



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RAÍRA JUSTINO OLIVEIRA COSTA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DE *Hymenaea martiana* HAYNE  
(FABACEAE) EM *Aedes aegypti* E TOXICOLÓGICA EM *Mus musculus* E ANÁLISE DE  
SEU PERFIL FITOQUÍMICO

RECIFE

2023

RAÍRA JUSTINO OLIVEIRA COSTA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DE *Hymenaea martiana* HAYNE  
(FABACEAE) EM *Aedes aegypti* E TOXICOLÓGICA EM *Mus musculus* E ANÁLISE DE  
SEU PERFIL FITOQUÍMICO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Produtos Naturais e seus compostos bioativos.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ivone Antônia de Souza  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia Vanusa da Silva

RECIFE

2023

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Costa, Raíra Justino Oliveira.

Avaliação da atividade inseticida de *Hymenaea martiana* Hayne FABACEAE em *Aedes aegypti* e toxicológica em *Mus musculus* e análise de seu perfil fitoquímico / Raíra Justino Oliveira Costa. - Recife, 2023.

106 f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2023.

Orientação: Ivone Antônia de Souza.

Coorientação: Márcia Vanusa da Silva.

Inclui referências e apêndices.

1. Controle vetorial; 2. Estimulante do sistema nervoso central; 3. Extratos vegetais; 4. Testes de toxicidade aguda; 5. Testes de toxicidade subaguda. I. Souza, Ivone Antônia de. II. Silva, Márcia Vanusa da. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

RAÍRA JUSTINO OLIVEIRA COSTA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DE *Hymenaea martiana* HAYNE  
(FABACEAE) EM *Aedes aegypti* E TOXICOLÓGICA EM *Mus musculus* E ANÁLISE DE  
SEU PERFIL FITOQUÍMICO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Tese aprovada em: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ivone Antônia de Souza (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosali Maria Ferreira da Silva (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Jane Sheila Higino (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Ricardo Brandão  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Karine da Silva Carvalho  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba

*Dedico esta tese a todos que não tiveram as mesmas oportunidades que a educação me proporcionou. Que este trabalho seja uma lembrança do poder transformador do conhecimento.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser um conforto constante ao longo desta jornada.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ivone Antônia de Souza, pela confiança depositada no meu trabalho, pela paciência, dedicação, incentivo e amizade ao longo dessa trajetória. Agradeço por me acolher em seu laboratório e investir no meu crescimento acadêmico e pessoal.

À minha coorientadora, Dr.<sup>a</sup> Márcia Vanusa da Silva, pela valiosa contribuição e suporte no desenvolvimento deste projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (UFPE), pela oportunidade de realização do mestrado e agora do doutorado. Aos professores do programa, pelo compartilhamento de saberes, e à equipe da secretaria, pela prontidão e eficiência em facilitar meu percurso acadêmico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro que viabilizou a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental, do Departamento de Antibióticos da UFPE, que compartilharam comigo os desafios e as conquistas desta caminhada. Em especial, ao amigo e companheiro Rômulo Carlos, cuja presença foi essencial em todo esse processo.

Às minhas alunas de Iniciação Científica, Cleonice e Marcilene, pela dedicação, empenho e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus avós, cuja dedicação e sacrifícios foram fundamentais para oferecer melhores condições de vida a seus filhos e netos. Em especial, à minha avó Marcelina, exemplo maior de amor, força e coragem, que continua a inspirar minhas conquistas, mesmo *in memoriam*. Aos queridos Francisco e Severino, também em memória, minha eterna gratidão. E à minha avó Maria, viva e presente, obrigada por ser luz e apoio constante.

Aos meus pais, Francisca e Lairton, pela base sólida de valores e educação, pelos sacrifícios realizados e pelo apoio incondicional nos momentos mais difíceis. Tudo o que faço é por vocês!

À minha irmã, Raiane, por ser meu porto seguro e minha companhia em todos os momentos, compartilhando alegrias e desafios. Obrigada por sempre estar ao meu lado.

À minha família, em especial às tias e primos, pela torcida constante, paciência, ligações e orações dedicadas ao meu sucesso. Amo vocês!

A Maira Rodrigues, minha grande motivadora, que com sua presença sempre trouxe conforto, serenidade e força para seguir em frente.

Aos amigos que sempre estiveram ao meu lado e àqueles que conheci ao longo desta jornada, minha gratidão por todos os momentos de descontração, apoio e alegria.

## RESUMO

A utilização de plantas tem se tornado de grande relevância na descoberta de moléculas com diferentes atividades biológicas, como por exemplo, inseticidas. As pesquisas com utilização de óleos e extratos vegetais têm ampliado uma série de ações no controle de vetores de doenças e pragas, como *Aedes aegypti*, mosquito transmissor dos vírus responsáveis por doenças como dengue, Zika, chikungunya e febre amarela urbana. Todavia, é importante investigar a seguridade no uso dessas moléculas e toxicidade a organismos não-alvos. Sendo assim, o objetivo dessa pesquisa, foi avaliar o potencial toxicológico do extrato etanólico bruto das folhas de *Hymenaea martiana* Hayne (EEBHm) sobre larvas e pupas de *Ae. aegypti* e *Mus musculus*, bem como a prospecção fitoquímica do extrato. Para a análise química do extrato, seguiu-se as metodologias de cromatografia em camada delgada e reação química propostas por Harbone (1998) e de Wagner e Bladt (1996). Para avaliação da atividade larvicida e pupicida, foram utilizadas diferentes concentrações (10, 7,5, 5 e 2,5 mg/mL) do EEBHm. As análises foram realizadas em triplicata. Para a avaliação das toxicidades do EEBHm, foram utilizadas fêmeas de camundongos Swiss (*Mus musculus*). A toxicidade aguda e subaguda baseou-se nos protocolos propostos pela *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD). Os dados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey. Na análise química realizada, foi confirmada no EEBHm a presença de flavonoides, cumarinas, terpenos e saponinas. Após 24 horas do experimento larvicida, foi observado que as larvas expostas apresentaram uma mortalidade superior a 90% em todas as concentrações utilizadas, o que não foi observado no grupo controle negativo. Sendo também observado o pico de mortalidade do experimento após 1 hora do início. Em relação ao teste pupicida no decorrer das 24 horas de exposição, às concentrações de 10, 7,5 e 5 mg/mL apresentaram superior a 90% de mortalidade e a concentração de 2,5 mg/mL um percentual de 53,3%, sendo observado o pico de mortalidade, após 4 horas de experimento. No teste de toxicidade aguda, os resultados do ensaio classificaram o extrato na categoria 5 (tendo como referência o *Globally Harmonised System* – GHS) e sua Dose Letal média (DL<sub>50</sub>) foi estipulada como  $\geq 5000$  mg. No teste de toxicidade subaguda, houve ausência de efeitos clínicos tóxicos graves em *Mus musculus* e aumento de parâmetros hematológicos como hemoglobina. Portanto, foi notado que o EEBHm apresentou ação larvicida e pupicida sobre *Ae. aegypti* e não mostrou sinais graves de toxicidade aos camundongos, o que é indicativo de uma maior segurança ao utilizar o extrato. Ainda em relação aos testes de toxicidade, foi possível observar ações estimulantes do EEBHm sobre o sistema nervoso central e um poder nutricional relacionado ao aumento da hemoglobina dos animais.

**Palavras-chave:** Controle Vetorial. Estimulante do Sistema Nervoso Central. Extratos vegetais. Testes de Toxicidade Aguda. Testes de Toxicidade Subaguda.

## ABSTRACT

The use of plants has become of great relevance in the discovery of molecules with different biological activities, such as insecticides. Research using plant oils and extracts has expanded a series of actions to control disease and pest vectors, such as *Aedes aegypti*, the mosquito that transmits the viruses responsible for diseases such as dengue, Zika, chikungunya and urban yellow fever. However, it is important to investigate safety in the use of these molecules and toxicity to non-target organisms. Therefore, the objective of this research was to evaluate the toxicological potential of the crude ethanolic extract of the leaves of *Hymenaea martiana* Hayne (EEBHm) on larvae and pupae of *Ae. aegypti* and *Mus musculus*, as well as the phytochemical prospection of the extract. For the chemical analysis of the extract, the methodologies of thin layer chromatography and chemical reaction proposed by Harbone (1998) and Wagner and Bladt (1996) were followed. To evaluate the larvicidal and pupicidal activity, different concentrations (10, 7.5, 5 and 2.5 mg/mL) of EEBHm were used. Analyzes were performed in triplicate. For the evaluation of the EEBHm toxicities, female Swiss mice (*Mus musculus*) were used. Acute and subacute toxicity was based on protocols proposed by the Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). Data were analyzed by Analysis of Variance (ANOVA), followed by Tukey's test. In the chemical analysis carried out, the presence of flavonoids, coumarins, terpenes and saponins was identified in the EEBHm. After 24 hours of the larvicidal experiment, it was observed that the exposed larvae showed a mortality greater than 90% in all concentrations used, which was not observed in the negative control group. The peak mortality of the experiment was also observed 1 hour after the beginning. Regarding the pupicidal test during the 24 hours of exposure, the concentrations of 10, 7.5 and 5 mg/mL showed greater than 90% mortality and the concentration of 2.5 mg/mL a percentage of 53.3%, with the mortality peak being observed after 4 hours of the experiment. In the acute toxicity test, the test results classified the extract in category 5 (with reference to the Globally Harmonized System – GHS) and its average Lethal Dose (LD<sub>50</sub>) was stipulated as  $\geq 5000$  mg. In the subacute toxicity test, there was an absence of severe toxic clinical effects in *Mus musculus* and an increase in hematological parameters such as hemoglobin. Therefore, it was observed that the EEBHm presented larvicidal and pupicidal action on *Ae. aegypti* and did not show severe signs of toxicity to mice, which is indicative of greater safety when using the extract. Still in relation to the toxicity tests, it was possible to observe stimulating actions of the EEBHm on the central nervous system and a nutritional power related to the increase of the hemoglobin of the animals.

**Keywords:** Vector Control. Central Nervous System Stimulant. Plant extracts. Acute Toxicity Tests. Subacute Toxicity Tests.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Esquemática do ciclo biológico de <i>Aedes aegypti</i> .....	15
Figura 2 -	Imagem ilustrativa de <i>Aedes aegypti</i> e suas características morfológicas.....	17
Figura 3 -	Imagens de <i>Hymenaea martiana</i> Hayne.....	30
Figura 4 -	Mapa da região do Parque Nacional do Catimbau – PE.....	30
Figura 5 -	Evaporador Rotativo usado para concentração EEBHm.....	31
Quadro 1 -	Metabólitos secundários, fases móveis, reveladores e padrões usados no perfil fitoquímico do EEBHm.....	32
Figura 6 -	Fluxograma representando a metodologia de toxicidade aguda segundo OECD.....	35
Gráfico 1 -	Média do número de larvas mortas de <i>Aedes aegypti</i> , após exposição a diferentes concentrações do EEBHm, em 24 horas.....	40
Gráfico 2 -	Mortalidade de larvas de <i>Aedes aegypti</i> submetidas ao EEBHm em relação ao tempo de exposição.....	40
Gráfico 3 -	Média do número de pupas mortas de <i>Aedes aegypti</i> , após exposição a diferentes concentrações do EEBHm, em 24 horas.....	41
Gráfico 4 -	Mortalidade de pupas de <i>Aedes aegypti</i> submetidas ao EEBHm em relação ao tempo de exposição.....	42
Figura 7 -	Avaliação da CL50 e CL90 do EEBHm sobre larvas (A) e pupas (B) de <i>Aedes aegypti</i> .....	43
Figura 8 -	Peso médio de camundongos fêmeas após administração, por via oral (VO), do EEBHm na dose de 2000 mg/kg.....	49
Gráfico 5 -	Consumo semanal de água (mL) por <i>Mus musculus</i> durante 28 dias de tratamento com o EEBHm.....	52
Gráfico 6 -	Consumo semanal de ração (g) por <i>Mus musculus</i> durante 28 dias de tratamento com o EEBHm.....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estágios de vida de <i>Ae. aegypti</i> .....	15
Tabela 2 -	Prospecção fitoquímica do EEBHm.....	38
Tabela 3 -	Sinais clínicos e taxa de mortalidade após administração por via oral do EEBHm em Camundongos <i>Mus musculus</i> no teste de toxicidade aguda.....	45
Tabela 4 -	Principais sinais clínicos após administração por via oral do EEBHm em Camundongos <i>Mus musculus</i> no teste de toxicidade subaguda.....	50
Tabela 5 -	Média do peso corporal (média $\pm$ desvio padrão) de camundongos fêmeas <i>Mus Musculus</i> tratados por via oral com o EEBHm.....	54
Tabela 6 -	Peso dos órgãos (gramas $\pm$ desvio padrão) dos animais tratados com EEBHm após 28 dias.....	54
Tabela 7 -	Valores médios da dosagem sérica (média $\pm$ desvio padrão) de AST, ALT, ureia, creatinina de camundongos Swiss <i>Mus musculus</i> tratados com EEBHm via oral por 28 dias nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg e no grupo controle.....	55
Tabela 8 -	Efeitos do EEBHm sobre os parâmetros hematimétricos dos camundongos <i>Mus musculus</i> .....	56

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>13</b>
2.1	<i>Aedes aegypti</i> (DIPTERA: CULICIDAE), (LINNAEUS, 1762) .....	13
2.2	IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA E ARBOVIROSES.....	17
2.3	MEDIDAS DE CONTROLE CONTRA <i>Aedes aegypti</i> E RESISTÊNCIA A INSETICIDAS .....	20
2.4	PLANTAS E SEUS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	22
<b>2.4.1</b>	<b>A flora da Caatinga.....</b>	<b>24</b>
2.5	TOXICIDADE DOS PRODUTOS NATURAIS.....	25
2.6	<i>Hymenaea martiana</i> HAYNE.....	27
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
3.1	MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO DO EXTRATO.....	29
<b>3.1.1</b>	<b>Processamento do material vegetal.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Preparação do extrato bruto etanólico.....</b>	<b>31</b>
3.2	ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	32
3.3	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	33
3.3.1	<b>Ensaio inseticidas.....</b>	<b>33</b>
3.3.1.1	Estabelecimento e manutenção da colônia.....	33
3.3.1.2	Avaliação da atividade larvicida do EEBHm.....	33
3.3.1.3	Avaliação da atividade pupicida do EEBHm.....	34
3.3.1.4	Análise dos dados e tabulação dos resultados.....	34
<b>3.3.2</b>	<b>Ensaio de toxicidade .....</b>	<b>34</b>
3.3.2.1	Animais.....	34
3.3.2.2	Toxicidade aguda.....	35
3.3.2.3	Toxicidade subaguda.....	36
3.3.2.3.1	<i>Análise bioquímica e hematológica.....</i>	<i>37</i>
3.3.2.4	Análise estatística.....	37
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
4.1	RENDIMENTO DO EXTRATO E ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	37
4.2	ATIVIDADE INSETICIDA.....	39
4.3	TOXICIDADE AGUDA.....	44
4.4	TOXICIDADE SUBAGUDA.....	49
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>58</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>59</b>
	<b>APÊNDICE A – ARTIGO 1.....</b>	<b>79</b>
	<b>APÊNDICE B – ARTIGO 2.....</b>	<b>93</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Historicamente, os produtos naturais e seus análogos estruturais têm contribuído constantemente para a farmacoterapia, oferecendo características especiais em comparação às moléculas sintéticas convencionais, que conferem vantagens e desafios ao processo de descoberta de medicamentos. Nos últimos anos, os avanços nos desenvolvimentos tecnológicos e científicos têm aberto novas oportunidades e, conseqüentemente, facilitado os estudos na área farmacológica (Atanasov, 2021).

Esses produtos representam uma fonte inesgotável para a descoberta de novos agentes terapêuticos. A estrutura complexa dos vegetais lhes confere propriedades biológicas importantes à sua sobrevivência, desempenhando um papel relevante nos programas de descoberta de novas drogas (Litaudon *et al.*, 2019).

As plantas desenvolveram processos fisiológicos sofisticados para combater ameaças, como ataques de patógenos e condições físicas adversas (seca, salinidade, temperatura e exposição à radiação ultravioleta). Os vegetais reconhecem os sinais de ameaça e criam respostas de defesa, como a síntese de metabólitos secundários. Esses compostos, incluindo óleos voláteis, flavonoides, alcaloides, glicosídeos e taninos, auxiliam na sobrevivência vegetal e apresentam atividades biológicas importantes, como no desenvolvimento de produtos farmacêuticos de grande relevância industrial (Thakur *et al.*, 2019).

Esses compostos recebem o nome de metabólitos secundários, por não serem essenciais para os processos centrais de crescimento e desenvolvimento das plantas. Essas estruturas geralmente são exclusivas de espécies ou grupos de espécies específicas e mediam interações com outros organismos, interferindo, por exemplo, no metabolismo de insetos ao apresentar funções como atração ou aversão (Beran *et al.*, 2019; Savi; Aluizio; Glienke, 2019).

Esse conhecimento tem incentivado pesquisas que utilizam óleos e extratos vegetais, ampliando uma série de ações no controle de vetores de doenças e pragas, e despertado o interesse da comunidade científica. Tal fato contribui para o desenvolvimento de programas de manejo integrado para o controle de insetos vetores, visto que os inseticidas de origem botânica são biodegradáveis, apresentam baixo impacto ambiental e maior seletividade (Oliveira *et al.*, 2014; Freitas *et al.*, 2019).

Um dos maiores vetores de importância médica no Brasil atualmente é *Aedes aegypti*, mosquito originário da África e considerado relevante por ser transmissor de arboviroses que

causam doenças como dengue, zika, chikungunya e febre amarela urbana (Regis *et al.*, 2013; Wong; Poon; Wong, 2016; Freitas *et al.*, 2019).

Entre as viroses transmitidas por artrópodes, a dengue é a de maior distribuição e número de casos, causando aproximadamente 100 milhões de infecções anuais aparentes. Sua transmissão ocorre em mais de 120 países, e acredita-se que mais da metade da população mundial esteja em risco de contrair um dos seus quatro sorotipos: DEN1, DEN2, DEN3 e DEN4 (Bhatt *et al.*, 2013; Carvalho *et al.*, 2017). Apesar da primeira vacina contra essa doença ter sido licenciada em 2015/2016, ela não se mostrou eficaz para todos os sorotipos, e outras candidatas a vacinas ainda estão em fase de testes (Prompetchara *et al.*, 2019).

No final de 2019, o mundo foi impactado pela doença Covid-19, causada pelo *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2), ou Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave. Essa doença rapidamente se tornou pandêmica, provocando uma crise internacional de saúde pública com efeitos devastadores. As semelhanças clínicas entre Covid-19 e dengue levantaram preocupações em países endêmicos de dengue, como o Brasil, devido a recursos limitados. Além disso, a reatividade cruzada de anticorpos entre essas infecções é uma preocupação emergente, pois anticorpos DENV pré-existentes podem interferir no Covid-19 por meio de aprimoramento dependente de anticorpos (Harapan *et al.*, 2021; Rabiou *et al.*, 2021).

