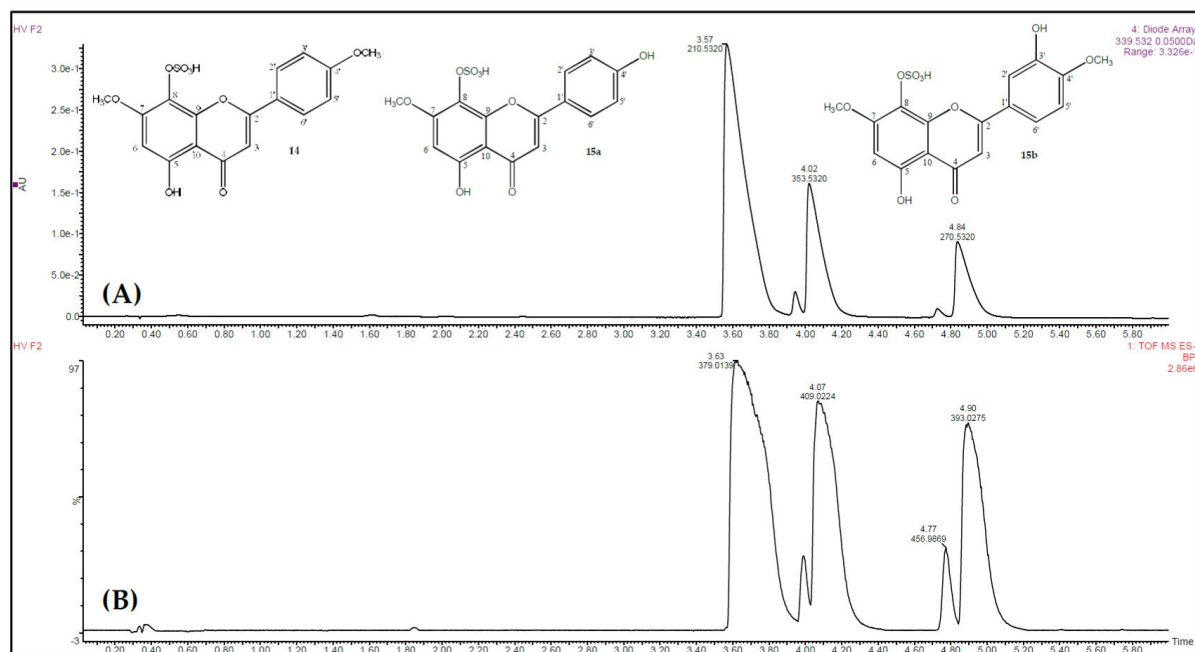
Figura 90. Espectro de NOESY (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz) de Hv-9**Figura 91.** Expansão do espectro de NOESY (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz) de Hv-9

Figura 92. Espectro de UV à 340 nm em UPLC-DAD (A) e ESI base peak ion (BPI) Cromatograma de Hv-9, mistura analisada por UPLC-QTOF-MS (B)



5.2.10. Caracterização estrutural de *Hv*-10

A substância codificada como *Hv*-10, foi isolada como um pó amarelo. A análise dos espectros de RMN de ^1H , obtido em Acetona- d_6 (Figuras 93 a 96, pág. 169 e 170), evidenciou a presença de um conjunto de sinais na região de aromáticos entre δ_{H} 6,78 e δ_{H} 7,0. Foram observados os sinais: δ_{H} 6,78 (d, $J=8,1$ Hz, H-5/ H-5') acoplando orto com δ_{H} 6,83 (dd, $J=8,1$ Hz, H-6/ H-6'), um singlete em δ_{H} 6,99 (d, $J=1,9$ Hz H-2/ H-2'), indicando a presença de uma substituição do tipo ABX no anel (Figura 94, pág. 169) (YI et al. 2010).

Um próton oximetínico em δ_{H} 4,7 (d, $J=4,3$ Hz, H-7/H-7'), prótons oximetilênicos em δ_{H} 4,21 (dd, $J=9,0$ Hz, H-9/H-9') e δ_{H} 3,79 (dd, $J=9,1$ Hz, H-9/H-9'), e um hidrogênio metínico em δ_{H} 3,08 (dd, $J=6,3$ Hz, H-8/H-8'), levaram a sugerir que a substância seria uma lignana (Figura 95, pág. 170) (ZHOU, REN, LI, 2017). Além de um singlete em δ_{H} 3,84 com integral para seis hidrogênios sugerindo a presença de duas metoxilas na molécula.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 97 e 98, pág. 171) apresenta 10 sinais, referentes a 20 carbonos característico de lignanas, sendo seis carbonos aromáticos: δ_{C} 148,4 (C-3/C-3'), δ_{C} 146,9 (C-4/C-4'), δ_{C} 134,2 (C-1/C-1'), δ_{C} 119,7 (C-6/C-6'), δ_{C} 115,5 (C-5/C-5'), δ_{C} 110,6 (C-2/C-2'); um carbono oximetínico em δ_{C} 86,7 (C-7/C-7'), um carbono oximetilênico em δ_{C} 72,4 (C-9/C-9'), um metínico em δ_{C} 55,2 (C-8/C-8') e um carbono em δ_{C} 56,3 que confirmou a presença de metoxilas na molécula (ASSIS-JUNIOR, GARCEZ, GARCEZ, 2013). Para se confirmar as posições dos substituintes na estrutura, tanto nos anéis furofurânicos quanto aromáticos, foram avaliadas as correlações nos mapas de contorno de HMQC e HMBC (Figuras 99 a 104, págs. 172 a 174).

Após comparação dos dados obtidos com aqueles da literatura (Tabela 18, pág. 167), pode-se constatar que a substância *Hv*-10 tratava-se de uma lignana dibenzilbutirolactônica, o pinoresinol, isolado anteriormente de *H. angustifolia* e *H. hirsuta* (CHEN et al., 2006; CHIN et al., 2006). Sendo relatada pela primeira vez na espécie *H. velutina*.

As lignanas e seus derivados são bastante conhecidas devido suas atividades antichagásica (SOUZA et al. 2012). Estudos comprovam a atividade antiinflamatória e antitumoral do pinoresinol (DURING et al. 2012; LÓPEZ-BIEDMA et al. 2016).

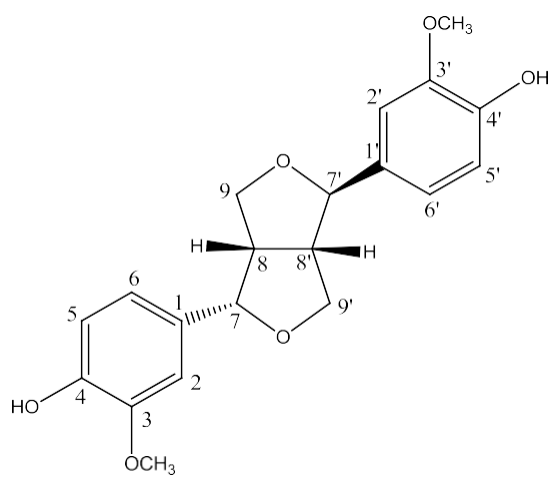
Hv-10: Pinoresinol

Tabela 18. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de *Hv-10* (δ , CD_3COCD_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente) com modelo da literatura Mo-1 (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz) (YI et al., 2010) e Mo-2 (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz) (MARQUES, 2014) e Mo-3 (δ , CDCl_3 , 500 e 125 MHz) (MESSIANO, 2010).

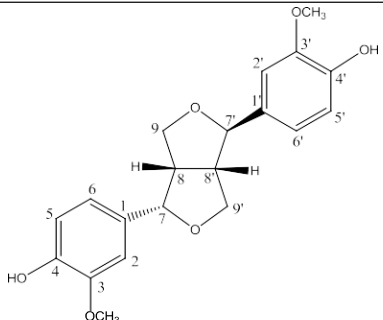
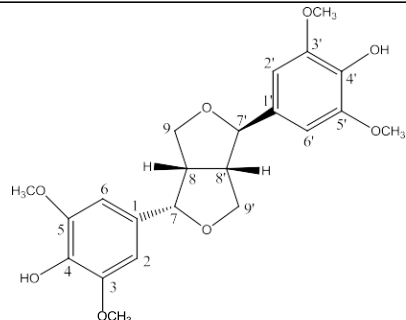
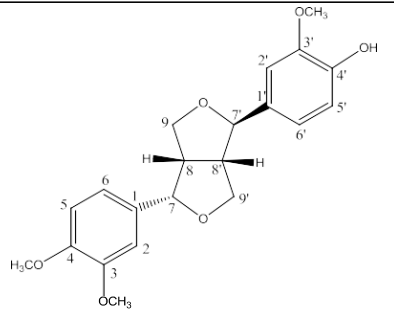
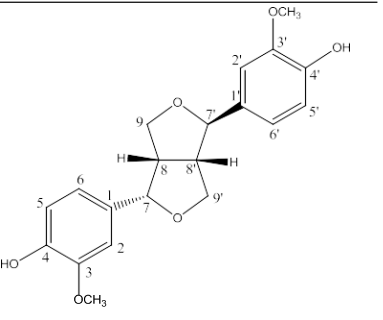
Mo-1 (Pinoresinol)			Mo-2 (Seringoresinol)		Mo-3 ((-)-Filigenina)		<i>Hv-10</i>	
								
C	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1 e 1'	-	132,8	-	131,99	-	131,0; 133,1	-	134,1
2 e 2'	6,90 (d, 2H)	108,6	6,56 (s, 4H)	102,55	6,96 (d, $J=1,5$ Hz, 1H) 6,93 (d, $J=2,0$ Hz, 1H)	109,1; 108,6 148,9;	6,98 (d, $J=1,9$ Hz, 2H)	110,6
3 e 3'	-	145,2	-	147,08	-	146,7	-	148,4
4 e 4'	-	146,7	-	134,17	-	148,2	-	-
5 e 5'	6,88 (d, $J=8,0$ Hz, 2H)	114,3	-	147,08	6,87 (sl, 1H); 6,91 (d, $J=8,0$ Hz, 1H)	114,3	6,78 (d, $J=8,1$ Hz, 2H)	115,5
6 e 6'	6,81 (dd, $J= 8,0$ e 1,9 Hz, 2H)	119,0	6,56 (s, 4H)	102,55	6,87 (sl, 1H); 6,86 (dd, $J=8,0$; 2,0	117,8; 119,2	6,83 (dd, $J=8,1$ Hz, 2H)	119,7

Tabela 18 (Continuação). Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de *Hv-10* (δ , CD_3COCD_3 , 500 MHz e 125 MHz, respectivamente) com modelo da literatura Mo-1 (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz) (YI et al., 2010) e Mo-2 (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz) (MARQUES, 2014) e Mo-3 (δ , CDCl_3 , 500 e 125 MHz) (MESSIANO, 2010).

Mo-1 (Pinoresinol)			Mo-2 (Seringoresinol)		Mo-3 ((-)-Filigenina)		<i>Hv-10</i>	
C	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
7 e 7'	4,47 (d, $J=4,4$ Hz, 2H)	85,8	4,70 (d, $J=4,0$ Hz, 2H)	86,09	4,89 (d, $J=5,5$ Hz, 1H)	82,1; 87,7	4,66 (d, $J=4,3$ Hz, 2H)	86,7
8 e 8'	3,10 (m, 2H)	54,1	3,18-2,92 (m, 2H)	54,28	4,46 (dd, $J=7,0$ Hz, 1H)		3,08 (dd, $J=6,3$ Hz, 2H)	55,3
9 e 9'	4,24 (m, 2H); 3,88 (m, 2H)	71,6	4,26 (dd, $J=8,9$; 6,7 Hz, 4H)	71,75	3,34 (m, 1H) 2,93 (m, 1H)	50,2; 54,5	4,20 (dd, $J=9,0$ Hz, 2H); 3,78 (dd, $J=9,1$ Hz, 2H)	72,3
OCH ₃ -3,3'	3,90 (s, 6H)	56,0	3,87 (s, 12H)	56,29	3,92 (s, 3H) 3,93 (s, 3H)	56,0 56,0	3,84 (s, 6H)	56,2
OCH ₃ -4	-	-	-	-	3,90 (s, 3H)	55,9	-	-
OCH ₃ -5,5'	-	-	3,87 (s, 12H)	56,29	-	-	-	-

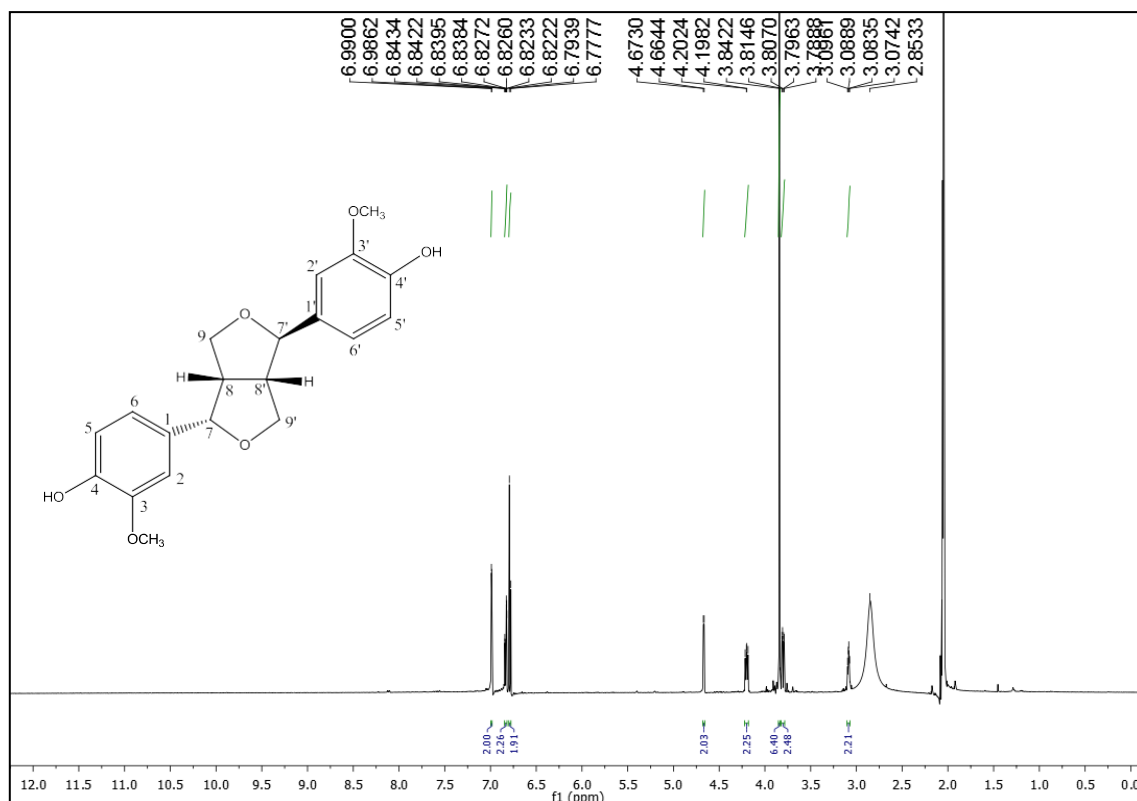
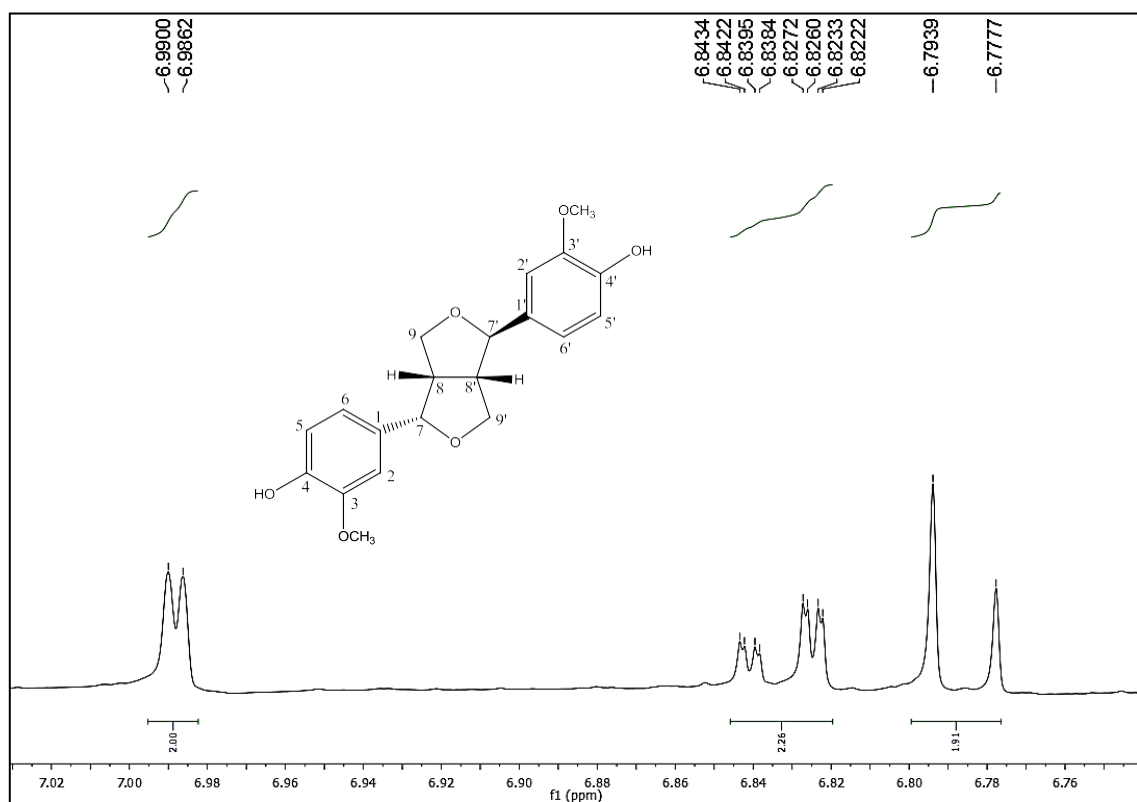
Figura 93. Espectro de RMN ^1H (δ , CD_3COCD_3 , 500 MHz) de *Hv*-10**Figura 94.** Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 6,76 e 7,02 ppm (δ , CD_3COCD_3 , 500 MHz) de *Hv*-10

Figura 95. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 3,75 e 4,7 ppm (δ , CD_3COCD_3 , 500 MHz) de *Hv*-10

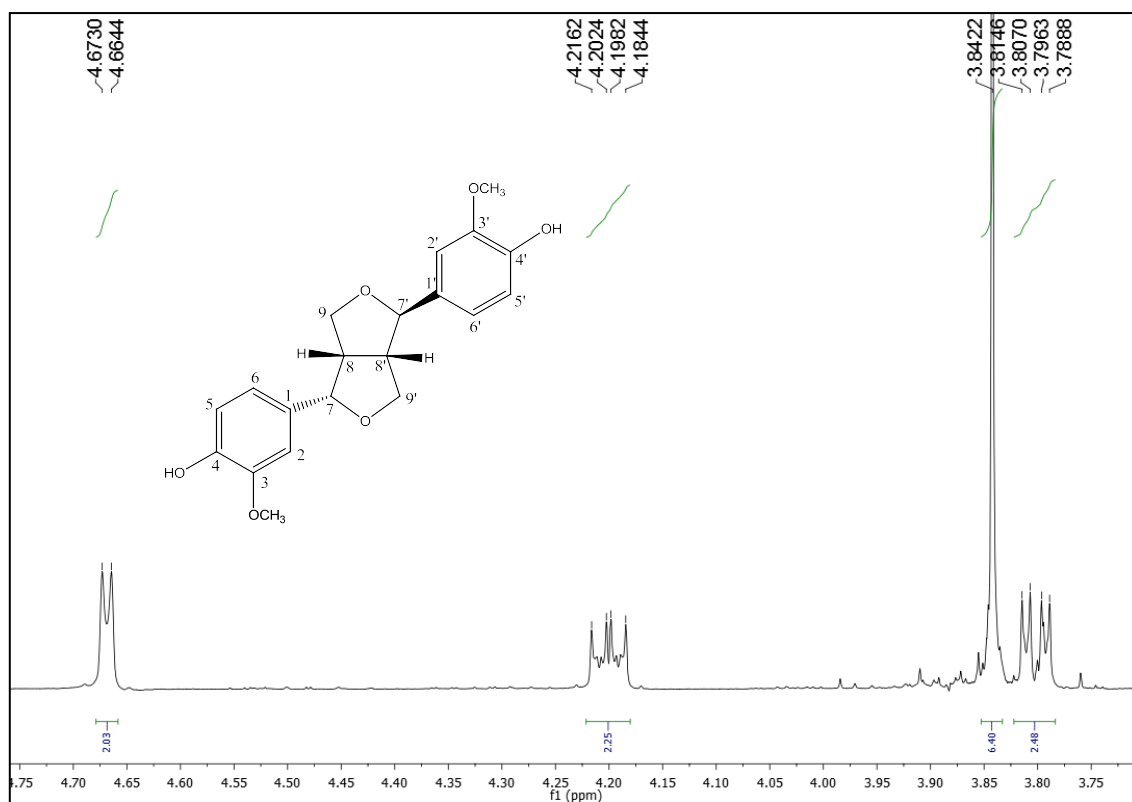


Figura 96. Expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 1,7 e 3,4 ppm (δ , CD_3COCD_3 , 500 MHz) de *Hv*-10

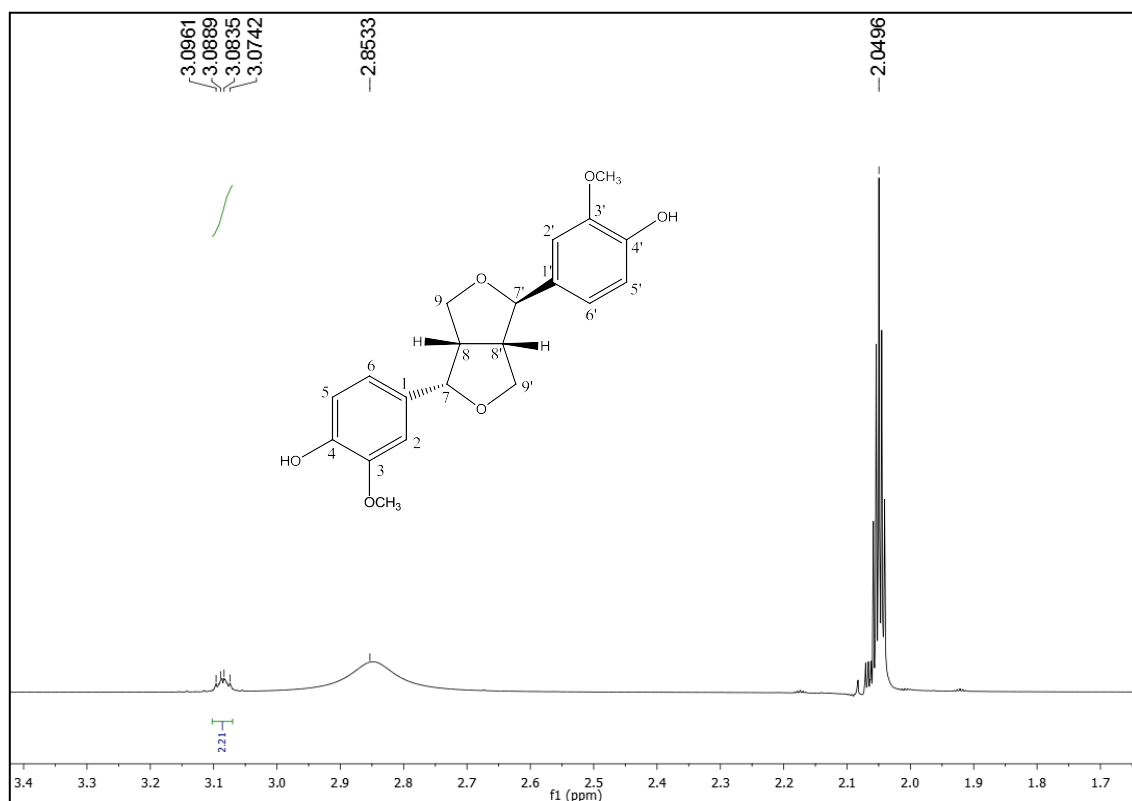


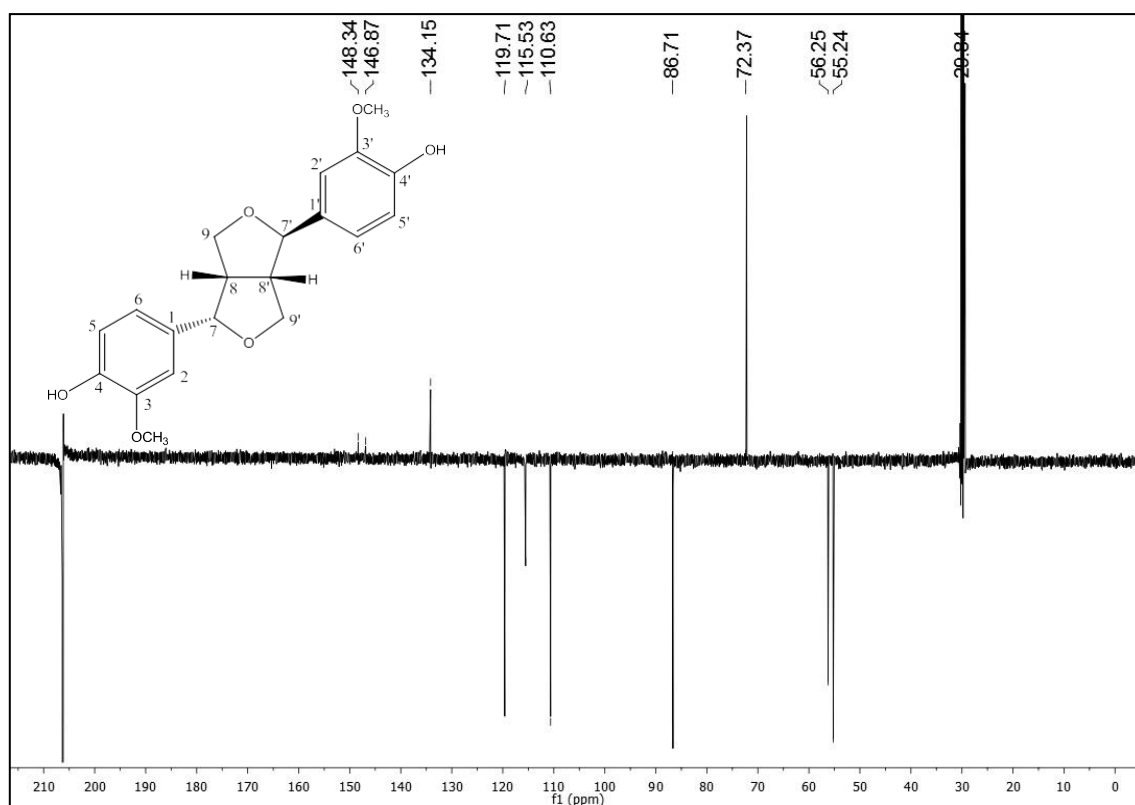
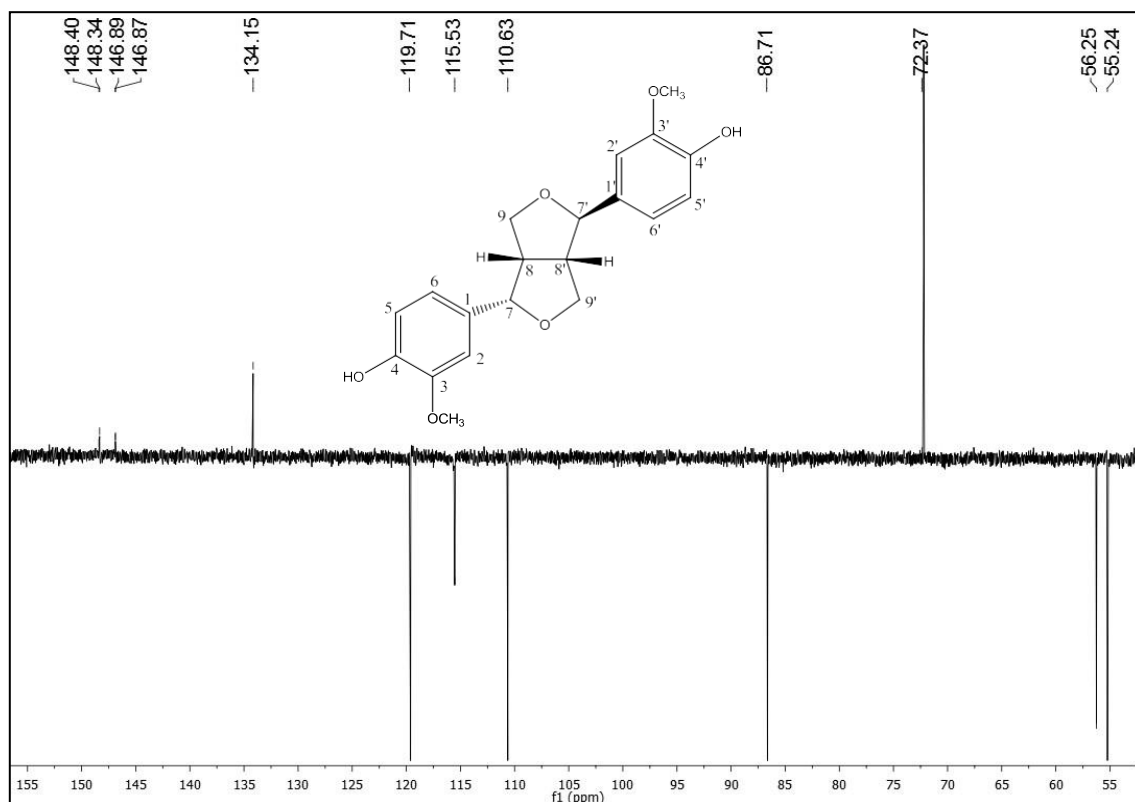
Figura 97. Espectro de RMN ^{13}C (δ , CD_3COCD_3 , 125 MHz) de *Hv*-10**Figura 98.** Expansão do espectro de RMN ^{13}C (δ , CD_3COCD_3 , 125 MHz) de *Hv*-10