Diante disso, faz-se necessária a aplicação eficiente de formas de prevenção das arboviroses, como o controle vetorial. Entre as medidas de controle, destacam-se a vigilância entomológica, a partir da identificação e inspeção de possíveis criadouros, e o uso de inseticidas químicos, como organoclorados, organofosforados, piretroides e deltametrina. Contudo, o uso indiscriminado desses inseticidas químicos vem selecionando populações de vetores resistentes, além de causar impactos ambientais cada vez mais negativos (Braga; Valle, 2007; WHO, 2009; Zara *et al.*, 2016).

Uma alternativa para diminuir a resistência aos inseticidas é o uso de inseticidas naturais biodegradáveis, que reduzem o impacto sobre a biodiversidade e apresentam baixa ou nenhuma toxicidade para organismos não-alvo (Cruz *et al.*, 2016; Pimenta-Neto *et al.*, 2020).

Na busca por inseticidas botânicos, destaca-se a rica biodiversidade brasileira e seus ecossistemas. A combinação entre a diversidade biológica do Brasil e o conhecimento tradicional coloca o país em uma posição privilegiada para o desenvolvimento de novos produtos (Balbino; Dias, 2010; Pasa, 2011; Brasil, 2016; Fenalti *et al.*, 2016).

Entre os biomas brasileiros, destaca-se a Caatinga, única e exclusivamente brasileira. Entre as espécies de sua flora, figuram as da família Fabaceae, a terceira maior família de

angiospermas. No Brasil, são registrados 253 gêneros, sendo 18 endêmicos, e 3.031 espécies, das quais 1.586 são endêmicas. No Nordeste, foram catalogados 170 gêneros, 1.168 espécies e 637 endêmicas da Caatinga (Silva; Freire, 2010; Flora do Brasil, 2023).

Entre as plantas dessa família, encontra-se o gênero *Hymenaea*, neotropical e composto por 16 espécies no Brasil, das quais 13 são encontradas na Caatinga (Flora do Brasil, 2023). Árvores desse gênero são utilizadas na construção civil, ornamentação e cura de doenças. Estudos recentes com *Hymenaea sp.* indicam seu potencial fungicida, bactericida e praguicida, sendo empregada no sistema orgânico e agrícola (Judd *et al.*, 2009; Mercês, 2015).

A espécie *Hymenaea martiana* Hayne, em específico, é utilizada amplamente pelos habitantes de áreas que contam com sua presença pois, segundo o conhecimento popular, tanto as cascas como as folhas podem agir em diversas finalidades a citar: antibacteriana, antiespasmódica, antifúngica, anti-inflamatória, antioxidante, descongestionante, diurética, expectorante, fortificante, hepatoprotetora e vermífuga (Rocha *et al.*, 2018).

Diante da ampla utilização popular, das diversas aplicações e da ampla distribuição de *Hymenaea martiana* no ambiente da Caatinga, os estudos sobre seu potencial farmacológico são de extrema importância. Tais estudos podem fornecer evidências científicas que assegurem benefícios para a população e, ao mesmo tempo, minimizem os riscos associados ao uso da planta, além de explorar atividades ainda não investigadas.

Com base na literatura existente, nos relatos sobre o gênero *Hymenaea* e nos desafios relacionados ao controle de *Aedes aegypti*, o objetivo deste trabalho foi analisar a composição química do extrato etanólico de *H. martiana* e avaliar seu potencial no controle de *Aedes aegypti* e sua toxicidade em *Mus musculus*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE), (LINNAEUS, 1762)

O nome *Aedes aegypti*, deriva do grego aēdēs ("odioso") e do latim Ægypt ("do Egito"), essa nomenclatura taxonômica foi dada de acordo com Linnaeus, 1762, para o popularmente conhecido "mosquito da dengue" (Ferreira, 1986). É originário da África e foi descrito pela primeira vez no Egito, pertence ao filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Díptera, subordem Nematocera, família Culicidae, subfamília Culicinae, tribo Aedini e Gênero *Aedes* (Braga; Valle 2007; Terra *et al.*, 2017).

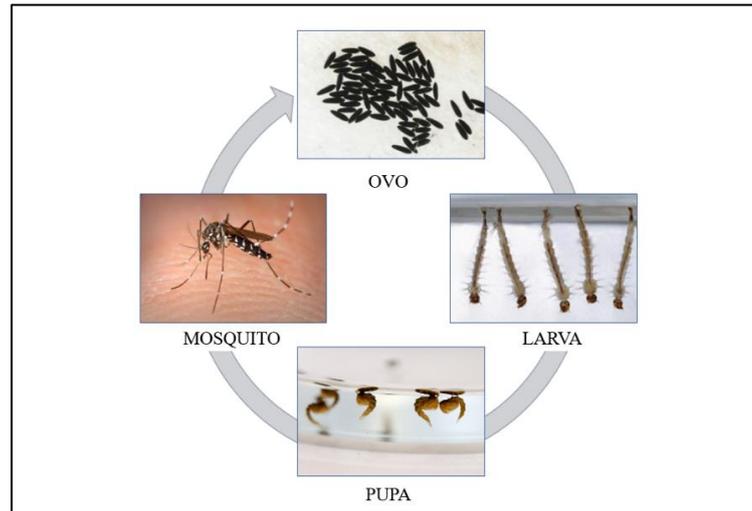
Recentemente, estudos demonstraram que o mosquito *Ae. aegypti* está estabelecido em 167 países (Wilkerson; Linton; Stickman, 2020). *Ae. aegypti* é uma espécie cosmopolita e de ampla dispersão, sobretudo nas regiões tropicais e subtropicais do globo, podendo ser encontrado em cerca de 23 países do continente americano, além do território africano, se estendendo a países europeus, como Portugal, podendo alcançar países da América do Norte, como os Estados Unidos da América. Inicialmente teve sua disseminação pelo continente americano facilitada principalmente por navios, aviões e veículos terrestres que transportavam ovos, larvas e, até mesmo, mosquitos adultos (Schaffner; Mathis, 2014; Ayuso, 2016).

A distribuição dessas espécies é em grande parte impulsionada pelo movimento humano e pela presença de clima adequado, o que aumenta o risco global de doenças transmitidas por esse mosquito (Kraemer, 2015). Em revisão, Gubler (2011) destaca que, além desses fatores, a falta de medidas de controle efetivas contribui para essa disseminação. No Brasil, a alta incidência desse vetor também se deve ao acelerado e desordenado processo de urbanização, bem como às condições climáticas e sociais que favorecem sua rápida proliferação (Busato *et al.*, 2014).

Nos grandes centros urbanos, onde a população humana está em grande número e vive em estreita convivência com grandes populações de mosquitos, ocorre um favorecimento para a manutenção dos vírus, especialmente para a geração periódica de cepas epidêmicas (Gubler, 2011). A predominância do mosquito em ambientes urbanos é favorecida pela grande quantidade de recipientes artificiais que oferecem condições adequadas para a conclusão de seu ciclo (Scott; Takken, 2012; Powell; Tabachnick, 2013).

A transmissão das arboviroses ocorre através da fêmea de *Ae. aegypti*. Para desenvolvimento do seu ciclo biológico as fêmeas realizam a *skip-oviposition* (colocam seus ovos em diversos locais, tais como, paredes úmidas de reservatórios ou até mesmo direto na água). Esses ovos podem resistir sem eclodir por longos períodos até entrarem em contato com a água e após a eclosão o vetor passa por quatro estágios larvais, torna-se pupa e em seguida adulto, como mostra a figura 1 (Zara *et al.*, 2016; Prud'homme *et al.*, 2017).

O tempo de amadurecimento para que o mosquito atinja a fase adulta depende de fatores ambientais como a temperatura, umidade e nutrição. Em regiões com clima tropical o ciclo biológico dura cerca de 10 dias e começa quando as fêmeas colocam seus ovos diretamente na água ou em paredes úmidas de criadouros para que aconteça a eclosão (Forattini, 2002; Santos, 2008; Clemons *et al.*, 2010). Na Tabela 1 é mostrado os dias do ciclo de vida desde o estágio larval até a fase adulta deste mosquito em um estudo realizado por Clemons e colaboradores (2010).

Figura 1 - Esquemática do ciclo biológico de *Aedes aegypti*

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

As fêmeas de *Ae. aegypti* são hematófagas e para completar seu ciclo de vida, precisam inicialmente realizar a ingestão de sangue, chamada de repasto sanguíneo. Esse sangue é essencial para a maturação de seus ovos e para o desenvolvimento larval (Oliveira *et al.*, 2014). Cada fêmea pode depositar entre 150 e 200 ovos, que preferencialmente, são depositados em locais úmidos, que facilmente possam ser inundados ou próximos à água e que podem ser criadouros naturais ou artificiais (Varejão *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2010).

Tabela 1 - Estágios de vida de *Ae. aegypti*

<b>Estádio</b>	<b>Dias</b>
Incubação de ovos / 1º instar	1-2
2º instar	3
3º instar	4
4º instar	7-8 (machos); 8-9 (fêmeas)
Pupa	7-9
Adulto	9 (machos); 10 (fêmeas)

Fonte: Adaptado de Clemons e colaboradores, 2010.

Os ovos são alongados e medem cerca de um milímetro de comprimento, podendo resistir a grandes períodos de desidratação. Inicialmente os ovos são brancos, em vinte e quatro horas sofrem oxidação e exibem coloração negra, e para a finalização da formação do embrião é necessário um período de quarenta e oito horas, processo estimulado por fatores como a baixa concentração de oxigênio disperso na água. Essa etapa é a de maior resistência e serve como uma estratégia de sobrevivência para regiões com invernos rigorosos (Beserra *et al.*, 2008; Silva; Poletto, 2012; Assunção, 2013).

Após a eclosão do ovo, inicia-se a etapa de larva. A larva divide-se em cabeça, tórax e abdome e apresenta um formato vermiforme alongado. A cabeça e o tórax são maiores que o abdome, que é fino, flexível e constituído por nove partes, o que garante grande mobilidade (Abed *et al.*, 2007). Possuem ciclo exclusivamente aquático, alimentam-se de restos orgânicos, bactérias e algas e a duração do seu estágio evolutivo depende de variáveis como temperatura, umidade, disponibilidade de alimento e densidade das larvas no criadouro, mas em condições normais não ultrapassam cinco dias (Beserra *et al.*, 2008). Esse estágio de larvas é crucial para a dinâmica populacional do mosquito, com a taxa de desenvolvimento sendo influenciada pela temperatura e a qualidade da água (Walker; Lynch, 2007).

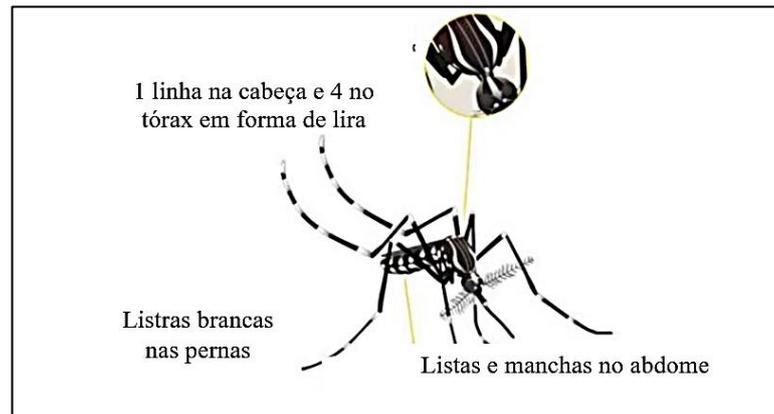
Logo em seguida, inicia-se a fase de pupa, que dura em média dois dias e meio, ainda em ambiente aquático. As pupas são divididas em cefalotórax e abdome, e a cabeça junta-se com o tórax, conferindo-lhe um aspecto de vírgula, sendo essa a última fase antes da transformação em adultos. Durante o período de pupa, o mosquito não se alimenta, pois está se preparando para a metamorfose, passando por modificações necessárias para a emergência do adulto. A pupação é uma fase sensível e crucial para o desenvolvimento do mosquito (Aciole, 2009; Palencia, 2012).

O adulto emerge da superfície da água e pousa nas paredes do reservatório esperando solidificar o exoesqueleto das asas e do aparelho reprodutor em um ângulo de 180°, o que facilitará a cópula e pode demorar algumas horas. Passando-se 24 horas da eclosão, fêmea e macho estão aptos para a cópula e reprodução, que ocorre durante o voo e após uma única inseminação a fêmea ficará fértil por toda a sua vida. Nessa fase, as fêmeas de *Ae. aegypti* necessitam da refeição de sangue, para maturação dos ovários e conseqüentemente a ovogênese (Nelson, 1986; Consoli; De Oliveira, 1998; Brasil, 2001; Rey, 2008; Miranda, 2019).

O mosquito adulto possui corpo longo, dividido em cabeça, tórax, abdômen e pernas alongadas. As asas funcionais são as posteriores, enquanto as anteriores são curtas e possuem halteres para equilíbrio durante o voo (Consoli; De Oliveira, 1998; Brasil, 2001).

Na fase adulta, os mosquitos têm hábitos diurnos, alimentam-se e colocam seus ovos com maior incidência entre 6h e 8h da manhã e entre 16h e 18h (Gomes; Sciavico; Eiras, 2006). *Ae. aegypti* tem coloração escura e mede cerca de 5 a 10 milímetros. Possui escamas brancas prateadas que conferem a aparência de faixas em sua cabeça, pernas e abdômen, conforme demonstrado na Figura 2 (Becker *et al.*, 2010; Morales Periñan *et al.*, 2019).

Figura 2 - Imagem ilustrativa de *Aedes aegypti* e suas características morfológicas



Fonte: Adaptado de Torres e colaboradores (2018).

## 2.2 IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA E ARBOVIROSES

A importância epidemiológica atribuída a este inseto, associa-se principalmente, pelo fato de transmitir doenças que acometem o homem e outros animais, como a dengue (ONG *et al.*, 2019), febre amarela (Cândido; Silva; Cavalcanti, 2019), zika (Dutra *et al.*, 2016) e a chikungunya (Cigarroa-Toledo *et al.*, 2016). Dengue, chikungunya e zika são consideradas doenças de notificação compulsória e estão presentes na Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública, do Ministério da Saúde (Brasil, 2019; Brasil, 2020).

No Brasil, anualmente os números associados a essas doenças são motivos de preocupação para saúde pública. Segundo o boletim epidemiológico mais recente do Ministério da Saúde, no período de 02 de janeiro de 2022 a 31 de dezembro de 2022, foram registrados no território brasileiro 1.450.270 casos prováveis de dengue, 174.517 casos prováveis de chikungunya e 9.204 prováveis casos de zika. Foram confirmados também nesse período, 1.473 casos de dengue grave e 18.145 casos de dengue com sinais de alarme, além do registro de 1.016 óbitos causados por dengue e 94 por chikungunya (Brasil, 2023).

Essas doenças são também chamadas de arboviroses, pois parte do ciclo replicativo ocorre nos insetos, e são consideradas um grande desafio de saúde pública. As arboviroses que causam patologias em humanos e animais de sangue quente são as pertencentes às famílias *Bunyaviridae*, *Togoviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae*. Situações como o desmatamento, variações climáticas e ambientais facilitam a disseminação do mosquito e, conseqüentemente, da transmissão desses vírus (Lopes; Nozawa; Linhares, 2014).

Os arbovírus transmitidos pelos mosquitos mantêm um ciclo de vida que passa de um mosquito infectado para um hospedeiro saudável, e continua com a passagem do vírus de um hospedeiro virêmico para um mosquito (Yu *et al.*, 2019). A passagem do vírus para as fêmeas de *Ae. aegypti* (apenas as fêmeas se alimentam de sangue humano) ocorre após a ingestão de sangue contaminado. Após a contaminação inicial, ocorre a multiplicação dos vírus no seu intestino e a infecção de tecidos, fazendo com que eles cheguem às glândulas salivares, transmitindo a doença enquanto estiver vivo (Jardim; Schall, 2009).

O processo de transmissão das doenças para os humanos se dá no momento do repasto sanguíneo, onde as partículas virais presentes no inseto são injetadas na corrente sanguínea da pessoa, juntamente com a saliva do mosquito. Nos seres humanos o ciclo replicativo começa pelas células estriadas, depois ocorre a viremia e dissemina-se por todo o organismo do hospedeiro (Jardim; Schall, 2009; Valle, 2017).

Para sobreviver e manter um ciclo entre diferentes ambientes, os arbovírus transmitidos por mosquitos exploram abordagens sofisticadas, incluindo subverter o sistema imunológico, sequestrar fatores de defesa do hospedeiro e tirar proveito dos micróbios intestinais (Yu *et al.*, 2019).

As infecções transmitidas pelo *Ae. aegypti* estão associadas a problemas sérios de saúde e requerem atenção e cada uma das infecções transmitidas pelo mosquito possuem características específicas. A febre amarela urbana, é transmitida por um vírus pertencente ao gênero *Flavivirus*. O quadro clínico da doença é bifásico, na primeira fase, os sintomas são leves e moderados e, posteriormente, o caso pode evoluir para a forma mais grave, com manifestações hemorrágicas (Anjos *et al.*, 2014).

A chikungunya, tem como agente etiológico o vírus do gênero *Alphavirus* dificilmente apresenta sinais de hemorragias, mas apresenta quadro de febre associada à dor articular intensa e debilitante. A infecção é frequentemente caracterizada por artralgia debilitante crônica acometendo principalmente os punhos, tornozelos e cotovelos (Donalísio; Freitas, 2015; Moraes *et al.*, 2019).

Já o Zika vírus, do gênero *Flavivirus*, apresenta como sintomas principais da sua infecção, exantema, febre, artralgia, mialgia, cefaleia e conjuntivite. Ocasionalmente podem ocorrer dor de garganta, tosse, vômitos e diarreia. Apesar do quadro clínico assemelhar-se ao da dengue, a evolução costuma ser mais benigna. Mulheres gestantes têm sido de grande preocupação para os órgãos de saúde pública devido à sua associação ao aumento do número de casos de microcefalia (Portal da Saúde, 2016).

Porém dessas viroses, quem se permanece em destaque continuamente nos últimos anos é a dengue. Essa doença é considerada um problema de saúde pública mundial, sendo os países de clima tropical os mais atingidos em virtude do clima quente e úmido, que oferece condições para proliferação do mosquito. Além do clima, a falta de saneamento básico possibilita ainda mais a sua proliferação. Fatores como esses, foram responsáveis pelo aumento da incidência da dengue em 30 vezes nas últimas cinco décadas (Silva; Mariano; Scopel, 2008; WHO, 2012).

Essa doença é considerada a maior infecção causada por arbovírus no mundo, resultando em 50 a 100 milhões de casos sintomáticos anuais. Sua transmissão ocorre em mais de 120 países, e estima-se que mais da metade da população global esteja sob risco de contrair a infecção (Brady *et al.*, 2012; Bhatt *et al.*, 2013). A distribuição mundial do vírus da dengue está em expansão, com consequentes aumentos na morbimortalidade e nas taxas de hospitalização, resultando em cerca de 10.000 mortes por ano (Stanaway *et al.*, 2016).