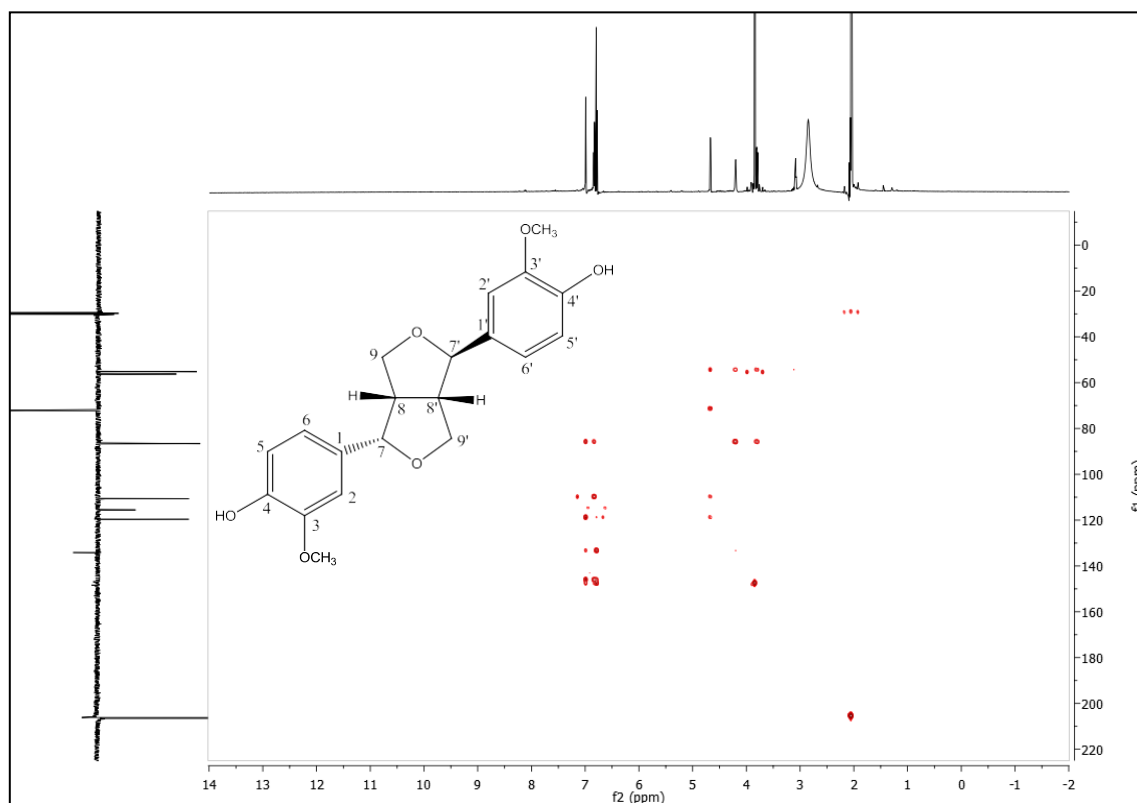
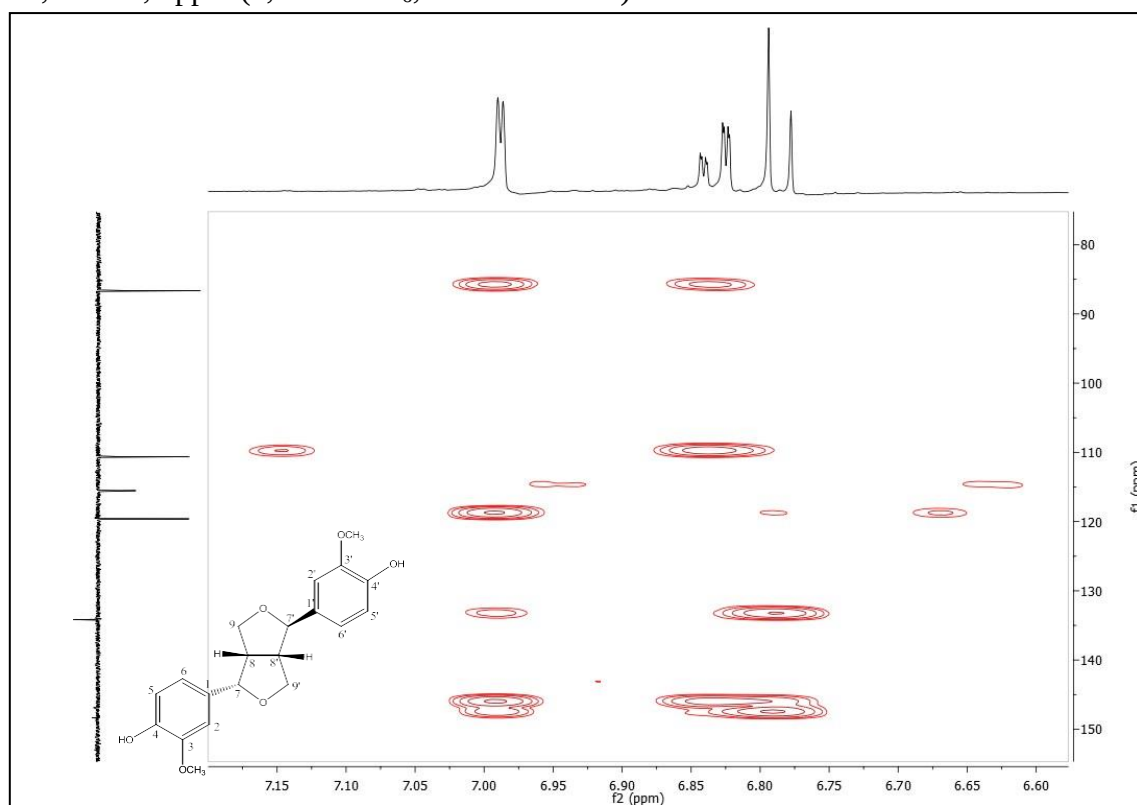
Figura 99. Espectro HMBC (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125MHz) de *Hv*-10**Figura 100.** Expansão do espectro HMBC na região entre δ_H 6,6 e 7,15 ppm e entre δ_C 80,0 e 150,0 ppm (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125MHz) de *Hv*-10

Figura 101. Expansão do espectro HMBC na região entre δ_H 3,6 e 4,8 ppm e entre δ_C 50,0 e 150,0 ppm (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125MHz) de *Hv*-10

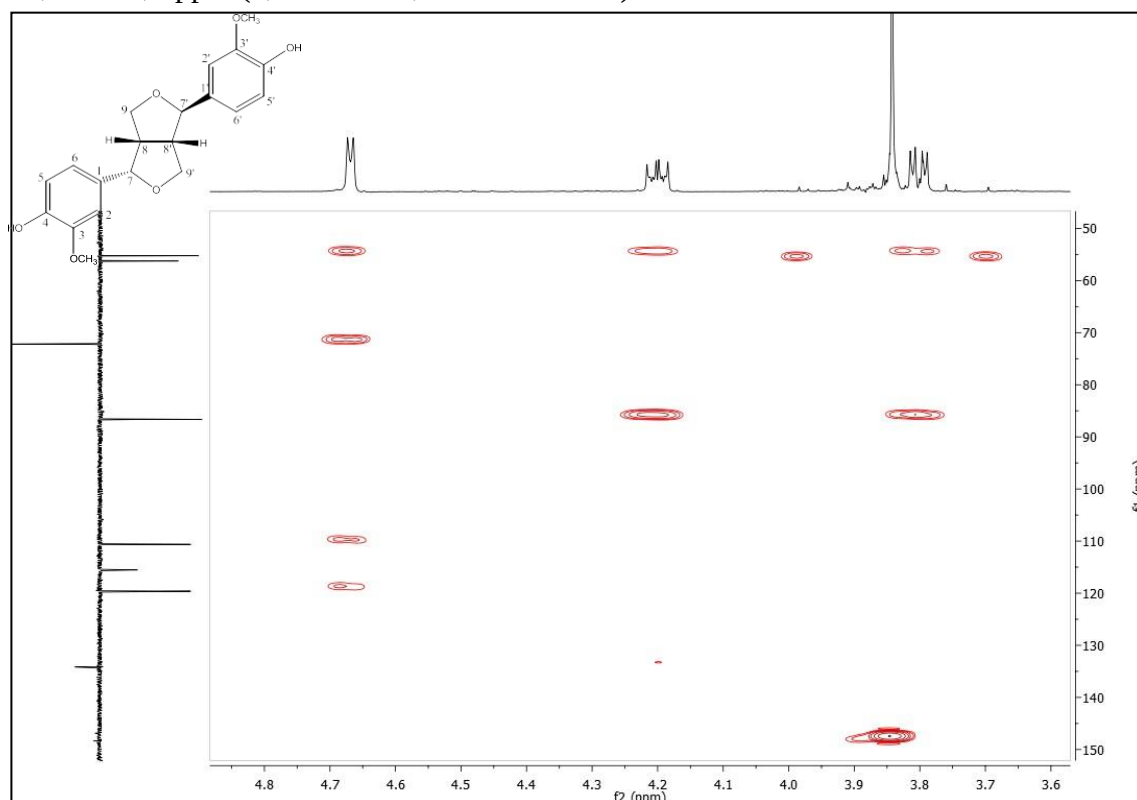


Figura 102. Espectro HMQC (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125MHz) de *Hv*-10

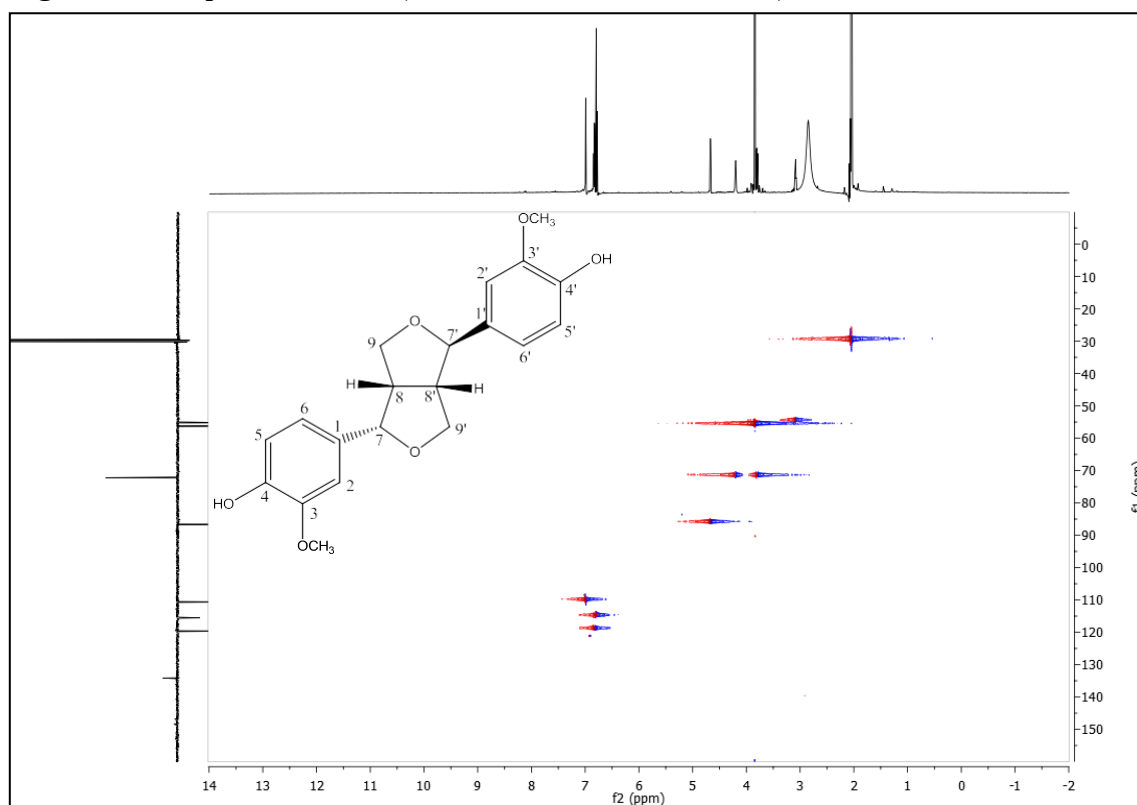


Figura 103. Expansão do espectro HMQC na região entre δ_H 6,65 e 7,15 ppm e entre δ_C 108,0 e 121,0 ppm (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125MHz) de *Hv-10*

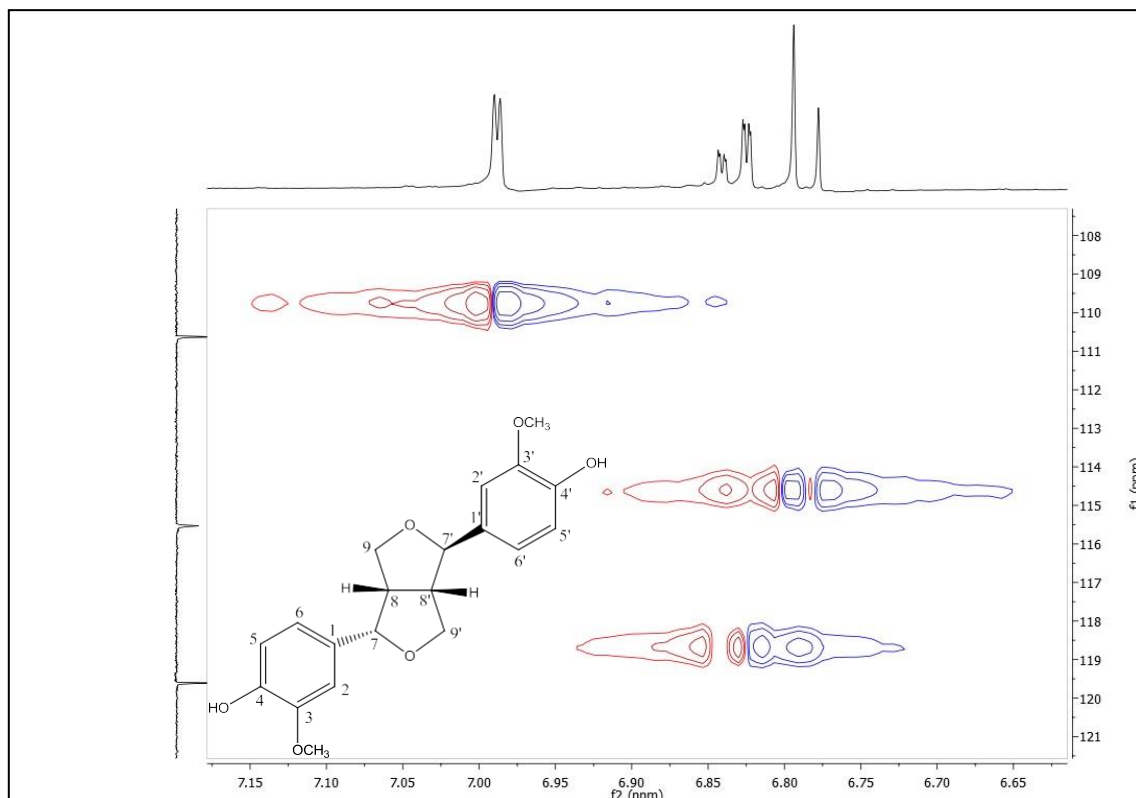
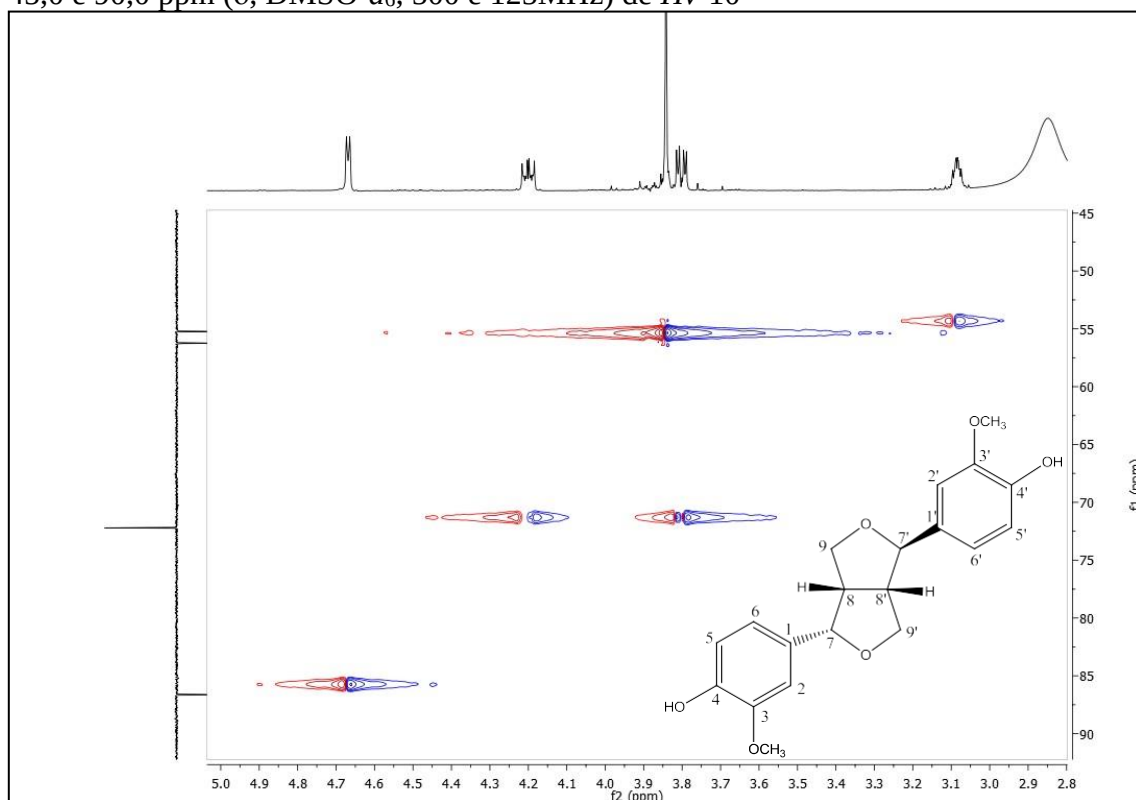


Figura 104. Expansão do espectro HMQC na região entre δ_H 2,8 e 5,0 ppm e entre δ_C 45,0 e 90,0 ppm (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125MHz) de *Hv-10*



5.3. Avaliação da atividade das fases de *Helicteres velutina* frente a larvas L4 de *Aedes aegypti*

Em estudo anterior realizado pela nossa equipe, foi verificada a atividade larvicida do EEB das partes aéreas de *H. velutina*, que apresentou CL_{50} 2,98 mg/mL frente as larvas (L4) de *Ae. aegypti* (FERNANDES et al. 2018). Visando dar continuidade ao estudo biológico com esta espécie, o extrato foi quimicamente fracionado, por meio de uma cromatografia liquido-liquido como descrito no Esquema 6 (pág. 64). As fases obtidas foram biomonitoradas com ensaios utilizando as larvas do vetor, no intuito de se trabalhar fitoquimicamente com aquelas que tivessem maior potencial bioativo, buscando isolar os constituintes químicos responsáveis pela atividade previamente descrita (FERNANDES et al. 2018), que venham a ser úteis na busca por novos compostos naturais inseticidas, mais seletivos e biodegradáveis, sobre o *Ae. aegypti*.

Os resultados obtidos para atividade larvicida das fases hexano, diclorometano, acetato de etila, n-butanólica e hidroalcóolica, obtidas a partir do EEB, estão apresentados na Figura 105, pág. 176. Como podemos observar nos gráficos de barras, as fases que apresentaram atividade promissora foram as de menor polaridade, hexânica e diclorometânica, com valores de CL_{50} 3,38 mg/mL e 5,80 mg/mL, respectivamente, essas concentrações foram ligeiramente superiores em relação ao CL_{50} do EEB, o que sugere uma atividade sinérgica das substâncias existentes na composição do extrato (COELHO, DE PAULA, ESPÍNDOLA, 2009).

As fases de maior polaridade, acetato de etila com CL_{50} 13,42 mg/mL, n-butanólica com CL_{50} 10,31 mg/mL e hidroalcóolica com mortalidade mínima na concentração máxima utilizada (20,0 mg/mL) em 24 horas, precisariam de doses significativamente maiores que as estabelecidas, sendo excluída do estudo.

Estes resultados estão em acordo com o que foi descrito anteriormente por Mukandiwa, Eloff, Naidoo (2015), que avaliaram o efeito larvicida dos extratos hexânico, diclorometânico e acetônico das folhas de *Clausena anisata* (Rutaceae) contra as larvas (L3) de *Ae. aegypti*, onde apenas o extrato hexânico causou mortalidade nas concentrações testadas, apresentando CL_{50} 0,068 e 0,059 mg/mL em 24 e 48 horas, respectivamente. Outro estudo relatou que o extrato hexânico das folhas de *Zanthoxylum oxyphyllum* (Rutaceae) mostrou-se ativo com CL_{50} 1,93; 1,40; 3,93 e 5,99 mg/mL para os estágios L1, L2, L3 e L4 de *Ae. aegypti*, respectivamente (BORAH, KALITA,

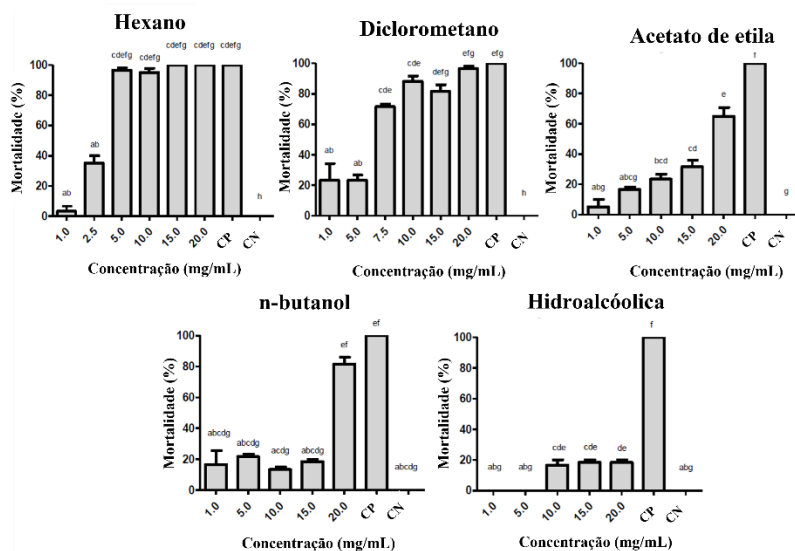
TALUKDAR, 2014). Esses dados demonstram que o estágio larval escolhido e o tempo de análise interferem no resultado obtido, podendo se observar concentrações que variam conforme essas duas variáveis.

Uma pesquisa avaliando a atividade da casca do caule, raízes e folhas da espécie *Murraya koeniggi*, extraída com diferentes solventes, mostrou que o extrato hexânico apresentou forte atividade contra larvas de *Ae. aegypti*, seguido do extrato clorofórmico e metanólico (SUKARI et al. 2013). Outro trabalho com a mesma espécie, avaliou frações obtidas após procedimento cromatográfico do extrato hexânico, a fração mais ativa teve CL_{50} 0,035 mg/mL (ARIVOLI, RAVEEN, SAMUEL, 2015).

Em estudo realizado por Guarido (2009), as atividades de extratos obtidos das sementes de *Annona foetida* Mart. (Anonaceae) foram avaliadas, o extrato mais eficiente foi o diclorometânico CL_{50} 0,007 mg/mL, seguido do hexânico 0,015 mg/mL e metanólico 0,076 mg/mL em 24 h. Outro estudo mostrou resultados semelhantes com os valores de CL_{50} 0,289 e 0,325 mg/mL, para o extrato diclorometânico e hexânico após 24 h de tratamento, respectivamente (PLUEMPANUPATI et al. 2012).

Os extratos vegetais podem manifestar os seus efeitos tóxicos nas larvas de diversas maneiras, por exemplo, supressão da reprodução e fertilidade, mortalidade e inibição do crescimento (DARMALI et al., 2015).

Figura 105: Atividade larvicida das fases de *H. velutina* contra *Ae. aegypti* após 24 horas. CP = Controle Positivo, CN = Controle Negativo.



(*) Barras seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente segundo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade

Como podemos observar a atividade das fases frente às larvas de *Ae. aegypti*, dependem de vários fatores, como a espécie escolhida, parte da planta de onde foram obtidos os extratos, solventes escolhidos para extração, entre inúmeros outros (SANTANA, 2012; NOUR, SANDANASAMY, NOUR, 2012). As espécies vegetais são únicas e singulares, possuindo uma gama de compostos com vasta complexidade estrutural, cada fase extrai da sua matriz os constituintes de maior afinidade pela mesma, para a espécie *H. velutina* foi observado que as fases mais ativas frente às larvas (L4) de *Ae. aegypti* são as mais apolares e com base nisso optamos por dar continuidade aos ensaios biológicos com as fases hexânica e diclorometânica e seus derivados.

5.3.1. Avaliação da atividade ovicida das fases de *Helicteres velutina* frente ao *Aedes aegypti*

As fases hexânica e diclorometânica foram avaliadas quanto a sua capacidade de inibir a eclodibilidade dos ovos de *Ae. aegypti*, para isso foram testadas concentrações que variaram de 0,1 a 10,0 mg/mL, os resultados podem ser observados na Figura 106, pág. 178.

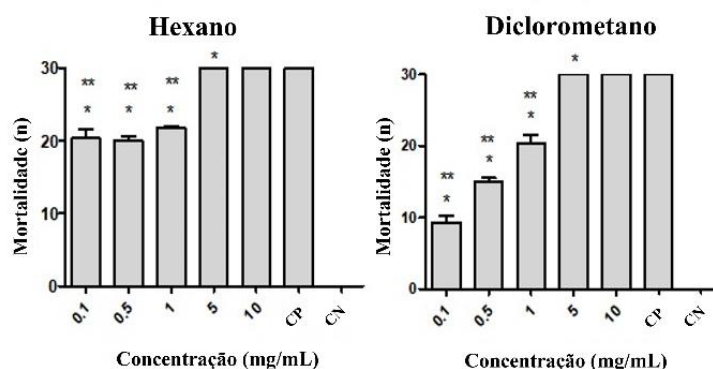
Nos gráficos gerados pelo GraphPad Prism foi observado que a porcentagem de eclosão foi inversamente proporcional à concentração das fases, com grande similaridade entre a atividade ovicida das fases hexânica e diclorometânica, apresentando 100% de mortalidade (inviabilidade de eclosão) na concentração de 5,0 mg/mL, enquanto os ovos no controle negativo mostraram 100% de eclodibilidade, durante o mesmo período de observação.

Pesquisas anteriores relatam atividade ovicida de extratos vegetais. Govindarajan (2011) em estudo com a espécie *Cardiospermum halicacabum* Linn. (Sapindaceae), avaliou os extratos benzenico, hexânico, clorofórmico, acetato de etila e metanólico quanto à capacidade de inibir a eclosão de ovos, o extrato clorofórmico apresentou promissora atividade ovicida na concentração de 0,5 mg/mL e o extrato hexânico a 0,6 mg/mL.

Munusamy et al. (2016), avaliou a ação ovicida dos extratos hexânico, clorofórmico e metanólico, obtidos de diferentes plantas, detectando maior atividade para o extrato metanólico da raiz de *Rubia cordifolia*, na concentração de 0,5 mg/mL, inibindo 70,4% da eclosão de ovos de *Ae. aegypti*, seguido do extrato hexânico da raiz de *Scilla peruviana* que registrou atividade ovicida de 43,2% na mesma concentração.

Reegan (2015), mostrou que entre os extratos hexânico, acetato de etila e metanólico de diferentes vegetais, o hexânico de *Limonia acidissima* (Linn.) apresentou melhor atividade ovicida com 60% de inibição na concentração de 0,5 mg/mL, seguido do extrato hexânico de *Aegle marmelos* (Linn.), com moderada atividade e ação ovicida de 48,8% na mesma concentração, os demais extratos testados não apresentaram atividade promissora. Atividade ovicida do extrato de *A. alnifolia* obtido com diferentes solventes, hexano, benzeno, acetato de etila, acetona e metanol, apresentou maior inibição da eclosão de ovos na ordem em que foram citados (KOVENDAN et al, 2013; GOVINDARAJAN & SIVAKUMAR, 2014). Como pode ser visto a atividade ovicida, assim como as demais atividades, depende não apenas do solvente de extração, mas também das espécies estudadas, pois cada espécie apresenta um perfil químico e biológico distinto.

Figura 106: Atividade ovicida das fases de *H. velutina* contra *Ae. aegypti* após 25 dias. CP = Controle Positivo, CN = Controle Negativo.



(*) Resultados diferem significativamente do controle negativo. (**) Resultados diferem significativamente do controle positivo.

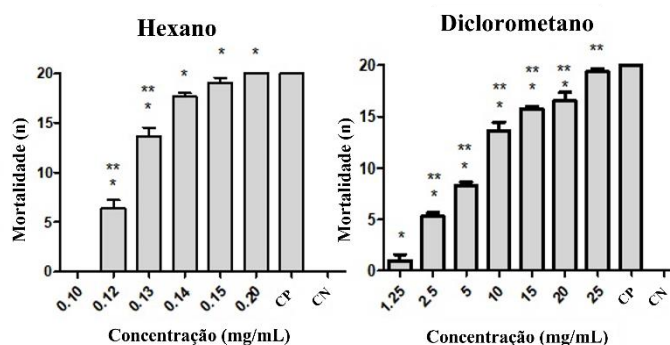
5.3.2. Avaliação da atividade pupicida das fases de *Helictes velutina* frente ao *Aedes aegypti*

A atividade pupicida das fases hexânica e diclorometânica são mostrados na Figura 107, pág. 179. A mortalidade pupal foi consideravelmente maior na fase hexânica, indo de 85% na concentração de 0,15 mg/mL para 100% a 0,20 mg/mL nas primeiras 24h, enquanto a fase diclorometânica só começou a causar morte das pupas a partir de 1,25 mg/mL, na dose de 10,0 mg/mL alcançou 78% de mortalidade após 72h de exposição. Os valores de CL₅₀ foram 0,12 e 8,85 mg/mL, respectivamente.

Algumas pesquisas anteriores mostraram resultados diferentes, como o estudo com a espécie *Dalbergia oliveri* (Fabaceae), no qual a mortalidade das pupas foi maior com extrato diclorometânico, após 48 horas de tratamento na CL₅₀ 1,0 mg/mL e hexânico 1,21 mg/mL (PLUEMPANUPAT et al. 2012). Reegan et al. (2014), avaliaram algumas frações oriundas do extrato hexânico, estas apresentaram atividade pupicida promissora com CL₅₀ entre 0,004 e 0,032 mg/mL. Isso mostra que o estudo de biomonitoramento pode levar à obtenção de compostos cada vez mais ativos e em menores concentrações.

Estudos obtidos com outros solventes também relataram atividade. O extrato metanólico dos frutos de *Solanum xanthocarpum* apresentou boa atividade pupicida com CL₅₀ de 0,279 mg/mL (KUMAR et al, 2012), bem como o extrato etanólico de *Citrus sinensis* CL₅₀ 0,497 mg/mL (MURUGAN et al, 2012).

Figura 107: Atividade pupicida das fases de *H. velutina* contra *Ae. aegypti* após 72 horas. CP = Controle Positivo, CN = Controle Negativo.



(*) Resultados diferem significativamente do controle negativo. (**) Resultados diferem significativamente do controle positivo.

5.3.3. Avaliação da atividade adulticida das fases de *Helictes velutina* frente ao *Aedes aegypti*

Para avaliar a atividade adulticida foram realizados testes de contato tarsal e corporal das fases hexânica e diclorometânica de *H. velutina* contra o mosquito adulto de *Ae. aegypti*.

Os resultados do ensaio de contato tarsal está apresentado na Figura 108, pág. 181. Os gráficos mostram uma mortalidade dose-dependente, a atividade tarsal da fase diclorometânica foi superior à fase hexânica. Os valores de CL₅₀ calculados foram 0,74 e 8,01 mg/mL, respectivamente. Em relação às alterações comportamentais dos mosquitos,

foi observado que nas concentrações mais altas, os adultos apresentavam movimentos inquietos por alguns momentos, com voo anormal e depois morriam.

Govindarajan e Sivakumar (2012) avaliaram o efeito de extratos de plantas obtidos com diferentes solventes (hexano, benzeno, clorofórmio, acetato de etila e metanol) em adultos de *Ae. aegypti* em 24 h, sendo registrada maior atividade para o extrato metanólico, seguido de clorofórmio, benzeno, acetato de etila e hexânico com CL_{50} 0,192; 0,207; 0,222; 0,235; 0,252 mg/mL, respectivamente. Esses dados estão de acordo com o descrito por Amerasan et al. (2012), utilizando como solventes metanol, acetona, benzeno, clorofórmio e hexano para *Cassia tora* que apresentou CL_{50} 0,252; 0,269; 0,287; 0,307; 0,329 mg/mL, respectivamente, corroborando com o que havia sido descrito por Kovendan et al. (2013). Para a espécie *Albizia lebbbeck* o extrato metanólico, seguido por acetato de etila, clorofórmio, benzeno e hexano com CL_{50} 0,069; 0,087; 0,099; 0,111; 0,119 mg/mL, apresentaram as melhores respostas em adultos de *Ae. aegypti*, respectivamente (GOVINDARAJAN & RAJESWARY, 2015).

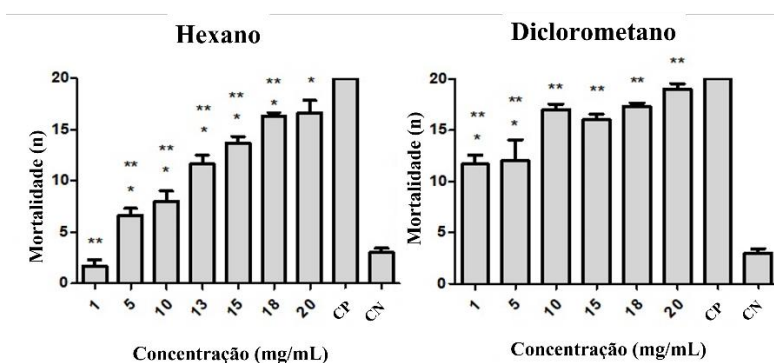
No trabalho de Ajaegbu et al. (2016) com a espécie *Spondias mombin*, a melhor atividade foi da fase diclorometânica com CL_{50} 2,172 mg/mL, seguida por hexano 4,426 mg/mL e acetato 5,346 mg/mL. Govindarajan & Sivakumar (2014), mostrou que o extrato metanólico foi o mais ativo, 0,2 mg/mL matou 99% dos mosquitos, enquanto o extrato clorofórmico, com uma concentração de 0,25 mg/mL foi capaz de matar 97% dos adultos expostos, sendo ligeiramente mais ativo que o extrato hexânico de *Erythrina indica*, onde 0,3 mg/mL matou 94% dos adultos de *Ae. aegypti*.