No Brasil, o histórico da doença mostra que em 2008 foram registrados mais de 800 mil casos, tornando-se o ano com mais casos de dengue (Siqueira Jr., *et al.*, 2010). No ano de 2010 o número de mortos superou o da epidemia ocorrida em 2008, registrando-se 478 mortes (Brasil, 2011). Em 2018 ocorreram 196.036 prováveis casos de dengue no Brasil, em 2019 os números chegaram a cerca de 1,5 milhão de casos e confirmados 782 óbitos, o que demonstra um aumento no número de casos e na gravidade da doença (Brasil, 2019; Brasil, 2020).

Existem quatro sorotipos de dengue relacionados a antígenos (DENV1-DENV4) com aproximadamente 65-70% de homologia de aminoácidos. A infecção por qualquer sorotipo do vírus pode causar diferentes sintomas clínicos, que variam de doença febril aguda a manifestações graves como febre hemorrágica da dengue e até síndrome do choque da dengue (Green; Rothman, 2006; Monath, 2019).

No intuito de combater diretamente a dengue, pesquisas foram iniciadas com o objetivo de desenvolver uma vacina eficaz. No ano de 2015 foi licenciada a CYD-TDV (Dengvaxia<sup>®</sup>), primeira vacina contra a dengue e aprovada em vários países como Brasil, México, Tailândia, El Salvador e Costa Rica (Aguiar; Stollenwerk; Halstead, 2016; Prompetchara *et al.*, 2019).

No entanto, nos ensaios de fase III a eficácia vacinal foi considerada moderada (56,7% e 60,8%) e em todos os grandes ensaios clínicos a sua eficácia contra o DENV-2 foi consistentemente mais baixa. A capacidade de proteção da vacina também dependia de outros fatores como status sorológico prévio dos vacinados e idade. Também foi observado durante os testes um risco aumentado de hospitalização em indivíduos com menos de 9 anos de idade (Capeding *et al.*, 2014; Villar *et al.*, 2015; Prompetchara *et al.*, 2019).

Uma outra vacina, Butatan-DV (vacina liofilizada tetravalente viva atenuada contra a dengue, desenvolvida pelo Instituto Butatan e que se encontra em ensaios de fase II, apresentou resultados positivos em relação à segurança do imunizante, porém ainda está em fase de testes a respeito da eficácia (Mohanty, 2022).

Outras vacinas vêm sendo desenvolvidas e passaram pelos ensaios de fase I, são exemplos a vacina inativada purificada do vírus tetravalente da dengue (TDENV-PIV) com adjuvante de alúmen e a vacina com um vírus tetravalente da dengue vacina viva atenuada (TDENV-LAV). Os regimes de vacinação testados apresentaram perfis de segurança aceitáveis, porém os autores indicam a necessidade de avaliação adicional para segurança, imunogenicidade e potencial para benefício clínico (Lin, 2021).

Apesar das pesquisas em andamento, esses estudos demandam tempo e, geralmente, originam produtos onerosos que não serão de fácil acesso para a população como um todo. Sendo assim, o controle vetorial se torna uma das estratégias mais efetivas na tentativa de controlar as arboviroses, podendo ser efetuado principalmente a partir do controle biológico, físico, químico e genético.

### 2.3 MEDIDAS DE CONTROLE CONTRA *Aedes aegypti* e RESISTÊNCIA A INSETICIDAS

Historicamente, as medidas de prevenção e controle de *Ae. aegypti* baseiam-se, especialmente, na redução das populações do inseto vetor realizado pelo Ministério da Saúde através de pulverização residual de inseticidas químicos sintéticos interna dentro e ao redor das residências em estação chuvosa; em visitas de rotina as residências, para aplicar larvicida em recipientes que contêm água parada para destruir o habitat das larvas; e através de métodos químicos, que contêm componentes que são prejudiciais ao meio ambiente e a saúde pública (Ryan *et al.*, 2019; Santos; Paz; Lima, 2019).

Essas medidas intervencionistas, que visam reduzir o número de mosquitos imaturos e adultos por meio do uso de produtos larvicidas ou inseticidas, requerem aplicação contínua, apresentam elevados custos e estão ameaçadas pela seleção de espécies resistentes (Lindsay, 2017).

O impacto do controle vetorial reforçado se baseia na implementação de alta qualidade e para sua implantação exige cobertura, aceitação e uso adequado. Quando se pensa em medidas de controle vetorial deve-se levar em consideração também outros fatores como o controle do meio ambiente e da biodiversidade. Muitas doenças transmitidas por vetores fazem parte de

sistemas ecológicos complexos e não intencionais os impactos nos organismos não visados devem ser evitados (Garcia, 2019).

O controle ambiental, é composto por medidas pensadas para eliminar os criadouros de *Ae. aegypti* através de práticas como tratamento de resíduos e saneamento básico, associado ao controle social, onde a sociedade participa do combate à dengue (Funasa, 2012; Brasil, 2014a). Alternativas de controle biológico utilizam animais predadores do mosquito como os peixes ou parasitas (Cavalcanti *et al.*, 2007; Macías *et al.*, 2008).

O controle químico, que até recentemente era bastante utilizado, é feito a partir de pesticidas e apresentam resultado em um curto período. São chamados de organosintéticos, e são divididos em: piretróides, carbamatos, organofosforados e organoclorados. A nebulização também era um instrumento bastante utilizado e consistia em um controle químico onde o inseticida era espalhado pela máquina matando o mosquito adulto nos períodos de manhã e tarde (Funasa, 2012; Brasil, 2014a).

Entretanto, o controle químico trouxe algumas características negativas associadas ao seu uso. O surgimento de populações de insetos resistentes a inseticidas sintéticos faz com que sejam utilizadas quantidades maiores e crescentes dessas substâncias para garantir um resultado satisfatório e, tal fato, contribui com a intensificação da contaminação do meio ambiente (Braga; Valle, 2007; Chiele, 2023).

Outra forma de controle é através da manipulação genética. Essa metodologia consiste na criação e liberação de mosquitos submetidos a uma alteração do seu material genético. Posteriormente os machos modificados são liberados no ambiente para copular com as fêmeas selvagens, fazendo com que as larvas resultantes deste acasalamento não atinjam o estágio adulto. Em 2011, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), permitiu a liberação de mosquitos dessa linhagem no município de Juazeiro-Bahia e em 2014 foi aprovado a produção comercial desses mosquitos (Ostera; Gostin, 2011; Brasil, 2014b).

No entanto, vários autores têm alertado para os riscos oriundos da liberação dos mosquitos transgênicos no ambiente, o que possivelmente acarretará impactos negativos e significativos à biodiversidade. Alguns fatores devem ser levados em consideração, como por exemplo, reduzir a relação de custo com o aumento na quantidade, o aumento da qualidade, liberação de fêmeas entre os machos irradiados (o que resulta em aumento de fêmeas no ambiente) (Oliveira *et al.*, 2011; Ostera; Gostin, 2011; Vázquez-Salat; Houdebine, 2013).

A partir disso, algumas alternativas de controle para *Ae. aegypti* vêm sendo estudadas, a exemplo, o uso de plantas para a formulação de inseticidas botânicos, que são menos impactantes para o meio ambiente, tendem a reduzir os riscos de populações de insetos

resistentes e minimizam os riscos à saúde humana (Corrêa; Salgado, 2011; Garcez *et al.*, 2013; Shivkumara *et al.*, 2019).

O interesse nesses produtos tem crescido gradativamente com intuito de tornar-se uma alternativa para substituir o uso de inseticidas químicos que podem prejudicar organismos não-alvo e o meio ambiente, para controle de *Aedes aegypti*. Outras vantagens associadas a esses produtos, são: ser biodegradável, seguro de aplicar e diversidade de uso (capacidade ovicida, larvicida, desregulador do desenvolvimento, repelente, atraente e estimulante de oviposição) (Kabir; Choudhary, 2013; Shivkumara *et al.*, 2019; Duarte *et al.*, 2020).

## 2.4 PLANTAS E SEUS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

As plantas constituem parte importante da medicina tradicional, sendo considerada por séculos como sua base fundamental e fazendo parte da cultura das comunidades tradicionais e, até mesmo, das contemporâneas. Esse saber empírico, obtido através da observação e das experiências vivenciadas e passado de geração em geração, constitui uma importante fonte de pesquisa etnobotânica, o que favorece a descoberta de novos princípios ativos oriundos de produtos naturais (Fenalti *et al.*, 2016; Santos-Lima *et al.*, 2016; Nóbrega *et al.*, 2017; Silva; Moreira; Felismino, 2017).

Estudos mostram que, cerca de 80% da população dos países emergentes utiliza exclusivamente a medicina popular na atenção primária à saúde e, desses, 85% fazem uso de extratos vegetais e plantas com efeito farmacológico (Brasil, 2016; Ianck *et al.*, 2017).

Partes da planta como raiz, caule, folhas fornecem substâncias ativas que podem ser utilizadas pela indústria farmacêutica na obtenção de um medicamento e, por essa razão, as plantas estão sendo cada vez mais estudadas sendo consideradas possíveis fontes de substâncias com atividades biológicas. Essas substâncias são os chamados metabólitos secundários e comumente são utilizados em produtos e terapias (Rosa; Barcelos; Bampi, 2012; Rezende *et al.*, 2016).

As plantas produzem uma quantidade imensurável de compostos bioativos, os quais são dotados de estruturas químicas de altíssima complexidade e com um espectro de funções bastante complexo, uma vez que não cumprem um papel específico no metabolismo, no crescimento e na divisão celular do organismo produtor. Estão, por outro lado, intrinsecamente relacionados aos mecanismos de defesa do vegetal em face dos mais distintos fatores de pressão

de seleção do ambiente, em especial aqueles voltados contra o ataque de herbívoros (Simões, 2016).

Esses metabólitos não possuem suas funções fisiológicas totalmente definidas. Seus efeitos terapêuticos podem ser utilizados para o restabelecimento da saúde do ser humano, mas também podem ser tóxicas a eles. Os metabólitos secundários podem alterar o conjunto funcional orgânico do indivíduo, podendo conduzir a efeitos biológicos diversos e graves ao indivíduo, e até o óbito. Pode ainda ter ação sinérgica com medicamentos de uso crônico e interferir em exames laboratoriais (Cheng *et al.*, 2019).

A realização de ensaios visando uma investigação analítica de forma quantitativa e qualitativa a fim de determinar a atividade de metabólitos frente a alguma enfermidade é imprescindível. Podendo assim, desvendar os conhecimentos relacionados às propriedades químicas, farmacológicas e toxicológicas, estabelecendo critérios de eficácia, segurança e qualidade para a população (Carvalho, 2016; Souza *et al.*, 2017).

Além da utilidade fitoterápica das plantas, outra ação também tem atraído a atenção de pesquisadores, o controle de insetos vetores. Diferentes produtos de origem vegetal estão sendo pesquisados a partir de espécies de plantas e vêm apresentando resultados promissores em relação ao controle alternativo para vetores como *Ae. aegypti* (Almeida Viana; Goes Sampaio; Martins, 2018).

Em resposta aos ataques patogênicos, as plantas ativam mecanismos de defesa que envolvem a produção de metabólitos secundários, como alcaloides, esteroides, terpenóides e compostos fenólicos. Esses compostos, além de desempenharem funções protetoras contra herbívoros e microrganismos, também coevoluem com insetos e agentes patogênicos, o que lhes confere grande diversidade estrutural e funcional. Por essa razão, tornam-se fontes naturais de substâncias com propriedades inseticidas, amplamente estudadas para o desenvolvimento de biopesticidas e alternativas sustentáveis no manejo de pragas (Simões *et al.*, 2010; Marangoni; De Moura; Garcia, 2013).

A ação destes compostos bioativos pode atuar de diversas maneiras, como por exemplo, inibindo a alimentação, reduzindo a oviposição de insetos, retardando o crescimento de suas formas imaturas ou atraindo predadores naturais. É importante destacar que a ação inseticida de um extrato vegetal ou óleo essencial pode variar significativamente conforme a espécie de inseto desafiada, a espécie e a idade da planta, a região geográfica de sua ocorrência (incluindo a existência de quimiotipos), as estruturas vegetais utilizadas e a polaridade do solvente empregado no processo de obtenção (Beran *et al.*, 2019; Thakur *et al.*, 2019).

### 2.4.1 A flora da Caatinga

O Brasil detém a maior biodiversidade mundial, contendo aproximadamente em torno de 15 a 20% do número de espécies da terra, distribuídas em diferentes ecossistemas. A flora é um dos principais componentes dessa biodiversidade e é nela que estão incluídas as plantas medicinais. A associação do conhecimento conservado pela população, originado a partir da miscigenação de índios, europeus e africanos, reflete em uma diversidade de conhecimento acerca da manipulação e uso dessas plantas, das diferentes formas de utilização terapêuticas desses recursos naturais (Moura; Neves; Coradin, 2021).

Apesar desses fatores, ainda existe um grande distanciamento entre o uso da medicina tradicional e a medicina ocidental, destacando entre elas, a fitoterapia (Shin *et al.*, 2013; Antonio; Tesser; Moretti-Pires, 2014).

Um outro problema relacionado ao uso de plantas medicinais é a escassez de estudos que possam fornecer um acervo de informações, a fim de comprovar cientificamente sua eficácia e segurança (Coutinho, 2018). Apesar de todo o potencial apresentado pelo Brasil, pesquisas revelam que menos de 10% da flora nacional foram avaliadas quanto às suas características biológicas e farmacológicas (Almeida, 2012).

Apesar dos esforços que o Brasil tem demonstrado para aprofundar os estudos com sua flora, alguns ecossistemas ainda são bastante negligenciados no que se diz respeito a novas investigações e conservação, sendo a Caatinga um dos sistemas subestimados e menos estudados no Brasil (Albuquerque; Andrade, 2002; Schimidit, 2016).

A Caatinga é o único bioma exclusivamente brasileiro, ocorre quase que exclusivamente na Região Nordeste, ocupando os estados brasileiros do Ceará, Pernambuco, Maranhão, Piauí, Rio Grande do Norte, Paraíba, Alagoas, Sergipe, Bahia e no Norte de Minas Gerais. Ocupa uma área de aproximadamente 862. 818 km<sup>2</sup>, o que corresponde a cerca de 11% do território nacional e ocupa a quarta posição em extensão no País. Localizada em área de clima semiárido, essa vegetação apresenta como característica marcante, a perda das folhagens durante os períodos de seca e a rápida renovação nos limitados períodos chuvosos. Apesar do clima difícil, o bioma detém certa quantidade de riquezas biológicas e espécies únicas, que ocorrem apenas nele (Brasil, 2012; IBGE, 2019).

O termo Caatinga vem da língua Tupi-guarani e significa “floresta branca” ou “mata branca”. Essa denominação faz referência à penetração da luz do sol até o solo nos períodos de seca, quando as plantas perdem suas folhagens. Também pelo fato de apresentarem folhas

menores, espinhos e vida xerófila, que permite sua sobrevivência devido às condições climáticas desfavoráveis. A vegetação típica desse ecossistema é parte de um bioma global chamado Florestas Arbustais Tropicais Sazonalmente Secos (FATSS, ou, na sigla em inglês, SDTFW), no qual pode ser observada grande variedade, desde árvores grandes de copas altas e contínuas com característica de floresta, até arbustos do tipo xerófilo, ligados aos baixos índices pluviométricos (Fernandes; Queiroz, 2018; IBGE, 2019).

Entretanto, apesar das diferenças notáveis dentro do bioma, há um gradiente estrutural entre as grandes árvores e a vegetação arbustiva mais rasteira, que faz com que sejam classificados como pertencentes a um só bioma (Heusser; Stein; Neckel, 2018). Dentre as espécies que podem ser encontradas nesse ambiente estão as pertencentes à família Fabaceae que está entre as quatro maiores da flora mundial, e desempenha papel importante tanto para a vegetação quanto para a fauna (Lee, Langenhein, 1975).

## 2.5 TOXICIDADE DOS PRODUTOS NATURAIS

Visto a importância do uso de plantas como possibilidade terapêutica para a ciência, é necessário que haja um controle de qualidade e segurança desses produtos, para que seu uso seja realizado de maneira mais segura e se tenha informações a respeito da toxicidade, preparo, indicações, contraindicações e dosagens. As substâncias bioativas presentes nas plantas medicinais e nos fitoterápicos são conhecidas pelos benefícios obtidos através de seus usos, mas esses compostos também podem ser nocivos à saúde humana. Esse ponto salienta a importância de avaliar o grau tóxico, pois a sua dosagem pode inviabilizar o uso (Carneiro *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2017b).

A toxicidade desses produtos, assim como suas atividades farmacológicas, é produzida pelos metabólitos secundários e podem causar alterações patológicas em homens e animais, podendo levar a sérios distúrbios no organismo e até mesmo ao óbito. A maioria das intoxicações por produtos de origem vegetal resulta principalmente por: superdosagem, erro na via de administração, preparo inapropriado, uso ininterrupto e sinergismo com outras plantas. Além desses fatores, ainda existe um risco associado à variedade no nome popular das espécies, que em uma região pode designar uma espécie, mas em outra localidade pode representar outra. (Colombo, 2008; Cunha *et al.*, 2008; Jesus; Suchara, 2013; Simões *et al.*, 2010; Vasconcelos *et al.*, 2009; Madeiro; De Lima., 2015).

A facilidade para obtenção desses produtos é um problema inerente aos medicamentos

naturais pois, muitas vezes, a população subestima sua toxicidade, pelo fato de acreditarem que estes são “inofensivos” ao organismo. No entanto, mesmo aqueles que possuem baixa toxicidade podem causar sérios danos à saúde, quando administrados em conjunto com outros medicamentos de origem sintética ou natural, ou até mesmo pelo seu uso prolongado (Turolla; Nascimento, 2006; Balbino; Dias, 2010; Macena; Nascimento; Krambeck Silva, 2012).

As principais formas que as plantas provocam danos à saúde são através da inalação, contato ou ingestão (Getter; Nunes, 2011). Os efeitos adversos acontecem de forma particular a cada planta, intensidade do contato e a resposta do organismo a ela. Os sintomas apresentados majoritariamente são: dores de cabeça, vômitos intensos, asfixia, diarreia, irritação, queimação, até mesmo paradas cardíacas e óbito (Vasconcelos *et al.*, 2009).

De forma geral, as intoxicações provocadas por plantas medicinais não são notificadas, uma vez que as manifestações clínicas apresentadas não são associadas à utilização ou exposição a um determinado vegetal, já que grande parte dos usuários, não tem conhecimento que as plantas podem possuir efeitos tóxicos ao organismo. Também há a crença de que o natural não oferece riscos à saúde, disseminando uma ideia de segurança para seu uso (Padayachee; Baijnath, 2019).

Além disso, o diagnóstico do paciente com intoxicação e a identificação da espécie em casos de acidentes, pode ser uma tarefa difícil. Essa dificuldade é atribuída em grande parte à escassez de informações acerca das espécies e da utilização correta dessas plantas por parte dos pacientes. Esse conjunto de fatores faz com que muitos casos não sejam relatados ou sejam registrados como intoxicação por agente desconhecido (Peacock *et al.*, 2009; Monseny *et al.*, 2015).

Por todos os motivos expostos, as pesquisas realizadas para avaliação da ação dos compostos bioativos presentes nos vegetais devem priorizar a qualidade e segurança desses produtos. Os estudos associando conhecimentos com base nas ações farmacológicas e toxicológicas, a posologia e aspectos clínicos associados às substâncias naturais, evitam uma propagação de uso inadequado e permitem que o seu uso seja eficaz e não danoso (Seeff, 2007; Jordan, Cunningham, Marles, 2010).