No teste de contato corporal, observou-se um comportamento contrário ao do teste de contato tarsal, onde a ação da fase hexânica foi ligeiramente superior a fase diclorometânica, com os valores de CL_{50} 0,05 e 0,23 mg/mL, respectivamente (Figura 109, pág. 181). Quanto as alterações comportamentais durante os bioensaios, após o período de 24 e 48 horas de tratamento, os adultos ficavam com movimentos incomuns, inquietos e dificilmente permaneceram na superfície do recipiente de contenção, ficando cada vez mais letárgicos, paralisados e depois morreram. Foi observada mortalidade no controle negativo, o que pode ser atribuído à ausência de alimentação dos insetos.

O resultado obtido é comparável a relatos anteriores de Yu et al. (2015) que observaram em seus experimentos que entre os extratos hexânico, clorofórmico, aquoso e metanólico da espécie *Bryopsis pennata* contra *Ae. aegypti*, o mais ativo foi o clorofórmio CL_{50} 73,49 mg/cm², seguido do metanólico 86,48 mg/cm², hexânico 233,55 mg/cm² e aquoso 523,82 mg/cm². De acordo com Choochote et al. (2005) estudos

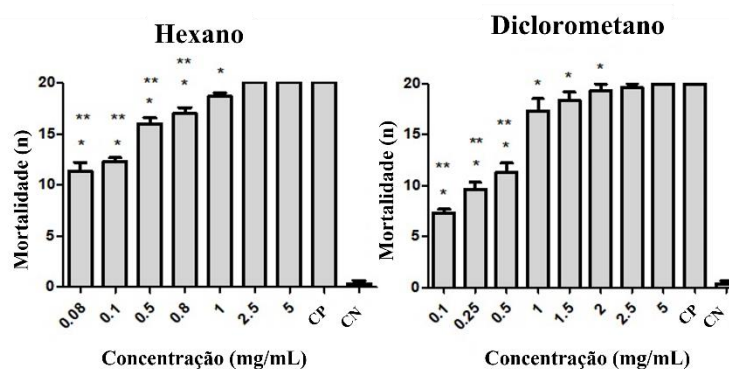
relacionados à aplicação tópica em corpos de insetos ainda são bastante raros, nestes estudos os mosquitos que ficam deitados no fundo do recipiente de retenção e não respondem a estimulação mecânica são contados como mortos.

Figura 108. Atividade adulticida – contato tarsal das fases de *H. velutina* contra *Ae. aegypti* após 48 horas. CP = Controle Positivo, CN = Controle Negativo.



(*) Resultados diferem significativamente do controle negativo. (**) Resultados diferem significativamente do controle positivo.

Figura 109: Atividade adulticida – contato corporal das fases de *H. velutina* contra *Ae. aegypti* após 48 horas. CP = Controle Positivo, CN = Controle Negativo.



(*) Resultados diferem significativamente do controle negativo. (**) Resultados diferem significativamente do controle positivo.

Um estudo de Reegan et al. (2014) avaliando a inibição da postura de ovos com os extratos hexânico, acetato de etila e metanólico de *Limonia acidissima*, o extrato hexânico causou 100% de inibição em fêmeas adultas de *Ae. aegypti* nas concentrações testadas de 0,062 a 0,5 mg/mL. Há também estudos que mostram atividade tóxica para insetos que se alimentam dos extratos das sementes de *Piptadenea viridiflora*, *Erythrina velutina* e *Enterolobium contortisiliquum* com CL₅₀ 0,005 0,012 e 0,013 mg/mL, respectivamente.

5.3.4. Avaliação da atividade das substâncias isoladas de *Helicteres velutina* frente a larvas L4 de *Aedes aegypti*

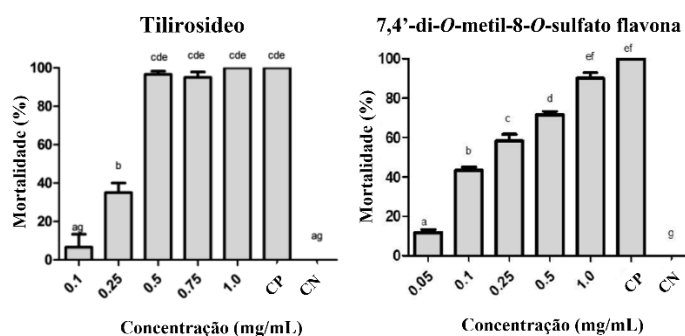
Após os ensaios biológicos com as fases hexânica, diclorometânica e estudo fitoquímico com as respectivas fases, que levou ao isolamento e caracterização estrutural de 17 substâncias durante o mestrado e doutorado (FERNANDES et al. 2018), foi realizado um estudo computacional *in silico*, que nos permitiu fazer uma triagem para testar apenas as substâncias mais promissoras sobre o *Ae. aegypti*, os dados podem ser vistos no tópico 5.4 (pág. 198).

Das 17 substâncias, apenas três foram ativas nas três proteínas testadas, entre elas o β -sitosterol glicosilado, que já possui estudo anterior comprovando sua atividade com CL_{50} de 0,011 mg/mL em larvas L2 (PONTUAL, 2010), as outras duas foram o tilirosídeo e a 7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato flavona, foram realizados testes larvicidas com essas duas substâncias a fim de se comprovar suas atividades preditas no teste virtual.

Como pode ser visto na Figura 110, pág. 183, as duas substâncias testadas mostraram promissora atividade na concentração de 1,0 mg/mL, com mortalidade de 90,0% para o flavonoide sulfatado em 24 h e que aumentou para 100,0% em 48 h na mesma concentração, já o tilirosídeo apresentou mortalidade máxima na concentração de 1,0 mg/mL após 72 h. As CL_{50} calculadas foram de 0,182 e 0,275 mg/mL, respectivamente.

A estrutura química da 7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato flavona é semelhante a estrutura da 7,4'-Di-O-metilisoescutelareina (Figura 111, pág. 183), nos chamou atenção as mesmas terem dado resultados tão diferentes nos testes *in silico*, então decidimos fazer uma análise experimental com a substância sem sulfato no C-8 do núcleo flavonoídico para compararmos os resultados. A ausência do sulfato diminuiu consideravelmente a atividade passando de 90% de mortalidade para 21,6%, o que nos levou a sugerir que a presença do sulfato na molécula corroborou em grande parte para sua atividade larvicida (Tabela 19, pág. 183).

Figura 110: Atividade larvica das substâncias isoladas de *H. velutina*, tilirosídeo após 72 h e 7,4'-di-*O*-metil-8-*O*-sulfato flavona após 24 h. CP = Controle Positivo, CN = Controle Negativo.



(*) Barras seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente segundo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

Figura 111: Estruturas químicas. A) 7,4'-di-*O*-metil-8-*O*-sulfato flavona; B) 7,4'-Di-*O*-metilisoescutelareina.

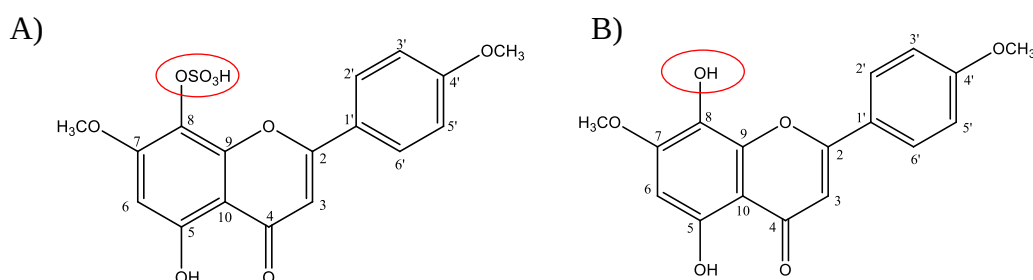


Tabela 19. Atividade das substâncias isoladas de *H. velutina* com atividade promissora *in silico* contra *Ae. aegypti* após 24, 48 e 72 horas de exposição

Substâncias	Concentrações (mg/mL)	% de larvas mortas ± Desvio padrão			CL ₅₀ (mg/mL)
		24 h	48 h	72 h	
7,4'-Di- <i>O</i> -metilisoescutelareina	1,0	21,6 ± 1,5	21,6 ± 1,5	21,6 ± 1,5	-
7,4'-di- <i>O</i> -metil-8- <i>O</i> -sulfato-flavona	1,0	90,0 ± 1,0	100 ± 1,0	100 ± 1,0	0,182
	0,5	71,6 ± 0,5	93,3 ± 1,5	100 ± 1,0	
	0,25	58,3 ± 1,1	88,3 ± 1,5	100 ± 1,0	
	0,1	43,3 ± 0,5	48,3 ± 1,3	51,6 ± 0,5	
Tilirosídeo	0,05	11,6 ± 0,5	20,0 ± 1,0	20,0 ± 1,0	0,275
	1,0	15,0 ± 1,0	60,0 ± 1,0	100 ± 1,0	
	0,75	11,6 ± 0,5	60,0 ± 1,0	100 ± 1,0	
	0,5	6,6 ± 0,5	48,3 ± 0,5	83,3 ± 0,5	
	0,25	3,3 ± 0,5	43,3 ± 0,5	70,0 ± 1,0	
	0,1	0,0 ± 0	21,6 ± 1,3	46,6 ± 0,5	

Garcez et al. (2013) traz uma revisão com diversas substâncias obtidas a partir de plantas, pertencentes a diferentes classes de metabólitos secundários, que mostraram atividade frente a larvas de *Ae. aegypti*. Pontual (2010), relata atividade para quercetina (0,035 mg/mL) e canferol (0,030 mg/mL) isolados de *Gardenia ternifolia* (Rubiaceae) promoveram mortalidade de L2.

5.3.5. Tempo de sobrevivência das larvas (L4) expostas às fases e substâncias promissoras

O tempo de sobrevivência das larvas expostas as substâncias teste, foi avaliado nos intervalos de 0, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas, para a fase hexânica (5,0 mg/mL), diclorometânica (10,0 mg/mL), 7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato-flavona e tilirosídeo (1,0 mg/mL), tendo em vista que esta última só apresentou mortalidade total das larvas após 72h de exposição (Figura 105, pág. 176 e Figura 110, pág. 183).

Essa análise nos permitiu observar o perfil de mortalidade das larvas ao longo do tempo e saber de forma mais precisa a partir de que momento a substância começa a ter efeito, devendo-se levar em consideração que foram utilizadas diferentes concentrações das soluções teste, escolhidas com base na dose necessária para se matar todas as larvas expostas nos períodos de tempo assinalados anteriormente.

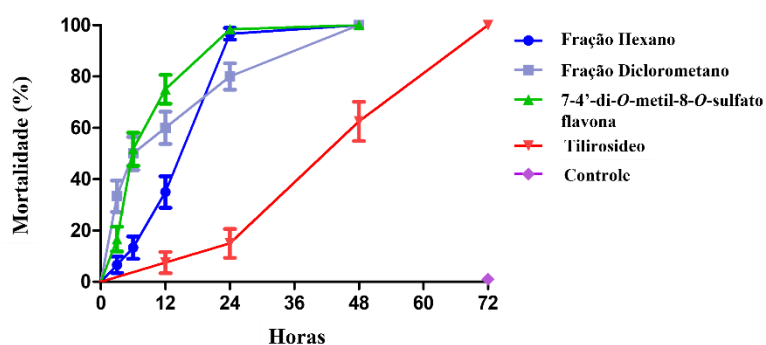
Como pode ser observada na Figura 112 (pág. 185), a fase diclorometânica apresentou o melhor perfil de mortalidade nas três primeiras horas, chegando a 33,5%, seguido da 7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato-flavona 16,7% e fase hexânica 6,7%, no mesmo intervalo, o comportamento dos três compostos se manteve semelhante ao longo da análise, chegando a 90,0%, 98,34% e 96,7%, respectivamente, ao atingir 24 horas de exposição.

O tilirosídeo por sua vez apresentou um perfil diferente, 6,7% das larvas expostas morreram nas 12 primeiras horas de análise, com mortalidade mais acentuada após 48h, representando 65,0%, totalizando 100,0% ao atingir 72h. No controle negativo não foi registrado nenhuma morte, algumas das larvas inclusive chegaram a se transformarem em pupa nesse período.

Em estudo realizado por Nunes (2013), com suco de *Agave sisalana*, observou-se um comportamento similar utilizando a concentração de 6,5 mg/mL, as larvas começaram a morrer a partir de 12 h, atingindo 88,0% de mortalidade das larvas em 24 h de exposição.

Levando-se em consideração as doses utilizadas no nosso estudo, a substância mais ativa foi a 7,4'-di-*O*-metil-8-*O*-sulfato-flavona, que apresentou o melhor perfil de mortalidade na concentração de 1,0 mg/mL.

Figura 112. Porcentagem da sobrevivência das larvas de *Ae. aegypti* expostas as fases e substâncias isoladas de *H. velutina* com suas respectivas concentrações letais.



Durante esse ensaio, também foram observados os aspectos macroscópicos das larvas e suas alterações morfológicas após 24 horas de exposição, permitindo verificar que nos grupos testes mesmo quando as larvas não estavam mortas, se apresentavam debilitadas, com motilidade comprometida, ficando cada vez mais letárgicas, apresentando alteração na coloração e no aspecto corporal (Figura 113, pág. 186). No grupo controle negativo as larvas apresentavam morfologia externa normal, providas de motilidade em meio líquido, corroborando com o que havia sido descrito anteriormente (SANTOS, 2015).

Na fase hexânica foi observado um alongamento do corpo das larvas, com completa destruição corporal (Figura 113, pág. 186), apesar de mais lenta, também se mostrou mais agressiva, quando comparada à fase diclorometano, onde por sua vez as larvas apresentaram um aspecto de contração corporal, sem, no entanto, ser possível observar destruição aparente (Figura 114, pág. 186). Estes dados ajudam a explicar a eficácia maior da fase hexânica, que necessita de metade da concentração da fase diclorometano para ter a mesma porcentagem de mortalidade em 24h de exposição.

Quanto à 7,4'-di-*O*-metil-8-*O*-sulfato flavona e o tilirosídeo a diferença mais marcante em comparação ao controle negativo, foi em relação à alteração na coloração corporal, enquanto as larvas expostas ao flavonoide sulfatado apresentaram perda de coloração, as tratadas com o flavonoide glicosilado estava com corpo mais escuro, porém nenhuma das duas apresentou diferenças morfológicas com o controle (Figura 113 e 114, pág. 186).

Figura 113. Aspectos macroscópicos das larvas de *Ae. aegypti* após 24 horas de exposição as fases hexânica e diclorometânica e as substâncias 7,4'-di-*O*-metil-8-*O*-sulfato flavona e Tilirosídeo observados ao olho nu



Figura 114. Aspectos macroscópicos das larvas de *Ae. aegypti* após 24 horas de exposição as fases hexânica e diclorometânica e as substâncias 7,4'-di-*O*-metil-8-*O*-sulfato-flavona e Tilirosídeo observados em microscópio.



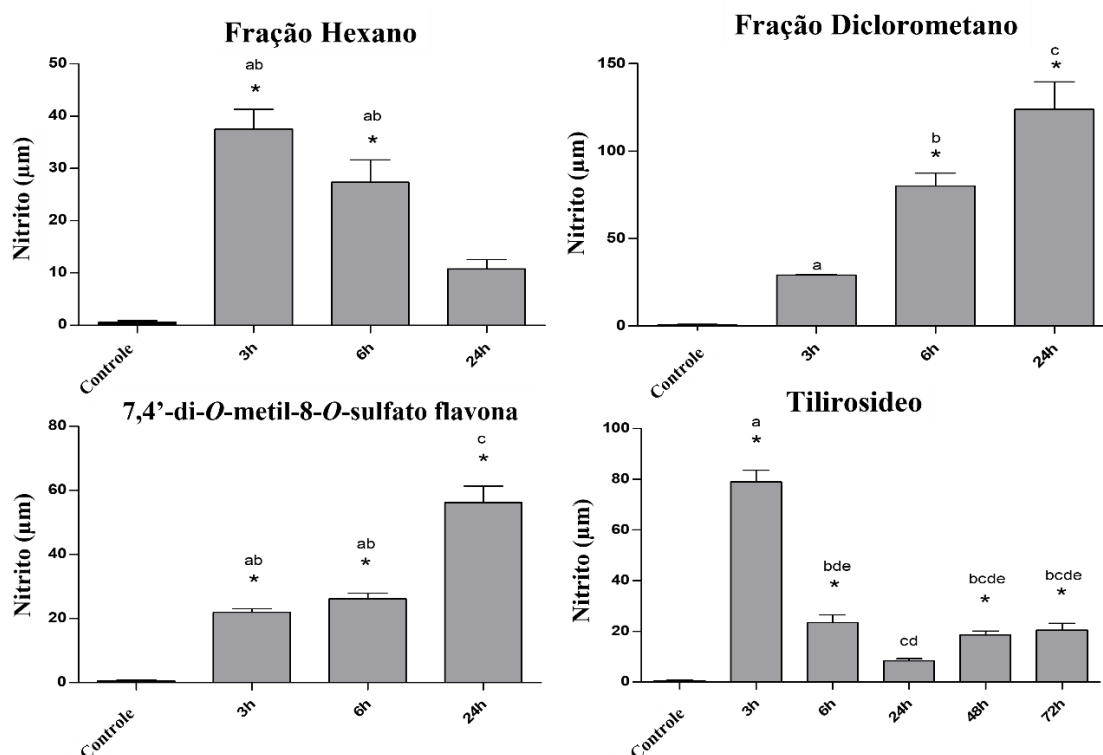
5.3.6. Produção de NO em larvas (L4) expostas às fases e substâncias isoladas de *Helicteres velutina* em diferentes períodos

Com o objetivo de verificar a possível alteração na produção de NO, produzido pelos hemócitos de larvas (L4) expostas às amostras, determinou-se a concentração do íon nitrito (NO_2^-), produto de degradação do NO, após 3, 6 e 24 horas para as fases e 7,4'-di-*O*-metil-8-*O*-sulfato flavona e após 3, 6, 24, 48 e 72 h para o tilirosídeo, expostas a CL_{50} da atividade larvicida dessas substâncias (Figura 115, pág. 187).

A concentração de NO nas larvas tratadas com a fase hexânica foi maior nas primeiras três horas de exposição ($37,5 \pm 6,5 \mu\text{M}$) e diminuiu ao longo do tempo, chegando a $27,3 \pm 7,5 \mu\text{M}$ e $10,8 \pm 3,0 \mu\text{M}$, após 6 e 24h, respectivamente. O tilirosideo também apresentou a concentração máxima de NO nas três primeiras horas ($78,9 \pm 8,0 \mu\text{M}$), diminuindo para $23,4 \pm 5,2 \mu\text{M}$, $8,3 \pm 1,2 \mu\text{M}$, e se mantendo em $20,5 \pm 4,6 \mu\text{M}$ nos intervalos avaliados.

A fração diclorometânica mostrou resultado contrário, a produção de NO foi menor nas primeiras horas de exposição ($29,2 \pm 0,6 \mu\text{M}$) e aumentou significativamente ao longo do tempo, chegando a $80,1 \pm 12,7 \mu\text{M}$ e $123,8 \pm 27,1 \mu\text{M}$ em 6 e 24 horas. S substância 7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato-flavona teve comportamento similar, a concentração de NO foi $21,9 \pm 1,8 \mu\text{M}$ nas três primeiras horas, aumentando para $26,2 \pm 3,0 \mu\text{M}$ e $56,2 \pm 8,8 \mu\text{M}$ em 6 e 24 horas, respectivamente.

Figura 115. Produção de NO em larvas (L4) expostas a CL₅₀.



(*) Resultados diferem significativamente do controle negativo. Barras seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente segundo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

A fração hexânica e o tilirosideo mostram um perfil semelhante na produção de NO, onde após um pico máximo de produção nas primeiras horas de exposição, a concentração diminui ao longo do tempo. Esta diminuição pode estar relacionada com a ação mais lenta desses compostos nas larvas, a resposta mais tardia pode causar menor recrutamento dos hemócitos, diminuindo a produção de células de defesa, o que resulta na menor concentração de NO e maior ação agente agressor.

A fração diclorometânica e a 7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato-flavona apresentaram aumento na concentração de NO, isso pode ser atribuído a uma ação mais rápida desses compostos e maior recrutamento de células de defesa ao longo do tempo de exposição, apesar da maior produção de agentes de defesa pelas larvas, as substâncias conseguem ser mais agressivas.

Os resultados obtidos sugerem que os compostos atuam causando mortalidade através de mecanismos de ação distintos.

Nunes et al. (2015) relatam que o aumento da produção de NO pelos hemócitos, está correlacionado com a resposta imune contra agentes estranhos. Estudos anteriores relatam o aumento na produção de NO por invertebrados ao longo do tempo, evidenciando o envolvimento desta molécula no processo imune de defesa dos insetos (FARALDO et al. 2005; RIBEIRO, 2010; NAPPI et al. 2000).

A diminuição na produção de NO é relatada em estudos com *Ae. aegypti*, sendo atribuído a um possível efeito inibidor da enzima NO sintase, interferindo na produção do óxido nítrico nas larvas, podendo potencializar os efeitos deletérios do sisal e agravando os danos ao inseto (NUNES et al. 2015).

5.3.7. Atividade citotóxica das fases e substâncias isoladas de *Helicteres velutina* após 24h de exposição

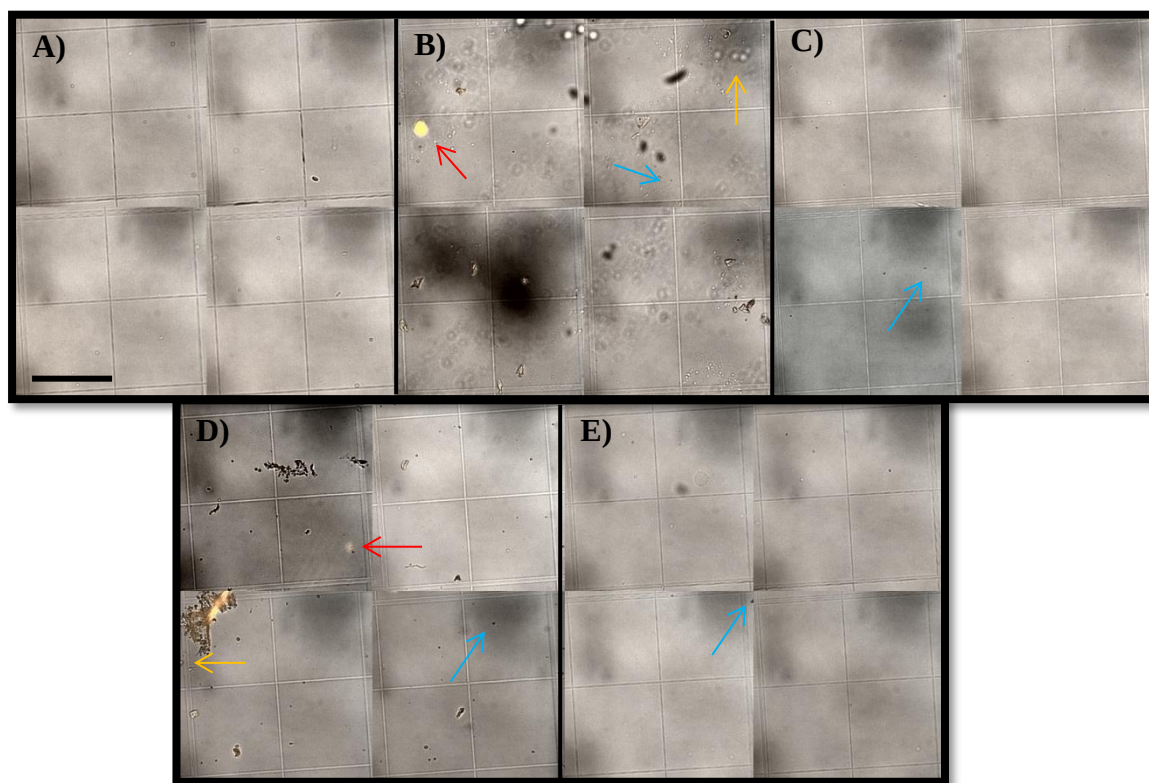
A determinação do total de células e sua viabilidade estão entre as mais importantes medidas quando se procura estudar os mecanismos de ação de substâncias em insetos (NUNES, 2013). Existem diversas maneiras de se mensurar a viabilidade celular, sendo a mais comum a detecção da integridade da membrana, membranas defeituosas levam a perda de componentes intracelulares (SILVA, 2007).

No nosso estudo utilizamos como marcador de necrose celular o iodeto de propídeo (IP), ele atravessa apenas membranas de células necróticas, corando DNA e RNA presentes no citoplasma, emite fluorescência vermelha após absorver luz UV, não

sendo capaz de penetrar no interior de células viáveis (NUNES, 2013; BERGSTEIN, WEISS, BICUDO, 2014; BRANDÃO, 2017).

Conforme pode ser visto na figura 116 (pág. 189), após 24h de exposição, não ocorreu expressiva necrose celular de hemócitos das larvas tratadas com o tilirosídeo quando comparadas com os hemócitos das larvas do grupo controle. Tendo sido observado maior impregnação do IP pelas células tratadas com a fase diclorometano, 7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato-flavona e a fase hexânica, com percentual de necrose de hemócitos de 15,4 %, 11,0 % e 7,0%, respectivamente (Figura 117, pág. 190).

Figura 116. Quadrantes da câmara de Neubauer para contagem de hemócitos. A) Controle negativo; B) Fase Diclorometânica; C) Fase Hexânica; D) 7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato flavona e E) Tilirosídeo

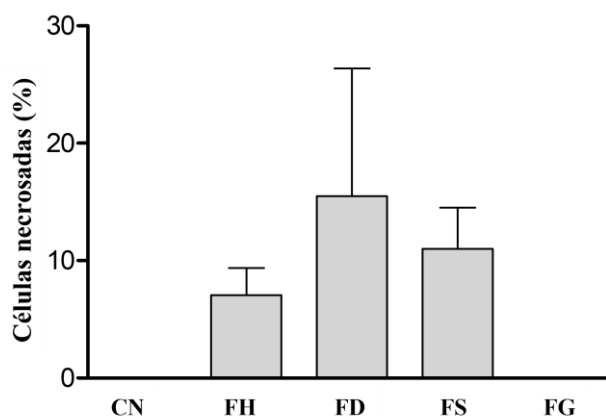


Na tabela 20 (pág. 190) observamos o número de células totais e viáveis contabilizadas no hemacitômetro com auxílio das imagens computacionais e *software* ImageJ, as principais áreas de atuação do programa incluem, otimização, manipulação algébrica, contagem e definição das áreas e diâmetros das células em análise.

Tabela 20. Células contabilizadas na câmara de Neubauer, utilizando microscópio de fluorescência

Teste	Total de células/mL	Nº de células viáveis/mL	% de células viáveis
Controle (-)	$1,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	100,0 %
Fase Hexânica	$1,32 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	98,1%
Fase Diclorometânica	$5,5 \times 10^6$	$5,15 \times 10^6$	93,6%
Tilirosídeo	$9,2 \times 10^5$	$9,2 \times 10^5$	100,0 %
7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato-flavona	$2,5 \times 10^6$	$2,46 \times 10^6$	98,7%

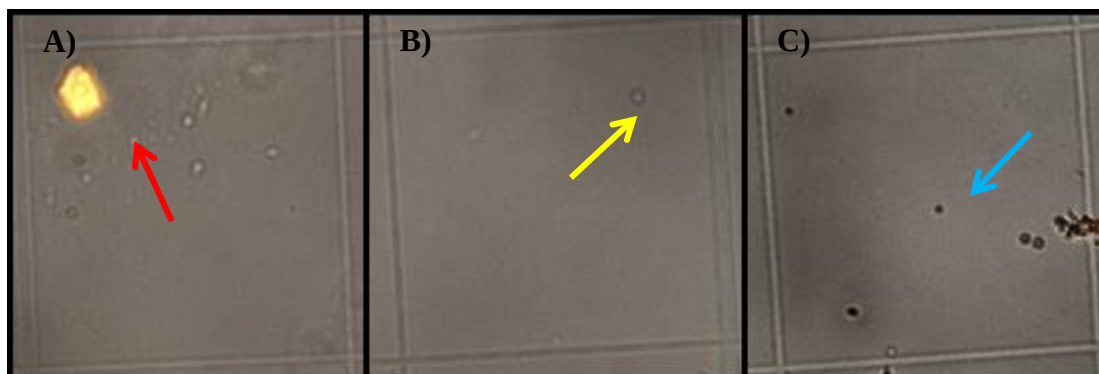
Com os dados obtidos na tabela 20 também foi possível calcular, a quantidade de células necrosadas em cada experimento, como podemos observar na figura 117 (pág. 190), a fase diclorometano apresentou maior porcentagem de células necrosadas (coradas) em relação à quantidade total de células contabilizadas, a 7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato-flavona teve uma porcentagem de necrose de 11,0 %, seguida da fase hexânica 7,0 % e o tilirosídeo onde a necrose não foi observada nas células analisadas, demonstrando mesmo comportamento visto no controle negativo. Não foi detectada diferença estatística entre os grupos.

Figura 117. Porcentagem de necrose celular observada para as fases e substâncias isoladas de *H. velutina*. **CN:** Controle Negativo; **FH:** Fase Hexânica; **FD:** Fase Diclorometânica; **FS:** Flavonoide Sulfatado (7-4'-di-O-metil-8-O-sulfato flavona); **FG:** Flavonoide Glicosilado (Tilirosídeo).

Ainda são raros estudos que avaliem o percentual de necrose celular através da microscopia de fluorescência e marcação com iodeto de propídeo para hemócitos de larvas de *Ae. aegypti*. Em trabalho realizado anteriormente por Nunes et al. (2015) utilizando citometria de fluxo, analisando o percentual de necrose de hemócitos nos intervalos de 3, 6, 12 e 24h expostos ao suco de *Agave sisalana*, observou-se que nas 12 primeiras horas de exposição das larvas ocorreu 21% de necrose e em 24h de 16,5% em relação ao grupo controle.

Para correlacionar os resultados obtidos com os possíveis mecanismos de ação envolvidos na morte celular, foram analisados os tipos celulares encontrados em cada tratamento. As análises morfológicas incluem observação de geometrias de regiões e obtenção dos dados de interesse (SILVA, 2007). A identificação dos hemócitos foi feita com base em comparações com a literatura (ARAÚJO, 2011) e o diâmetro e área foram medidos por meio do *software* ImageJ (Figura 118, pág. 191).

Figura 118. Hemócitos presentes nas análises. A) Plasmatócitos (59,4 μm); B) Oenocitoides (13 μm); C) Prohemócitos (1,6 μm)



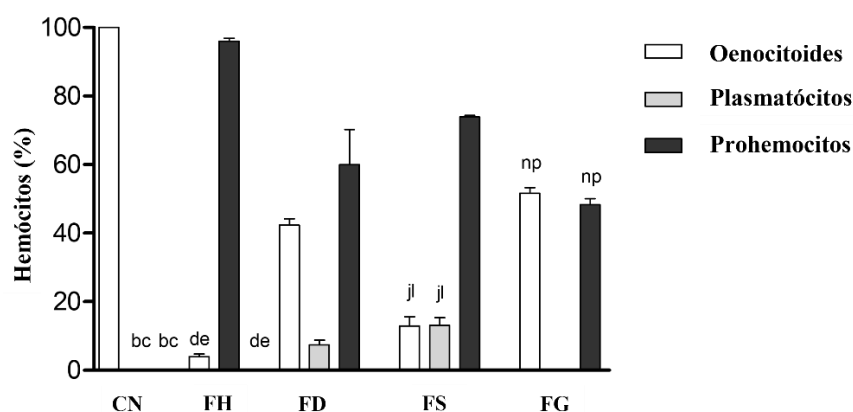
As células livres circulantes na hemolinfa dos insetos são denominadas de hemócitos e apresentam formas e funções diversificadas (NUNES, 2013). O número e os tipos de hemócitos podem apresentar-se muito variáveis em resposta ao stress, ferimentos e infecções; após contato com partículas estranhas, os hemócitos migram para o local onde destroem os agentes invasores, participando ativamente dos mecanismos de defesa do inseto tais como, reconhecimento, fagocitose, encapsulação, coagulação, formação de nódulos e a citotoxicidade (ARAÚJO, 2011).