A avaliação da toxicidade pode se dar através de vários tipos de ensaios e é necessário que o protocolo seguido seja padronizado e reprodutível, para isso, existem diretrizes que regem tais ensaios. No Brasil, a recomendação é que os protocolos estejam de acordo com a regulamentação federal vigente, sob responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). No âmbito mundial, os protocolos realizados e aceitos são da *Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD)*, da *Food and Drug*

*Administration* (FDA) e do ministério da Saúde do Japão (Turolla; Nascimento, 2006; Brasil, 2013; Fernandes et. al., 2016).

A OECD estabelece várias metodologias para avaliação de toxicidade e sugere como modelos experimentais a utilização de espécies de roedores, como camundongos e ratos. Das metodologias propostas, os testes para avaliação de toxicidade aguda e toxicidade subaguda são muito utilizados e recomendados. A toxicidade aguda é a etapa inicial para investigar a existência do potencial tóxico sistêmico de uma substância como os efeitos adversos que ocorrem dentro de um período curto após administração de dose única, ou doses múltiplas, administradas em 24 horas. Já a toxicidade subaguda, refere-se aos efeitos nocivos, cumulativos, decorrentes de uma exposição repetida, de preferência oral, em um período limitado de exposição ao longo que deve durar no mínimo 28 dias (Oga; Carvalho; Batistuzzo, 2008; OECD, 2008; Rhiouani *et al.*, 2008; Betti *et al.*, 2012).

Dentre os gêneros que apresentam grande potencial para estudos farmacológicos e toxicológicos está o *Hymenaea*. Pertencendo à família Fabaceae, possuindo 16 espécies registradas no Brasil, sendo 13 delas endêmicas e 08 delas encontradas no estado de Pernambuco (Flora do Brasil, 2023).

## 2.6 *Hymenaea martiana* HAYNE

*H. martiana* pertence ao gênero *Hymenaea* e a família Fabaceae. Espécies da família Fabaceae podem ser encontradas em diferentes regiões do mundo e são divididas em três subfamílias: Mimosoideae, Papilionoideae e Caesalpinioideae. Na subfamília Caesalpinioideae encontra-se o gênero *Hymenaea* (Dutra; Garcia; Lima *et al.* 2008)

Pertencem à família Fabaceae, cerca de 727 gêneros e 19.327 espécies distribuídas em todos os continentes, com exceção do antártico (Souza; Funch; Queiroz, 2016). No Brasil, essa família engloba 3.031 espécies distribuídas em 253 gêneros, ocorrendo em todas as regiões brasileiras. *Hymenaea* é constituído por espécies nativas, porém não endêmicas do Brasil e apresenta como domínios fitogeográficos da Caatinga, Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, a Pampa e o Pantanal. Das espécies encontradas em território brasileiro destacam-se *Hymenaea courbaril* Linnaeus, *Hymenaea stigonocarpa* Mart. e *Hymenaea martiana* Hayne (Flora do Brasil, 2023).

As plantas pertencentes a esse gênero são da tribo produtora de resina (*Detarieae*). Mostra-se como um dos mais importantes, e foi estabelecido por Linnaeus em 1753. Apresenta-

se em climas tropicais e subtropicais, tais como África e América do Sul e no Brasil está presente em todo território nacional (Lee; Langenheim, 1975).

É conhecida por diversos nomes populares designados para esse gênero, tais como jutaicicca, jitaí, jutaíacú, jatobeiro, jataíba, burandã, imbiúva, farinha, e pertence à ordem Guarani. Jatobá e jataí são os mais comuns, significando, respectivamente, "folha dura" ou "árvore de fruto duro" e "fruto comestível" (Lorenzi, 2002).

Estas árvores apresentam variação de porte que alternam entre 3 e 40 metros de altura a depender da espécie. A menor espécie pertencente a esse gênero é a *Hymenaea stigonocarpa* conhecida por jatobá-do-cerrado e a mais alta dentre elas é a espécie *Hymenaea courbaril*, popularmente conhecida como jatobá amazônico (Langenheim *et al.*, 1982).

De forma geral, *Hymenaea* apresentam-se em forma de vida arbórea ou arbustica. As árvores, arvoretas ou arbustos são sempre verdes, de ramos marrons ou acinzentados apresentando fissuras ou descamação em placas. Sua folhagem é bi foliar, podendo apresentar-se assimétrica, elíptica, ovalada ou oblonga, de aspecto liso ou enrugado. Apresenta flores de 5 pétalas, em geral brancas, frutos do tipo câmara possuindo epicarpo de coloração castanho-escuro, na maioria das vezes, lustroso ou opaco, de aspecto verrucoso ou liso, contendo até 8 sementes, geralmente castanho-escuras. O endocarpo é fináceo, de sabor adocicado e aroma forte (Souza *et al.*, 2015; Flora do Brasil, 2019).

O jatobá é uma espécie florestal com alto potencial para multiprodutos e diferentes formas de comercialização. Além de sua importância ecológica, apresenta potencial agrônomico (caule e os frutos) e alimentício, pois possui uma polpa farinhenta ao redor das sementes da fruta, rica em nutrientes. Sua resina exsudada do tronco é rica em terpenos, tornando-a uma espécie importante para uso comercial (Dias; Luzia; Jorge., 2013; Da Costa, 2019).

Dentre as plantas desse gênero, encontramos *H. martiana*, uma espécie popularmente conhecida no Nordeste do Brasil como "jatobá" e que figura entre as espécies de *Hymenaea* de maior expressão econômica e medicinal. Este vegetal é amplamente utilizado pela população na construção civil, em ornamentação e principalmente na cura ou amenização de doenças (Judd *et al.*, 2009; Batista *et al.*; 2011).

Essa espécie se encontra em diversas regiões do país e em outras áreas do continente. É encontrada principalmente na região da bacia amazônica e sua utilidade se dá principalmente para o uso anti-inflamatório e analgésico, em especial pela população da região nordeste (Da Cruz Silva *et al.*, 2012). Nessa região ela possui ampla distribuição podendo ser encontrada em 7 (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí) dos 9 estados que compõem

a região (Pinto, Tozzi, Mansano, 2023).

As propriedades bioativas dessa espécie já foram alvo de diversas pesquisas. Alguns desses estudos já comprovaram sua atividade como: antinociceptiva e antiinflamatória (Pacheco *et al.*, 2021), antioxidante (Oliveira *et al.*, 2021), antibacteriana (Peixoto *et al.*, 2016) e hepatoprotetora (Closa *et al.*, 1997).

Outro alvo das pesquisas em relação a essa espécie, são os metabólitos secundários que podem ser encontrados nesse vegetal. A presença dos flavonoides é constantemente encontrada em espécies de *H. martiana*, sendo citadas em pesquisas como as de Da Cruz Silva e colaboradores (2012), Vieira e colaboradores (2018) e Oliveira e colaboradores (2021).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO DO EXTRATO

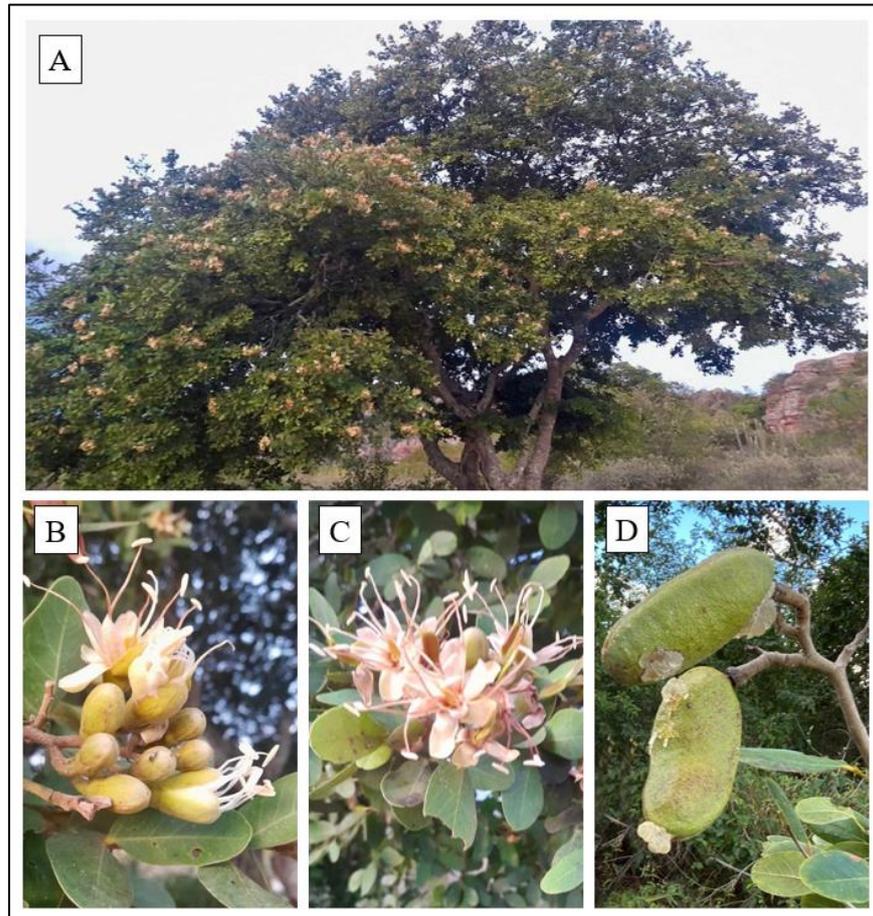
Esta pesquisa está cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SISGEN sob número de protocolo AAE34B3 e segue todos os protocolos para trabalhos utilizando a flora brasileira.

Para obtenção do extrato etanólico e realização dos experimentos, foi utilizada a espécie *H. martiana* pertencente ao gênero *Hymenaea* (Figura 3).

A coleta do vegetal foi realizada no período matutino, no mês de dezembro de 2019, na região do Parque Nacional do Catimbau, situada no Estado de Pernambuco (Figura 4).

Esta região compreende os municípios de Buíque, Ibirimir, Sertânia e Tupanatinga, e se encontra a aproximadamente 280 km da capital Pernambucana, Recife, e sua área geográfica situa-se entre o agreste e o sertão. Possui altitude de 800 metros, e apresenta as seguintes coordenadas: latitude 8° 35' 46" Sul e longitude 37° 14' 32" Oeste. A espécie foi identificada no Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA e a exsicata depositada sob tombo nº 94668.

Figura 3 - Imagens de *Hymenaea martiana* Hayne



Legenda: A; Árvore. B: Flores e botões florais. C: Flores. 4: Frutos.

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Figura 4 - Mapa da região do Parque Nacional do Catimbau – PE



Fonte: Google Maps, 2020.

### 3.1.1 Processamento do material vegetal

Após a obtenção, a planta foi encaminhada ao Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental (LAFAC) para processamento e obtenção do extrato bruto etanólico. Inicialmente, as folhas foram separadas dos caules e lavadas em água corrente. Em seguida, as folhas foram secas com papel toalha e pesadas, obtendo-se o valor de 700g de folhas frescas, e posteriormente submetidas à estufa de circulação de ar modelo NT 513 – Novas Técnica, durante 72 horas, sob a temperatura de 30-36°C.

### 3.1.2 Preparação do extrato bruto etanólico

Depois de submetidas à secagem, as folhas foram pesadas novamente, pesando 427,5 g e foram fragmentadas com auxílio de tesoura em pequenos pedaços, os quais foram triturados manualmente e submetidas ao processo de maceração, usando como solvente o etanol a 95%, em uma proporção de 4 L de etanol para 200 g das folhas secas, obtendo o extrato líquido. Em seguida, o extrato foi colocado para agitação em agitador automático por cerca de 10h, filtrado em papel filtro qualitativo gramatura (80 g/m<sup>2</sup>), e o filtrado foi concentrado em evaporador rotativo a temperatura de  $\pm 40^\circ\text{C}$  para obtenção do extrato etanólico bruto das folhas de *Hymenaea martiana* (EEBHm) (Figura 5).

Figura 5 - Evaporador Rotativo usado para concentração do EEBHm



Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

O material rotaevaporado foi depositado em um recipiente aberto e deixado à temperatura ambiente, para a completa evaporação do solvente. Posteriormente, o extrato bruto etanólico foi encaminhado ao refrigerador a  $\pm 4^{\circ}\text{C}$  e coberto com papel alumínio. Após a secagem, foram obtidos 34.63 gramas de extrato e o rendimento total do extrato, de acordo com a fórmula:

$$\text{RE\%} = \text{Pext} / \text{Pfolhas} \times 100.$$

Onde: RE = Rendimento total do extrato (%); Pext = Peso do extrato seco (g); Pfolhas = Peso das folhas frescas ou secas (g).

### 3.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA

Para a realização da prospecção fitoquímica, seguiu-se, inicialmente, a técnica de cromatografia em camada delgada, visando verificar, inicialmente, a presença dos seguintes compostos: alcalóides, cumarinas, flavonoides, saponinas, taninos, terpenos e quinonas.

A verificação da presença de saponinas foi realizada de acordo com Harbone (1998). Após a separação dos metabólitos, foram utilizados reveladores adequados e sistema de desenvolvimento empregando padrões cromatográficos (Quadro 1).

Quadro 1 - Metabólitos secundários, fases móveis, reveladores e padrões usados no perfil fitoquímico do EEBHm

Classe	Fase móvel	Revelador	Padrão
Alcalóides	AcOEt-HCOOH-AcOH-H <sub>2</sub> O (100:11:11:27 v/v)	Dragendorff	Pilocarpina
Cumarinas e Quinonas	CHCl <sub>3</sub> -MeOH (98:2 v/v)	KOH 10%	Cumarina e lapachol
Flavonoides, derivados cinâmicos e fenilpropanoglicosídeos	AcOEt-HCOOH-AcOH-H <sub>2</sub> O (100:11:11:27 v/v)	NP-PEG (NEU)	Quercetina, rutina e ácido clorogênico
Saponinas	---	Teste de formação de espuma	Extrato aquoso de casca de <i>Zizipus joazeiro</i> (juá)
Protoantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas	AcOEt-HCOOH-AcOH-H <sub>2</sub> O (100:11:11:27 v/v)	Vanilina clorídrica	Catequina
Triterpenos e esteroides	Tolueno:AcOEt (90:10 v/v)	Lieberman & Burchard	$\beta$ -sitosterol
Mono e sesquiterpenos	Tolueno:AcOEt (90:10 v/v)	Anisaldeído sulfúrico	Timol

Fonte: Adaptado de Wagner e Bladt (1996).

### 3.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

#### 3.3.1 Ensaios inseticidas

##### 3.3.1.1 Estabelecimento e manutenção da colônia

Os ovos de *Aedes aegypti*, foram cedidos pelo Insetário do Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ), os quais foram depositados em recipientes plásticos (15,0 cm x 5,0 cm) contendo água deionizada, na proporção de, aproximadamente, 1000 ovos para 1 L de água deionizada e 1 g de alimentação. As vasilhas com os ovos e a água deionizada foram acondicionadas em uma sala climatizada regulada para  $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , sendo a umidade relativa do ar ideal entre 70 e 80%. Após o sexto dia, as larvas atingiram a fase de pupa, as quais foram coletadas e colocadas dentro de recipientes plásticos para posterior emergência. Esses recipientes foram colocados dentro de gaiolas (40,0 cm x 15,0 cm).

Após a emergência dos adultos, machos e fêmeas foram alimentados com solução açucarada, obtida a partir de água mineral e açúcar refinado comercial, na proporção de 1:9 (p/v), sendo que, uma vez por semana, foi realizado o repasto sanguíneo as fêmeas com sangue de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), conforme as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), com o número de protocolo 23076.049863/2015-91. No terceiro dia, após o repasto sanguíneo, foi estimulada a oviposição, sendo colocados recipientes com papel-filtro para a deposição dos ovos.

##### 3.3.1.2 Avaliação da atividade larvicida do EEBHm

Para avaliação da atividade inseticida do EEBHm, foram utilizadas larvas de terceiro e quarto instar. O extrato seco bruto obtido foi ressuscitado em água estéril contendo 1% (v/v) de tensoativo mono láurico (Tween 80) para facilitar a dissolução, ajustando a concentração final para 1 g de extrato seco em 1 mL de solução. Do volume total do extrato concentrado foram feitas diluições com água destilada estéril e foram obtidas as concentrações da amostra de 10; 7,5; 5,0 e 2,5 mg/mL. Para a preparação do grupo controle, também foi utilizado Tween 80 e água destilada nas mesmas proporções definidas.

No bioensaio, foram usadas 30 larvas por repetição, e três repetições por tratamento. As observações da mortalidade das larvas foram realizadas nos intervalos de 30 min, 1h, 2h, 4h, 8h, 16h e 24h, após o início do experimento (WHO, 1970).

### 3.3.1.3 Avaliação da atividade pupicida do EEBHm

Para avaliação da atividade inseticida do EEBHm, foram utilizadas pupas. O extrato seco bruto obtido foi ressuspenso em água estéril contendo 1% (v/v) de tensoativo mono láurico (Tween 80) para facilitar a dissolução, ajustando a concentração final para 1 g de extrato seco em 1 mL de solução. Do volume total do extrato concentrado foram feitas diluições com água destilada estéril e foram obtidas as concentrações da amostra de 10; 7,5; 5,0 e 2,5 mg/mL. Para a preparação do grupo controle, também foi utilizado Tween 80 e água destilada nas mesmas proporções definidas.

No bioensaio, foram usadas 30 pupas por repetição, e três repetições por tratamento. As observações da mortalidade das pupas foram realizadas nos intervalos de 30min, 1h, 2h, 4h, 8h, 16h e 24h, após o início do experimento (WHO, 1970).

### 3.3.1.4 Análise dos dados e tabulação dos resultados

Os resultados dos ensaios foram tabulados em uma planilha eletrônica do programa *Microsoft Office Excel 2016* e, a partir dos resultados obtidos, foram elaborados os elementos gráficos. Com os resultados da análise dos dados de mortalidade de larvas e pupas, em relação ao controle, foram calculadas as médias  $\pm$  desvio padrão e realizada a análise de variância (ANOVA), utilizando o software *GraphPad Prism 8*<sup>®</sup>.

## 3.3.2 Ensaios de toxicidade

Os testes foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob protocolo de nº 0053/2019. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental (LAFAC) do Departamento de Antibióticos da UFPE.