No presente estudo os hemócitos encontrados nas análises foram: oenocitóides, prohemócitos e plasmatócitos, a prevalência de cada hemócito para as substâncias teste estão representadas pela figura 119 (pág. 192).

Os oenocitóides medem de 7-10 μm de diâmetro, possuem formato redondo, com núcleo pequeno, lobulado e excêntrico, os prohemócitos são as menores células encontradas na hemolinfa, geralmente apresentando-se em grupos, possuem perfil esférico, oval ou até alongados, medindo de 5-7 μm de diâmetro, bastante semelhante aos oenocitóides, quando observados na câmara de Neubauer diferem-se apenas pelo tamanho. Os plasmatócitos por sua vez são células bastante polimórficas, variando de arredondadas a alongadas com 9-40 μm de diâmetro (ARAÚJO, 2011).

Ainda segundo Araújo (2011), para o mosquito *Ae. aegypti*, as subpopulações de hemócitos mais presentes são os prohemócitos (53,3%), oenocitóides (30,8%) e plasmatócitos (12%), juntos constituem cerca de 96% do total de células, os trobocitóides, adipohemócitos e granulócitos, são os mais raros.

Figura 119. Hemócitos predominantes em cada substância teste. **CN:** Controle Negativo; **FH:** Fase Hexânica; **FD:** Fase Diclorometânica; **FS:** Flavonoide Sulfatado (7-4'-di-O-metil-8-O-sulfato flavona); **FG:** Flavonoide Glicosilado (Tilirosideo).



Os oenocitóides foram predominantes no tilirosideo e no controle negativo (51,6% e 100,0 %, respectivamente), prohemócitos por sua vez foram majoritários nas fases hexânica, diclorometânica e 7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato-flavona (96,0 %, 59,9 % e 73,8 %, respectivamente).

Ainda avaliando a figura 119, podemos observar que os plasmócitos só foram observados na fase diclorometânica e na 7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato-flavona (7,4 % e 13,1 %, respectivamente). A presença desse hemócito sugere que as larvas precisam recrutar mais células de defesa no combate as substâncias, o que podem caracterizar sua maior toxicidade frente as larvas, corroborando com o que foi visto previamente nos testes de sobrevivência e produção de NO.

Estudos anteriores mostram que os granulócitos e os plasmatócitos são os hemócitos que participam mais ativamente das defesas celulares na maioria dos insetos estudados (ARAÚJO et al, 2008).

Os dados de viabilidade celular, aqui apresentados tiveram um comportamento semelhante ao que foi descrito anteriormente para a produção de NO, onde a fase hexânica e o tilirosídeo apresentaram perfis parecidos, com diminuição da produção de NO ao longo do tempo (Figura 115, pág. 187), o que nos levou a sugerir que o NO produzido pelos prohemócitos e oenócitoides não seria suficiente para combater as substâncias invasoras e decairia ao longo do tempo, resultando na morte das larvas.

Já a fase diclorometânica e a 7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato-flavona que apresentaram aumento gradativo na produção de NO (Figura 115, pág. 187), sendo maior para fase (123,8 μ M de nitrito) do que para a substância (56,2 μ M de nitriro) em 24h, apresentaram um outro tipo celular, os plasmócitos, com detecção de um maior índice de necrose celular, o que sugere que com o reconhecimento de um agente estranho mais agressivo outras células de defesa são recrutadas e começam a produzir NO excessivamente como forma de combater o agente invasor. Quanto maior o número de células mortas por necrose, mais as células que ainda estão viáveis vão produzir NO como uma forma de defesa, pois elas precisam tentar reagir ao agente agressor (FARALDO et al. 2005).

As sugestões aqui elencadas não descartam a possibilidade de existir outros mecanismos de ação envolvidos, devendo-se futuramente utilizar metodologias para detectar a possível presença de células apoptóticas, para conhecermos com mais detalhes quais os caminhos que acarretam a morte celular. Pois o fato de as membranas estarem intactas e não integrarem o IP, não descarta a possibilidade de elas estarem sofrendo outros processos como a apoptose, onde a morte pode ser causada por alteração estrutural das células (FOSTER, 2008).

5.3.8. Atividade repelente do extrato, fases e substâncias isoladas de *H. velutina*

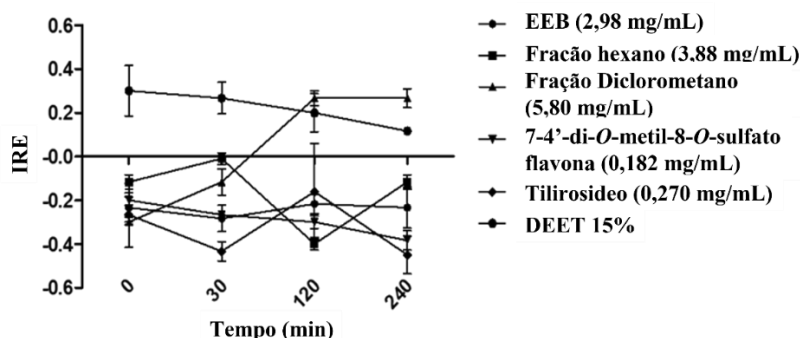
Tendo-se em vista o constante interesse em desenvolver inseticidas e repelentes de origem vegetal como alternativa aos inseticidas químicos existentes no mercado, objetivou-se determinar a atividade repelente de soluções do extrato, fases e substâncias promissoras nos ensaios preliminares, contra fêmeas de *Ae. aegypti*.

Na análise de repelência espacial que leva em consideração a atração ou repelência na câmara onde foi colocado o neonato banhado com a solução teste, foi possível observar que quando expostos a CL₅₀ dessas soluções, ocorreu picos de atividade repelente da 7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato flavona (0,182 mg/mL) em 0 min, fase hexânica (3,88 mg/mL) em 30 min, e para o extrato etanólico (2,98 mg/mL) fase diclorometânica (5,80 mg/mL) e tilirosídeo (0,275 mg/mL) em 120 min (Figura 120, pág. 195). A atividade que mais se aproximou do controle positivo chegando inclusive a ultrapassá-lo foi a da fase diclorometano, chegando a 0,27 de repelência espacial, após 240 min.

A realização do mesmo teste aumentando a dose da solução teste para a CL₁₀₀ da atividade larvicida, mostrou um perfil de atividade semelhante ao visto para CL₅₀. Os picos de Índice de Repelência Espacial (IRE) para o extrato (10,0 mg/mL) foi em 0 min, tilirosídeo (1,0 mg/mL) em 30 min, fase hexânica (5,0 mg/mL) 120 min, fase diclorometano (10,0 mg/mL) e 7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato-flavona (1,0 mg/mL) em 240 min (Figura 121, pág. 195). Foi possível verificar uma modesta melhora na atividade, principalmente durante os primeiros minutos de análise, a fase diclorometano se manteve com a mais promissora, com IRE chegando a 0,3, superior ao controle positivo utilizado com IRE igual a 0,12 em 240 min de experimento. Já a fase hexânica apresentou uma queda com IRE chegando a valores negativos (-0,22) em 240 min, indicativos de atração à câmara teste (Tabela 21, pág. 195 e Tabela 22, pág. 196).

Um estudo de repelência realizado com o extrato etanólico da espécie *Vitex negundo* contra fêmeas de *Ae. aegypti*, verificou que a concentração 0,02 ppm forneceu completa proteção no período de 110 a 271 minutos, mostrando que os repelentes naturais podem ter seu pico de atividade aumentado ao longo do tempo (KUMAR et al. 2011). Outro trabalho de Keziah et al. (2015), mostrou resultados parecidos, avaliando a atividade repelente da espécie *Ocimum gratissimum* no intervalo de 0 a 180 min, foi possível registrar proteção máxima do extrato metanólico bruto até 120 min e da fase acetato de etila até 150 min.

Figura 120. Índice de repelência espacial da CL₅₀ do extrato, fases e substâncias isoladas de *H. velutina* sobre fêmeas de *Ae. aegypti*



Os valores obtidos variam de -1 a 1, valores próximos a -1 indicam atração pela câmara que contém o neonato com tratamento, zero indica que não houve repelência ou atração significativa e 1 indica maior atração pela câmara com o controle e consequentemente maior atividade repelente das substâncias teste (WHO, 2013).

Tabela 21. Índice de repelência espacial da CL₅₀ do extrato, fases e substâncias isoladas de *H. velutina* sobre fêmeas de *Ae. aegypti*

MÉDIA DO IRE ± DESVIO PADRÃO						
TEMPO (min)	EEB	FH	FD	FG	FS	DEET
0	-0,23 ± 1,1	-0,12 ± 0,5	-0,30 ± 2,0	-0,27 ± 0,5	-0,22 ± 1,0	0,30 ± 2,8
30	-0,28 ± 1,1	-0,03 ± 0,5	-0,12 ± 1,0	-0,42 ± 2,6	-0,27 ± 0,5	0,27 ± 2,1
120	-0,22 ± 0,5	-0,40 ± 0,5	0,27 ± 0,5	-0,32 ± 3,2	-0,30 ± 0,5	0,20 ± 1,5
240	-0,23 ± 1,1	-0,12 ± 1,0	0,27 ± 0,5	-0,45 ± 1,5	-0,37 ± 1,0	0,12 ± 1,0

EEB: Extrato etanólico bruto; FH: Fase hexânica; FD: Fase diclorometânica; FG: Flavonoide Glicosilado e FS: Flavonoide Sulfatado.

Figura 121. Índice de repelência espacial da CL₁₀₀ do extrato, fases e substâncias isoladas de *H. velutina* sobre fêmeas de *Ae. aegypti*

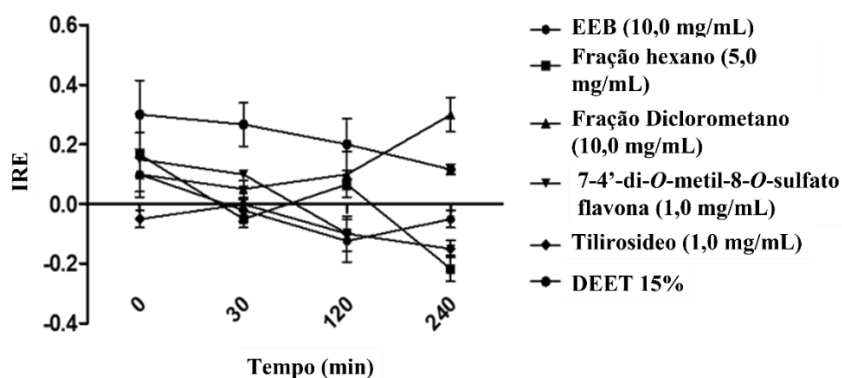


Tabela 22. Índice de repelência espacial da CL₁₀₀ do extrato, fases e substâncias isoladas de *H. velutina* sobre fêmeas de *Ae. aegypti*

MÉDIA DO IRE ± DESVIO PADRÃO						
TEMPO (min)	EEB	FH	FD	FG	FS	DEET
0	0,10 ± 1,0	0,17 ± 1,1	0,10 ± 1,5	-0,05 ± 1,5	0,15 ± 1,0	0,30 ± 2,8
30	-0,02 ± 1,5	-0,05 ± 1,5	0,05 ± 1,5	0,0 ± 1,0	0,10 ± 1,0	0,27 ± 2,1
120	-0,12 ± 1,5	0,07 ± 1,1	0,25 ± 1,0	-0,10 ± 1,0	-0,10 ± 1,0	0,20 ± 1,5
240	-0,05 ± 1,1	-0,22 ± 2,0	0,30 ± 0,5	-0,15 ± 1,5	0,07 ± 1,5	0,12 ± 1,0

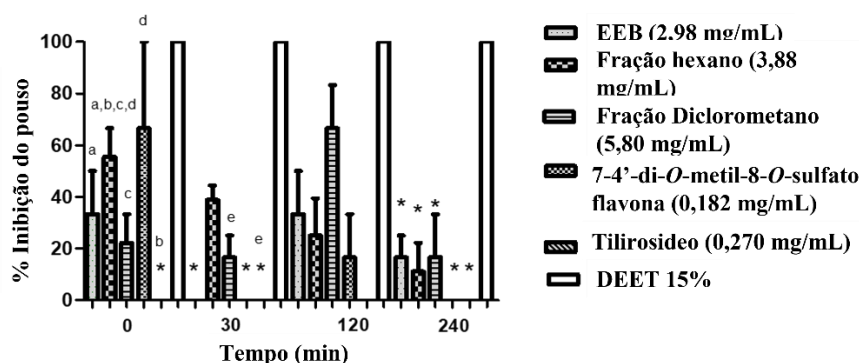
EEB: Extrato etanólico bruto; FH: Fase hexânica; FD: Fase diclorometânica; FG: Flavonoide Glicosilado e FS: Flavonoide Sulfatado.

A repelência das substâncias teste também foi representada por meio da análise dos pousos (aterrissagens) das fêmeas sobre os neonatos, nos intervalos avaliados. Utilizando a CL₅₀, a fase diclorometânica apresentou oscilação na inibição do pouso ao longo do tempo, com maior atividade aos 120 min, na fase hexânica a inibição diminui gradativamente ao longo do tempo, o extrato teve melhor desempenho em 0 e 120 min, a 7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato-flavona teve atividade máxima em 0 min e o tilirosídeo não apresentou inibição do pouso em nenhum dos tempos avaliados, segundo cálculos aplicados (Figura 122 e Tabela 23, pág. 197).

Com a CL₁₀₀ das soluções teste foi observado melhores resultados, exceto para o tilirosídeo que apresentou o mesmo perfil não desempenhando inibição, o extrato chegou a 100% de inibição aos 120 min, fase hexânica diminui de forma gradativa, fase diclorometano teve melhor desempenho em 120 min e a inibição causada pela 7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato-flavona se manteve constante ao longo dos 240 min (Figura 123, pág. 197, Tabela 24, pág. 198).

Extrato e frações de *Clausena anisata* apresentaram boa atividade repelente, o extrato na concentração de 150 mg/mL teve repelência média de 83%, já para a fase hexânica 7,5 mg/mL foi 54%, durante um período de 3 horas, o DEET (15%) por sua vez forneceu 90% de proteção contra os pousos das fêmeas (MUKANDIWA, ELOFF, NAIDOO, 2016). Um estudo com óleos essenciais das espécies *Ocimum sanctum*, *Mentha piperita* e *Plectranthus amboinicus* preparados com solução teste a 20%, mostraram-se compatíveis com o padrão DEET, não apresentando nenhum pouso de mosquito no teste até 6 h, enquanto o óleo de *Eucalypto globulus* exibiu repelência apenas até os primeiros 90 min (LALTHAZUALI & MATHEW, 2016).

Figura 122. Porcentagem de inibição de pouso proporcionada pela CL₅₀ do extrato, fases e substâncias isoladas de *H. velutina* sobre fêmeas de *Ae. aegypti*.



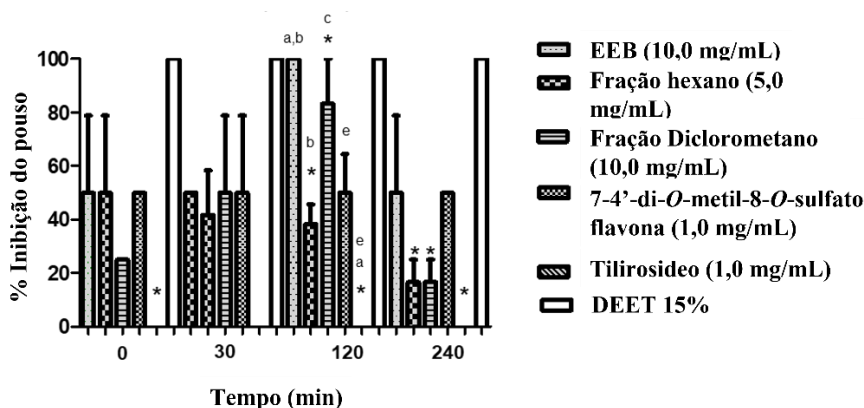
Barras com (*) são diferentes significativamente em relação ao controle positivo (DEET 15%) e barras com a mesma letra são diferentes significativamente segundo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 23. Porcentagem de inibição de pouso proporcionada pela CL₅₀ do extrato, fases e substâncias isoladas de *H. velutina* sobre fêmeas de *Ae. aegypti*

% MÉDIA DA REPELÊNCIA ± DESVIO PADRÃO						
TEMPO (min)	EEB	FH	FD	FG	FS	DEET
0	33,3 ± 10,2	66,6 ± 28,2	22,2 ± 0	0,0 ± 0	66,6 ± 28,2	100 ± 0
30	0,0 ± 0	38,8 ± 9,8	16,6 ± 5,7	0,0 ± 0	0,0 ± 0	100 ± 0
120	33,3 ± 10,2	25,0 ± 0	66,6 ± 28,2	0,0 ± 0	16,6 ± 5,7	100 ± 0
240	16,6 ± 5,7	11,1 ± 0	16,6 ± 5,7	0,0 ± 0	0,0 ± 0	100 ± 0

EEB: Extrato etanólico bruto; FH: Fase hexânica; FD: Fase diclorometânica; FG: Flavonoide Glicosilado e FS: Flavonoide Sulfatado.

Figura 123. Porcentagem de inibição de pouso proporcionada pela CL₁₀₀ do extrato, fases e substâncias isoladas de *H. velutina* sobre fêmeas de *Ae. aegypti*.



Barras com (*) são diferentes significativamente em relação ao controle positivo (DEET 15%) e barras com a mesma letra são diferentes significativamente segundo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 24. Porcentagem de inibição de pouso proporcionada pela CL₁₀₀ do extrato, fases e substâncias isoladas de *H. velutina* sobre fêmeas de *Ae. aegypti*

% MÉDIA DA REPELÊNCIA ± DESVIO PADRÃO						
TEMPO (min)	EEB	FH	FD	FG	FS	DEET
0	50,0 ± 28,2	50,0 ± 28,2	25,0 ± 6,7	0,0 ± 0	50,0 ± 28,2	100 ± 0
30	50,0 ± 28,2	41,6 ± 9,8	50,0 ± 28,2	0,0 ± 0	50,0 ± 28,2	100 ± 0
120	100 ± 0	37,5 ± 10,2	83,3 ± 5,7	0,0 ± 0	50,0 ± 28,2	100 ± 0
240	50,0 ± 28,2	16,6 ± 5,7	16,6 ± 5,7	0,0 ± 0	50,0 ± 28,2	100 ± 0

EEB: Extrato etanólico bruto; FH: Fase hexânica; FD: Fase diclorometânica; FG: Flavonoide Glicosilado e FS: Flavonoide Sulfatado.

5.4. Análise do modelo de *Aedes aegypti*

As estruturas químicas dos dois bancos de dados utilizados na pesquisa, em formato smiles, foram submetidas no software Dragon 7.0 (TALETE, 2016) para gerar os descritores moleculares. O software gerou 5270 descritores para cada molécula dos dois bancos de dados, os descritores do banco de dados de moléculas com atividade conhecida contra o mosquito *Aedes aegypti* L. obtidas a partir do ChEMBL database foram utilizados como dados e entrada no software Knime 3.5.3 para gerar o modelo de predição.

O Dragon 7.0 calcula 5270 descritores constitucionais/moleculares, que incluem os tipos de átomos mais simples, contagens de fragmentos e grupos funcionais; descritores topológicos que se baseiam na representação gráfica da molécula, sendo sensíveis ao tamanho, forma, ramificação e ciclização das estruturas; descritores geométricos/topográficos utilizam informações sobre a distância geométrica entre os átomos; e descritores tridimensionais com várias estimativas de propriedades como logP e Lipinski (BARROS, 2017).

Descritores moleculares associados com os dados de atividade biológica foram utilizados para geração do modelo com o algoritmo “Random Forest” (RF). Para o

modelo com o mosquito *Ae. aegypti*, as moléculas com $pIC_{50} \geq 4,15$ foram consideradas ativas e com $pIC_{50} \leq 4,15$ inativas, totalizando 91 e 82 moléculas, respectivamente.

Na tabela 25, pág. 199, podemos observar os dados referentes ao modelo construído pelo RF, que obteve excelentes resultados de performance, robustez e taxa de classificação. Sendo confiavelmente capaz de triar as moléculas e selecionar aquelas com maior probabilidade de potencial ativo contra as larvas de *Ae. aegypti*.

Tabela 25. Resumo dos parâmetros correspondentes aos resultados obtidos no modelo Random Forest para *Ae. aegypti*. PPV (Valor Positivo Predito/Precisão) e NPV (Valor Negativo Predito).

Modelo RF <i>Ae. aegypti</i>	Especificidade	Sensitividade	Acurácia	PPV	NPV
Validação cruzada interna	0,80	0,85	0,82	0,84	0,80
Teste externo	0,77	0,81	0,82	0,81	0,77

Uma maneira de avaliar de modo global o modelo a partir dos resultados obtidos da matriz de confusão é através do Coeficiente de Correlação de Matthews (MCC). O MCC correlaciona classificações binárias observadas e preditivas, dele resulta um valor entre -1 (desacordo entre predição e observação) e +1 (predição perfeita), sendo o 0 nada mais que uma previsão aleatória (MATHEWS, 1975).

O valor obtido no teste foi de 0,68 e na validação cruzada de 0,71, confirmando que o modelo gerado possui boa predição. O MCC pode ser calculado a partir da equação 12, pág. 200.

Equação 12. Coeficiente de Correlação de Matthews

$$MCC = \frac{VP \times VN - FP \times FN}{\sqrt{(VP + FP)(VP + FN)(VN + FP)(VN + FN)}}$$

Onde:

VP = Verdadeiro Positivo **VN** = Verdadeiro Negativo

FP = Falso Positivo **FN** = Falso Negativo

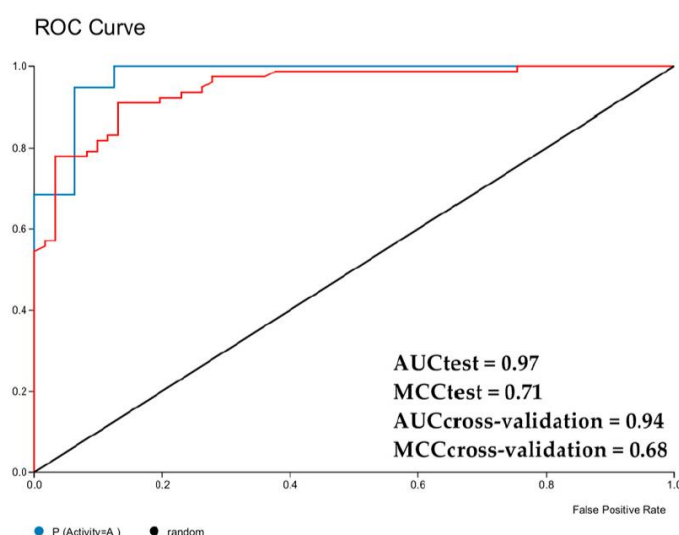
$$\text{MCC}(\text{teste}) = \mathbf{0.68}$$

$$\text{MCC}(\text{validação}) = \mathbf{0.71}$$

O gráfico de Característica de Operação de Receptor (ROC) (Figura 124, pág. 200), para análise da performance do modelo foi gerado para o conjunto de teste com uma área sob a curva no valor de 0,9770 para o modelo criado. Um modelo é dito perfeito quando possui área sob a curva igual a 1 (SILVA, 2006).

Modelos que estão representados no lado esquerdo do gráfico, próximo ao eixo Y, fazem classificação positiva somente com evidência forte, cometendo poucos erros falsos positivos, enquanto os modelos no lado direito fazem classificação positiva com pouca evidência cometendo muitos erros falsos positivos, dessa forma procura-se modelos que se aproximem do lado esquerdo do gráfico, com alta taxa de sensibilidade e baixa taxa de falso positivo (SILVA, 2006). Modelos com alta taxa de sensibilidade, que se aproximem de 1, possui poucos falsos positivos, significando que o modelo tende a perfeição, enquanto modelos que possuam baixa taxa de sensibilidade e alta taxa de especificidade, ou seja, alta taxa de falso positivos, resultam em modelos com classificação aleatória (BARROS, 2017).

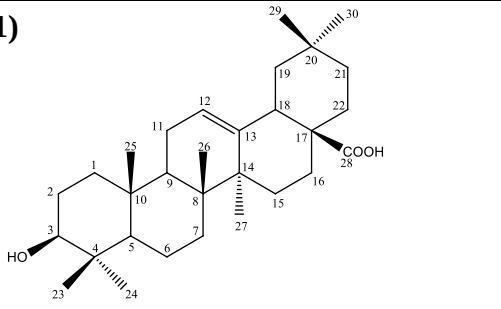
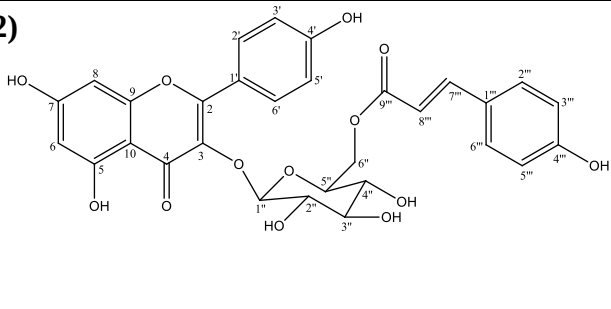
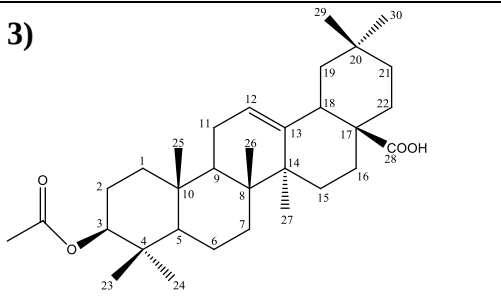
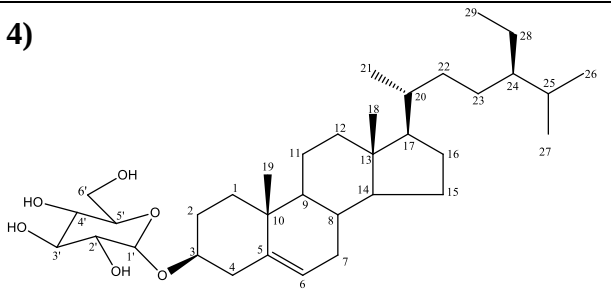
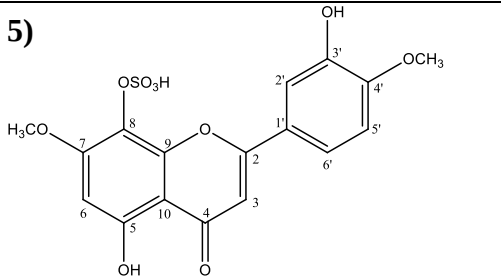
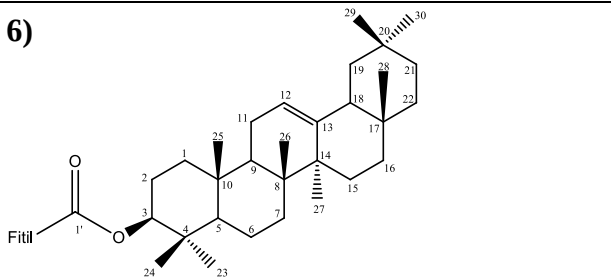
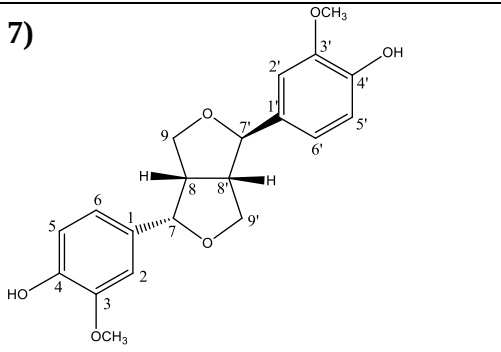
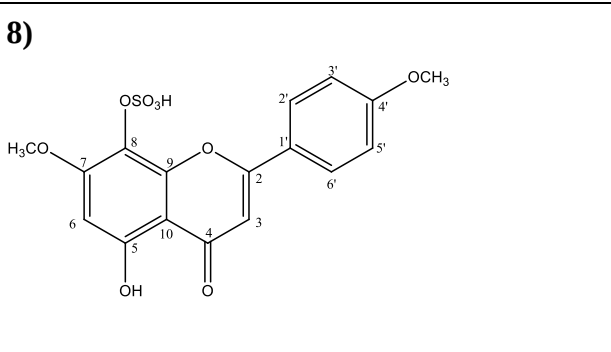
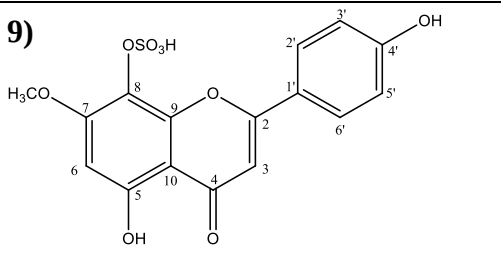
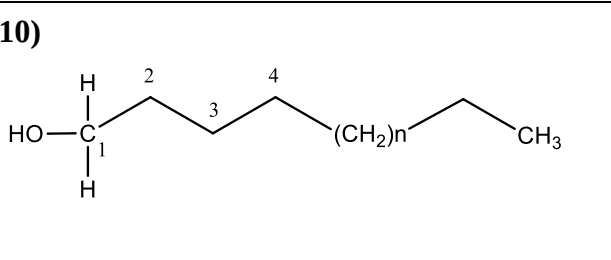
Figura 124: Gráfico ROC com área sob a curva para o conjunto teste do modelo obtido com Random Forest



Esse modelo foi utilizado para selecionarmos as possíveis moléculas bioativas isoladas de *H. velutina* contra o mosquito *Ae. aegypti*. As moléculas que atingiram uma probabilidade de serem ativas maior que 50%, $\text{pIC}_{50} \geq 4,15$, foram consideradas

potencialmente ativas, totalizando 14 moléculas selecionadas pelo modelo (Quadro 8, pág. 201) (Tabela 26, pág. 203).

Quadro 8: Estruturas químicas das moléculas testadas, na ordem de potencial atividade contra *Ae. aegypti*, segundo modelo Random Forest.

1) 	2) 
3) 	4) 
5) 	6) 
7) 	8) 
9) 	10) 

Quadro 8 (Continuação): Estruturas químicas das moléculas testadas, na ordem de potencial atividade contra *Ae. aegypti*, segundo modelo Random Forest.