### 3.3.2.1 Animais

Nos ensaios de toxicidade, foram utilizadas fêmeas (núlparas e não grávidas) de camundongos albinos *Swiss (Mus musculus)* provenientes do biotério do LAFAC, do Departamento de Antibióticos da UFPE. Os animais pesavam entre 30 e 45 gramas e tinham

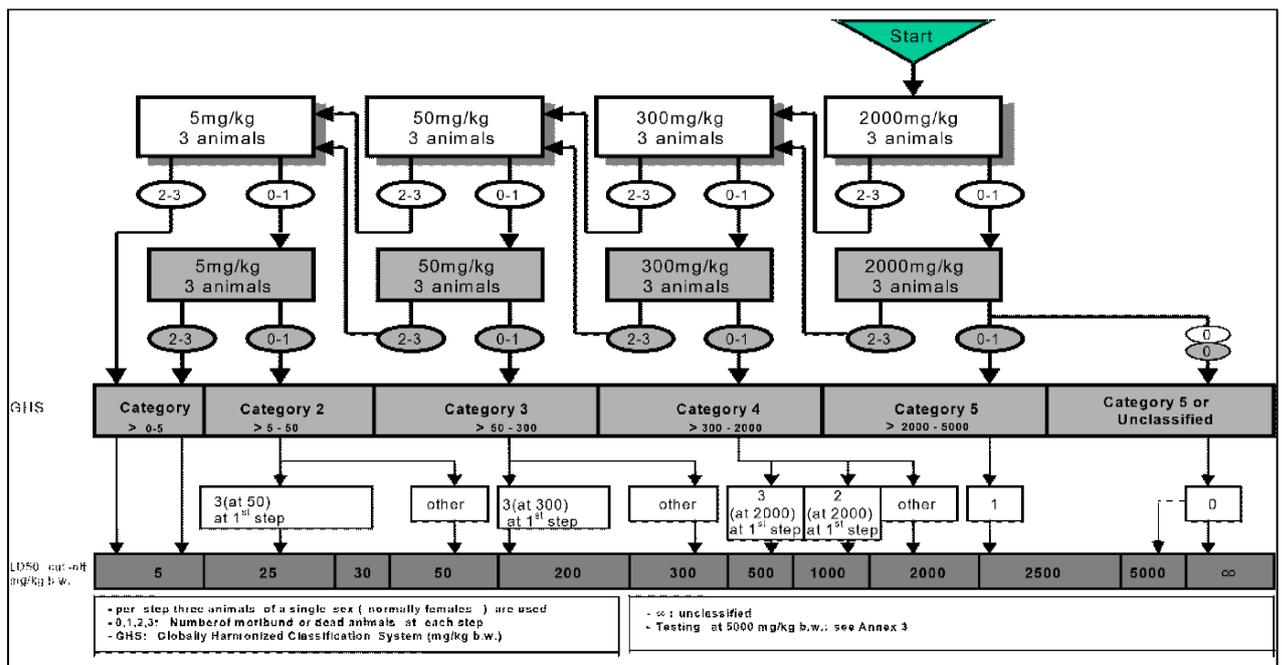
idades entre 90 e 120 dias, receberam água e ração “ad libitum” e foram mantidos em condições normais de temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e umidade ( $60 \pm 1\%$ ), sob ciclo natural claro e escuro de 12-12 horas.

### 3.3.2.2 Toxicidade aguda

O teste de toxicidade oral aguda foi realizado segundo o protocolo experimental Guideline 423 (OECD 423; 2001) com doses sequenciais, seguindo a proposta da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Como sugerido pelo protocolo, quando houver estudos anteriores que indiquem baixos efeitos tóxicos relacionados à substância testada, deve-se iniciar a avaliação a partir da dose de 2000 mg/kg, onde a próxima dose a ser testada é determinada a partir do resultado da primeira aplicação, conforme apresentado na Figura 6.

Figura 6 - Fluxograma representando a metodologia para o ensaio de toxicidade aguda em dose única



Fonte: OECD (2001)

Os animais foram divididos em grupos experimentais de três animais e a alimentação foi suspensa por 4 horas, antes do experimento e a água liberada. A alimentação foi reintegrada

após 3 horas da administração. O EEBHm foi solubilizado em Tween 80 1% (v/v) e em salina e posteriormente, a solução foi administrada por via oral nos camundongos, introduzida no trato digestório dos animais, através de cânula metálica acoplada à seringa (gavagem). O manejo e cuidado com os animais seguiram os princípios éticos da experimentação animal, segundo critérios estabelecidos pelo CEUA.

Após a administração da dose por via oral, os animais foram acompanhados na primeira hora, periodicamente (6 em 6 horas) nas primeiras 24 horas e diariamente por 14 dias.

Cada animal foi marcado, de forma diferente, para posterior acompanhamento. As marcações foram realizadas com uma caneta marcadora permanente correspondente aos números ordinais de 1 a 3. Os animais foram observados quanto às diversas reações comportamentais relacionadas com o Sistema Nervoso Central (SNC) (efeitos estimulantes e depressores) e com o Sistema Nervoso Autônomo (SNA).

A massa corporal de cada animal e os parâmetros fisiológicos (consumo de ração e produção de excretas) foram acompanhados diariamente. Ao fim do período de observação, todos os animais sobreviventes foram eutanasiados e autopsiados.

### 3.3.2.3 Toxicidade subaguda

Foi utilizada a metodologia recomendada pela OECD (2008), com modificações. Foram estabelecidas três doses do EEBHm: 25 mg/kg, 50 mg/kg e 100mg/kg. Os camundongos albinos swiss *Mus musculus*, foram divididos em 4 grupos com seis animais por gaiola. Os animais foram tratados durante 28 dias consecutivos por via oral. Os grupos testes receberam as doses estabelecidas de EEBHM e o grupo controle recebeu uma solução de água mineral e Tween (na mesma proporção usada na diluição do EEBHm).

A massa corporal, ingestão de alimentos e água dos animais foram registrados diariamente durante todo tratamento. Sinais de toxicidade, como piloereção, diarreia, alterações na atividade locomotora e mortalidade, também foram observados durante o período experimental.

No final do vigésimo oitavo dia, os animais foram anestesiados com uma solução dexilazina e cetamina de no máximo 0,10mL/100g de massa corpórea, na proporção de 8,75mL de cetamina e 1,25mL de xilazina (realizando o cálculo de acordo com a massa de cada animal) e aplicada por via intraperitoneal. O sangue dos animais foi coletado por punção cardíaca para a realização dos exames hematológicos e bioquímicos; e os órgãos (fígado, rins e baço) foram removidos, pesados e suas massas expressas em gramas (g).

### 3.3.2.3.1 Análise bioquímica e hematológica

Para a análise, foram selecionadas as dosagens bioquímicas de: uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). O sangue foi coletado em mini tubos secos com ativador de coágulo- *Labor Import*<sup>®</sup> e submetido à centrifugação por 10 minutos a 3500 rotações por minuto (rpm), para obtenção do soro. Os parâmetros bioquímicos foram determinados por meio de kits específicos e foram utilizados na leitura dos resultados o analisador bioquímico automático *Cobas Mira Plus*<sup>®</sup> (*Roche Diagnostic System*).

Para as análises hematológicas, o sangue foi coletado em mini tubo com *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* (EDTA) - *Labor Import*<sup>®</sup> e homogeneizado previamente à avaliação do eritrograma e do leucograma. A análise dos resultados foi realizada no analisador hematológico celular automático *Animal Blood Counter Vet*<sup>®</sup> (*Horiba ABX Diagnostics*). Também foram confeccionadas lâminas hematológicas para a contagem diferencial de leucócitos. O esfregaço sanguíneo foi feito manualmente, e as lâminas foram coradas com coloração panótica e analisadas em microscópio óptico.

### 3.3.2.4 Análise estatística

Os resultados da avaliação da toxicidade subaguda, bem como os parâmetros bioquímicos e hematológicos, foram expressos como uma média  $\pm$  desvio padrão. Foi utilizada uma análise de variância (ANOVA), utilizando o software *GraphPad Prism 8*<sup>®</sup>. Os valores de p inferior a 0,05 foram considerados significativos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização dos ensaios propostos nesta pesquisa, a seguir, estão os resultados obtidos através das atividades testadas.

### 4.1 RENDIMENTO DO EXTRATO E ANÁLISE FITOQUÍMICA

Para a obtenção do EEBHm, foram utilizados 200 g do material seco, e resultou em 34,63 g de extrato, sendo de 17,3 % a taxa de rendimento calculada.

O rendimento total do extrato encontrado neste estudo é semelhante aos dados da literatura. Em um estudo realizado por Santana (2015) o rendimento do extrato etanólico das folhas de *H. martiana* ficou em torno de 20%. Outra pesquisa realizada por Silva (2019) utilizando uma espécie do mesmo gênero (*Hymenaea eriogyne*) obteve o rendimento de 24,89% para o extrato etanólicos bruto das folhas.

As plantas utilizadas pelo homem com as finalidades curativas têm instigado pesquisas que pretendem avaliar as suas atividades biológicas e os metabólitos secundários. Para elucidar e caracterizar as substâncias presentes nesses vegetais, tem-se investido em estudos fitoquímicos, buscando registrá-las e caracterizá-las.

O resultado da análise fitoquímica do EEBHm coletadas no município de Buíque – PE, encontra-se descrito na Tabela 2.

Tabela 2 – Prospecção fitoquímica do EEBHm

<b>Metabólitos secundários avaliados</b>	<b>Resultado</b>
Saponinas	+
Flavonóides	+
Fenilpropanóides	-
Triterpenos e esteróides	+
Mono e sesquiterpenos	+
Alcalóides	-
Proantocianidinas e leucoantocianidinas	+
Taninos hidrolisáveis	tr
Cumarinas	+
Quinonas	-

Legenda: (+) positivo; (tr) traços e (-) ausente.

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Os métodos químicos e cromatográficos são os procedimentos preliminares mais utilizados na prospecção fitoquímica. Os métodos químicos, como a prospecção fitoquímica de Matos (1988), baseiam-se na reação entre os compostos presentes nos extratos vegetais e reagentes previamente conhecidos, enquanto a cromatografia é uma técnica utilizada para identificação e análise de misturas e substâncias isoladas, podendo ainda utilizar reveladores para confirmar as substâncias (Simões *et al.*, 2010).

Conforme demonstrado na Tabela 2, foram reveladas, por meio dessas técnicas, a presença de catequinas, cumarinas, flavonoides, taninos, terpenos e saponinas.

O gênero *Hymenaea* é conhecido por apresentar alguns compostos, como o ácido isocítrico, ácido isopimárico, ácido oleico, ácido protocatecuíco, terpenos, cumarinas,

flavonoides, taninos e compostos fenólicos, corroborando os resultados obtidos nesta prospecção fitoquímica (Silva Oliveira *et al.*, 2018).

Segundo Tiago e colaboradores (2019 e 2020) as espécies pertencentes ao gênero *Hymenaea* possuem compostos terpênicos e fenólicos e essas substâncias são algumas das responsáveis pelas ações antifúngicas, antibacterianas e moluscicidas que comumente são apresentadas por espécies pertencentes a esse gênero.

A presença dos flavonoides é constantemente encontrada em espécies de *H. martiana*, sendo citadas em pesquisas como as de Da Cruz Silva e colaboradores (2012), Vieira e colaboradores (2018) e Oliveira e colaboradores (2021). Em uma pesquisa realizada por Oliveira *et al.* (2016), utilizando os frutos da espécie, além de flavonoides também foi identificada a presença de monoterpenos e diterpenos e saponinas, estando em concordância com os dados dessa pesquisa.

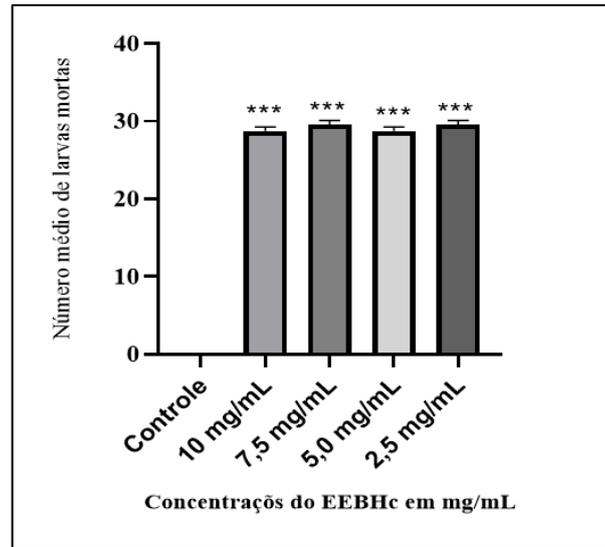
Quanto aos compostos encontrados nessa pesquisa e que não foram citados por outros autores, essa diferença justifica-se em fatores como: sazonalidade, ritmo circadiano e clima em que um vegetal é coletado, além da forma de processamento do extrato, também podem influenciar na quantidade e natureza dos constituintes bioativos presente no vegetal no fato dos metabólitos secundários serem diversos e representarem atividades biológicas distintas (Mohammed *et al.*, 2018; Ziane *et al.*, 2019; Passos *et al.*, 2012).

#### 4.2 ATIVIDADE INSETICIDA

Em relação à atividade larvicida sobre *Ae. aegypti*, observou-se que a maior concentração utilizada (10 mg/mL) alcançou uma taxa de mortalidade de 94,4%, após 24 horas de acompanhamento do experimento. Essa concentração, assim como as demais, manteve-se com taxas de mortalidade elevadas, superior a esse percentual ao longo do tempo de observação. Quando analisadas as concentrações de 7,5 mg/mL, 5,0 mg/mL e 2,5 mg/mL, as taxas de mortalidade foram respectivamente 97,8%, 95,6% e 97,8%, revelando um desempenho consistente entre as diferentes concentrações do produto testado.

No Gráfico 1, é possível observar a comparação estatística entre o número de larvas mortas nos grupos de teste e o grupo controle.

Gráfico 1 – Média do número de larvas mortas de *Aedes aegypti*, após exposição à diferentes concentrações do EEBHm, em 24 horas

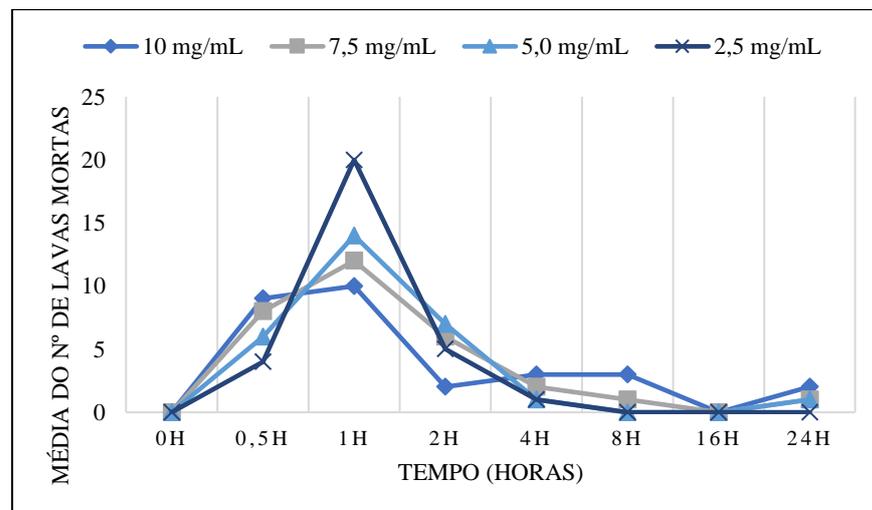


Legenda: \*\*\* valor estatisticamente significantes com  $p < 0.001$ .

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

No gráfico 2, é possível observar a relação entre a mortalidade larval e o tempo do experimento.

Gráfico 2 – Mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao EEBHm em relação ao tempo de exposição.



Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

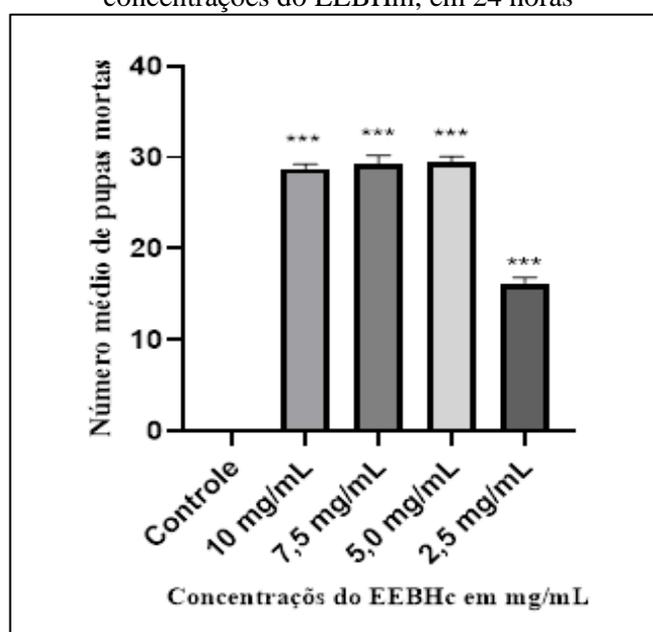
Todas as concentrações utilizadas no teste, 10,0 mg/mL, 7,5 mg/mL, 5,0 mg/mL e 2,5 mg/mL, mantiveram padrões de mortalidade semelhantes, sendo a primeira hora de acompanhamento de exposição o momento de maior nível de mortalidade.

Também foram observadas as alterações comportamentais das larvas durante o experimento. Em contato com o EEBHm, as larvas alteraram a motilidade já nos primeiros trinta minutos de experimento. Com o passar do tempo, os movimentos larvais foram sendo gradualmente comprometidos, ficando parcialmente imobilizadas na primeira hora de experimentação, comportamento estes não observados no grupo controle, cujos movimentos continuaram normais.

Esse efeito causado nas larvas de *Ae. aegypti* após entrarem em contato com o extrato pode estar relacionado à penetração dos compostos bioativos no corpo das mesmas. De acordo com Sparg et. al. (2004), a interação com as saponinas presentes nas substâncias bioativas e os esteróis presentes na membrana celular da larva, ocasiona uma ruptura gerada pelo aumento da permeabilidade e desbalanço hidrolítico. O autor Cheeke (2000) afirma que as saponinas são consideradas um surfactante natural de alto potencial biológico, o que explicaria a facilidade de penetração do EEBHm nas células larvais.

Em relação à avaliação da atividade inseticida do EEBHm sobre a fase evolutiva de pupa de *Ae. aegypti*, obteve-se um percentual de mortalidade acima de 50% em todas as concentrações. Sendo eles, 95,6% na concentração de 10,0 mg/mL, 96,7% na concentração de 7,5 mg/mL, 97,8% na concentração de 5,0 mg/mL e 53,3% na concentração de 2,5 mg/mL. No gráfico 3, é possível visualizar a comparação estatística entre o número de pupas mortas nos grupos testes em relação ao grupo controle.

Gráfico 3– Média do número de pupas mortas de *Aedes aegypti*, após exposição à diferentes concentrações do EEBHm, em 24 horas

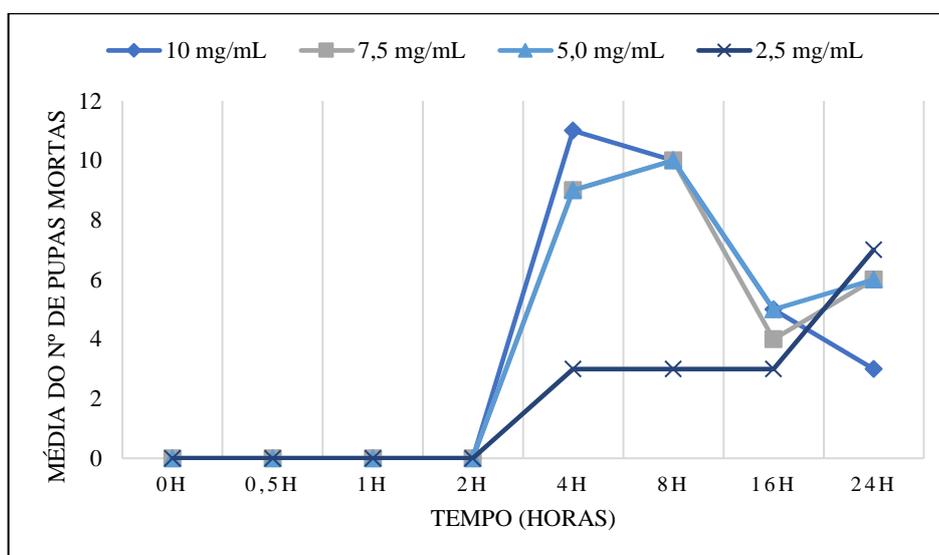


Legenda: \*\*\* valor estatisticamente significantes com  $p < 0.001$ .

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

A mortalidade das pupas só começou a ser observada a partir da quarta hora de acompanhamento, comportamento que foi acompanhado em todas as concentrações do extrato, como mostrado no gráfico 4. Nesse gráfico, é possível observar que as concentrações utilizadas no teste, 10,0 mg/mL, 7,5 mg/mL e 5,0 mg/mL, mantiveram os padrões de mortalidade semelhantes em todos os horários de acompanhamento. A menor concentração (2,5 mg/mL) foi a que apresentou o menor quantitativo de mortes no período total de 24 horas. Não foram observadas mudanças comportamentais significativas quando comparadas as concentrações e o controle negativo.

Gráfico 4 - Mortalidade de pupas de *Aedes aegypti* submetidas ao EEBHm em relação ao tempo de exposição.



Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Analisando os dados acima é possível observar que o EEBHm atingiu altos índices de mortalidade em larvas e pupas. Além da presença das cumarinas, anteriormente citada como um dos metabólitos secundários responsáveis por essa ação, podemos citar também a presença dos flavonoides que foram encontrados no EEBHm. Em sua pesquisa, Crozier, Jaganath e Clifford (2009) associaram o poder inseticida dos flavonoides e antocianinas ao seu potencial de atração apresentado. Dessa forma, esses metabólitos poderiam atuar como sinais visuais para a atração de insetos até as plantas e devido à sua adstringência, atuariam como um sistema de defesa contra eles.

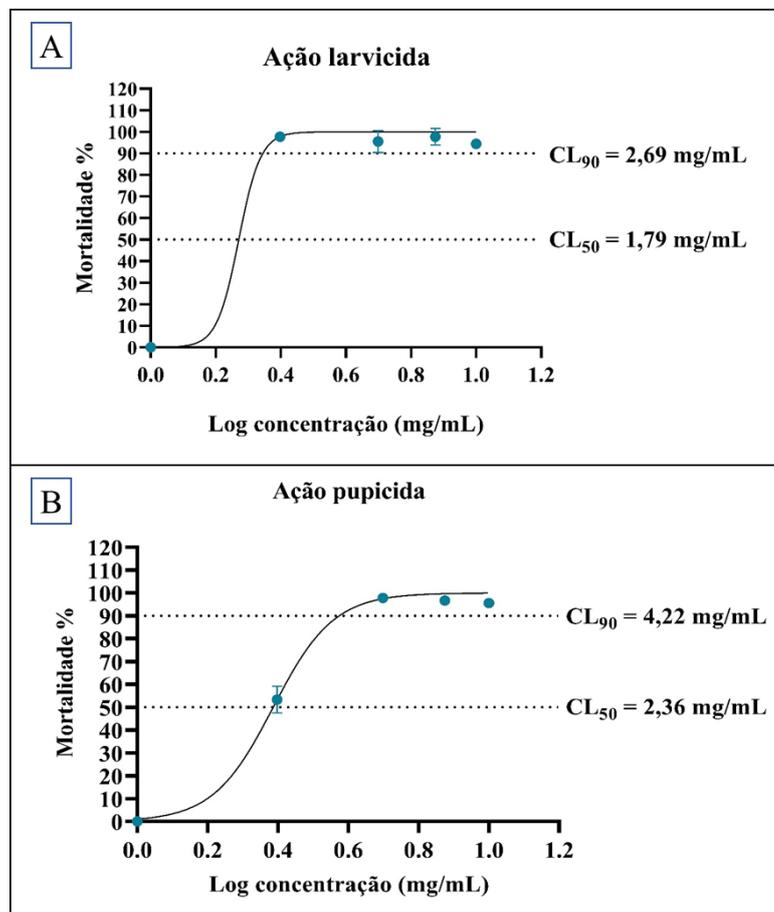
Comparando os testes realizados em larvas e pupas pode se notar pontos de divergência como o atraso na mortalidade das pupas quando comprado as larvas e a ausência de diminuição

de motilidade. Beserra e colaboradores (2008) explicam em sua pesquisa que na fase pupal, o *Ae. aegypti* não se alimenta, apresenta movimentos reduzidos e é mais resistente a condições adversas. Esses fatos podem explicar o atraso na mortalidade, tanto pela ausência da alimentação, o que pode diminuir a interação das pupas com o extrato, quanto pelo fato de nesse estágio elas serem mais resistentes a mudanças ambientais.

Sobre tal fato, Souza e colaboradores (2011), bem como, Gupta e colaboradores (2011) ratificam que, como as pupas não se alimentam, os compostos com ação pupicida tem mecanismo de ação através da absorção pela superfície corporal ou causam danos nas trompas respiratórias. Dessa forma, as diferenças entre o efeito larvicida e pupicida do EEBHm podem indicar uma maior ação do extrato no trato digestivo das larvas e/ou sobre o seu epitélio.

Após a avaliação da mortalidade foram calculadas as concentrações letais 50 e 90 (CL<sub>50</sub>, CL<sub>90</sub>) e os resultados estão demonstrados na Figura 7.

Figura 7- Avaliação da CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> do EEBHm sobre larvas (A) e pupas (B) de *Aedes aegypti*



Legenda: CL<sub>50</sub>:concentrações letais 50. CL<sub>90</sub>: concentração letal 90.  
Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Quando comparadas a outros estudos que avaliaram o potencial larvicida de espécies de *Hymenaea*, os valores de CL<sub>50</sub> encontrados nessa pesquisa foram maiores. Na pesquisa realizada por Bezerra-Silva e colaboradores (2015) que analisaram a atividade larvicida do extrato ciclohexânico do cerne de *Hymenaea stigonocarpa* a CL<sub>50</sub> ficou estimada em 300 µg/mL. Em outro estudo, utilizando os óleos essenciais das cascas dos frutos verdes de *Hymenaea courbaril*, Aguiar e colaboradores (2010) obtiveram a CL<sub>50</sub> de 28,4 µg/mL.

As diferenças entre as CL<sub>50</sub> podem ser explicadas por alguns fatores, principalmente pelo motivo dos estudos envolverem espécies diferentes. Outros fatores importantes são as diferenças entre a parte da planta estudada e o método de extração. O estudo que utilizou o óleo essencial foi o que apresentou a menor CL<sub>50</sub>, porém em estudos anteriores foi demonstrado que *Hymenaea* spp. possuem um baixo rendimento de óleo essencial, o que dificultaria a realização da pesquisa e a produção de inseticidas em larga escala (Puga, 2015; Menezes; Oliveira; Castro, 2020).

A escolha do método extrativo dessa pesquisa também levou em consideração a parte da planta escolhida. Porto e colaboradores (2017) estudando o efeito larvicida de extratos de mais de 40 plantas nativas do Brasil contra *Ae. aegypti* mostraram que os extratos com maior letalidade eram os obtidos com solventes metanólicos e etanólicos, principalmente quando as extrações dos produtos eram realizadas a partir das folhas das plantas.

Em relação a CL<sub>90</sub> para atividade larvicida e CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> para atividade pupicida os dados na literatura são escassos. Tal fato mostra a necessidade da realização de pesquisas que visem estudar essas vertentes sobre a temática.

Apesar da falta de dados de outros autores principalmente em relação a atividade pupicida, Kabarú e Gichia (2001) destacam a capacidade de substâncias interferirem em etapas evolutivas de *Ae. aegypti* diferentes como qualificadoras de bons inseticidas, pois estes produtos devem ser capazes de interferir no ciclo de vida do vetor em seus diferentes estágios de maturação.

#### 4.3 TOXICIDADE AGUDA

No ensaio de toxicidade, o primeiro grupo (G1) exposto a dose de 2000 mg/kg não apresentou mortalidade ou morbidade nas primeiras 24 horas, após a exposição ao extrato e nem durante o estudo. Sendo assim, seguiu-se o protocolo e realizou a exposição de um segundo grupo de animais (G2), novamente a dose de 2000 mg/kg, onde também não foi verificada

morbidade ou mortalidade. A dose de 5000 mg/kg não foi realizada, pois a OECD (2008) indica o seu uso apenas em casos excepcionais, onde exista a necessidade de sua utilização.

De acordo com os resultados obtidos diante das doses testadas, o extrato foi classificado na categoria 5 de acordo com o GHS e sua Dose Letal<sub>50</sub> (DL<sub>50</sub>) foi estipulada como  $\geq 5000$  mg (OECD; 2008).

Após a exposição dos animais às doses 2000 mg/kg foram observados os sinais clínicos em relação a um grupo controle (CT), em que os animais receberam apenas solução salina + tween 80, na mesma proporção das doses. Os resultados foram tabulados segundo Malone (1983) e estão demonstrados na tabela 3.

Tabela 3. Sinais clínicos e taxa de mortalidade após administração por via oral do EEBHm em Camundongos *Mus musculus* no teste de toxicidade aguda

Sinais Clínicos	Doses via oral (mg/kg)					
	2000					
	Grupo 1			Grupo 2		
	CM	LM	RM	CM	LM	RM
<b>1. Sist. Nervoso Central</b>						
Ausência de coord. Motora	-	-	-	-	-	-
Convulsão tônica crônica	-	-	-	-	-	-
Parada cardiorrespiratória	-	-	-	-	-	-
Refluxo	++	++	+++	+	++	++
<b>1.1 Efeitos estimulantes</b>						
Agressividade	-	+	-	-	-	-
Ambulação aumentada	+++	+	++	++	+	+
Aumento da respiração	++	+	++	++	++	++
Autolimpeza	-	++	+	-	-	-
Bocejo	-	-	-	-	-	-
Ereção de cauda	-	-	-	-	-	-
Espasmos	++	+	+++	++	+	+
Frêmito vocal	-	-	-	-	-	-
Inversão de marcha	-	-	-	-	-	-
Irritabilidade	-	-	-	-	-	-
Movimento circular	++	++	++	++	++	++
Movimento das vibrissas	+	-	-	-	-	-
Movimento estereotipado	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Reação de fuga	+++	+++	+	+	++	+
Sacudir a cabeça	-	-	-	-	-	-
Saltos acrobáticos	+++	++	+	++	+	++
Tremores grosseiros	+++	++	+++	++	+	+
<b>1.2 Efeitos depressores</b>						
Ambulação diminuída	-	-	-	-	-	-
Ataxia	-	-	-	-	-	-
Catatonía	-	-	-	-	-	-
Cauda em <i>straub</i>	-	-	-	-	-	-

(Continua)

Tabela 3. Sinais clínicos e taxa de mortalidade após administração por via oral do EEBHm em Camundongo *Mus musculus* no teste de toxicidade aguda

(Continuação)

Perda do reflexo auricular	-	-	-	-	-	-
Ptose palpebral	-	-	-	-	-	-
Prostração	++	-	++	-	+	+
Resposta ao toque diminuída	-	-	-	-	-	-
Sedação	-	-	-	-	-	-
<b>2. Sist. Nervoso Autônomo</b>						
Cianose	-	-	+	-	-	-
Contorções	-	-	-	-	-	-
Diarreia	-	-	-	-	-	-
Dispneia	-	-	-	-	-	-
Distensão abdominal	-	-	-	-	-	-
Diurese	-	-	-	-	-	-
Edema de focinho	+	+	++	-	+	-
Excreção fecal	+	-	-	+	-	+
Piloereção	-	-	-	-	-	-
Taquipneia	-	-	-	-	-	-
Salivação	-	-	-	-	-	-
<b>3. Mortalidade (%)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

Legenda: Resultado negativo (-), Resultado positivo (+), Resultado positivo moderado (++) e Resultado positivo intenso (+++).

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Observou-se que os efeitos mais pronunciados foram no sistema nervoso central (SNC), principalmente desencadeando atividade estimulante, tais como aumento da ambulação, saltos, tremores, hiperatividade e movimentos circulares. Além do mais, efeitos positivos intensos como movimento estereotipado foram observados.

Em relação ao sistema nervoso autônomo (SNA), houve a presença de sinais como refluxo e excreção fecal, além de sinais moderados, como espasmos e posição estática, não havendo mortalidade no grupo tratado.

O comportamento estereotipado complexo e o aumento da ambulação observado nos camundongos tratados com o extrato, sugere uma possível atividade sobre o SNC considerando que, a atividade locomotora espontânea e o movimento repetitivo estão relacionados com os níveis de excitabilidade desse sistema (Da Costa Júnior *et al.*, 2011). Prut e Belzung (2003), relataram em seus estudos que sinais como locomoção aumentada podem ser indicativos de um efeito estimulante.

A maioria dos efeitos clínicos relacionados ao SNC e SNA, como agitação intensa, irritabilidade, reação de fuga, prostração, refluxo, espasmos, possivelmente estão relacionados com os potenciais ativos dos metabólitos secundários encontrados no EEBHm.

Diversos autores já relataram a capacidade de metabólitos secundários extraídos de plantas demonstrarem atividades nesse sistema (Girard, 2003; Almeida *et al.*, 2012; Mustad, 2014; Silva *et al.*, 2017a). Alguns dos metabólitos encontrados no EEBHm são conhecidos por causarem alterações a nível de SNC. MacLennan, Darlington e Smith (2002) afirmam que os terpenos constituem o grupo de metabólitos com ações sobre o SNC, em seu estudo os diterpenóides encontrados no extrato de *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae), atuaram modulando sistemas neurotransmissores, tais como serotoninérgicos, noradrenérgico, dopaminérgico e colinérgico, aumentando o fluxo sanguíneo.

Outra ação conhecida dos terpenos é a estimulação da geração do segundo mensageiro Trifosfato de Inositol (IP<sub>3</sub>), que mobiliza o cálcio intracelular, levando a excitotoxicidade celular. Esse processo colabora com a consolidação de memória e apresentam resultados na redução do tempo de sono induzido por pentobarbital sódico, aumentando assim, o tempo de latência para início do sono (MacLennan; Darlington; Smith, 2002; Passos *et al.*, 2009). Baseado nesse fato, podemos pressupor que esses transmissores tenham contribuído para alguns efeitos apresentados pelos animais como aumento da ambulação, e de forma geral nas características de estimulação do SNC.

Outro grupo de metabólitos encontrado no EEBHm e que possui muitos estudos voltados a sua atividade no sistema nervoso, são os flavonoides. Diversas pesquisas estão sendo realizadas com a intenção de compreender como esse metabólito consegue atuar no SNC. Uma das suas características interessantes descoberta há alguns anos foi a capacidade de ultrapassar a Barreira Hemato-Encefálica (BHE) e atingir os neurônios. Youdim, Shukitt-Hale e Joseph (2004) executaram um estudo *in vitro* e *in situ* para determinar a permeabilidade da BHE a flavonóides, utilizando culturas celulares e um modelo de perfusão cerebral *in situ*, com ratos. Os flavonoides foram captados em todas as regiões cerebrais analisadas (cerebelo, córtex, hipocampo, hipotálamo, estriato, colículo superior e medula) após perfusão *in situ*, o que permitiu a conclusão de que foram capazes de ultrapassar a BHE sem sofrerem transformações.

Os avanços no conhecimento da neurofarmacologia dos flavonoides sugerem que eles têm potencial para tratamento de diversas condições neurológicas e mentais. A ação de moléculas como, por exemplo, a hispidulina, que é capaz de atingir o receptor do Ácido Gama-Aminobutírico (*Gamma-AminoButyric Acid* – GABA)- A, e tem demonstrado importante papel na regulação da ansiedade e epilepsia, outrora outros flavonoides são úteis em condições de

neurodegeneração (JOHNSTON; BEART, 2004); e uma gama de estudos sugerem que os flavonoides têm propriedades neuroativas, o que condiz com os efeitos estimulantes apresentados no teste de toxicidade (Guaraldo *et al.*, 2000; Dhawan; Kumar; Sharma, 2001; Watanabe *et al.*, 2001; Dhawan; Dhawan; Sharma, 2004).

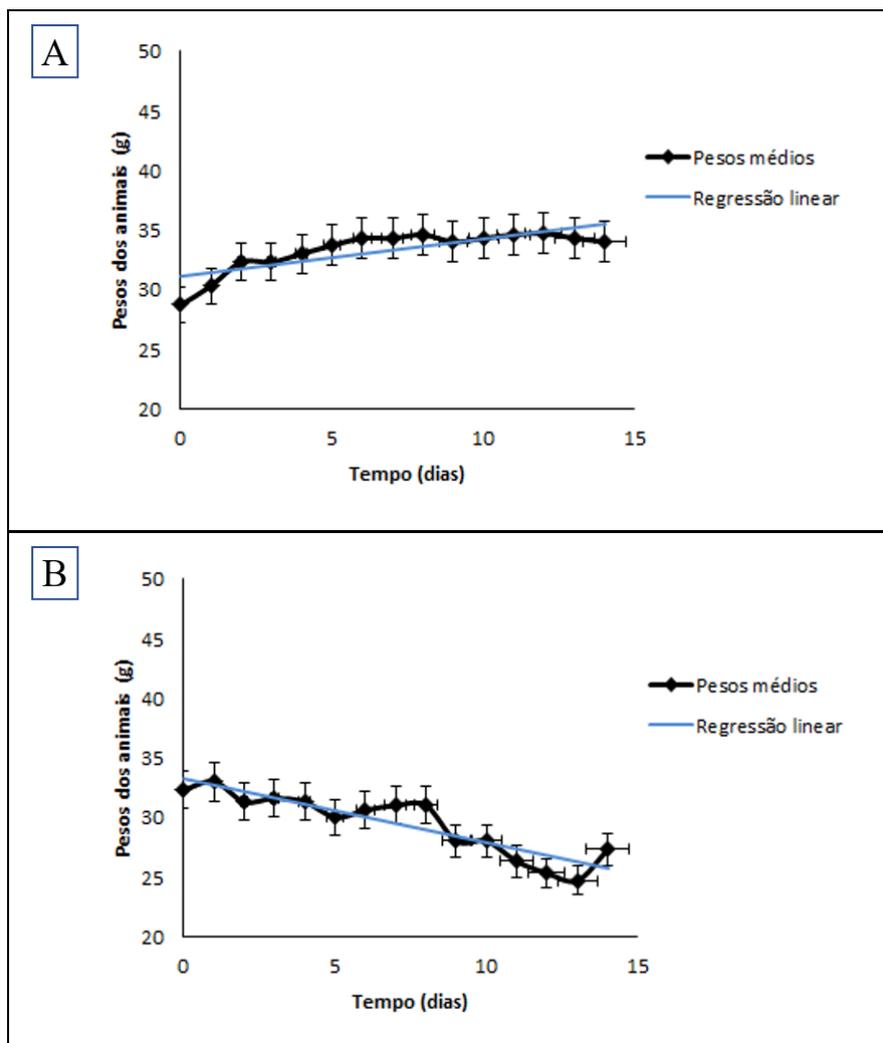
Outro metabólito encontrado no EEBHm que podem estar envolvidos nos efeitos apresentados no teste de toxicidade são as cumarinas. São substâncias amplamente distribuídas em plantas, assim como, em espécies de fungos e bactérias. Sua capacidade de exercer interações não covalentes com muitas enzimas e receptores em organismos vivos leva as cumarinas a exibir uma ampla gama de atividades e aplicações biológicas, entre elas, ações antioxidantes e anti-neurodegenerativas (Franco *et al.*, 2021).