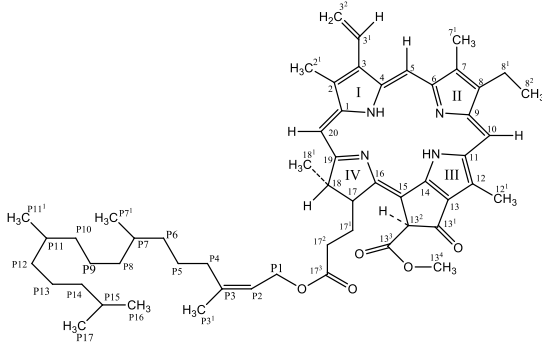
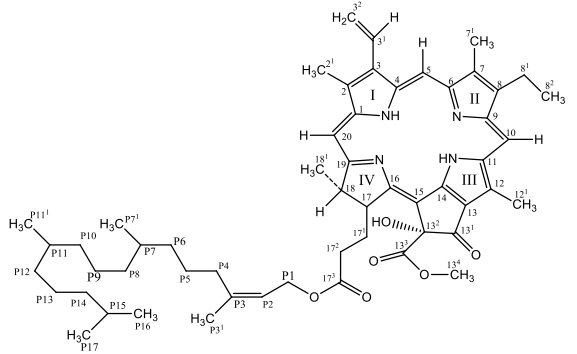
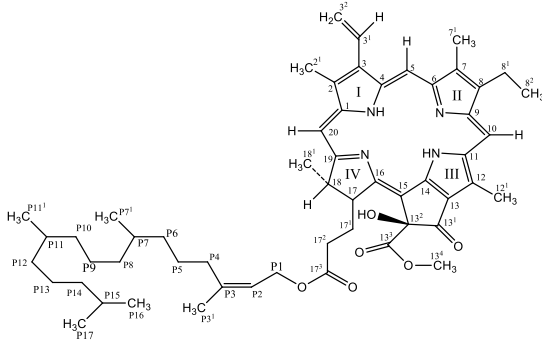
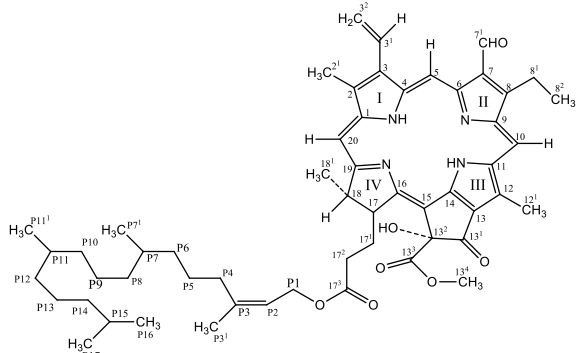
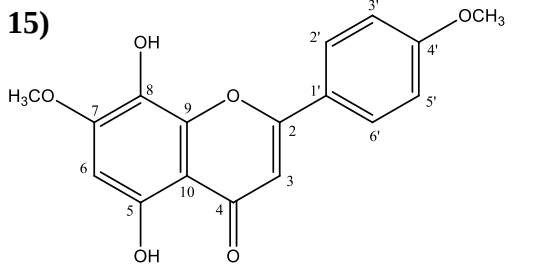
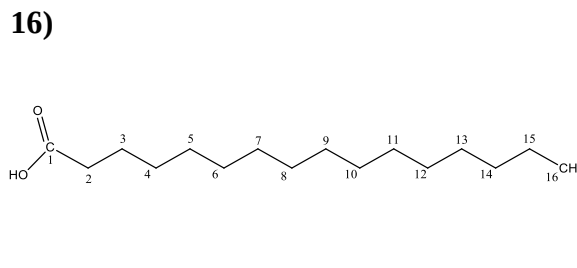
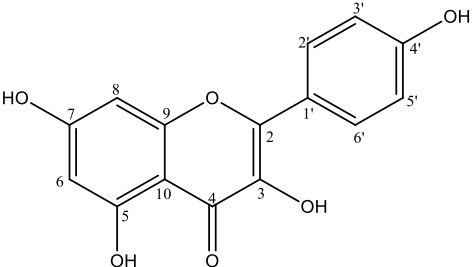
11) 	12) 
13) 	14) 
15) 	16) 
17) 	

Tabela 26. Moléculas potencialmente ativas a partir do modelo de Random Forest

MÓLECULA	POTENCIAL ATIVO
1) Ácido oleanólico	0,82
2) Tilirosídeo	0,79
3) Acetato do ácido oleanólico	0,78
4) β -sitosterol glicosilado	0,71
5) Condadine	0,70
6) 3- β -esterearloxi-olean-12-eno	0,69
7) Pinoresinol	0,68
8) 7-4'-di-O-metil-8-O-sulfato flavona	0,66
9) Mariahine	0,64
10) Decanol	0,57
11) Feofitina A	0,56
12) Feofitina A (R)	0,55
13) Feofitina A (S)	0,53
14) Feofitina B	0,52
15) 7,4'-Di-O-metilisoescutelareina	0,46
16) Ácido palmitico	0,33
17) Canferol	0,16

Na análise do domínio de aplicabilidade, dentre as 14 moléculas potencialmente ativas, apenas cinco foram consideradas com resultados confiáveis: β -sitosterol glicosilado, isoescutelareina sulfatada, tilirosídeo, condadine e mariahine, e o resultado das outras nove moléculas: Ácido oleanólico, Acetato do ácido oleanólico, 3- β -esterearloxi-olean-12-eno, Pinoresinol, Decanol, Feofitina A, Feofitina A (R), feofitina A (S) e Feofitina B, foram considerados resultados preditos não confiáveis, o que pode ser atribuído à ausência de estruturas similares a essas no modelo utilizado, uma vez que não foram encontradas na literatura atividades para substâncias estruturalmente equivalentes com atividade em *Ae. aegypti*. Segundo Zhang et al. (2006), quando as moléculas do teste estão em um espaço químico distante das moléculas do modelo, o resultado predito não é considerado confiável.

5.4.1 Análise do Docking

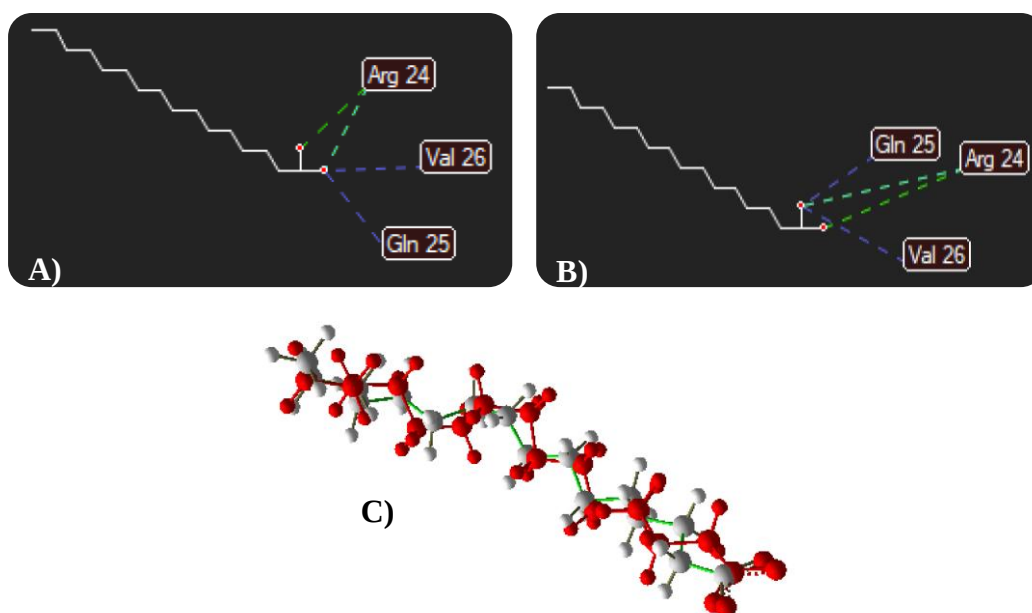
Para realização do Docking molecular foram selecionadas três proteínas alvo no mosquito *Ae. aegypti*, são elas: 1YIY, 1PZ4 e 3UQI, obtidas a partir do PDB databank, com seus respectivos ligantes inibidores (HAN et al. 2005; DYER et al. 2003; RAJAN et al. 2012).

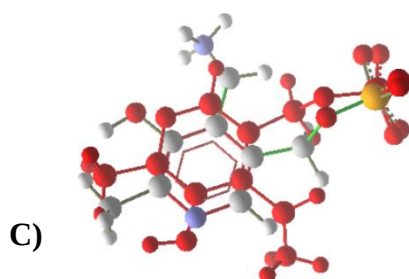
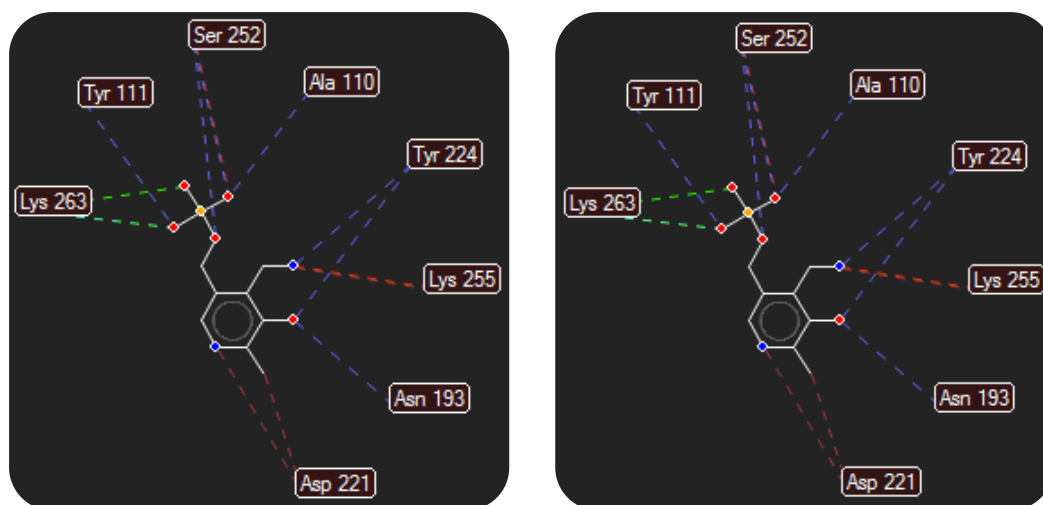
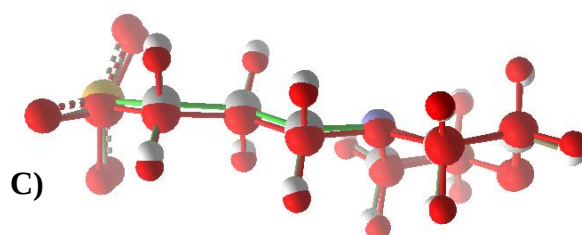
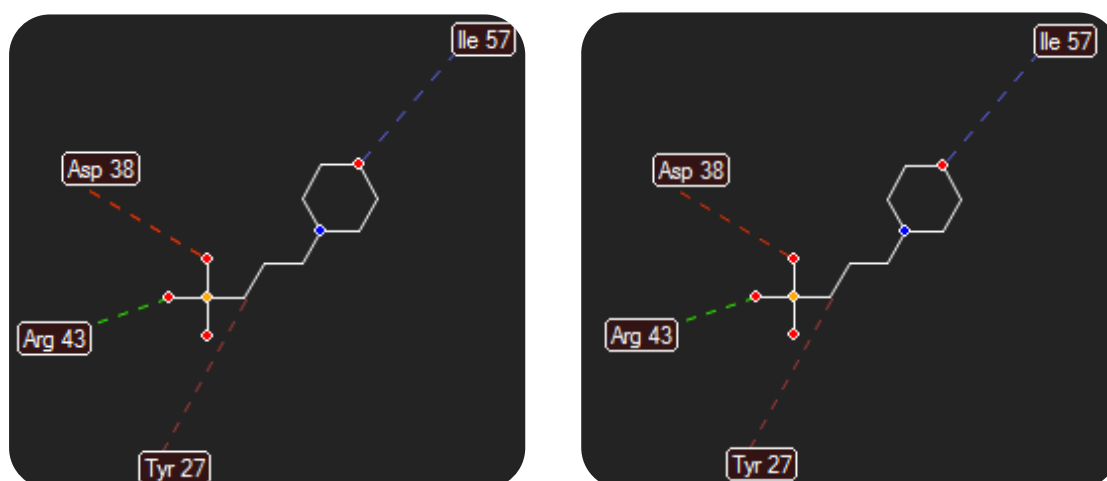
Foram observados os ligantes nos seus respectivos sítios de ligação, bem como as interações com os resíduos de aminoácidos das enzimas. As interações do tipo hidrogênio (tracejado azul) são as mais frequentes devido à presença de hidroxilas e carbonilas nas estruturas dos ligantes. As interações eletrostáticas (tracejado verde) são resultantes da interação entre dipolos e/ou íons de cargas opostas. As interações estéricas (tracejado vermelho) mostram as conformações assumidas pelos ligantes no sítio ativo da proteína para a atividade (Figura 125, pág. 204).

Como uma forma de validar o docking, foi feito o redocking, um estudo do docking com os ligantes já conhecidos de cada enzima, após comparação com dados da literatura, foi possível avaliar o desempenho do docking, quanto mais próximo desta conformação o ligante assumir no redocking, mais respaldo terá o estudo do docking.

Figura 125. Comparações entre as interações dos ligantes e o redocking das três enzimas. A) Interações entre o ligante e o sítio ativo da proteína; B) Interações entre o ligante no redocking e o sítio ativo da proteína e C) Superposição da conformação do ligante (cinza) com o redocking (vermelho).

IPZ4:



IYIY:3UQI:

As predições do docking molecular foram validadas pelo redocking do ligante original com o alvo das proteínas do *Ae. aegypti*. A tabela 27 (pág. 206) mostra seus MolDock scores, o Root Mean Square Deviation (RMSD), valores e energias do PDB.

Tabela 27. A energia do docking (Kj/mol) do ligante com cada proteína do Protein Data Bank (PDB), energia do ligante do Moldock score e os valores de RMSD obtidos a partir do redocking.

Proteína	Energia, Valor PDB (Kj/mol)	Energia, Valor PDB (Kj/mol)	Redocking, Valor RMSD
1YIY	-103,002	-124,274	0,158
1PZ4	-106,678	-110,680	0,203
3UQI	-54,802	-57,032	0,138

Um protocolo de triagem virtual, usando os mesmos parâmetros para todas as proteínas, foi realizado nos compostos isolados. Com base nos valores de energia de ligação, as moléculas testadas foram classificadas usando o seguinte cálculo de probabilidade (Equação 13, pág. 206):

Equação 13. Probabilidade de potencial ativo

$$ps = \frac{E_{TM}}{E_M}, \text{ se } E_{TM} < E_L$$

Onde,

ps: probabilidade baseada na estrutura;

E_{TM} : energia de acoplamento da molécula teste e variação TM de 1 a 1848 (Conjunto de dados de metabólitos secundários);

E_M : valor energético mais baixo obtido das moléculas testadas, que para as três proteínas aqui testadas, foi o tilirosideo, que mostrou valores de energia de -163,330; -188,175; -154,188 kJ/mol para 1YIY; 1PZ4 e 3UQI, respectivamente;

E_L : energia do ligante com proteína cristalográfica.

A equação 13 visa normalizar as pontuações do docking molecular (triagem virtual baseada na estrutura), permitindo comparar os valores da triagem virtual baseada na estrutura com os valores da triagem virtual baseada no ligante. A seleção das estruturas foi baseada em suas energias. A energia deve ser menor que o valor obtido para o ligante

no estudo de cristalografia. As moléculas investigadas foram classificadas como ativas se os valores de probabilidade baseados na estrutura fossem maiores ou iguais a 0,5.

O número de moléculas identificadas com valores de probabilidade superiores a 0,5 e valores de energia de ligação inferiores ao do ligante foram os seguintes: oito para a proteína 1YIY, oito para a proteína 1PZ4 e nove para a proteína 3UQI (Tabela 28, pág. 207).

Tabela 28. Probabilidade de potencial ativo das substâncias isoladas de *Helicteres velutina* pontuados pelo Moldock

PROBABILIDADE DE POTENCIAL ATIVO						
MOLÉCULAS	MOLDOCK (1YIY)	PROB (1YIY)	MOLDOCK (1PZ4)	PROB (1PZ4)	MOLDOCK (3UQI)	PROB (3UQI)
Tilirosídeo	-163.3378	1	-188.175	1	-153.188	1
β-sitosterol glicosilado	-148.9306	0.91179	-144.589	0.7683	-98.6537	0.644004
Condadine	-140.6552	0.86113	-88.4915	0	-58.7109	0.38326
Mariahine	-136.7114	0.83698	-93.2679	0	-81.3189	0.530844
7,4'-di-O-metil-8-O- sulfato flavona	-132.8622	0.81342	-107.752	0.5726	-68.8555	0.449484
Pinoresinol	-129.1742	0.79084	-143.144	0.7606	-97.1114	0.633936
7-4'-Di-O- metilisoescutlareína	-114.16706	0.69896	-130.68033	0.6944	-66.0305	0.431042
Ácido palmitico	-107.11224	0.65577	-99.5141	0	-82.4129	0.537985
Canferol	-81.472136	0	-103.883	0	-56.9525	0.371782
Decanol	-42.387996	0	-76.889	0	-85.0066	0.554917
Feofitina a S	-68.5302	0	-13.9201	0	-82.3086	0.537304
Feofitina b	-25.1339	0	-88.966	0	-72.7624	0.474988
Acetato do ácido oleanólico	-8.424856	0	-134.926	0.7170 24	-60.6399	0.395853
Feofitina a	11.87072	0	-65.6387	0	-87.2372	0.569478
Ácido oleanólico	31.089784	0	-119.862	0.6369	-46.6654	0
Feofitina a R	49.69726	0	-45.6367	0	-14.542	0
3β-esterearoxi-olean- 12-eno	74.735164	0	-163.164	0.8670	-98.5554	0.643362

As energias de ligação geradas a partir do Moldock são valores negativos, assim utilizando essa fração na equação, tornamos os valores positivos e numa escala entre 0 e 1.

Uma avaliação usando triagem virtual baseada em estrutura do ligante foi realizada para verificar moléculas potencialmente ativas e seus possíveis mecanismos de ação, mostrando possíveis moléculas multitarget. Essa abordagem também busca minimizar a probabilidade de seleção de moléculas falso-positivas, porque considera as pontuações técnicas de rastreamento virtual e as correlaciona com a verdadeira taxa negativa (Lorenzo et al. 2016; Acevedo et al. 2018;). O cálculo foi realizado usando a seguinte equação:

Equação 14. Probabilidade de potencial ativo combinado

$$P_c = \frac{ps + (1 + TN) \times p}{2 + TN}, \text{ se } P_c > 0,5$$

Onde, P_c : probabilidade combinada; ps : probabilidade baseada na estrutura; TN : verdadeira taxa negativo; p : probabilidade baseada no ligante.

Nesta equação, o score baseado em ligantes está correlacionado com uma taxa de falsos positivos decrescentes com aumentos incrementais no valor de TN . Assim, a probabilidade de identificar incorretamente moléculas inativas como moléculas ativas é minimizada. A tabela 29 (pág. 209) mostra os resultados para as moléculas mais bem classificadas, obtidas usando essa abordagem combinada, e a Figura 130 (pág. 215), mostra as estruturas mais bem classificadas.

Os valores de probabilidade combinada foram calculados para as 17 moléculas em cada enzima estudada, no final analisamos quais moléculas eram multitarget.

Foi realizada uma triagem virtual baseada na estrutura do receptor, utilizando as substâncias isoladas de *H. velutina* com as três proteínas alvo de *Ae. aegypti*, a fim de se obter compostos com atividade inseticida. Dentre as 17 substâncias testadas, cinco moléculas se mostraram potencialmente ativas, destas apenas três foram ativas nas três enzimas estudadas, o β -sitosterol glicosilado (Figura 126, pág. 211), a 7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato flavona (Figura 127, pág. 211) e o tilirosideo (Figura 128, pág. 212). A

condadine e a mariahine (Figura 129, pág. 213), apresentaram atividade nas enzimas 1YIY e 3UQI.

Tabela 29. Resumo das estruturas mais bem classificadas, obtidas utilizando uma abordagem que combina triagem virtual baseada em ligantes e estrutura (VS); p: valor de probabilidade ativa no VS; ps: valor de probabilidade ativo no VS baseado na estrutura; pc: valor da probabilidade combinada.

Moléculas	Proteína	p	ps	Pc
Tiliosideo	1YIY	0.79	1	0.79
	1PZ4	0.79	1	0.79
	3UQI	0.79	1	0.79
7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato flavona	1YIY	0.66	0.81	0.73
	1PZ4	0.66	0.57	0.63
	3UQI	0.66	0.45	0.59
5,4'-di-hidroxi-7-metoxi-8-O-sulfato flavona (mariahine)	1YIY	0.64	0.83	0.60
	1PZ4	0.64	0	0.41
	3UQI	0.64	0.53	0.53
5,3'-di-hidroxi-7,4'-dimetoxi-8-O-sulfato flavona (condadine)	1YIY	0.70	0.86	0.66
	1PZ4	0.70	0	0.45
	3UQI	0.70	0.38	0.54
Sitosterol-3-O-β-D-glicopiranosideo	1YIY	0.71	0.91	0.68
	1PZ4	0.71	0.76	0.65
	3UQI	0.71	0.64	0.62

Figura 126. β -sitosterol glicosilado e suas respectivas interações nos sítios ativos de suas enzimas

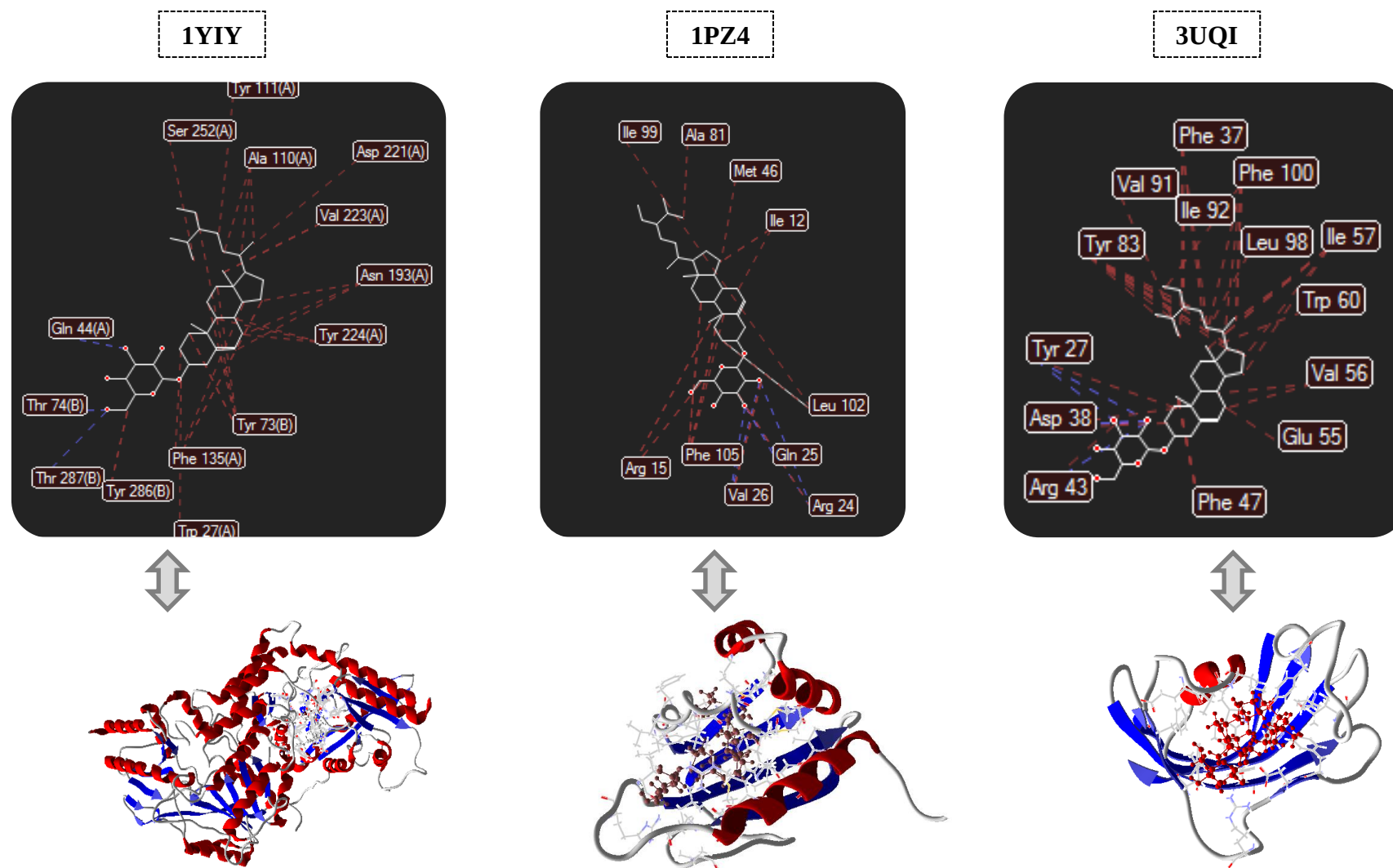


Figura 127. 7,4'-di-*O*-metil-8-*O*-sulfato flavona e suas respectivas interações nos sítios ativos de suas enzimas

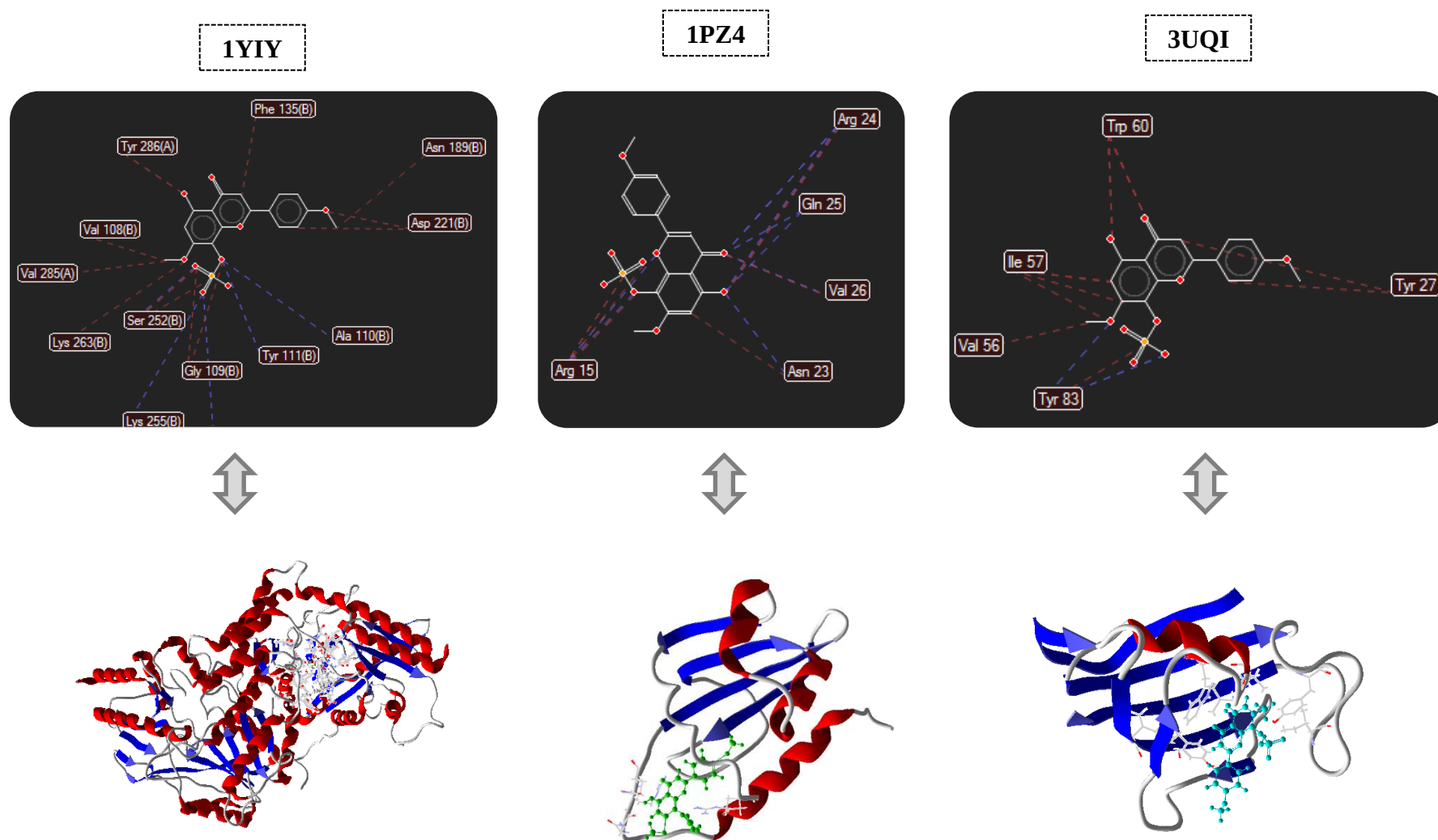


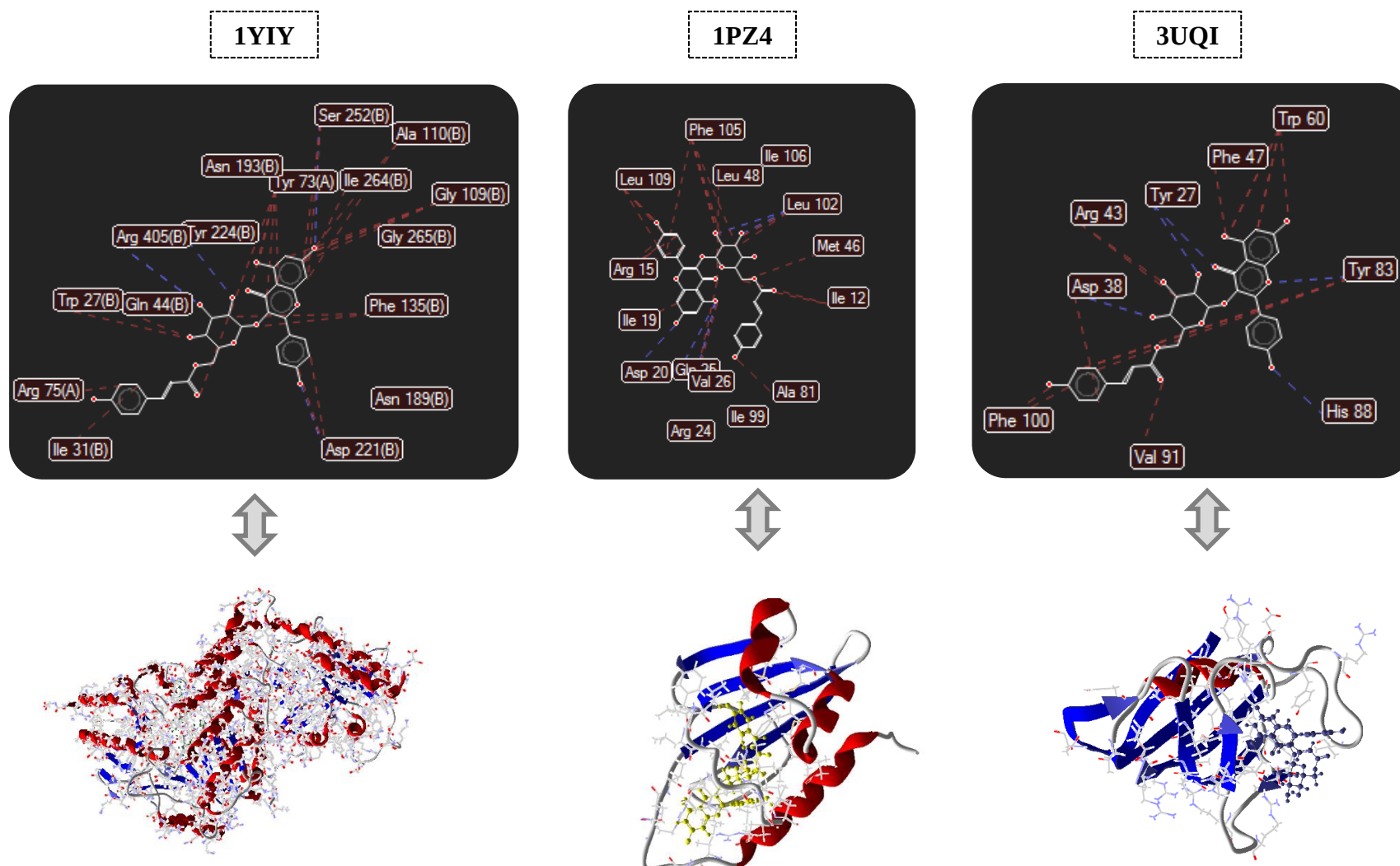
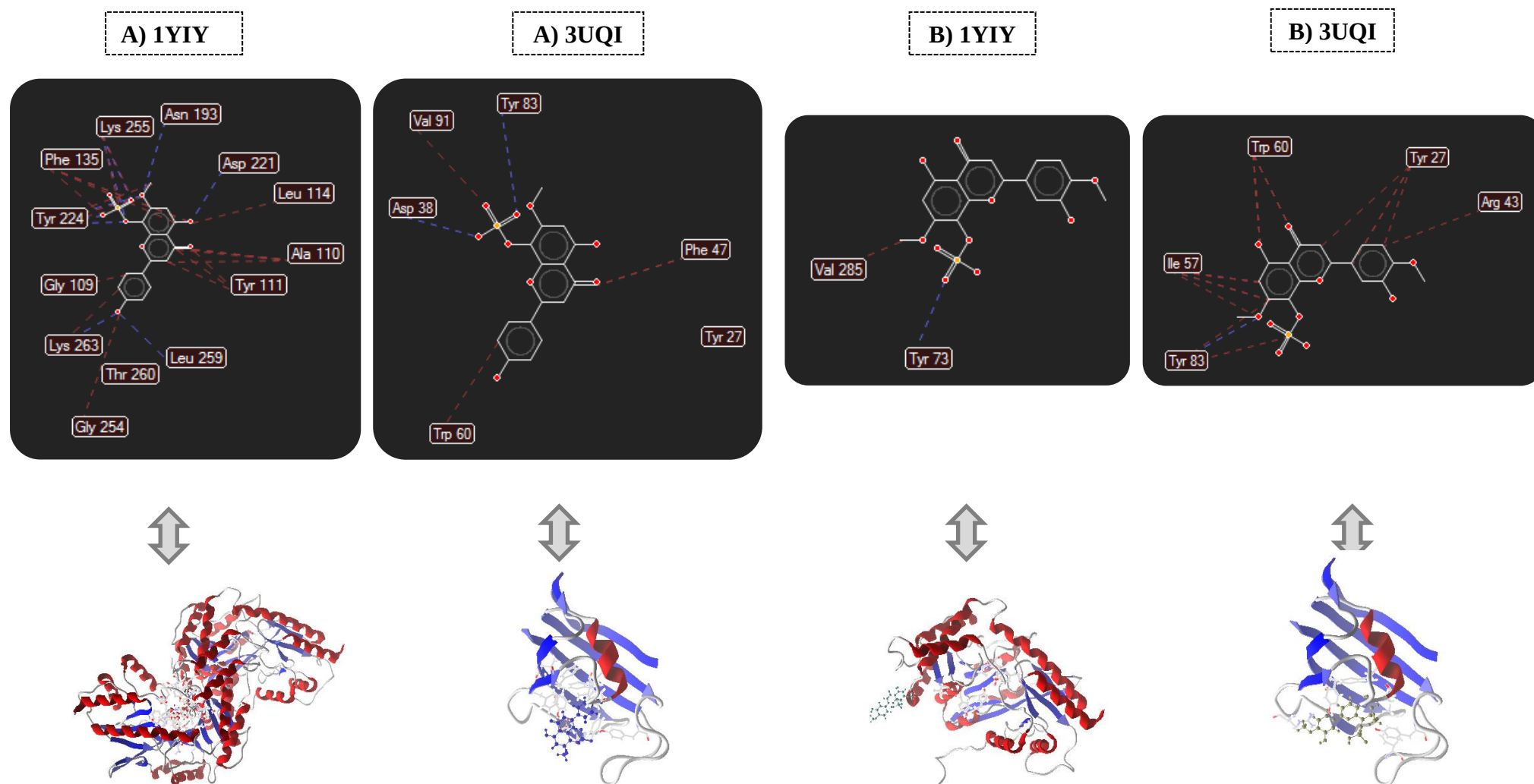
Figura 128. Tilirosídeo e suas respectivas interações nos sítios ativos de suas enzimas

Figura 129. A) Mariahine e B) Condadine e suas respectivas interações nos sítios ativos de suas enzimas



As cinco substâncias que apresentam atividade potencial contra *Ae. aegypti* no modelo de previsão também mostraram boa atividade no estudo de acoplamento molecular. Os melhores resultados foram atribuídos ao tilirosideo, 7,4'-di-*O*-metil-8-*O*-sulfato flavona e sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosideo, com boas probabilidades de atividade contra as três proteínas, especialmente contra 1PZ4, encontrado no intestino das larvas. Relatos da atividade larvícida do sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosideo foram encontrados na literatura (PONTUAL, 2010), assim, outros estudos foram realizados com o tilirosideo e a 7,4'-di-*O*-metil-8-*O*-sulfato flavona.

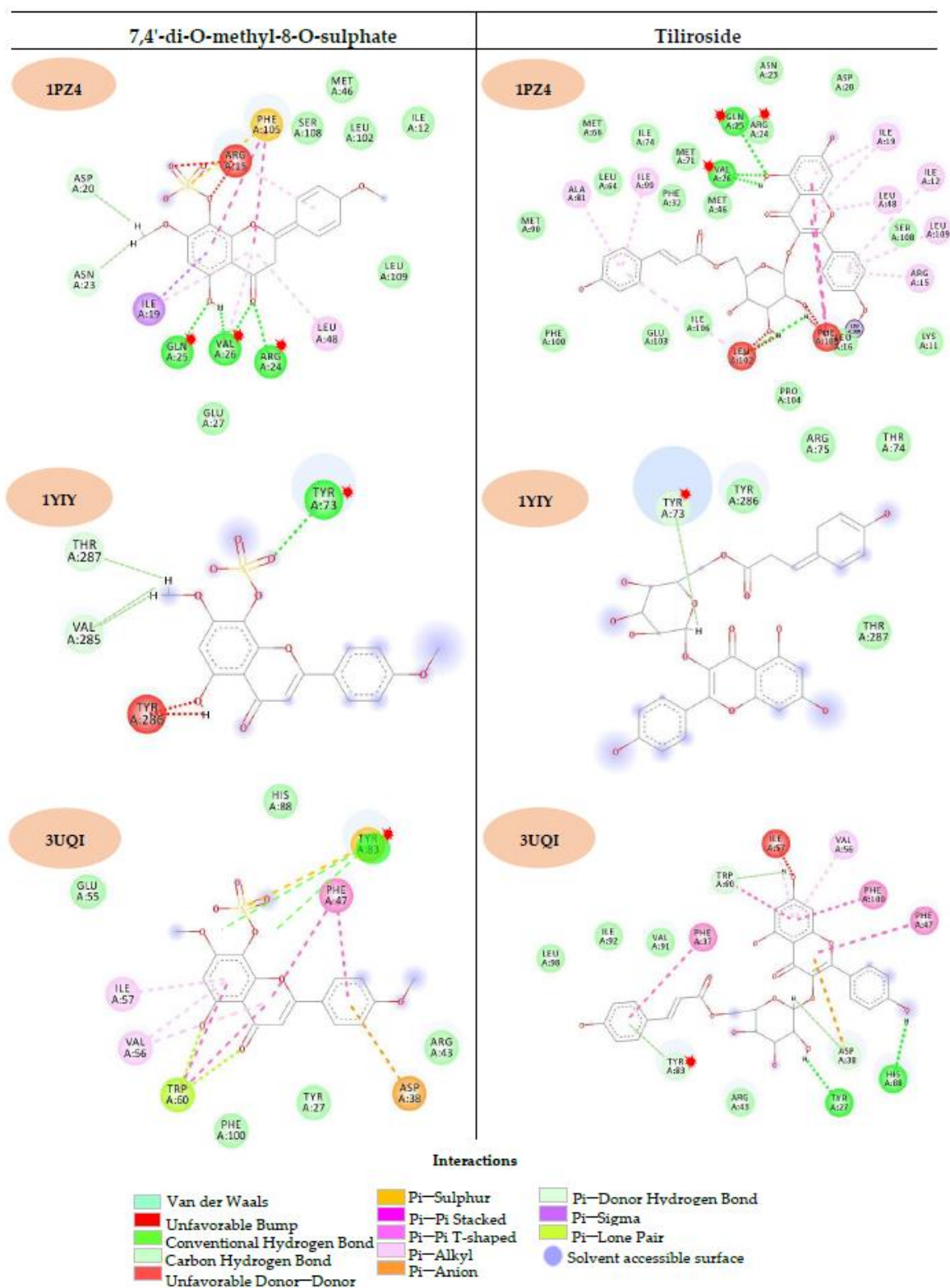
A figura 130 (pág. 215), mostra as interações entre os locais ativos da proteína e as substâncias teste, destacando os resíduos de aminoácidos em comum entre os dois compostos. Não se podem tirar conclusões sobre os compostos que não foram testados in vitro. A triagem virtual foi realizada com a intenção de selecionar compostos promissores para testes in vitro, a fim de evitar desperdício de materiais e minimizar custos.

Na figura 130 observamos os resíduos de aminoácidos críticos comuns no tilirosideo e o flavonoide sulfatado que interagem com os locais ativos das proteínas. Ambos os compostos testados interagem com os sítios ativos por meio de ligações de hidrogênio com espécies oxigenadas, principalmente as hidroxilas fenólicas e o grupo sulfato da 7,4'-di-*O*-metil-8-*O*-sulfato flavona.

Para a enzima 1YIY apenas o resíduo de serina 252 interage com ambos os compostos, no entanto, para a 7,4'-di-*O*-metil-8-*O*-sulfato flavona, outros três resíduos interagem formando ligações de hidrogênio com o grupo sulfato. Essa tendência também foi observada para outras proteínas, e o grupo sulfato parece ser responsável por várias interações com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo, o que pode resultar em sua alta probabilidade de serem ativos no estudo de acoplamento.

Nossos achados mostraram que os melhores resultados in silico foram exibidos para os flavonoides e esteroides. Esses compostos possuem certas características, como anéis planares e aromáticos, grupos sulfatos e açúcares, que podem ser cruciais para suas atividades biológicas (BARROS et al. 2018).

Figura 130. Interações dos compostos com os sítios ativos da proteína. Os resíduos de aminoácidos em comum para as duas substâncias estão marcados com um asterisco vermelho e representam as interações de hidrogênio.





6. Conclusão



O estudo fitoquímico da espécie *Helicteres velutina* K. Schum (Sterculiaceae) biomonitorado no mosquito *Ae. aegypti*, permitiu detectar potencial atividade das fases de menor polaridade (hexano e diclorometano), obtidas a partir do extrato desta espécie, frente aos estágios de desenvolvimento do vetor (ovo, larva, pupa e adultos). O trabalho fitoquímico realizado com essas fases permitiu o isolamento e identificação de 12 substâncias: ácido palmítico (*Hv-1*), decanol (*Hv-2*), feofitina a (*Hv-3*), uma mistura de 13²-hidroxi-feofitina-(13²-*R*)- feofitina a e 13²-hidroxi-feofitina-(13²-*S*)- feofitina a (*Hv-4a* e *Hv-4b*), feofitina b (*Hv-5*), acetato do ácido oleanólico (*Hv-6*), 3- β -esterearoxi-olean-12-eno (*Hv-7*), 7,4'-Di-O-metilisoescutelareina (*Hv-8*), uma mistura de flavonoides sulfatos mariahine e condadine (*Hv-9a* e *Hv-9b*) e pinoresinol (*Hv-10*), todas relatadas pela primeira vez na espécie, com destaque para a mistura *Hv-9a* e *Hv-9b*, composta por duas substâncias inéditas na literatura. O isolamento e identificação destas substâncias contribuíram para o conhecimento químico do gênero *Helicteres* e da família Sterculiaceae (Malavaceae *sensu lato*).

O estudo computacional “*in silico*” com as substâncias identificadas neste trabalho e em trabalho anterior (FERNANDES, 2017), analisou o potencial de 17 substâncias frente a proteínas encontradas no mosquito *Ae. aegypti* (1YIY, 1PZ4 e 3UQI), permitindo detectar provável atividade de cinco substâncias segundo o domínio de aplicabilidade, com 86% de confiabilidade. Três dessas moléculas: β -sitosterol glicosilado, tilirosideo e 7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato flavona demonstraram potencial atividade nas três enzimas estudadas no docking.

O tilirosideo e a 7,4'-di-O-metil-8-O-sulfato flavona apresentaram atividade “*in vitro*” frente a larvas em estágio L4 de *Ae. aegypti*, corroborando com o teste de estrutura-atividade. O mecanismo de ação dessas substâncias e das fases hexânica e diclorometânica pode estar associado com os tipos de hemócitos encontrados nas larvas tratadas e com sua capacidade de produzir óxido nítrico,

O estudo químico e biológico com a espécie *H. velutina* tem contribuído cientificamente para ratificar o que é citado pela medicina popular do uso dessa espécie como repelente de insetos, caracterizando a mesma como uma alternativa promissora para ser usada no controle do *Ae. aegypti*, vetor de diversas arboviroses.



ACEVEDO, C.H.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T. *In silico* studies designed to select sesquiterpene lactones with potential antichagasic activity from an in-house Asteraceae Database. **Chemmedchem**, v. 13, p. 634-645, 2018.

AGUIAR, I.; SANTOS, E.R.; MAFUD, A.C.; ANNIES, V.; SILVA, M.A.N.; MALTA, V.R. S.; GAMBARDELLA, M.T.P.; MARQUES, F.A.; CARLOS, R.M. Synthesis and characterization of Mn (I) complexes and their larvicidal activity against *Aedes aegypti*, vector of dengue fever. **Inorganic chemistry communications**, v. 84, p. 49-55, 2017.

AGUIAR, B.S.; LORENZ, C.; VIRGINIO, F.; SUESDEK, L.; CHIARAVALLOTI-NETO, F. Potential risks of Zika and chikungunya outbreaks in Brazil: A modeling study. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 70, p. 20-29, 2018.

AJAEGBU, E.E.; DANGA, S.P.Y.; CHIJOKE, I.U.; OKOYE, F.B.C. Mosquito adulticidal activity of the leaf extracts of *Spondias mombin* L. against *Aedes aegypti* L. and isolation of active principles. **Journal Vector Borne Diseases**, v. 53, p. 17-22, 2016.

ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: Fragilidades e perspectivas. **Revista brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 678-689, 2006.

ALEYKUTTY, N.A. Docking studies on identified constituents of *Helicteres isora* as antidiabetic agents. **International Journal of Computer Applications**, v. 45, n. 20, p. 8-13, 2012.

ALMEIDA, M.R.; MARTINEZ, S.T.; PINTO, A.C. Química de produtos naturais: plantas que testemunham histórias. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 1117-1153, 2017.

ALVES, I.S.; DANTAS, I.C.; MELO, J.I.M.; FELISMINO, D.C. A família Malvaceae *sensu lato* em uma área do Agreste Paraibano, Nordeste do Brasil. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 6, n. 1, p. 1-20, 2011.

AMARAL, M.C.P.C. **Criação em massa de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) para aplicação no controle vetorial autocida: validação de uma linhagem, otimização e planejamento**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo, SP, 2018.

AMARAL, J.K.; SCHOEN, R.T.; A case report of chikungunya fever, rheumatoid arthritis, and felty's syndrome. **Rheumatology and Therapy**, v. 5, p. 293-301, 2018.

AMERASAN, D.; MURUGAN, K., KOVENDAN, K., KUMAR, P.M., PANNEERSELVAM, C., SUBRAMANIAM, J., WILLIAM, S.J., HWANG, J.S. Adulticidal and repelente properties of *Cassia tora* Linn. (Family: Caesalpinaceae) against *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, and *Anopheles stephensi*. **Parasitology Research**, v. 111, p. 1953-1964, 2012.

APG I - Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG I. **Missouri Botanical Garden Press**, v. 85, n. 4, p. 531-553, 1998.

APG II - Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 399-436, 2003.

APG III - Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnaean Society**, v. 161: 128-131, 2009.

APG IV - Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnaean Society**, v. 181: 1-20, 2016.

ARAÚJO, H.C.R.; CAVALCANTI, M.G.S.; SANTOS, S.S.; ALVES, L.C.; BRAYNER, F.A. Hemocytes ultrastructure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Micron**, n. 39, v. 18, p. 184-189, 2008.

ARAÚJO, H.R.C. **Caracterização morfológica dos hemócitos do *Aedes aegypti* e do *Aedes albopictus* e a resposta imune dos hemócitos do *Aedes aegypti* após a infecção pelo Dengue vírus**. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Belo Horizonte, MG, 2011.

ARIVOLI, S.; RAVEEN, R.; SAMUEL, T. Larvicidal activity of *Murraya koenigii* (L.) Spreng (Rutaceae) hexane leaf extract isolated fractions against *Aedes aegypti* Linnaeus, *Anopheles stephensi* Liston and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Journal of Mosquito Research**, v. 5, p.1-8, 2015.

ASSIS-JUNIOR, L.R.; GARCEZ, F.R.; GARCEZ, W.S. Pregnanos e outros constituintes das raízes de *Macrosiphonia petraea* (A. St.-Hil.) Kuntze (Apocynaceae). **Química nova**, v. 36, n. 4, p. 519-523, 2013.

AZIZULLAH, A.; REHMAN, Z.U.; ALI, I.; MURAD, W.; MUHAMMAD, N.; ULLAH, W.; HADER, D.P. Chlorophyll derivatives can be an efficient weapon in the fight against dengue. **Parasitology Research**, v. 113, n. 12, p. 4321-4326, 2014.

BADAL, S; SMITH, K.N.; RAJNARAYANAN, R. Analysis of natural product regulation of cannabinoid receptors in the treatment of human disease. **Pharmacology and therapeutics**, p. 1-81, 2017.

BAI, N.S. Chemical investigation of the stem bark of *Helicteres isora*. **Bulletin Research Institute**, Univ. Kerala, Trivandrum, Ser. A, 3, 89-107, 1954.

BALOGUN, S.O.; SILVA JR, I.F.; COLODEL, E.M.; OLIVEIRA, R.G.; ASCÊNCIO, S.D.; MARTINS, D.T.O. Toxicological evaluation of hydroethanolic extract of *Helicteres sacarolha* A. St.-Hil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 2, n. 2, p. 1-7, 2014.

BARRETO, M.B.; GOMES, C.L.; FREITAS, J.V.B.; PINTO, F.C.L.; SILVEIRA, E.R.; GRAMOSA, N.V. Flavonoides e terpenoides de *Croton muscicarpa* (Euphorbiaceae). **Química Nova**, v. 6, n. 5, p. 675-679, 2013.

BARROS, R.P.C. **Triagem virtual de metabólitos secundários com potencial atividade antimicrobiana do gênero *Solanum* e estudo fitoquímico de *Solanum capsicoides* All.** Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2017.

BARROS, R.P.C.; CUNHA, E.V.L.; CATÃO, R.M.R.; SCOTTI, L.; SOUZA, M.S.R.; BRÁS, A.A.Q.; SCOTTI, M.T. Virtual screening of secondary metabolites of the genus *Solanum* with potencial antimicrobial activity. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 28, p. 686-691, 2018.

BELLÉ, F.P. **Efeito larvicida dos extratos de *Eugenia uniflora* e *Urera baccifera* frente ao *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae).** Trabalho de Conclusão de curso (Bacharel em Farmácia), Chapecó, RS, 2017.

BERGSTEIN, T.G.; WEISS, R.R.; BICUDO, S.D. Técnicas de análise de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 38, n. 4, p. 189-194, 2014.

BORAH, R.; KALITA, M.C.; TALUKDAR, A.K. Herbal product for mosquito control and its process for preparation thereof. **Indian Patent Application**, p. 1-25, 2014.

BRANDÃO, D.C. **Avaliação biológica *in vitro* e *in vivo* de compostos fluorescentes derivados do benzotiadiazol produzidos para o imageamento celular.** Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular), Brasília, DF, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico. **Febre amarela: Ministério da Saúde atualiza casos no país.** 2018a. Disponível em: < <http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42857-febre-amarela-ministerio-da-saude-atualiza-casos-no-pais-4>> Acessado em 03 de set. de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana epidemiológica 32, 2018.** v. 49, n. 36, 2018b. Disponível em: < <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/agosto/31/2018-043.pdf>> Acessado em 03 de set. de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 20 de 2018,** v. 4, n. 29, 2018c. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/junho/29/Monitoramento-integrado-de-alteracoes-no-crescimento-e-desenvolvimento-relacionadas-a-infeccao-pelo-virus-Zika.pdf>> Acessado em 03 de set. de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico. **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito *Aedes* (dengue, Chikungunya e zika) semanas epidemiológicas 1 a 8, 2021,** v. 52, n. 8, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/marco/15/boletim_epidemiologico_svs_8.pdf> Acessado em 19 de mai. de 2021.

BRENT, S.E.; WATTS, A.; CETRON, M.; GERMAN, M.; KRAEMER, M.U.G.; BOGOCH, I.I.; BRADY, O.J.; HAY, S.I.; CREATORE, M.I.; KHAN, K. International travel between global urban centres vulnerable to yellow fever transmission. **Bull World Health Organ**, v. 96, p. 343-354, 2018.

BRITO-FILHO, S.G., FERNANDES, M.G., CHAVES, O.S., CHAVES, M.C.O., ARARUNA, F.B., EIRAS, C., LEITE, J.R.S.A., AGRA, M.F., BRAZ-FILHO, R., SOUZA, M.F.V. Chemical constituents isolated from *Turnera subulata* SM and electrochemical characterization of Phaeophytin b. **Quimica Nova**, v. 37, p. 603–609, 2014.

BRITO-FILHO, S.G.; MACIEL, J.K.S.; TELES, Y.C.F.; FERNANDES, M.M.M.S.; CHAVES, O.S.; FERREIRA, M.D.L.; FERNANDES, P.D.; FELIX, L.P.; CIRINO, I.C.S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P.; BRAZ-PINTO, R.; SOUZA, M.F.V. Phytochemical study of *Pilosocereus pachycladus* and antibiotic-resistance modifying activity of syringaldehyde. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 453-458, 2017.

CARNEIRO, F.M.; SILVA, M.J.P.; BORGES, L.L.; ALBERNAZ, L.C.; COSTA, J.D.P. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência**, v. 3, n. 2, p. 44-75, 2014.

CASANOVA, L.M.; COSTA, S.S. Interações sinérgicas em produtos naturais: potencial terapêutico e desafios. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 1-21, 2017.

CECHINEL-FILHO V., YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1997.

CDC – Center for Disease Control and Prevention. **Mosquito life-cycle**. 2012. Disponível em https://www.cdc.gov/dengue/entomologyecology/m_lifecycle.html. Acessado em Jul. de 2018.

CHAGAS, J.M. **Avaliação do potencial inseticida de extratos salinos de sementes de seis espécies de plantas (Família Fabaceae) contra *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) L. em diferentes estágios do ciclo biológico**. Dissertação (Mestrado em ciências biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2016.

CHAVES, O.S.; GOMES, R.A.; TOMAZ, A.C.A., FERNANDES, M.G.; MENDES JUNIOR, L.G.; AGRA, M.F.; BRAGA, V.A.; SOUZA, M.F.V. Secondary Metabolites from *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) and the Vasorelaxant Activity of Cryptolepinone. **Molecules**, v.18, n. 3, p. 2769-2777, 2013.

CHAVES, O.S.; TELES, Y.C.F.; MONTEIRO, M.M.O; MENDES JUNIOR, L. G; AGRA. M.F; BRAGA. V.A.; SARMENTO SILVA, T.M and SOUZA., M.F.V. Alkaloids and Phenolic Compounds from *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) and Vasorelaxant Activity of Two Indoquinoline Alkaloids. **Molecules**, v. 22, n. 94, p. 1-9, 2017.

CHEN, W.; TANG, W.; LOU, L.; ZHAO, W. Pregnane, coumarin and lupine derivatives and cytotoxic constituents from *Helicteres angustifolia*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1041-1047, 2006.

CHIN, Y.W., JONES, W.P., RACHMAN, I., RISWAN, S., KARDONO, L.B.S., CHAI, H.B., FARNSWORTH, N.R., CORDELL, G.A., SWANSON, S.M., CASSADY, J.M., KINGHORN, A.D. Cytotoxic lignans from the stems of *Helicteres hirsuta* collected in Indonesia. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 62-65, 2006.

CHOOCHOTE, W., CHAIYASIT, D., KANJANAPOTHI, D., RATTANACHANPICHAI, E., JITPAKDI, A., TUETUN, B., PITASAWAT, B. Chemical composition and anti-mosquito potential of rhizome extract and volatile oil derived from *Curcuma aromatica* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector Ecology**, v. 30, p. 302-309, 2005.

CHOOCHOTE, W.; CHAITHONG, U.; KAMSUK, K.; RATTANACHANPICHAI, E., JITPAKDI, A., TIPPAWANGKOSOL, P., CHAIYASIT, D., CHAMPAKAEW, D., TUETUN, B., PITASAWAT, B. Adulticidal activity against *Stegomyia aegypti* (Diptera: Culicidae) of three *Piper* spp. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, p. 33-37, 2006.

COELHO, A.A.M.; De PAULA, J.E.; ESPÍNDOLA, L.S. Atividade larvica de Extratos Vegetais sobre *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), em condições de laboratório. **BioAssay**, v. 4, n. 3, p. 1-6, 2009.

COLAÇO, M.A.S. **Etnobotânica dos índios Pankararé, no Raso da Catarina – Bahia: uso e importância cultural de plantas da caatinga**. Dissertação (Mestrado em botânica) – Universidade Estadual de Feira de Santana, BA, 2006.

COLLI-SILVA, M.; ANTAR, G.M. *Helicteres* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB9075>>. Acesso em: 04 Jun. 2018

COSTA, V.C.O. **Contribuição ao conhecimento químico de espécies de *Hyptis* com ocorrência no semiárido paraibano: *Hyptis macrostachys* Benth. e *Hyptis umbrosa* Salzm. Ex Benth.** Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2013.

COSTA, M.S.; PEREIRA, M.J.B.; OLIVEIRA, S.S.; SOUZA, P.T.; DALL' OGLIO, E.L. ALVES, T.C. Anonáceas provocam mortalidade em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 2, p. 184-190, 2013.

CRISTÓBAL, C. L. Taxonomía del genero *Helicteres* (Sterculiaceae). revisión de las especies americanas. **Bonplandia**, v. 11, n. 1-4, p. 1-206, 2001.

CRISTÓBAL, C. L.; GOLDBERG, A.; SAINT-HILAIRE, A. F.; SCHUMANN, K. M. Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais: Sterculiaceae. **Boletim de Botânica da Universidade Federal de São Paulo**, v. 24, p. 107-113, 2006.

CRUZ, F. R. **Sterculiaceae Vent. no Estado de São Paulo**. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretária de Estado do Meio Ambiente. São Paulo, SP, 2007.

CRUZ, F.R.; ESTEVES, G.L. **Parte integrante da Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. Sterculiaceae *In*: Martins, S.E., Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J., Giulietti, A.M., Melhem, T.S. Instituto de Botânica, São Paulo, v. 6, p. 257-284, 2009.

CRUZ, P.E.O. **Estudo fitoquímico e investigação das atividades antioxidante, antimicrobiana e larvicida das cascas de *Annona salzmannii* A. DC. (Anonaceae)**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, 2011.

DARMALI, L; SILVA, C.B.; OCAMPOS, F.M.M.; BURCI, L.M.; NASCIMENTO, K.F.; JESUS, C.; DIAS, J.F.G.; DALLARMI, M.M.; GOMES, O.M.; ZANIN, S.M.W. Larvicidal activity of *Dalbergia brasiliensis* (Fabaceae-Papilioideae) on *Aedes aegypti*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 9, n. 35, p. 881-885, 2015.

DAVID, B.; WOLFENDER, J.L.; DIAS, D.A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, p. 1-17, 2014.

DAYAL, R.; SINGH, A.; OJHA, R.P.; MISHRA, K.P. Possible therapeutic potential of *Helicteres isora* (L.) and it's mechanism of action in diseases. **Journal of Medicinal Plants Studies**, v. 3, p. 95-100, 2015.

DAYAL, R.; SINGH, A.; MISHRA, K.P. Potential of enhancing tumor toxicity by crude ethanolic extracts of fruits of *Helicteres isora* (L.). **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, p. 417-423, 2017.

DE SOUZA, D.K., PICADO, A., BIÉLER, S., NOGARO, S., NDUNGU, J.M. Dianosis of neglected tropical diseases during and after the COVID-19 pandemic. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 14, n. 8, 2020.

DESHPANDE, H.A., BHALSING, S.R. Sterculiaceae: A critical appraisal on plant tissue culture studies in medicinally important plants. **Research in Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 31-38, 2015.

DOMINGUES, B.F. **3D-Pharma: Uma ferramenta para triagem virtual baseada em fingerprints de farmacóforos**. Tese (Doutorado em Bioinformática), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2013.

DYER, D.H.; LOVELL, S.; THODEN, J.B.; HOLDEN, H.M.; RAYMENT, I.; LAN, Q. (1PZ4). The Structural Determination of an Insect Sterol Carrier Protein-2 with a Ligand-bound C16 Fatty Acid at 1.35-Å Resolution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 40, p.39085-39091, 2003. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m306214200>.

DONALD, K. World Health Organization recommends yellow fever shot to São Paulo visitors, **Clinical Infectious Diseases**, v. 66, p. 1, 2018.

DURING, A.; DEBOUCHE, C.; RASS, T.; LARONDELLE, Y. Among plant lignans, pinoresinol has the strongest anti-inflammatory properties in human intestinal Caco-2 cells. **The Journal of Nutrition**, v. 142, n. 10, p. 1798-1805, 2012.

EFSA (European Food Safety Authority). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance 1-decanol. **EFSA Journal Parma**, Italy, n. 8, v. 9, p. 1-42, 2010.

ELOY, C.C.; VIEIRA, D.M.; LUCENA, C.M.; ANDRADE, M.O. Apropriação e proteção dos conhecimentos tradicionais no Brasil: a conservação da biodiversidade e os direitos das populações tradicionais. Volume especial populações tradicionais. **Gaia Scientia**, p. 189-198, 2014. Disponível em: <<http://periodicos.ufpb.br/index.php/gaia/article/viewFile/22587/12537>>.

ESCUTIA, G.; McDONALD, E.; RODRIGUEZ-LAINZ, A.; HEALY, J. Demographic and travel characteristics of travel-associated Zika vírus infection case-patients in San Diego County, California (January 1, 2016-March 31, 2017). **Journal of Community Health**, v. 43, p. 566-569, 2018.

FARALDO, A.C.; SÁ-NUNES, A.; DEL BEL, E. A.; FACCIOLI, L. H.; LELLO, E. Nitric oxide production in blowfly hemolymph after yeast inoculation. **Nitric Oxide: Biology Chemistry**, v. 13, p. 240-246, 2005.

FERNANDES, M. M. M. S.; CHAVES, O. S.; TELES, Y. C.; AGRA, M. F.; SOUZA, M. F. V. New substance porphyrin to *Bakeridesia pickelli* (H. Monteiro). In: **4th BCNP XXX RESEM**. Natal-RN, 2013.

FERNANDES, D.A. **Estudo fitoquímico de *Helicteres velutina* K. Schum (Sterculiaceae) e avaliação do seu potencial larvicida contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae)**. 2017. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2017.

FERNANDES, D.A.; SOUZA, M.S.R.; TELES, Y.C.F.; OLIVEIRA, L.H.G.; LIMA, J.B.; CONCEIÇÃO, A.S.; NUNES, F.C.; SILVA, T.M.S.; SOUZA, M.F.V. New sulphated flavonoids and larvicidal activity of *Helicteres velutina* K. Schum (Sterculiaceae). **Molecules**, v. 23, p. 2784-2795, 2018.

FERNANDES, D.A.; BARROS, R.P.C.; TELES, Y.C.F.; OLIVEIRA, L.H.G.; LIMA, J.B.; SCOTTI, M.T.; NUNES, F.C.; CONCEIÇÃO, A.S.; SOUZA, M.F.V. Larvicidal compounds extracted from *Helicteres velutina* K. Schum (Sterculiaceae) evaluated against *Aedes aegypti* L. **Molecules**, n. 24, p. 2315-2330, 2019.

FERNANDES, D. A., OLIVEIRA, L. H. G., RIQUE, H. L., SOUZA, M. F. V., & NUNES, F. C. Insights on the larvicidal mechanism of action of fractions and compounds from aerial parts of *Helicteres velutina* K. Schum against *Aedes aegypti* L. **Molecules**, v. 25, n. 13, p. 3015, 2020a.

FERNANDES, D.A.; ASSIS, E.B.; SOUZA, M.S.R.; SOUZA, P.I.V.; SOUZA, M.F.V. *Helicteres* L. species (Malvaceae *sensu lato*) as source of new drugs: a review. **Quimica Nova**, v. 43, n. 6, p. 787-803, 2020b.