Recentemente, vários autores têm trabalhado no desenvolvimento de séries híbridas de cumarina que se apresentam como promissores inibidores de colinesterase (De Souza *et al.*, 2019; Najafi *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2020). Essa classe farmacológica vem sendo bastante estudada no tratamento de doenças neurodegenerativas como o Alzheimer, mas também possui alguns efeitos colaterais já conhecidos como efeitos sobre o sistema gastrointestinal e sistemas nervoso central (Franco *et al.*, 2021).

Como principais efeitos colaterais gástricos podemos citar o vômito, náusea e dispepsia, tais implicações podem ser as responsáveis por alguns dos efeitos apresentados no teste de toxicidade como o refluxo e os espasmos. Já a nível de SNC destaca-se como efeitos colaterais a tontura, tremor, sintomas extrapiramidais e convulsões, estes podem ter implicado em alguns sinais apresentados pelos animais como tremores e movimentos circulares e estereotipados (Cunha *et al.* 2008). Vale ressaltar que no teste de toxicidade aguda são usadas doses máximas a fim de testar possíveis letalidades do estrato e que em doses menores as ações apresentadas pelo EEBHm podem ser avaliadas como neuroestimuladores.

No que diz respeito à avaliação da massa corpórea dos animais (figura 8), após submetidos ao EEBHm na dose de 2000 mg/kg, não houve uma redução significativa nos animais do grupo teste ( $P > 0,05$ ). Com relação ao grupo controle, houve um aumento da massa corporal ( $Y = 0,3111 * X + 31,116$  e  $R^2 = 0,6341$ ), significativo ( $P < 0,05$ ), sendo a correlação fraca ( $r = 0,66$ ).

Figura 8 – Peso médio de camundongos fêmeas após administração, por via oral (VO), do EEBHm na dose de 2000 mg/kg.



Legenda: A: grupo controle, B: grupo tratado.

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Segundo Júnior *et al.* (2012), a variação de peso é um dos parâmetros mais utilizados em estudos toxicológicos e pode indicar de forma precoce sinais da toxicidade de uma substância em um animal. Logo, os dados deste estudo não sugerem efeitos tóxicos de ordem física nos animais, causados pelas aplicações das diferentes doses de EEBHm na dose testada.

#### 4.4 TOXICIDADE SUBAGUDA

Após a determinação da  $DL_{50}$ , a pesquisa seguiu para a etapa de análise da toxicidade subaguda. Os estudos de toxicidade de doses repetidas permitem caracterizar o perfil

toxicológico da substância por meio da administração diária repetida. A partir desses estudos, é possível obter informações sobre os efeitos tóxicos, identificar órgãos-alvo e avaliar os efeitos fisiológicos, hematológicos, bioquímicos, anatômicos e histopatológicos (Brasil, 2013).

Para o teste de toxicidade subaguda os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de exposição (n=6): Grupo controle tratado com água mineral e tween 80 (Controle), Grupo tratado com EEBHm 25 mg/kg (G1), Grupo tratado com EEBHm 50 mg/kg (G2) e Grupo tratado com EEBHm 100 mg/kg (G3).

Durante o teste, os animais foram pesados diariamente em horário fixo para ajuste do volume da dosagem administrada em cada animal e tiveram seu consumo de água e ração medidos.

Também foram observados possíveis alterações comportamentais, comparando os sinais apresentados pelos animais dos grupos testes com os do grupo controle. As principais alterações comportamentais estão demonstradas na tabela 4.

Tabela 4. Principais sinais clínicos após administração por via oral do EEBHm em Camundongos *Mus musculus* no teste de toxicidade subaguda.

Sinais Clínicos	Grupos e doses do EEBHm			
	G1 – 25mg/mL	G2- 50mg/mL	G3- 100mg/mL	Controle
Ambulação aumentada	++	+++	+++	+
Agitação	+++	+++	+++	-
Agressividade	+++	+++	+++	+
Tentativa de fuga	++	++	++	-
Aumento da defecação	+	++	++	-
Autolimpeza	+++	++	++	+

Legenda: Resultado negativo (-), Resultado positivo (+), Resultado positivo moderado (++) e Resultado positivo intenso (+++).

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Esse comportamento apresentado pelos animais pode ter relação direta com os metabólitos secundários apresentados pelo EEBHm e abordados no item 4.3.

Porém, o fato de os animais estarem sendo expostos a doses diárias do EEBHm pode desencadear comportamentos de estresse, tanto pelo uso da gavagem, quanto pela palatabilidade do sabor do extrato. Autores como Mello e colaboradores (2008) evidenciaram em seus estudos utilizando ratos *Wistar* que o estresse age de forma deletéria para o desempenho da memória em mamíferos, tanto para a memória de reconhecimento de objetos a curto e longo prazo, quanto o estresse crônico, prejudicando apenas a de longo prazo. Nessa pesquisa, o prejuízo de memória nesses animais poderia ser associado às múltiplas tentativas

de fugas apresentadas pelos animais do grupo teste, bem como a ambulação aumentada, como tentativa de reconhecimento ambiental.

A reação de autolimpeza apresentada pelos animais dos grupos teste é outra característica relacionada ao estresse crônico. Meshalkina e Kalueff (2016) relataram em sua pesquisa a autolimpeza dos ratos, como uma característica de estresse é um parâmetro classificatório, devido ao fato que esses parâmetros podem auxiliar no entendimento de qual nível de estresse o rato se encontra. Isto é, existem padrões de autolimpeza relacionados à estado de conforto, padrões encontrados em condições de excitação moderada e em contexto de excitação e resposta ao estresse de “luta ou fuga”.

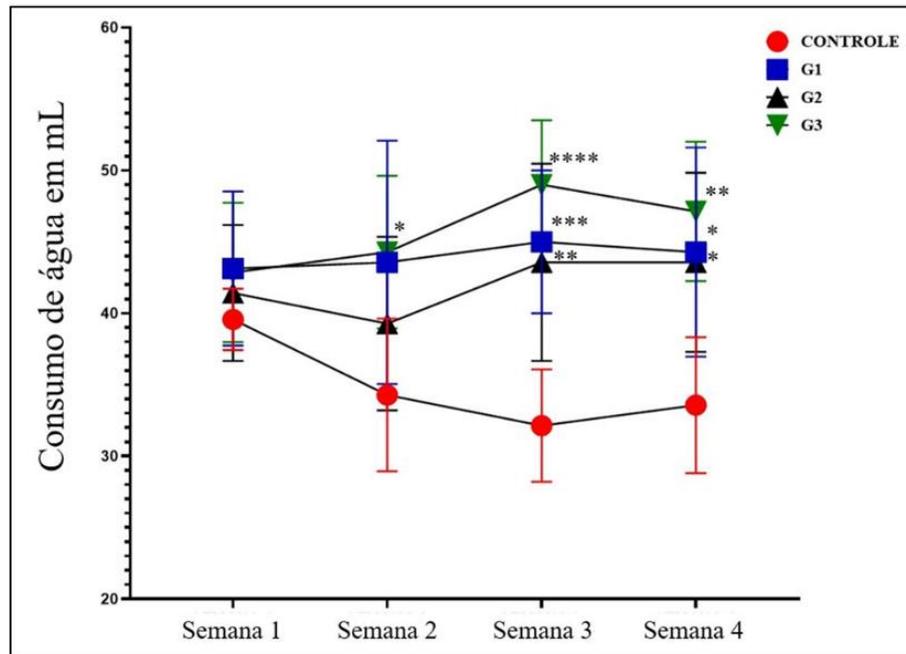
O grupo de animais submetidos ao teste de toxicidade subaguda também teve acompanhamento diário rigoroso, no qual se monitoraram tanto o consumo de água quanto de ração ao longo do experimento. Os dados referentes a esse acompanhamento semanal, durante os 28 dias de estudo, estão ilustrados, respectivamente, nos gráficos 5 e 6.

Segundo Santos e Volpato (2015), a atividade tóxica sistêmica de uma substância pode ser indicada pela análise dos dados do consumo de água e ração e morte dos animais, uma vez que essas variáveis refletem o estado geral de saúde dos mesmos

Durante o desenvolvimento do teste, pode-se observar, através dos gráficos variações no consumo de água e ração entre os diferentes grupos de tratamento. Notou-se, em particular, um aumento no consumo de água pelos animais dos grupos tratados, com destaque para o G3, que recebeu a maior dose do extrato, evidenciando um possível efeito fisiológico relacionado à dose administrada.

Resultados similares foram encontrados na avaliação toxicológica do *Rosmarinus officinalis* (SANTOS, 2017) e *Olea europaea* (BREUNIG, 2021), onde ambos observaram que o grupo que recebeu a maior dose da substância também foi o que apresentou maior consumo de água, reforçando uma possível relação entre a administração das substâncias e a alteração no comportamento hídrico. Por outro lado, segundo Leichter e Lee (1984) e Campbell e colaboradores (2009), uma redução na ingestão de água seria um sinal de alerta importante, pois poderia comprometer a hidratação e o desenvolvimento dos animais. No presente estudo, a ausência de diminuição na ingestão pode indicar uma segurança relativa do extrato nas doses testadas.

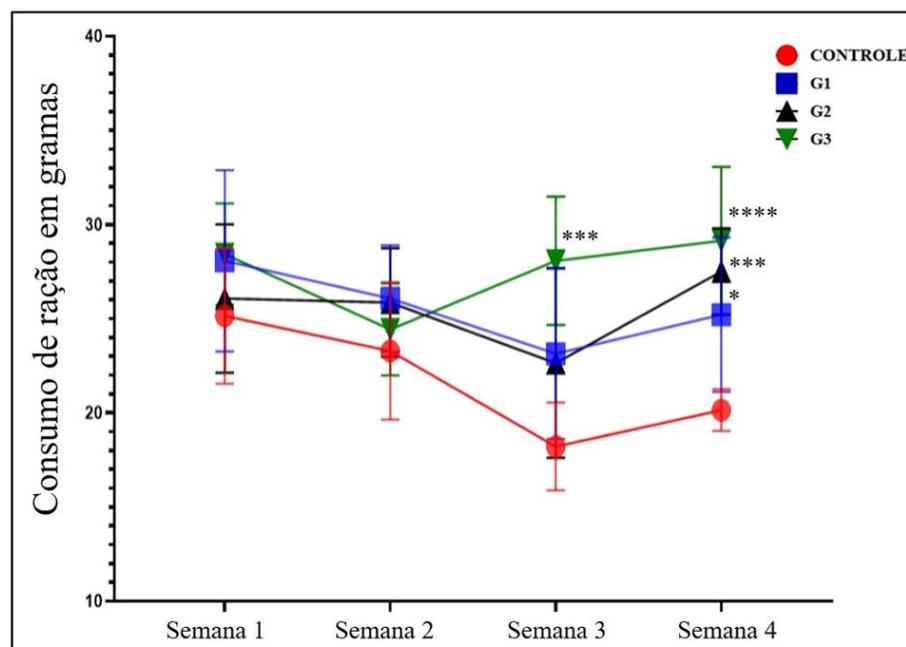
Gráfico 5 – Consumo semanal de água em mililitros por *Mus musculus*, durante 28 dias de tratamento com o EEBHm.



Legenda: G1 – 25mg/kg, G2 – 50mg/kg e G3 -100mg/kg. Os resultados foram analisados por Análise de variância (ANOVA One Way) e Tukey Post Hoc Tests. O nível de significância adotado foi \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Gráfico 6 – Consumo semanal de ração em gramas por *Mus musculus*, durante 28 dias de tratamento com o EEBHm.



Legenda: G1 – 25mg/kg, G2 – 50mg/kg e G3 -100mg/kg. Os resultados foram analisados por Análise de variância (ANOVA One Way) e Tukey Post Hoc Tests. O nível de significância adotado foi \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Ainda segundo Campbell e colaboradores (2009), para que a análise dos dados relativos ao consumo de água em estudos de toxicidade e desenvolvimento seja considerada um parâmetro confiável de avaliação, esses dados devem ser avaliados em associação aos parâmetros de hidratação e depleção de fluidos dos animais. No entanto, essa análise complementar não foi realizada neste experimento, o que limita uma interpretação mais abrangente dos resultados observados. Apesar disso, os dados apresentados fornecem indicativos relevantes para estudos futuros.

Quanto ao consumo de ração, é possível observar no gráfico 6 que houve uma diminuição gradual no consumo de ração por todos os grupos durante a primeira e a segunda semana. Após esse período, os grupos testes apresentaram um aumento nesse consumo, com diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao grupo controle. Segundo Breunig (2021), a diminuição no consumo alimentar pode ser um indicativo de toxicidade sistêmica. Todavia, se essa diminuição não se mantiver ao longo do tempo, isso pode indicar uma possível adaptação dos animais aos componentes presentes no extrato testado, como foi observado neste estudo.

O aumento do consumo de ração pelos animais dos grupos teste pode ser justificado pelo potencial nutricional do jatobá. Silva e Silva (2021) relatam o uso popular da planta para aumento do apetite. Sampaio e colaboradores (2015) revelam, em seu estudo, que nos frutos e sementes de uma espécie pertencente ao gênero *Hymenaea* (*Hymenaea courbaril*), estão concentrados nutrientes como carboidratos, proteínas, lipídeos e minerais, que despertam o apetite de diversos animais.

Por se tratar de espécies do mesmo gênero e com características semelhantes, é possível que *H. martiana* também apresente esse mesmo potencial nutricional. Embora esses nutrientes tenham sido relatados em outras partes e espécies do gênero *Hymenaea*, é fundamental caracterizar o extrato utilizado neste estudo para investigar a presença desses compostos e validar sua relação com os efeitos observados.

Durante o experimento, os animais também foram pesados diariamente e, na tabela 5, estão demonstradas as médias de peso dos animais ao decorrer das semanas. A variação ponderal do peso dos animais durante as semanas analisadas não demonstrou grau de significância entre os animais tratados em comparação com o controle, mesmo observando-se o aumento no consumo de água e ração, como pode ser observado na tabela 5.

Tabela 5 – Média do peso corporal (média  $\pm$  desvio padrão) de camundongos fêmeas *Mus musculus* tratados por via oral com o EEBHm.

	Controle	EEBHm 25 mg/kg	EEBHm 50 mg/kg	EEBHm 100 mg/kg
Semana 1	38,29 $\pm$ 0,39	37,53 $\pm$ 0,25	35,51 $\pm$ 0,38	35,59 $\pm$ 0,39
Semana 2	36,40 $\pm$ 0,73	37,01 $\pm$ 0,59	35,48 $\pm$ 0,17	35,01 $\pm$ 0,17
Semana 3	37,64 $\pm$ 0,35	35,89 $\pm$ 0,32	34,88 $\pm$ 0,22	35 $\pm$ 0,28
Semana 4	37,29 $\pm$ 0,16	35,08 $\pm$ 0,49	34,81 $\pm$ 0,41	35,63 $\pm$ 0,40

Legenda: Anova seguido por Tukey \* $p < 0,05$  comparados com o controle.

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Após os 28 dias, os animais foram eutanasiados por punção cardíaca após anestesia com xilazina 2% (1 mL) e cetamina 10% (0,5 mL), diluídas em água destilada, administradas via intraperitoneal a 0,1 mL/10 g. Os órgãos foram coletados e observados macroscopicamente. Não foram observadas alterações morfológicas, como necrose ou hemorragias, nos órgãos analisados, e não houve diferenças significativas no peso dos órgãos dos grupos tratados quando comparados ao grupo controle, conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 – Peso dos órgãos (gramas  $\pm$  desvio padrão) dos animais tratados com EEBHm após 28 dias.

	Controle	EEBHm 25 mg/kg	EEBHm 50 mg/kg	EEBHm 100 mg/kg
Fígado (g)	1,89 $\pm$ 0,16	1,72 $\pm$ 0,11	1,74 $\pm$ 0,31	1,71 $\pm$ 0,12
Baço (g)	0,19 $\pm$ 0,19	0,21 $\pm$ 0,06	0,17 $\pm$ 0,04	0,16 $\pm$ 0,32
Rins (g)	0,40 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,06	0,36 $\pm$ 0,21

Legenda: Anova seguido por Tukey \* $p < 0,05$  comparados com o controle.

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

A avaliação de toxicidade é de extrema importância para que seja possível prever possíveis efeitos tóxicos em humanos e animais (Olson *et al.*, 2000). Como procedimento padrão, as alterações comportamentais e no peso corporal são utilizadas como marcadores preliminares para indicativo de toxicidade, sendo o aumento ou diminuição do peso dos órgãos também utilizado para avaliação de possíveis alterações patológicas causadas pela toxicidade do produto em questão (OECD, 2008).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas sobre o peso dos

animais e nem de seus órgãos isoladamente. Essas informações corroboram com a ideia de que o EEBHm não afetou negativamente o desenvolvimento dos animais. Ao avaliar macroscopicamente os órgãos após a eutanásia não foram notados quaisquer alterações morfológicas entre os animais dos grupos testes e controle.

A toxicidade de *H. martiana* é pouco estudada e por isso os dados a esse respeito são escassos. Em um trabalho realizado por Vale e colaboradores (2013), que testou a seiva de *Hymenaea* spp. em medula óssea de camundongo e na mosca *Drosophila melanogaster*, não foram evidenciados sinais de toxicidade nas doses testadas. É comum que plantas que não apresentem sinais de toxicidade em modelos de toxicidade aguda também não apresentem sinais nos testes de toxicidade subaguda, o que demonstra uma corroboração com os resultados encontrados nesta pesquisa.

Jesus *et al.* (2012) e Valadares (2017) realizaram estudos com o extrato metanólico de *Vatairea macrocarpa*, espécie pertencente à mesma família de *H. martiana*. Neles foi possível observar que a espécie não apresentou sinais de toxicidade frente aos testes de toxicidade aguda e subcrônica em suas maiores doses, não sendo observada alteração histopatológica nem a morte dos animais, corroborando com os dados dessa pesquisa.

Além da coleta dos órgãos, também foi coletado o sangue dos animais e realizados os exames bioquímicos e hematológicos. O rim e fígado são alvos de inúmeras substâncias tóxicas (Suk *et al.*, 2012). foram realizados os testes bioquímicos de creatinina, ureia como marcadores de lesão renal, e Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST) como marcadores para lesão hepática. Os resultados estão demonstrados na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores médios da dosagem sérica (média  $\pm$  desvio padrão) de AST, ALT, ureia, creatinina de camundongos Swiss *Mus musculus* tratados com EEBHm via oral por 28 dias nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg e no grupo controle.