FERREIRA, R.S.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1770-1778, 2011.

FERREIRA, F.L. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de extratos e constituintes das folhas de *Maytenus distichophylla* (Celastraceae)**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2014.

FERREIRA, M.E.A. **Plantas medicinais utilizadas em rituais de religiões de matriz afro-brasileira estudo de caso umbanda**. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, RS, 2017.

FERREIRA, M.D.L.; FERNANDES, D.A.; NUNES, F.C.; TELES, Y.C.F.; ROLIM, Y.M.; SILVA, C.M.; ALBUQUERQUE, J.B.L.; AGRA, M.F.; SOUZA, M.F.V. Phytochemical study of *Waltheria viscosissima* and evaluation of its larvicidal activity against *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, p. 582–590, 2019.

FONSECA, E.O.L.; MACORIS, M.L.G.; SANTOS, R.F.; MORATO, D.G.; ISABEL, M.D.S.S.; CERQUEIRA, N.A.; MONTE-ALEGRE, A.F. Experimental study on the action of larvicides in *Aedes aegypti* population collected in the Brazilian municipality of Itabuna, Bahia, under simulated field conditions. **Epidemiology Services Saude**, v. 28, n. 1, p.1-9, 2019.

FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, v. 14, p. 144-149, 2008.

FRANCESCHINELLI, E.V.; BAWA, K. S. The effect of ecological factors on the mating system of a South American shrub species (*Helicteres brevispira*). *Heredity*, v. 84, p. 116, 2000.

FRANKENBERG, L. **Terpenos de oleoresina de *Cola nítida* (Vent.) Schott & Endl. (Malvaceae): Caracterização, semissíntese, avaliação antiprotzoária e anti-inflamatória in vitro**. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2017.

FRANÇA, L.P. **Avaliação da atividade larvicida de extratos e óleo essencial de *Piper capitanum* Yunck, 1966 (Piperaceae) sobre *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 e *Anopheles* sp (Culicidae) em laboratório**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas. Manaus-AM, 2015.

FREITAS, J.R.; RAO, S.; MAHALINGAM, S. Chikungunya: treatments, opportunities and possibilities. **Microbiology Australia**, v. 39, p. 76-79, 2018.

GARCEZ, W.S.; GARCEZ, F.R.; SILVA, L.M.G.E.; SARMENTO, U.C. Substâncias de Origem Vegetal com Atividade Larvicida Contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n.3, p. 363-393, 2013.

GIKONYO, N.K.; MWANGI, R.W.; MIDIWO, J.O. Toxicity and growth-inhibitory activity of *Polygonum senegalense* (Meissn.) surface exudate against *Aedes aegypti* larvae. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 18, n. 3, p.229-234, 1998.

GOLDBERG, L. Patterns of nectar production and composition, and morphology of floral nectaries in *Helicteres guazumifolia* and *Helicteres baruensis* (Sterculiaceae): two sympatric species from the Costa Rican tropical dry forest. **Revista de Biologia Tropical**, v. 57, p. 161-177, 2009.

GOMES, R.A.; RAMIREZ, R.R.A.; MACIEL, J.K.S.; AGRA, M.F.; SOUZA, M.F.V.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P. Phenolic compounds from *Sidastrum micranthum* (A. St.-Hil.) Fryxell and evaluation of acacetin and 7,4'-di-O-methylisoscuteallarin as modulator of bacterial drug resistance. **Química Nova**, v. 34, p.1385–1388, 2011.

GOMES, R.A.; TELES, Y.C.F.; PEREIRA, F.O.; RODRIGUES, L.A.S.; LIMA, E.O.; AGRA, M.F.; SOUZA, M.F.V. Phytoconstituents from *Sidastrum micranthum* (A. St.-Hil.) Fryxell (Malvaceae) and antimicrobial activity of pheophytin a. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 861-867, 2015.

GOMEZ, M.M.; ABREU, F.V.S.; SANTOS, A.A.C.; MELLO, I.S.; SANTOS, M.P.; RIBEIRO, I.P.; FERREIRA-DE-BRITO, A.; MIRANDA, R.M.; CASTRO, M.G.; RIBEIRO, M.S.; LATERRIERE, R.D.; AGUIAR, S.F.; MEIRA, G.L.S.; ANTUNES, D.; TORRES, P.H. M.; MIR, D.; VICENTE, A.C.P.; GUIMARAES, A.C.R.; CAFFARENA, E.R.; BELLO, G.; LOURENCO-DE-OLIVEIRA, R.; BONALDO, M.C. Genomic and structural features of the yellow fever virus from the 2016-2017 Brazilian outbreak, **Journal of General Virology**, v. 99, p. 536-548, 2018.

GONÇALEZ, V.M. *Melochia* L. (Byttnerioideae, Malvaceae) na região Sudeste do Brasil. 2013. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e meio ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, SP, 2013.

GOVINDARAJAN, M. Mosquito larvicidal and ovicidal activity of *Cardiospermum halicacabum* Linn. (Family: Sapindaceae) leaf extract against *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Aedes aegypti* (Linn.) (Diptera: Culicidae). **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 15, p. 787-794, 2011.

GOVINDARAJAN, M.; SIVAKUMAR, R. Adulticidal and repellent properties of indigenous plant extracts against *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 110, p. 1607-1620, 2012.

GOVINDARAJAN, M.; SIVAKUMAR, R. Larvicidal, ovicidal, and adulticidal efficacy of *Erythrina indica* (Lam.) (Family: Fabaceae) against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 113, p. 777-791, 2014.

GOVINDARAJAN, M.; RAJESWARY, M. Ovicidal and adulticidal potential of leaf and seed extract of *Albizia lebbek* (L.) Benth. (Family: Fabaceae) against *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 114, p. 1949-1961, 2015.

GRIGS, M., BOLDRINI, I.I. O gênero Pavonia Cav. (Malvaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 3, p. 352-380, 2013.

GREEN, L.C.; RUIZ DE LUZURIAGA, K.; WAGNER, D.A.; RAND, W.; ISTFAN, N.; YOUNG, V.R.; TANNENBAUM, S.R. Nitrate biosynthesis in man. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 78, p. 7764–7768, 1981.

GUARDA, C.; LUTINSKI, J.A.; ROMAN-JUNIOR, W.A.; BUSATO, M.A. Atividade larvívica de produtos naturais e avaliação da susceptibilidade ao inseticida temefós no controle do *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Interciencia**, v. 41, n. 4, p. 243-247, 2016.

GUARIDO, M.M. **Atividade inseticida de extratos de *Annona foetida* Mart. (Annonaceae) sobre imaturos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade do Paraná, Curitiba, PR, 2009.

GUBLER, D.J. Potential yellow fever epidemics in unexposed populations. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 96, p. 299, 2018.

GUTMAN, J.R., LUCCHI, N.W., CANTEY, P.T., STEINHARDT, L.C., SAMUELS, A.M., KAMB, M.L., KAPPELLA, B.K., MCELROY, P.D., UDHAYAKUMAR, V., LINDBLADE, K.A. Malaria and parasitic neglected tropical diseases: potential syndemics with COVID-19. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 572-577, 2020.

HALL, M.; FRANK, E.; HOLMES, G.; PFAHRINGER, B.; REUTEMANN, P. WITTEN, I.H. The WEKA data mining software: an update. **SIGKDD Exploration**, v. 11, n. 1, 2009.

HAN, Q.; GAO, Y.G.; ROBINSON, H.; DING, H.; WILSON, S.; LI, J. (1YIY). Crystal structures of *Aedes aegypti* kynurenine aminotransferase. **The Febs Journal**, v. 272, n. 9, p. 2198-2206, 2005.

HARDE, P.A.; SHAH, M.B. Pharmacognostic Studies and HPLC Analysis of Roots of *Helicteres isora* (L.). **Pharmacognosy Journal**, v. 9, p. 523-527, 2017.

HEINZMANN, B.M.; BARROS, F.M.C. Potencial das plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de fitomedicamentos tendo como exemplo *Lippia alba* (mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **UFSM, Saúde Santa Maria**, v. 33, n.1, p. 43-48, 2007.

HU, X.; CHENG, D.; ZHANG, Z. Antidiabetic activity of *Helicteres angustifolia* root. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, p. 938-944, 2016.

HU, X.S.; CHENG, D.L.; LI, K.J.; WANG, L.B.; YANG, X.; SUN, S.; WANG, Y.P.; LI, S. H.; LEI, Z. F.; ZHANG, Z.Y. Glucose consumption and alpha-glucosidase inhibitory activities of aqueous root extract of *Helicteres angustifolia*. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 20, p. 1423-1429, 2016.

IMAM, H.; ZARNIGAR, D.; SOFI, G.; AZIZ, S. The basic rules and methods of mosquito rearing (*Aedes aegypti*). **Tropical Parasitology**, v. 4, p. 53-55, 2014.

JAIN, J.; OKABAYASHI, T.; KAUR, N.; NAKAYAMA, E.; SHIODA, T.; GAIND, R.; KUROSU, T.; SUNIL, S. Evaluation of an immunochromatography rapid diagnosis kit for detection of chikungunya virus antigen in India, a dengue-endemic country. **Virology Journal**, v. 15, n. 84, 2018.

KEZIAH, E.A.; NUKENINE, E.N.; DANGA, S.P.Y.; YOUNOUSSA, L.; ESIMONE, C.O. Creams formulated with *Ocimum gratissimum* L. and *Lantana camara* L. crude extracts and fractions as mosquito repellents against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 1, 2015.

KOVENDAN, K.; MURUGAN, K.; KUMAR, P.M.; THIYAGARAJAN, P.; WILLIAM, S.J. Ovicidal, repellent, adulticidal and field evaluations of plant extract against dengue, malaria and filarial vectors. **Parasitology Research**, v. 112, p. 1205-1219, 2013.

KRAEMER, M.U.G.; SINKA, M.E.; DUDA, K.A.; MYLNE, A.Q.N.; SHEARER F.M.; BARKER, C.M.; MOORE, C.G.; CARVALHO, R.G.; COELHO, G.E.; BORTEL, W.V.; HENDRICKX, G.; SCHAFFNER, F.; ELYAZAR, I.R.F.; TENG, H.J.; BRADY, O.J.; MESSINA, J.P.; PIGOTT, D.M.; SCOTT, T.W.; SMITH, D.L.; WINT, G.R.W.; GOLDING, N.; HAY, S.I. The global distribution of the arbovirus vectores *Aedes aegypti* and *Ae albopictus*. **eLife**, p. 1-18, 2015.

KUMAR, N.P.; SURESH, A.; VANAMAIL, P.; SABESAN, S.; KRISHNAMOORTHY, K.G.; MATHEW, J.; JOSE, V.T.; JAMBULINGAM, P. Chikungunya vírus outbreak in Kerala, India, 2007: a seroprevalence study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 8, p. 912-916, 2011.

KUMAR, P.M.; MURUGAN, K.; KALIMUTHU, K.; PANNEERSELVAM, C.; KUMAR, K.P.; AMERASAN, D.; SUBRAMANIAM, J.; KALIMUTHU, K.; NATARAI, T. Mosquitocidal activity of *Solanum xanthocarpum* fruit extract and copepod *Mesocyclops thermocyclopoides* for the control of dengue vector *Aedes aegypti*. **Parasitology Research**, v. 111, p. 609-618, 2012.

KUMAR, D.; SINGH, R. K.; FAROOQ, S. *In vitro* antimicrobial activity of oleanolic acid identified in chloroform extract of fruits of *Helicteres isora* L. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 6, p. 1102-1112, 2017a.

KUMAR, D.; SINGH, R. K.; FAROOQ, S. *In vitro* antimicrobial activity of β -sitosterol identified in petroleum ether extract of fruits of *Helicteres isora* Linn. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 6, p. 841-849, 2017b.

LASSEN, D.; LUCKE, C.; KVEDER, M.; MESGARDEH, A.; SCHMIDT, J.M.; SPECHT, B.; LEZIUS, A.; SPENER, E.; RUTERIAN, H. Three-dimensional structure of bovine heart fatty-acid-binding protein with bound palmitic acid, determined by multidimensional NMR spectroscopy. **European Journal of Biochemistry**, v. 230, p. 266-280, 1995.

LETA, S.; BEYENE, T. J.; CLERCQ, E. M.; AMENU, K.; REVIE, C. Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, **International Journal of Infectious Diseases**, v. 67, p. 25-35, 2018.

LIMA, G.S. **Estudo químico biomonitorado de extratos das folhas e do caule de *Guettarda grazielae* M.R.V. Barbosa (Rubiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de Alagoas, Macéio, AL, 2008.

LIMA, W.G.; GODÓI, I.P.; COMAR-JUNIOR, M.; MIZUNO, C.S.; FERREIRA, J.M.S.; ALVES, R.J.; TARANTO, A.G. Triagem virtual e avaliação *in silico* de potenciais inibidores da NSS metiltransferase do vírus da dengue. In: **IV Jornada acadêmica internacional de bioquímica e I semana científica de biotecnologia**, v. 2, n. 2, p. 38-41, 2013.

LIMA, J.B.; CONCEIÇÃO, A.S. Malvoideae Burnett (Malvaceae) na APA Serra Branca/Raso da Catarina, Jeremoabo, Bahia, Brasil. In: **V Workshop Rio São Francisco: cultura, identidade e desenvolvimento**. Anais eletrônicos. Paulo Afonso, BA, 2013. Disponível em: <<http://www.ppdru.unifacs.br/docs/workshopping-sao-francisco/ARTIGO-2.pdf>> Acessado em 22 de nov. de 2016.

LIMA, L. B. Análise do desmatamento na APA Serra Branca/Raso da Catarina em Jeremoabo–BA. **Seminário de Iniciação Científica**, n. 21, 2017.

LIRA, N.S. **Estudo químico dos organismos marinhos *Aplysina fistularis* Pallas e *Sargassum polyceratum* Montagne**. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2012.

LIU, Q.; GE, X.; CHEN, L.; CHENG, D.; YUN, Z.; XU, W.; SHAO, R. Purification and analysis of the composition and antioxidant activity of polysaccharides from *Helicteres angustifolia* L. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 2262-2268, 2018.

LOPES, E. C. S.; OLIVEIRA, L. H. G.; SOUSA, P. A. P. S.; NASCIMENTO, G. J. NUNES, F. C. Controlling dengue by fighting the mosquito vector: insecticide activity of the Basil against *Aedes aegypti*. **Clinical Research Infectious Diseases**, v. 3, n. 3, p. 1-3, 2016.

LÓPEZ-BIEDMA, A.; SÁNCHEZ-QUESADA, C.; BELTRÁN, G.; DELGADO-RODRÍGUEZ, M.; GAFORIO, J.J. Phytoestrogen (+)-pinorensinol exerts antitumor activity in breast cancer cells with different oestrogen receptor statuses. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 350, p. 1-14, 2016.

LORENZ, C.; VIRGINIO, F.; BREVIGLIERI, E.L. O fantástico mundo dos mosquitos. Águas de São Pedro: **Livronovo**, São Paulo, 2018.

LORENZO, V.; LUCIO, A.S.; TAVARES, J.F.; FILHO, J.M.; LIMA, T.K.; ROCHA, J.D.; SCOTTI, M.T. Structure and Ligand Based approaches to evaluate aporphynic alkaloids from Annonaceae as Multi-target agents against *Leishmania donovani*. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, p. 5196-5203, 2016.

MA, H.; MA, Y.; LIU, X.; DYER, D.H.; XU, P.; LIU, K.; LAN, Q.; HONG, H.; PENG, J.; PENG, R. NMR structure and function of *Helicoverpa armigera* sterol carrier protein-2, an important insecticidal target from the cotton bollworm. **Scientific reports**, v. 5, p. 1-14, 2015.

MAESTRIN, A.P.J., NERI, C. R., OLIVEIRA, K. T., SERRA, O. A., IAMAMOTO, Y. Extração e purificação de clorofila *a*, da alga *Spirulina maxima*: um experimento para os cursos de química. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1670-1672, 2009.

MAKIALA-MANDANDA, S.; AHUKA-MUNDEKE, S.; ABBATE, J.L.; PUKUTA-SIMBU, E.; NSIO-MBETA, J.; BERTHET, N.; LEROY, E.M.; BECQUART, P.; MUYEMBE-TAMFUM, J.J. Identification of dengue and chikungunya cases among suspected cases of yellow fever in the democratic republic of the congo. **Vector-borne and zoonotic diseases**, p. 1-7, 2018.

MARANGONI, C.; MOURA, N.F.; GARCIA, F.R.M. Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. **Revista de ciências ambientais**, v. 6, n. 2, p. 95-112, 2012.

MARQUES, S.D.G. **Síntese de lignanas por acoplamento oxidativo de fenilpropanoides**. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2014.

MARTIN, S. F. Natural products and their mimics as targets of opportunity for discovery. **The journal of organic chemistry**, 2017.

MARTINS, J.L.R.; RODRIGUES, O.R.L.; SOUSA, F. B.; FAJEMIROYE, J.O.; GALDINO, P.M.; FLORENTINO, I.F.; COSTA, E.A. Medicinal species with gastroprotective activity found in the Brazilian cerrado. **Fundamental & clinical pharmacology**, p. 1-14, 2015.

MATHEWS, B.W. Comparison of the predicted and observed secondary structure of T4 phage lysozyme. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) – Protein Structure**, v. 405, n. 2, p. 442-451, 1975.

MATIAS, N.G. **Avaliação da atividade larvívica de extratos vegetais frente ao *Aedes aegypti***. Monografia (Curso de farmácia) – Faculdade de Pindamonhangaba, SP, 2015.

MATSUO, A.; ONO, K.; HAMASAKI, K.; NOZAKI, H. Phaeophytins from a cell suspension culture of the liverwort *Plagiochila ovalifolia*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 2, p. 427-430, 1996.

MEENA, N.S.R.; PATNI, M.K.M.V. *In vivo* and *In vitro* biochemical estimation of primary metabolites from *Helicteres isora*: An important medicinal plant. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, p. 1213-1217, 2017.

MEHTA, R.; GERARDIN, P.; BRITO, C.A.A.; SOARES, C.N.; FERREIRA, M.L.B.; SOLOMON, T. The neurological complications of chikungunya vírus: A systematic review. **Reviews in Medical Virology**, v. 28, n. 1978, 2018.

MENDES, C.C.; CRUZ, F.G.; DAVID, J.M.; NASCIMENTO, I.P.; DAVID, J.P. Triterpenos esterificados com ácidos graxos e ácidos triterpênicos isolados de *Byrsonima microphylla*. **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 185-188, 1999.

- MENDES, L.A.; MARTINS, G.F.; VALBON, W.R.; SOUZA, T.S.; MENINI, L.; FERREIRA, A. FERREIRA, M.F.S. Larvicidal effect of essencial oils from Brazilian cultivars of guava on *Aedes aegypti* L. **Industrial crops & products**, v. 108, p. 684-689, 2017.
- MERCADO, M.; ACOSTA-REYES, J.; PARRA, E.; GUZMAN, L.; BELTRAN, M. GASQUE, P.; MEJIA-GARCIA, C.; VIASUS, D. Renal involvement in fatal cases of chikungunya vírus infection. **Journal of Clinical Virology**, v. 103, p. 16-18, 2018.
- MESSIANO, G.B. **Terpenos e lignanas de Aristolochiaceae**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2010.
- MIA, M.K., RAHMAN, O.R., HASSAN, A., HUQ, A.M. Three new records of Sterculiaceae for Bangladesh. **Bangladesh Journal Plant Taxon**. v. 18, n. 2, p. 153-157, 2011.
- MOLINSKI, T. F. All natural: the renaissance of natural products chemistry. **American chemical society**, v. 1, n. 6, p. 3849-3855, 2014.
- MUKANDIWA, L.; ELOFF, J. N.; NAIDOO, V. Larvicidal activity of leaf extracts and seselin from *Clausena anisata* (Rutaceae) against *Aedes aegypti*. **South African Journal of Botany**, v. 100, p. 169-173, 2016.
- MUNUSAMY, R.G.; APPADURAI, D.R.; KUPPUSAMY, S.; MICHAEL, G.P.; SAVARIMUTHU, I. Ovicidal and larvicidal activities of some plant extracts against *Aedes aegypti* L. and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal Tropical Disease**, v. 6, p. 468-471, 2016.
- MUQARRABUN, L.M.R.A.; AHMAT, N. Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of Family Sterculiaceae: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 92, n. 2, p. 514-530, 2015.
- MURUGAN, K.; MURUGAN, P.; NOORTHEEN, A. Larvicidal and repellent potential of *Albizzia amara* Boivin and *Ocimum basilicum* Linn against dengue vector, *Aedes aegypti* (Insecta: Diptera: Culicidae). **Bioresource Technology**, v. 98, p. 198-201, 2007.
- MURUGAN, K.; KUMAR, P. M.; KOVENDAN, K.; AMERASAN, D.; SUBRMANIAM, J.; HWANG, J. Larvicidal, pupicidal, repelent and adulticidal activity of *Citrus sinensis* orange peel extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 111, p. 1757-1769, 2012.
- NAPPI, A.J.; E. OTTAVIANI. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. **BioEssays**, v. 22, p. 469-480, 2000.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs, over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, p. 770-803, 2020.

NGUYEN, T.T.; GAO, X.; NIKLES, S.; PFERSCHY-WENZING, E.M.; KUNERT, O. BAUER, R. Activity-guided isolation of anti-inflammatory constituents from the aerial parts of the vietnamese medicinal plant *Helicteres hirsuta* Lour. **Reviews of clinical pharmacology and drug therapy**, v. 15, p. 48, 2017.

NOGUEIRA, T.B.S.S.; NOGUEIRA, R.B.S.S.; SILVA, D.A.; , TAVARES, J.F.; LIMA, E.O.; PEREIRA, F.O.; FERNANDES, M.M.M.S.; MEDEIROS, F.A.; SARQUIS, R.S.F.R.; BRAZ-FILHO, R.; MACIEL, J.K.S.; SOUZA, M.F.V. First Chemical Constituents from *Cordia exaltata* Lam and Antimicrobial Activity of Two Neolignans. **Molecules**, v. 18, n. 9, p. 11086-11099, 2013.

NOGUEIRA, M.L.; NERY, N.R.R.; ESTOFOLETE, C.F.; TERZIAN, A.C.B.; GUIMARAES, G.F.; ZINI, N.; SILVA, R.A.; SILVA, G. C. D.; FRANCO, L.C.J.; RAHAL, P.; BITTAR, C.; CARNEIRO, B.; VASCONCELOS, P.F.C.; HENRIQUES, D.F.; BARBOSA, D.M.U.; ROMBOLA, P.L.; GRANDE, L.; REIS, A.F.N.; PALOMARES, S.A.; CATELAN, M.W.; CRUZ, L.E.A.A.; NECCHI, S.H.; MENDONÇA, R.C.V.; SANTOS, I.N.P.; CARON, S.B.A.; COSTA, F.; BOZZA, F.A.; SOUZA, A.S.; MATTOS, C.C.B.; MATTOS, L.C.; VASILAKIS, N.; OLIANI, A.H.; OLIANI, D.C.M.V.; KO, A.I. Adverse birth outcomes associated with Zika virus exposure during pregnancy in Sao Jose do Rio Preto, Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, p. 645-652, 2018.

NOUR, A.H.; SANDANASAMY, J.D.; NOUR, A.H. Larvicidal activity of extracts from different parts of Neem (*Azadirachta indica*) against *Aedes aegypti* mosquitoes' larvae. **Scientific Research and Essays**, v. 7, n. 31, p. 2810-2815, 2012.

NUNES, F.C. **Estudo da atividade larvívica da *Agave sisalana* contra larvas de *Aedes aegypti***. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa- PB, 2013.

NUNES, F.C.; LEITE, J.A.; OLIVEIRA, L.H.G.; SOUSA, P.A.P.S.; MENEZES, M.C.; MORAES, J.P.S.; MASCARENHAS, S.R.; BRAGA, V.A. The larvicidal activity of *Agave sisalana* against L4 larvae of *Aedes aegypti* is mediated by internal necrosis and inhibition of nitric oxide production. **Parasitology Research**, v. 114, p. 543-549, 2015.

NUNES, F. C., OLIVEIRA, L. H. G., SOUSA, P. A. P. S., & RIQUE, H. L. **Biotecnologia no Controle de Mosquitos Transmissores de Arboviroses Bioensaios para Avaliação da Atividade Inseticida em Mosquitos Adultos** (p. 94-102). In. *As Ciências Biológicas e da Saúde na Contemporaneidade 2*, Atena Editora, Ponta Grossa. Cap. 10, 2019a.

NUNES, F. C., SOUZA, M. F. V., FERNANDES, D. A., FERREIRA, M. D. L., OLIVEIRA, L. H. G., FIGUEIREDO, G., & RIQUE, H. L. **Bioensaio para avaliação da atividade repelente em mosquitos adultos** (p. 72-84). In. *Ciências Biológicas: Campo Promissor em Pesquisa*. Atena Editora, Ponta Grossa. Cap. 9, 2019b.

OLIVA, L.O. **Distribuição dos ovos em *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae): Efeitos da idade da fêmea, posturas prévias e tipo do criadouro**. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2011.

OLIVAS-QUINTERO, S.; LÓPEZ-ÂNGULO, G.; MONTES-AVILA, J.; DÍAZ-CAMACHO, S. P.; VEJA-AVIÑA, R.; LÓPEZ-VALENZUELA, J. A.; SALAZAR-SALAS, N. Y.; DELGADO-VARGAS, F. Chemical composition and biological activities of *Helicteres vegae* and *Heliopsis sinaloensis*. **Pharmaceutic Biology**, v. 55, p. 1473-1482, 2017.

OLIVEIRA, F.C.S.; BARROS, R.M.F.; MOITA NETO, J.M. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 12, n. 3, p. 282-301, 2010.

OLIVEIRA, D.M. **Estudo químico, farmacológico e aplicação de métodos computacionais na elucidação estrutural de constituintes químicos de folhas de *Maytenus acanthophylla* Reissek (Celastraceae)**. Tese (Doutorado em Química), Belo Horizonte, MG, 2012.

OLIVEIRA, L.O. **Atividade antimalárica e inseticida de extratos de *Azadirachta indica* A. Juss. Introduzida no município de Boa Vista, Roraima**. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção), Boa vista, RR, 2013.

OLIVEIRA, L.F.G.; GILBERT, B.; VILLAS-BÔAS, G. K. Oportunidades para inovação no tratamento da leishmaniose usando o potencial das plantas e produtos naturais como fontes de novos fármacos. **Revista Fitos**, v. 8, n. 1, p. 33-42, 2013.

OLIVEIRA, L.H.G.; SOUSA, P.A.P.S.; HILARIO, F.F.; NASCIMENTO, G.J.; MORAIS, J. P.S.; MEDEIROS, E.P.; SOUSA, M.F.; NUNES, F.C. *Agave sisalana* extract induces cell death in *Aedes aegypti* hemocytes increasing nitric oxide production. **Asian pacif jornal of tropical biomedicine**, v. 6, n. 5, p. 396-399, 2016.

OLIVEIRA, S.F. **Estudo das propriedades físico-químicas e avaliação de compostos bioativos em *Physalis peruviana* L.** Dissertação (Mestrado em Qualidade e Tecnologia Alimentar) – Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Viseu, Portugal, 2016.

PAIXÃO, V.G.; PITA, S.S.R. Triagem virtual aplicada na busca de inibidores da tripanotiona redutase de *Trypanosoma cruzi* utilizando a base de dados de produtos naturais do Semiárido Baiano (NatProDB). **Revista Virtual de Química**, 2016.

PANNEERSELVAM, C.; MURUGAN, K.; KOVEDAN, K.; KUMAR, P.M. Mosquito larvicidal, pupiidal, adulticidal, and repellent activity of *Artemisia nilagirica* (Family: Compositae) against *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. **Parasitology Research**, v. 111, p. 2241-2251, 2012.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à Espectroscopia**, Cengage, 4 ed, p. 716, 2010.

PEREIRA, A.I.S.; PEREIRA, A.G.S.; LOPES SOBRINHO, O.P.; CANTANHEDE, E.K.P.; SIQUEIRA, L.F.S. Antimicrobial activity in fighting mosquito larvae *Aedes aegypti*: Homogenization of essential oils of linalool and eugenol. **Educación Química**, v. 25, n. 4, p. 446-449, 2014.

PERUMALSAMY, H.; JANG, M.J.; KIM, J.R.; KADARKARAI, M.; AHN, Y.J. Larvicidal activity and possible mode of action of four flavonoids and two fatty acids identified in *Millettia pinnata* seed toward three mosquito species. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 2-14.

PETTERSSON, J. H. O.; BOHLIN, J.; DUPONT-ROUZEYROL, M.; BRYNILDSRUD, O. B.; ALFSNES, K.; CAO-LORMEAU, V. M.; GAUNT, M. W.; FALCONAR, A. K.; LAMBALLERIE, X.; ELDHOLM, V.; MUSSO, D.; GOULD, E. A. Re-visiting the evolution, dispersal and epidemiology of Zika virus in Asia. **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, n. 79, 2018.

PERRY, S.C. Arthropod pest control composition and method for its use. **United States patent US 20140303262**, Oct 9, 2014.

PIMENTEL, P.; VIEIRA, V. MITIDIERI, T.; FRANÇA, F.; PIERONI, J.P. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança? **Revista Do BNDES**, p.41-89, 2015. Disponível em: <https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/5602/1/RB%2043%20Biodiversidade%20brasileira%20como%20fonte%20da%20inova%C3%A7%C3%A3o_P.pdf>

PLUEMPANUPAT, S.; KUMRUGSEE, N.; PLUEMPANUPAT, W.; NGAMKITPINYO, K.; CHAVASARI, W.; BULLANGPOTI. Laboratory evaluation of *Dalbergia oliveri* (Fabaceae: Fabales) extracts and isolated isoflavonoids on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 653-658, 2012.

PONTUAL, E.V. **Extrato de flores de Moringa oleífera: Atividade larvicida e efeito sobre tripsina e acetilcolinesterase de larvas de *Aedes aegypti***. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) – Universidade Federal do Pernambuco, Recife – PE, 2010.

PORDEUS, S.M. **Estudo taxonômico e síndrome de dispersão de Malvoideae Burnett (Malvaceae) no agreste Paraibano, Nordeste do Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ecologia e conservação) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB, 2016.

POSSEL, R.D. **Atividade inseticida e repelente de plantas do cerrado no controle alternativo do mosquito *Aedes aegypti***. Mestrado (Biotecnologia) – Universidade Federal de Tocantins, Gupuri, TO, 2019.

QUEVEDO, C.V. **Triagem virtual em banco de dados de ligantes considerando propriedades físico-químicas de um modelo de receptor totalmente flexível**. Tese (Doutorado em Ciências da computação) – Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 2016.

QUIRINO, T.F. **Avaliação do potencial inseticida de solução de *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) para o controle de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae)**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas), Campina Grande, PB, 2010.

RABELO, K.; SOUZA, L. J.; SALOMAO, N. G.; OLIVEIRA, E. R. A.; SENTINELLI, L.D.; LACERDA, M.S.; SARAQUINO, P.B.; ROSMAN, F.C.; BASILIO-DE-

OLIVEIRA, R.; CARVALHO, J.J.; PAES, M.V.; Placental inflammation and fetal injury a rare Zika case with Guillain-Barre syndrome and abortion. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 1018, 2018.

RAGONA, L.; FOGOLARI F.; ZETTA, L.; PÉREZ, D.M.; PUYOL, P.; KRUIF, K.; LOHR, F.; RUTERJANS, H.; MOLINARI, H. Bovine β -lactoglobulin: Interaction studies with palmitic acid. **Protein Science**, v. 9, p. 1347-1356, 2000.

RAJAN, S.; SAW, K.Q.; NGUYEN, Q.T.; BAEK, K.; YOON, H.S. High-resolution crystal structure of FKBP12 from *Aedes aegypti*. **Protein science**, v. 21, p. 1080-1084, 2012.

RAJKUMAR, S.; JEBANESAN, A. Bioactivity of flavonoid compounds from *Poncirus trifolia* L. (Family: Rutaceae) against the dengue vector, *Aedes aegypti* L. (Diptera). **Parasitology Research**, v. 104, n. 1, p. 19-25, 2008.

RAMESH, P.; YUVARAJAN, C.R. A new flavone methyl ether from *Helicteres isora*. **Journal Natural Products**, v. 58, p. 1242-1243, 1995.

RAVINDRAN, J.; SAMUEL, T.; ALEX, E.; WILLIAM, J. Adulticidal activity of *Ageratum houstonianum* Mill. (Asteraceae) leaf extracts against three vector mosquito species (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, p. 177-179, 2012.

REBEIZ, C.A.; JUVIK, J.A.; REBEIZ, C.C. Porphyrin insecticides: 1. Concept and phenomenology. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 30, n. 1, p. 11-27, 1988.

REEGAN, A. D.; GANDHI, M. R.; PAULRAJ, M. G.; BALAKRISHNA, K.; IGNACIMUTHU, S. Effect of niloticin, a protolimonoid isolated from *Limonia acidissima* L. (Rutaceae) on the immature stages of dengue vector *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Acta Tropica**, v. 139, p. 67-76, 2014.

REEGAN, A.D.; GANDHI, M.R.; PAULRAJ, M.G.; IGNACIMUTHU, S. Ovicidal and oviposition deterrent activities of medicinal plant extracts against *Aedes aegypti* L. and *Culex quinquefasciatus* Say Mosquitoes (Diptera: Culicidae), **Acta Tropica**, v. 6, p. 64-69, 2015.

REES, E.E.; PETUKHOVA, T.; MASCARENHAS, M. PELCAT, Y.; PGDEN, N.H. Environmental and social determinants of population vulnerability to Zika virus emergence at the local scale. **Parasite e vectors**, v. 11, n. 290, 2018.

RIBEIRO, L.M.S. **Respostas imunológicas e mecânicas em população suscetível e resistente *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: plutellidae) frente a formulações comerciais à base de *Bacillus thuringiensis* berliner**. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 76 pp. 2010.

RODRIGUES, R.P.; MANTOANI, S.P.; ALMEIDA, J.R.; PINSETTA, F.R.; SEMIGHINI, E.P.; SILDA, V.B.; SILVA, C.H.P. Estratégias de triagem virtual no planejamento de fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 739-776, 2012.

RODRIGUEZ, S.D.; DRAKE, L.L.; PRICE, D.P; HAMMOND, J.I.; HANSEN, I.A. The Efficacy of Some Commercially Available Insect Repellents for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Insect Science**. v. 15, n. 1, p. 1-5, 2015.

ROGIER, E.W.; MOSS, D.M.; MACE, K.E.; CHANG, M.; JEAN, S.E.; BULLARD, S.M.; LAMMIE, P.J.; LEMOINE, J.F.; UDHAYAKUMAR, V. Use of bead-based serologic assay to evaluate chikungunya virus epidemic, Haiti. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 6, p. 995-1001, 2018.

ROJAS-PINZÓN, P.A.; SILVA-FERNÁNDEZ, J.J.; DUSSÁN, J. Laboratory and simulated-field bioassays for assessing mixed cultures of *Lysinibacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae resistant to temephos. **Applied Entomology and Zoology**, v. 53, p. 183-191, 2018.

SABA, M.D. **Morfologia polínica de malvaceae: implicações taxonômicas e filogenéticas**. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana-BA, 2007.

SAHANE, R.; KANADE, P.; NIGADE, P.; CHAUDHARI, H. Protective effect of flavonoid rich fraction of *Helicteres isora* (L.) fruit on gentamicin induced nephrotoxicity in wistar rats. **International Journal of Applied Research**, v. 3, p. 169-173, 2017.

SALZBERG, S.L. Book Review: C4.5: Programs for Machine Learning Morgan Kaufmann Publishers by J. Ross Quinlan. Inc., 1993. Machine Learning, Kluwer Academic Publishers, Boston. **Manufactured in The Netherlands**, v. 16, p. 235-240, 1994.

SANTANA, H.T. **Estudo fitoquímico de *Piper alatabaccum* Trel & Yunck, 1950 e avaliação da atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) em condições de campo simulado**. Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Universidade Federal de Rondônia. Porto Velho-RO, 2012.

SANTOS, A.E. **Avaliação do potencial antioxidante e caracterização química das frações cromatográficas e extrato etanólico das folhas de *Bauhinia longifolia* (Bong.) Steudel**. Trabalho de Conclusão de Curso, Licenciatura em Química. Luz, MG, 2008.

SANTOS, E. A.; CARVALHO, C. M.; COSTA, A. L. S.; CONCEIÇÃO, A. S.; MOURA, F. B. P.; SANTANA, A. E. G. Bioactivity Evaluation of Plant Extracts Used in Indigenous Medicine against the Snail, *Biomphalaria glabrata*, and the Larvae of *Aedes aegypti*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, n.1, p.1-9, 2012.

SANTOS, D.B. **Atividade larvicida da *Copaifera langsdorffii* (Leguminosae), evidenciada pelas alterações morfohistológicas em *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae)**. Dissertação (Mestrado Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro) – Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO, 2015.

SAZIMA, M. *Helicteres ovata* (Sterculiaceae), pollinated by bats in southeaster Brazil. **Botanica Acta**. v. 101, p. 269-271, 1988.

SCHMITT, E. K.; HOEPFNER, D.; KRASTEL, P. Natural products as probes in pharmaceutical research. **Society for industrial microbiology and biotechnology**, p. 1-12, 2015.

SEELIG, F., BEZERRA, H., CAMERON, M., HIL, J., HISCOX, A., IRISH, S., JONES, R.T., LANG, T., LINDSAY, S.W., LOWE, R., NYONI, T.M., POWER, G.M., QUINTERO, J., STEWART-IBARRA, A.M., TUSTING, L.S., TYTHERIDGE, S., LOGAN, J.G. The COVID-19 pandemic should not derail global vector control efforts. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 14, n. 8, 2020.

SHUKLA, N.; GOSWAMI, R. B. Experimental evaluation of anti-inflammatory activity of *Helicteres isora* linn. **World Journal Pharmaceutical Research**, v. 5, p. 1420-1428, 2016.

SILVA, F.C. **Análise ROC**, 2006.

SILVA, B.G. **Quantificação de apoptose e necrose mediante corantes fluorescentes e análise de imagens no cultivo de células de inseto: o caso da *Drosophila melanogaster* S2**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, SP, 2007.

SILVA, M.R.M. **Malvaceae s.l. Juss. Serra Negra, Minas Gerais, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ecologia aplicada ao manejo e conservação de recursos naturais) – Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, MG, 2014.

SILVA, L.M.G.E. **Estudo químico biomonitorado por ensaio com larvas *Aedes aegypti* das espécies *Ocotea velloziana* (Meisn.) e *Aiouea trinervis* (Meisn.)** Tese – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, MS, 2010.

SILVA, S.L.C.; GUALBERTO, S.A.; CARVALHO, K.S.; FRIES, D.D. Avaliação da atividade larvicida de extratos obtidos do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Biotemas**, v. 27, p. 79-85, 2014.

SILVA, J.G.; SILVA, A.B.P.; MUNIZ, A.R.; SOUZA, L.M.O.; CONCEIÇÃO, E.S. Plantas medicinais trazidas da África para o Brasil: Africanizando o Brasil. **Anais do Congresso Nordeste de Biólogos (Congrebio)**. v. 6, 2016a. Disponível em: <<http://congresso.rebibio.net/congrebio2016/trabalhos/pdf/congrebio2016-et-05-002.pdf>>

SILVA, J.N.; DRUMOND, R.R.; MONÇÃO, N.B.N.; PERON, A.P.; SOUSA, J.M.C.; CITÓ, A.M.G.L.; FERREIRA, P.M.P. Estudo prospectivo sobre propriedades antineoplásicas de plantas da família Fabaceae: ênfase em *Mimosa caesalpiniiifolia*. **Revista GEINTEC**, v. 6, n. 3, p. 3304-3318, 2016b.

SILVA, G. E. A.; LIMA, R.N.; LANDA, G. G. Aspectos ecológicos de *Helicteres Sacarolha* ST.HIL. (Sterculiaceae) em um fragmento de mata urbana do município de

Belo Horizonte, MG. **In: VIII Congresso de Ecologia do Brasil.** Anais eletrônicos. Caxambu, MG, 2007. Disponível em: <<http://www.seb-ecologia.org.br/viiiiceb/pdf/949.pdf>>. Acesso em 08 jan. 2016.

SILVA, S.B.; SOUSA, V.C.; SANTOS, C.M.; MARIANO, D.C.; OKUMURA, R.S. Levantamento florístico do componente arbustivo-arbóreo da vegetação ciliar de fragmento no rio Parauapebas. **Agroecossistemas**, v. 9, n. 1, p. 99-115, 2017.

SINGARAPU, K.K.; RADEK, J.T.; TONELLI, M.; MARKLEY, J.L.; LAN, Q. Differences in the structure and dynamics of the apo- and palmitate-ligated forms of *Aedes aegypti* sterol carrier protein 2 (AeSCP-2). **Jbc Papers in Press**, 2010.

SOUSA, I.J.O.; ARAÚJO, S.; NEGREIROS, P.S.; FRANÇA, A.R.S.; ROSA, G.S.; NEGREIROS, F.S.; GONÇALVES, R.L.G. A diversidade da flora brasileira no desenvolvimento de recursos de saúde, **Revista UNINGÁ review**, v. 31, n.1, p. 35-39, 2017.

SOUZA, T.M.; FARIAS, D.F.; SOARES, B.M.; VIANA, M.P.; LIMA, G.P.G.; MACHADO, L.K.A.; MORAIS, S.M.; CARVALHO, A.F.U. Toxicity os Brazilian plant seed extracts to two strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and Nontarget animals. **Entomological Society of America**, v. 48, n. 4, p. 846-851, 2011.

SOUZA, V.A.; NAKAMURA, C.V.; CORRÊA, A.G. Atividade antichagásica de Lignanas e Neoligananas. **Revista virtual de química**, v. 4, n. 3, p. 197-207, 2012.

SOUZA, F. H. T. **Fitoquímica de *Borreria verticillata* (L.) G. MEY., *Borreria ocymoides* (BURM. F.) DC. e *Richardia brasiliensis* (Rubiaceae).** 2013. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2013.

SU, D.; GAO, Y.Q.; DAI, W.B.; HU, Y.; WU, Y.F.; MEI, Q.X. Helicteric acid, oleanic acid, and betulinic acid, three triterpenes from *Helicteres angustifolia* L., inhibit proliferation and induce apoptosis in HT-29 colorectal cancer cells via suppressing NF- κ B and STAT3 Signaling. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-8, 2017.

SUKARI, M.A.; NOOR, H.S.M.; BAKAR, N.H.A.; EE, G.C.L.; ISAMAIL, I.S.; RAHMANI, M.; ABDUL, A.B. Larvicidal carbazole alkaloids from *Murraya koenigii* against dengue fever mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, p. 7719-7721, 2013.

TALETE S.R.L. *Dragon* (Software for Molecular Descriptor Calculation). Version 7 Beta, Milano, 2016.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M.H. Moldock: a new technique for highaccuracy molecular docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3315–3321, 2006.

TELES, Y.C.F.; GOMES, R.A.; OLIVEIRA, M.S.; LUCENA, K.L.; NASCIMENTO, J.S.; AGRA, M. F.; IGOLI, J.O.; GRAY, A.I.; SOUZA, M.F.V. Phytochemical investigation of *Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presl and evaluation of its antibacterial activity. **Química Nova**, 37, 9, 2014.

TELES, Y.C.F. **Estudo fitoquímico de *Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presl (Malvaceae) e desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação do seu marcador químico.** Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2015.

TELES, Y.C.F.; CHAVES, O.S.; AGRA, M.F.; BATISTA, L.M.; QUEIROZ, A.C.; ARAÚJO, M. V.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S.; BRAZ-FILHO, R.; SOUZA, M. F.V. Chemical constituents from *Sidastrum paniculatum* and evaluation of their leishmanicidal activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 25, 363–368, 2015a.

TELES, Y.C.F.; HORTA, C.C.R; AGRA, M.F.; SIHERI, W.; BOYD, M.; IGOLI, J.O.; GRAY A. I.; SOUZA, M.F.V. New Sulphated Flavonoids from *Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presl (Malvaceae). **Molecules**, v. 20, p. 20161- 20172, 2015b.

THAM, H.W.; BALASUBRAMANIAM, V.; OOI, M.K.; CHEW, M.F. Viral determinants and vector competence of Zika virus. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 1040, 2018.

VARJÃO, R.R.; JARDIM, J.G.; CONCEIÇÃO, A.S. Rubiaceae Juss. De catanga na APA Serra Branca/Raso da Catarina, Bahia, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 13, n. 2, p. 105-123, 2013.

VALLI, M.; SANTOS, R. N. S.; FIGUEIRA, L. D.; NAKAJIMA, C. H.; GAMBOA, I. C.; ANDRICOPULO, A. D.; BOLZANI, V. S. Development of a natural products database from the biodiversity of Brazil. **Journal of natural products**, v. 1, n. 76, p. 439-444, 2013.

VAZEILLE, M.; DEHECQ, J.S.; FAILLOUX, A.B. Vectorial status of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* of la reunion island for Zika virus. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 32, p. 251-254, 2018.

VECHIA, L.D.; GNOATTO, S.C.B.; GOSMANN, G. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante, **Química nova**, v. 32, n. 5, p. 1245-1252, 2009.

VIANA, F.F.O. **Bioatividade dos extratos obtidos da parte aérea de *Aspidosperma pyrifolium* (Apocynaceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** Dissertação (Mestre em Meio ambiente e desenvolvimento), Itapetinga, BA, 2015.

VIVEKANANDHAN, P.; SENTHIL-NATHAN, S.; SHIVAKUMAR, M.S. Larvicidal, pupicidal and adult smoke toxic effects of *Acanthospermum hispidum* (DC) leaf crude extracts against mosquito vectors. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, p. 1-7, 2017.

XIE, F. Pesticide for pest control and preparation method thereof. **CN 107691525**, Feb 16, 2018.

WANG, Y.H.; CHANG, M.M.; WANG, X.L.; ZHENG, A.H.; ZOU, Z. The immune strategies of mosquito *Aedes aegypti* against microbial infection. *Developmental and Comparative Immunology*, p. 1-10, 2017.

WHO - World Health Organization. **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides**, WHO Technical Reports Series. WHO, Geneva, pp.1-41, 2005.

WHO - World Health Organization. **Guidelines for Efficacy testing of insecticides for indoor and outdoor ground-applied space spray applications**. WHO/HTM/NTDWHOPEs, 2009.

WHO - World Health Organization. **Guidelines for Efficacy testing of Spatial repellents. Control of neglected tropical diseases. Who pesticide evaluation scheme**. WHO/CDS/CPC/ MAL/13.12., Geneva, 58 pp, 2013.

YI, B.; HU, L.; MEI, W.; ZHOU, K.; WANG, H.; LUO, Y.; WEI, X.; DAI, H. Antioxidant phenolic compounds of Cassava (*Manihot esculenta*) from Hainan. **Molecules**, v. 16, p. 10157-10167, 2010.

YIN, X.; LU, Y.; CHENG, Z.H.; CHEN, D.F. Anti-Complementary Components of *Helicteres angustifolia*. **Molecules**, v. 21, p. 1506, 2016.

YU, K.X., Wong, C.L., Ahmad, R., Jantan, I. Mosquitocidal and oviposition repellent activities of the extracts of seaweed *Bryopsis pennata* on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Molecules**, v. 20, p. 14082-14102, 2015.

ZHANG, S., GOLBRAIKH, A., OLOFF, S., KOHN, H., TROPSHA, A. A novel automated lazy learning QSAR (ALL-QSAR) Approach: Method development, applications, and virtual screening of chemical database using validated ALL-QSAR models. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 46, pp. 1984–1995, 2006.

ZHOU, H.; REN, J.; LI, Z. Antibacterial activity and mechanism of pinoresinol from *Cinnamomum camphora* leaves against food-related bacteria. **Food control**, v. 79, p. 192-199, 2017.



ANEXO A. Artigo de revisão referente a tese (FERNANDES et al. 2020a). Doi: (10.21577/0100-4042.20170533) Fator de Impacto: 0.646 e Qualis: A4.

Quim. Nova, Vol. 43, No. 6, 787-803, 2020

<http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170533>

Helicteres L. SPECIES (Malvaceae *SENSU LATO*) AS SOURCE OF NEW DRUGS: A REVIEW

Diégina A. Fernandes^{a,*}, Edileuza B. de Assis^{a,b}, Maria Sallett R. Souza^{a,b}, Pedro Isaac Vanderlei de Souza^b and Maria de Fátima Vanderlei de Souza^{a,b,*}

^aDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900 João Pessoa – PB, Brasil

^bInstituto de Biociências, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 79070-900 Campo Grande – MS, Brasil

Recebido em 11/11/2019; aceito em 12/02/2020; publicado na web em 20/04/2020

Helicteres genus, Malvaceae, has pantropical distribution, encompasses about 60 species, 31 of them found in Brazil. Species belonging to this genus are used for treatment of various diseases and aroused scientific interest in search for bioactive compounds present in these plants. In this context, this review aims to provide a complete and concise overview of scientific advances in phytochemical and pharmacological studies of these species and their use by folk medicine. The presented data were collected from scientific databases, 'Web of Science', 'Scifinder', 'Pubmed', 'Sciencedirect', and 'Google Scholar', using the keyword 'Helicteres'. The species *H. isora* and *H. angustifolia*, found in Asia, are the most explored scientifically, whereas studies of species of this genus found in Americas are still rare, being possible to highlight studies carried out in Brazil with *H. velutina* and *H. eichleri*. About 149 compounds were isolated and characterized in the genus, being emphasized terpenoids, flavonoids and lignoids. These species have demonstrated various pharmacological properties *in vitro* and *in vivo*, including insecticide, antidiabetic, antitumor and hepatoprotective activities. The presented data show the importance of studies carried out isolating bioactive compounds from this genus that may be used in several diseases' treatment or/as prototypes to development of new drugs.

Keywords: *Helicteres* L.; secondary metabolite; ethnopharmacological relevance; scientific studies.

ANEXO B. Artigo original referente a tese (FERNANDES et al. 2018). Doi: (10.3390/molecules23112784). Fator de Impacto: 3.267 e Qualis: A2.



Article

New Sulphated Flavonoids and Larvicidal Activity of *Helicteres velutina* K. Schum (Sterculiaceae)

Diégina A. Fernandes¹, Maria S. R. Souza¹, Yanna C. F. Teles², Louise H. G. Oliveira³,
Jéssica B. Lima⁴, Adilva S. Conceição⁴, Fabíola C. Nunes³, Tania M. S. Silva⁵ and
Maria de Fátima Vanderlei de Souza^{1,6,*}

¹ Post Graduation Program in Bioactive Natural and Synthetic Products, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; diegina@ltf.ufpb.br (D.A.F.); sallett@ltf.ufpb.br (M.S.R.S.)

² Department of Chemistry and Physics, Agrarian Sciences Center, Federal University of Paraíba, Areia 58397-000, PB, Brazil; yanna@cca.ufpb.br

³ Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; louiseaguimaraes@outlook.com (L.H.G.O.); fabiola@cbiotec.ufpb.br (F.C.N.)

⁴ Post Graduation Program in Plant Biodiversity, Department of Education, University of the State of Bahia, Paulo Afonso 41150-000, BA, Brazil; jessica.bl@hotmail.com (J.B.L.); adilva.souza@gmail.com (A.S.C.)

⁵ Department of Molecular Sciences, Rural Federal University of Pernambuco, Campus Dois Irmãos, Recife 52171-900, PE, Brazil; sarmentosilva@gmail.com

⁶ Post Graduation in Development and Technological Innovation in Medicines, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil

* Correspondence: mfvanderlei@ltf.ufpb.br; Tel./Fax: +55-83-3216-7351

Received: 9 June 2018; Accepted: 22 August 2018; Published: 27 October 2018



Abstract: *Helicteres velutina* K. Schum (Sterculiaceae), commonly known in Brazil as ‘pitó’, is traditionally used by indigenous peoples as insecticides and repellents. The present work reports on the phytoconstituents from aerial parts of *H. velutina* and evaluation of the larvicidal potential of its extract. The compounds were isolated using chromatographic techniques and identified by NMR, IR and LC-HRMS. This study led to the isolation of a fatty acid, one aliphatic alcohol, four chlorophyll derivatives, one steroid, triterpenes, a lignan, and flavonoids, highlighting the new compounds in the literature, 5,4'-di-hydroxy-7-methoxy-8-O-sulphate flavone (mariahine) (15a) and 5,3'-di-hydroxy-7,4'-dimethoxy-8-O-sulphate flavone (condadine) (15b). The work presented here contributes to the chemotaxonomic knowledge of the Sterculiaceae family by describing the occurrence of sulphated flavonoids in this family for the first time. The crude ethanolic extract of *H. velutina* featured robust larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae, showing that the extract can be useful as a domestic larvicide, just as indicated by traditional use, to combat *A. aegypti*, a vector insect of severe viral diseases, such as dengue and Zika.

Keywords: *Helicteres velutina*; Sterculiaceae; sulphated flavonoids; larvicidal activity; *Aedes aegypti*

ANEXO C. Artigo original referente a tese (FERNANDES et al. 2019). Doi: (10.3390/molecules24122315). Fator de Impacto: 3.267 e Qualis: A2.



molecules



Article

Larvicidal Compounds Extracted from *Helicteres velutina* K. Schum (Sterculiaceae) Evaluated against *Aedes aegypti* L.

Diégina A. Fernandes¹, Renata P. C. Barros¹, Yanna C. F. Teles² , Louise H. G. Oliveira³,
Jéssica B. Lima⁴, Marcus T. Scotti¹ , Fabíola C. Nunes³, Adilva S. Conceição⁴ and
Maria de Fátima Vanderlei de Souza^{1,5,*}

- ¹ Post graduation Program in Bioactive Natural and Synthetic Products, Research Institute for Drugs and Medicines (IPeFarM), Federal University of Paraíba, 58051-900 João Pessoa, PB, Brazil; diegina@ltf.ufpb.br (D.A.F.); renatabarros@ltf.ufpb.br (R.P.C.B.); mtscotti@gmail.com (M.T.S.)
² Department of Chemistry and Physics, Agrarian Sciences Center, Federal University of Paraíba, 58397-000 Areia, PB, Brazil; yanna@cca.ufpb.br
³ Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, 58051-900 João Pessoa, PB, Brazil; louseguimaraes@outlook.com (L.H.G.O.); fabiola@cbiotec.ufpb.br (F.C.N.)
⁴ Post graduation Program in Plant Biodiversity, Department of Education, University of the State of Bahia, 41150-000 Paulo Afonso, BA, Brazil; jessica.bl@hotmail.com (J.B.L.); adilva.souza@gmail.com (A.S.C.)
⁵ Post graduation in Development and Technological Innovation in Medicines, Research Institute for Drugs and Medicines (IPeFarM), Federal University of Paraíba, 58051-900 João Pessoa, PB, Brazil
* Correspondence: mfvanderlei@ltf.ufpb.br; Tel.: +55-83-3216-7351; Fax: +55-83-3216-7351

Academic Editors: Valeria Patricia Sülsen and Albertina Moglioni

Received: 23 April 2019; Accepted: 17 June 2019; Published: 22 June 2019



Abstract: *Helicteres velutina* K. Schum (Sterculiaceae), a member of Malvaceae *sensu lato*, is a Brazilian endemic plant that has been used by the indigenous tribe Pankararé as an insect repellent. A previous study has reported the isolation of terpenoids, flavonoids and pheophytins, in addition to the larvicidal activity of crude *H. velutina* extracts derived from the aerial components (leaves, branches/twigs, and flowers). The present study reports the biomonitoring of the effects of fractions and isolated compounds derived from *H. velutina* against *A. aegypti* fourth instar larvae. A crude ethanol extract was submitted to liquid–liquid extraction with hexane, dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol to obtain their respective fractions. Larvicidal evaluations of the fractions were performed, and the hexane and dichloromethane fractions exhibited greater activities than the other fractions, with LC₅₀ (50% lethal concentration) values of 3.88 and 5.80 mg/mL, respectively. The phytochemical study of these fractions resulted in the isolation and identification of 17 compounds. The molecules were subjected to a virtual screening protocol, and five molecules presented potential larvicidal activity after analyses of their applicability domains. When molecular docking was analysed, only three of these compounds showed an ability to bind with sterol carrier protein-2 (1PZ4), a protein found in the larval intestine. The compounds tiliroside and 7,4'-di-*O*-methyl-8-*O*-sulphate flavone showed *in vitro* larvicidal activity, with LC₅₀ values of 0.275 mg/mL after 72 h and 0.182 mg/mL after 24 h of exposure, respectively. This is the first study to demonstrate the larvicidal activity of sulphated flavonoids against *A. aegypti*. Our results showed that the presence of the OSO₃H group attached to C-8 of the flavonoid was crucial to the larvicidal activity. This research supports the traditional use of *H. velutina* as an alternative insecticide for the control of *A. aegypti*, which is a vector for severe arboviruses, such as dengue and chikungunya.

Keywords: *Helicteres velutina*; *in silico* study; larvicidal activity; 7,4'-di-*O*-methyl-8-*O*-sulphate flavone; *Aedes aegypti*

ANEXO D. Artigo original referente a tese (FERNANDES et al. 2020b). Doi: (10.3390/molecules25133015). Fator de Impacto: 3.267 e Qualis: A2.



Article

Insights on the Larvicidal Mechanism of Action of Fractions and Compounds from Aerial Parts of *Helicteres velutina* K. Schum against *Aedes aegypti* L.

Diégina A. Fernandes ¹, Louise H. G. Oliveira ² , Hyago L. Rique ² ,
Maria de Fátima Vanderlei de Souza ¹ and Fabíola da Cruz Nunes ^{2,*}

¹ Post Graduation Program in Bioactive Natural and Synthetic Products, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; diegina@ltf.ufpb.br (D.A.F.); mfvanderlei@ltf.ufpb.br (M.d.F.V.d.S.)

² Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; louisehgoliveira@gmail.com (L.H.G.O.); hyagolrique@gmail.com (H.L.R.)

* Correspondence: fabiola_cnunes@hotmail.com or fabiola@cbiotec.ufpb.br; Tel.: +55-83-3216-7511; Fax: +55-83-3216-7511

Academic Editor: Josphat Matasyoh

Received: 27 May 2020; Accepted: 23 June 2020; Published: 1 July 2020



Abstract: Viral diseases transmitted by the female *Aedes aegypti* L. are considered a major public health problem. The aerial parts of *Helicteres velutina* K. Schum (Sterculiaceae) have demonstrated potential insecticidal and larvicidal activity against this vector. The objective of this research was to investigate the mechanisms of action involved in the larvicidal activity of this species. The cytotoxicity activity of *H. velutina* fractions and compounds of crude ethanolic extract of the aerial parts of this species was assessed by using fluorescence microscopy and propidium iodide staining. In addition, the production of nitric oxide (NO) and hemocyte recruitment were checked after different periods of exposure. The fluorescence microscopy revealed an increasing in larvae cell necrosis for the dichloromethane fraction, 7,4'-di-*O*-methyl-8-*O*-sulphate flavone and hexane fraction (15.4, 11.0, and 7.0%, respectively). The tiliroside did not show necrotic cells, which showed the same result as that seen in the negative control. The NO concentration in hemolymph after 24 h exposure was significantly greater for the dichloromethane fraction and the 7,4'-di-*O*-methyl-8-*O*-sulphate flavone (123.8 and 56.2 μ M, respectively) when compared to the hexane fraction and tiliroside (10.8 and 8.3 μ M, respectively). The presence of plasmocytes only in the dichloromethane fraction and 7,4'-di-*O*-methyl-8-*O*-sulphate flavone treatments suggest that these would be the hemocytes responsible for the highest NO production, acting as a defense agent. Our results showed that the larvicidal activity developed by *H. velutina* compounds is related to its hemocyte necrotizing activity and alteration in NO production.

Keywords: 7,4'-di-*O*-methyl-8-*O*-sulphate flavone; tiliroside; nitric oxide; cytotoxicity; larvicidal activity

ANEXO E. Artigo original referente a tese (FERNANDES et al. 2021). Doi: (10.29374/2527-2179.bjvm112120). Qualis: B3.

SCIENTIFIC ARTICLE

Ovicidal, pupicidal, adulticidal, and repellent activity of *Helicteres velutina* K. Schum against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae)

Atividade ovicida, pupicida, adulticida, e repelente de *Helicteres velutina* K. Schum contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae)

Diégina Araújo Fernandes¹, Hyago Luiz Rique², Louise Helena Guimarães de Oliveira³,
Willas Greison Silva Santos², Maria de Fátima Vanderlei de Souza⁴ & Fabiola da Cruz Nunes⁵

¹ Pharmacist, MSc. Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNB), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, PB, Brasil.

² Curso de Graduação em Biotecnologia, UFPB, João Pessoa, PB, Brasil.

³ Biotechnologist, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PgBiotec), UFPB, João Pessoa, PB, Brasil.

⁴ Pharmacist, DSc. Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPB, João Pessoa, PB, Brasil.

⁵ Veterinarian, DSc. Departamento de Biologia Celular e Molecular, UFPB, João Pessoa, PB, Brasil.

Abstract

Aedes aegypti is a vector of emerging and neglected diseases, such as dengue, chikungunya, and Zika. *Helicteres velutina*, known as "pitó" in Brazil, is traditionally used as an insect repellent, and several studies have demonstrated its larvicidal activity. The aim of this study was to investigate this species and evaluate its potential ovicidal, pupicidal, adulticidal, and repellent activity. The viability of the eggs was evaluated using different concentrations of the test substances for 25 days. The hexane fraction killed 72.7% of the eggs, while dichloromethane killed 67.7%. The survival of the pupae and adults was verified after 72 h and 48 h, respectively. The LC_{50} for the hexane and dichloromethane fractions was 0.12 mg/mL and 8.85 mg/mL for pupae, 8.01 mg/mL and 0.74 mg/mL for adults (tarsal test), and 0.05 mg/mL and 0.23 mg/mL for adults (body test), respectively. Repellency was assessed for 240 min using neonatal Wistar rats on a Y-tube olfactometer. The hexane fraction attracted mosquitoes to the test chamber, while the dichloromethane fraction had a repellent action. The 7,4'-di-O-methyl-8-O-sulfate flavone provides greater repellency, and this finding is similar to the results of the *in silico* studies that have shown the potential of this substance against adult mosquitoes. This suggests that 7,4'-di-O-methyl-8-O-sulfate flavone may be one of the substances present in the extract from aerial parts of *H. velutina* that is responsible for the repellent activity mentioned in traditional medicine. These findings provide a better understanding of the insecticidal and repellent activity of the extract, fraction, and compounds isolated from *H. velutina* against *Ae. aegypti*, thereby revealing its potential in the development of a more effective botanical insecticide.

Keywords: *Helicteres velutina*, insecticidal activity, repellent activity, *Aedes aegypti*, neglected diseases.



How to cite: Fernandes, D.A., Rique, H.L., Oliveira, L.H.G., Santos, W.G.S., Souza, M.F.V., & Nunes, F.C. (2021). Ovicidal, pupicidal, adulticidal, and repellent activity of *Helicteres velutina* K. Schum against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, 43, e112120. <http://dx.doi.org/10.29374/2527-2179.bjvm112120>.

Received: May 5, 2020.

Accepted: September 9, 2020

*Correspondence

Fabiola da Cruz Nunes
Departamento de Biologia Molecular,
Universidade Federal da Paraíba – UFPB
Centro de Biotecnologia, Campus I - Lot.
Cidade Universitária, Campus João Pessoa
CEP 58051-970 - João Pessoa (PB), Brasil
E-mail: fabiola@cbiotec.ufpb.br

ANEXO F. Parecer de aprovação pelo Comitê de Ética Animal (CEUA-UFPB)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo fitoquímico de *Helicteres velutina* K. Shum (Sterculiaceae) e exploratório da atividade inseticida e repelente do seu extrato, fases e substâncias isoladas contra o *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae)", protocolo nº 095/2016 sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. Fabíola da Cruz Nunes – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB).

Vigência do Projeto	2017 – 2021
Espécie/linhagem	<i>Mus musculus</i> / Swiss
Número de animais	36
Idade/Peso	30 g / 6-8 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério Thomas George - UFPB

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
CEUA-UFPB