	Controle	EEBHm 25 mg/kg	EEBHm 50 mg/kg	EEBHm 100 mg/kg
Ureia (mg/dL)	15,21 $\pm$ 3,28	16,61 $\pm$ 2,24	17,5 $\pm$ 2,77	15,26 $\pm$ 2,91
Creatinina (mg/dL)	0,41 $\pm$ 0,08	0,41 $\pm$ 0,04	0,47 $\pm$ 0,07	0,28 $\pm$ 0,08
AST (U/L)	10,95 $\pm$ 4,16	11,08 $\pm$ 3,75	10,65 $\pm$ 5,41	12,95 $\pm$ 4,66
ALT (U/L)	12,88 $\pm$ 3,85	13,88 $\pm$ 4,20	13,08 $\pm$ 5,82	15,03 $\pm$ 5,20

Legenda: Anova seguido por Tukey \*  $p < 0,05$  comparados com o controle.

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Bezerra *et al.* (2008) relatam que a toxicidade pode ser também avaliada investigando a variação dos órgãos e destaca como os principais órgãos afetados em caso de intoxicação são fígado e rins, por serem os órgãos responsáveis pela desintoxicação do organismo. Dessa forma, é importante destacar que os parâmetros bioquímicos avaliados nesta pesquisa não sofreram alterações significativas. Esses resultados corroboram com os dados de toxicidade aguda, massa corporal dos animais e peso dos órgãos, sinalizando que o EEBHm não apresenta sinais de toxicidade frente a esses mamíferos. Contudo, a realização de exames laboratoriais adicionais poderia fornecer uma avaliação mais detalhada.

Também foram realizados os exames hematológicos, para avaliação do número de hemácias, leucócitos e plaquetas, dosagem de hemoglobina e hematócrito e cálculo dos índices volume corpuscular médio (VCM); hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Os resultados se encontram na tabela 8.

Tabela 8 – Efeitos do EEBHm sobre os parâmetros hematimétricos dos camundongos *Mus musculus*.

	<b>Controle</b>	<b>EEBHm 25 mg/kg</b>	<b>EEBHm 50 mg/kg</b>	<b>EEBHm 100 mg/kg</b>
<b>Hemácias (10<sup>6</sup>/μL)</b>	4,51 ± 0,60	5,16 ± 0,57	5,34 ± 0,37	5,03 ± 0,59
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	13,26 ± 1,30	15,51 ± 1,88	16,08 ± 1,26*	16,08 ± 1,19*
<b>Ht (%)</b>	39,83 ± 3,89	46,66 ± 5,64*	48,66 ± 3,90*	48,33 ± 3,59*
<b>VCM (fm<sup>3</sup>)</b>	90,05 ± 1,63	90,85 ± 1,99	91,7 ± 0,95	91,4 ± 1,04
<b>HCM (pg)</b>	29,5 ± 0,5	29,8 ± 0,56	30,1 ± 0,08	30,16 ± 0,12*
<b>CHCM (g/dL)</b>	33 ± 0	33,18 ± 0,13	33,18 ± 0,10	33,16 ± 0,13
<b>Leucócitos (10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	5183,3 ± 898,919	6600 ± 903,696	6033,3 ± 1206,4	6133,3 ± 1214,7
<b>Segmentado</b>	45 ± 1,63	44,33 ± 2,13	45,16 ± 2,11	45,83 ± 2,40
<b>Eosinófilo</b>	3,5 ± 1,70	2 ± 1,15	1,83 ± 0,89	1,83 ± 0,89
<b>Linfócito Típico</b>	50,33 ± 2,28	51,66 ± 1,49	51,16 ± 1,95	51 ± 2
<b>Monócito</b>	1,66 ± 0,37	2 ± 0,81	2 ± 1	1,33 ± 0,47
<b>Plaquetas (μL)</b>	176500 ± 35831,7	166883,3 ± 11894,2	188333,3 ± 43153,4	174666,7 ± 24783,5

Legenda: Anova seguido por Tukey \* p<0,05 comparados com o controle; (VCM) Volume Corpuscular Médio; (HT) Hematócrito; (HCM); Hemoglobina Corpuscular Média; (CHCM) Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média.

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Na análise realizada dos parâmetros hematimétricos, pode ser observada alteração nos hematócritos de todos os grupos tratados com EEBHm, na quantidade de hemácias na dose intermediária (50 mg/kg) e na dose mais alta (100 mg/kg), e no HCM na maior dose administrada em comparação com o controle.

O sistema hematopoiético é um dos alvos mais sensíveis às substâncias químicas tóxicas e um importante indicador do estado fisiopatológico em humanos e animais (Li *et al.*, 2010). O hemograma é um exame de grande importância tanto na área veterinária quanto para os humanos. Constitui um dos mais explorados recursos primários para apontamento de desequilíbrio orgânico que pode nortear uma investigação mais assertiva. A ingestão de substâncias tóxicas, inclusive plantas e outros produtos naturais, pode alterar as concentrações das células sanguíneas (Melo *et al.*, 2012; Barros; Davino, 2014).

Os resultados do estudo de toxicidade subaguda indicaram que os seguintes parâmetros hematológicos não sofreram alterações estatisticamente significativas durante todo o período de 28 dias de tratamento: contagem total de hemácias, VCM, CHCM contagem total de leucócitos, contagem diferencial de leucócitos (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos). Porém, houve aumento estatisticamente significativo na concentração de hemoglobina do EEBHm de 50 mg/kg e 100 mg/kg, no hematócrito em todas as doses e no HCM do EEBHm 100 mg/kg.

A hemoglobina é uma proteína conjugada e é composta por globina e o núcleo prostético, heme, cujo principal componente químico é o ferro (Bicalho; Carneiro, 2010). Já o HCM é um índice hematimétrico, que fornece informações sobre o conteúdo médio de hemoglobina celular (Polizopoulou, 2010).

Evans (2008) discorre em sua pesquisa sobre o fato de os parâmetros hematológicos, como hemoglobina e HCM, no âmbito veterinário, especificamente para animais de laboratório, seria preocupante se estivessem apresentando decréscimo em seus valores. Portanto, considera-se que as alterações observadas nesses parâmetros hematológicos não são efeitos tóxicos induzidos pelo EEBHm.

Outro fator que deve ser levado em consideração é o potencial nutricional associado às espécies do gênero *Hymenaea*. Estudos relatam o uso dessas espécies como tônico em geral, fortificante, energizante, restaurador da força orgânica e da produção sanguínea, combatendo a fraqueza em crianças, e sendo bastante utilizadas popularmente no tratamento para anemia (Barret, 1994; Mendes; Carlini, 2007; Agra *et al.*, 2007; Albuquerque *et al.*, 2007a; Anselmo *et al.*, 2012). Diversas partes das espécies foram citadas durante os estudos, principalmente as

cascas, folhas, galhos, resina, seiva e frutos (Barret, 1994; Albuquerque *et al.*, 2007b; Mendes; Carlini, 2007; Araújo *et al.*, 2008; Cartaxo *et al.*, 2010; Chaves; Barros, 2012).

Um ensaio realizado por Oliveira (2015) usando equipamento de espectrometria atômica, mostrou a concentração de ferro contido em amostras de *H. martiana*. Para as folhas, o teor de ferro foi de  $0,690 \pm 0,003$  ppm, e para as cascas, o teor de ferro foi de  $32,280 \pm 0,402$  ppm. Esses dados colaboram para justificar o uso farmacológico de espécies do gênero no tratamento de anemia, uma vez que segundo a *Infinity Pharma*<sup>®</sup> (2017), a ingestão de plantas que contêm ferro pode levar ao aumento na concentração de hemoglobina. Como o HCM é obtido através da relação entre hemoglobina e eritrócitos esse fato também explicaria a alteração desse parâmetro laboratorial.

Tendo em vista esses dados, é possível formular a hipótese de que o aumento dos índices hematológicos observados nos animais que receberam doses do EEBHm está associado ao alto poder nutricional dessa espécie e em especial aos níveis de ferro encontrados nas partes das plantas desse gênero.

A alteração nos valores de hematócrito, puderam ser vistas em todos os grupos testados. O hematócrito é o volume da massa eritróide do sangue. Quando abaixo do normal indica anemia ou hemólise, por erro na colheita do material e quando elevado pode revelar desidratação, choque ou atividade física intensa (Bush, 2004).

Associada a essa informação, Ko e Luca (2009), relataram em sua pesquisa que, em relação a outras espécies, os camundongos são animais mais suscetíveis a alterações nas condições ambientais, pequenas variações na temperatura do ambiente e as respostas fisiológicas do animal podem acabar alteradas, correndo grande risco de entrarem em um estado de desidratação.

Dessa forma, além do estresse animal causado pelo tratamento com doses orais de EEBHm há 28 dias, soma-se o momento da anestesia, que segundo Council (2010) não existe um agente anestésico ideal ou uma técnica perfeita para ser posta em prática que não cause nenhum estresse ao animal. Tais fatos podem ter contribuído para alterações no hematócrito uma vez que o estresse pode levar a desidratação e essa, por sua vez, é uma das principais causas de aumento desse parâmetro (Bush, 2004).

## 5. CONCLUSÃO

Após análise fitoquímica, foi possível observar que o EEBHm mostrou a presença de algumas classes metabólicas como: saponinas, flavonoides, terpenos, cumarinas, taninos

condensados e hidrolisáveis. Esses metabólitos secundários possuem na literatura ampla discussão sobre suas ações e puderam ser associados com as atividades biológicas apresentadas pelo EEBHm.

O EEBHm apresenta atividade tóxica contra *Aedes aegypti*, podendo ser considerado um promissor método de controle alternativo para o combate deste mosquito. A análise evidenciou índices de mortalidade acima de 95% para todas as concentrações testadas como larvicidas e para as três maiores doses testadas como pupicida.

Os resultados de mortalidade tanto no estágio de larvas como no de pupas, bem como as alterações de motilidade das larvas, sugerem que o EEBHm pode ter ação tanto no trato digestivo das larvas e, também, pela penetração dos compostos bioativos no corpo das larvas.

Diante do potencial do EEBHm para desenvolvimento de um bioinseticida, é de suma importância a análise toxicológica, e testes de toxicidade aguda e subaguda, demonstram ausência de toxicidade em *Mus musculus*. Tal fato, indica uma maior segurança quanto a utilização do extrato bruto desta espécie como inseticida botânico, podendo ser inserido em programas integrados de controle populacional do vetor.

Ainda em relação aos testes de toxicidade, foi possível observar ações do EEBHm sobre o SNC, foram observadas diversas ações relacionadas a um potencial estimulantes do extrato tanto nos testes de toxicidade aguda, quanto nos de toxicidade subaguda. Esses resultados podem servir de base para posteriores pesquisas a fim de investigar o EEBHm como coadjuvante no tratamento de doenças que atingem o sistema nervoso.

Outro aspecto observado a partir desta pesquisa foi o poder nutricional associado ao EEBHm, que mostrou dados que sugerem a sua ação no aumento da hemoglobina. Dessa forma, também é importante que se faça análises posteriores no intuito de verificar quais elementos contidos no extrato poderiam estar associados a essa relação, possibilitando o uso deste extrato como um suplemento alimentar.

## REFERÊNCIAS

ABED, R. A. A. *et al.* Alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pela atividade larvicida do óleo-resina da planta medicinal *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae). **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 36, n. 1, p.75-86, 2007.

ACIOLE, S. D. G.. **Avaliação da Atividade Inseticida dos Óleos Essenciais das Plantas Amazônicas Annonaceae, Boraginaceae e de Mata Atlântica Myrtaceae como Alternativa de Controle às Larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera:**

**Culicidae**). 2009. 86p. Dissertação (Biologia Humana e Ambiente). Universidade de Lisboa. Faculdade de Ciências. Departamento de Biologia Animal, Lisboa, 2009.

AGRA, M. F. *et al.* Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 18, p. 472-508, 2008.

AGUIAR, J. C. D. *et al.* Chemical constituents and larvicidal activity of *Hymenaea courbaril* fruit peel. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 12, p. 1934578X1000501231, 2010.

AGUIAR, M.; STOLLENWERK, N.; HALSTEAD, S. B.. The impact of the newly licensed dengue vaccine in endemic countries. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 12, p. e0005179, 2016.

ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de Caatinga no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil, **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n. 3, p. 273-285, 2002.

ALBUQUERQUE, U. P. *et al.* Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 110, n. 1, p. 76-91, 2007b.

ALBUQUERQUE, U. P. *et al.* Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007a.

ALMEIDA, A. *et al.* Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)- limonene epoxide and its anxiolytic-like action. **Brain Research**, v. 1448, p. 56-62, 2012.

ALMEIDA, V. G.; GOES SAMPAIO, C.; MARTINS, V. E. P.. Produtos naturais de origem vegetal como ferramentas alternativas para o controle larvário de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 6, n. 4, p. 449-462, 2018.

ANJOS, B. T. C. *et al.* Revisão Bibliográfica: Características e Diagnóstico da Febre Amarela. **Revista NewsLab**, v. 121, p. 90-98, 2014.

ANSELMO, A.F. *et al.* Levantamento Etnobotânico de Plantas Medicinais Comercializadas por Raizeiros em uma Feira Livre no Município de Patos - PB. **Biofar**, volume especial, p. 39- 48, 2012.

ANTONIO, G. D.; TESSER, C. D.; MORETTI-PIRES, R. O.. Phytotherapy in primary health care, **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n.3, p. 541-553, 2014.

ARAÚJO, T. A. S. *et al.* A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of ethnopharmacology**, v. 120, n. 1, p. 72-80, 2008.

ASSUNÇÃO, G. V.; *et al.* **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA FRENTE AO *Aedes aegypti* DO ÓLEO ESSENCIAL DA ESPÉCIE *Citrus sinensis* L. Osbeck (LARANJA DOCE)**. 97 f. Dissertação de mestrado.

Programa de Pós-graduação em Química. Universidade Federal do Maranhão. São Luiz. 2013.

ATANASOV, A. G. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature reviews Drug discovery**, v. 20, n. 3, p. 200-216, 2021.

AYUSO, S.. Estados Unidos advertem que a vacina contra o zika levará anos. El País, Washington, 2016. Disponível em:  
<[https://brasil.elpais.com/brasil/2016/01/28/internacional/1454010152\\_353990.html](https://brasil.elpais.com/brasil/2016/01/28/internacional/1454010152_353990.html)>. Acesso em: 30 de janeiro de 2020.

BALBINO, E. E.; DIAS, M. F.. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2010, v. 20, n. 6, p. 992-1000.

BARRETT, B. Medicinal Plants of Nicaragua's Atlantic Coast. **Economic Botany**, v. 48, p. 8–20, 1994.

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da Toxicidade. In: OGA, S.; CAMARGO M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos da Toxicologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu. cap. 1.4, p. 30-36, 2014.

BATISTA, A. G. *et al.* Chemical composition of jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) flour and its effect on growth of rats. **Alimentos e Nutrição**, v. 22, n. 2, 2011.

BECKER, N.. **Mosquitoes and their control**. New Yourk: SpringerVerlag, 2.ed, 559 p. 2010.

BERAN, F.; *et al.* Chemical convergence between plants and insects: biosynthetic origins and functions of common secondary metabolites. **New Phytologist**, v. 223, n. 1, p. 52-67, 2019.

BESERRA, E. B.; *et al.* Biologia comparada de populações de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) da Paraíba. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 1, p. 81-85, 2008.

BEZERRA-SILVA, P. C. *et al.* Extract of *Bowdichia virgilioides* and *maackiain* as larvicidal agent against *Aedes aegypti* mosquito. **Experimental Parasitology**, v. 153, p. 160-164, 2015.

BETTI, A. H.; *et al.* Acute and repeated-doses (28 days) toxicity study of *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt (*Guttiferare*) in mice. **Food and chemical toxicology**, v. 50, n. 7, p. 2349-2355, 2012.

BEZERRA, D.P. *et al.* In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **Journal of applied toxicology**, v.28, p.156-163, 2008.

BFG-THE BRAZIL FLORA GROUP. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.

BHATT, S.; *et al.* The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 25 abr. 2013.

BICALHO, A. P. C.V.; CARNEIRO, R. A. **Apostila de Patologia Clínica**. 2010. p. 13-17. Disponível em: <[www.vetarq.com.br/2010/09/apostila-de-patologia-clinicapdf.html](http://www.vetarq.com.br/2010/09/apostila-de-patologia-clinicapdf.html)>. Acesso em: 14 de março de 2021.

BRADY, O. J. *et al.* Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus, **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, p. 1760, 2012.

BRAGA, I. A.; VALLE, D.. Aedes aegypti: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 16, n. 4, p. 179-293, 2007. Disponível em: <[http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1679-49742007000400006&lng=pt&nrm=iso](http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742007000400006&lng=pt&nrm=iso)>. Acessos: 10 fevereiro de 2020.

BRASIL, Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Parecer Técnico N° 3964. 2014b. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/19374.html>>. Acesso em: 29 de janeiro de 2020.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília, versão-2, 2013. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa>>. Acesso em: 14 fevereiro de 2021.

BRASIL, Ministério da Saúde. Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas. 3. ed. **Revista Brasília** :Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, p.84, 2001.

BRASIL, Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 30 de 2019 e levantamento rápido de índices para Aedes aegypti (LIRAa). **Secretaria de Vigilância em Saúde**. 2019. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos>>. Acesso em: 21 de setembro de 2021.

BRASIL, Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 52 de 2022. **Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente**. 2023. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022>>. Acesso em: 03 de março de 2023.

BRASIL, Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 01 a 52. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos>>. Acesso em: 21 de setembro de 2021.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS)**. Aspectos Clínicos da Infecção pelo Vírus da Dengue. Disponível em:<[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/kidengue/aspectosclinicos/livreto\\_aspectosclinicos.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/kidengue/aspectosclinicos/livreto_aspectosclinicos.pdf)>. 2014a. Acesso em: 28 janeiro de 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política e Programa Nacional de Plantas**

**Medicinais e Fitoterápicos.** Brasília, DF, 2016. Disponível em <[https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica\\_programa\\_nacional\\_plantas\\_medicinais\\_fitoterpicos.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterpicos.pdf)>. Acesso em: 28 de janeiro de 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico: criança.** Brasília: Ministério da Saúde, 2011. Disponível em: <[https://mosquito.saude.es.gov.br/Media/dengue/Arquivos/web\\_dengue\\_crian\\_25\\_01.pdf](https://mosquito.saude.es.gov.br/Media/dengue/Arquivos/web_dengue_crian_25_01.pdf)>. Acesso em: 8 de dezembro de 2019.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Práticas Integrativas e Complementares. Plantas Medicinais e Fitoterapia na Atenção Básica. **Normas e Manuais Técnicos–Caderno de Atenção Básica,** 2012. Disponível em: <[https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/praticas\\_integrativas\\_complementares\\_plantas\\_medicinais\\_cab31.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/praticas_integrativas_complementares_plantas_medicinais_cab31.pdf)>. Acesso em: 29 de fevereiro de 2021.

BREUNIG, R. L. **Avaliação da toxicidade crônica e reprodutiva da oleuropeína (Segmento I) em ratos Wistar.** 69 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2021.

BUSATO, M. A.; *et al.* Evolução da infestação por *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) nos municípios do oeste do estado de Santa Catarina. **Revista de Saúde Pública,** Florianópolis, v. 7, n. 2, p. 107-118, 2014.

BUSH, B. M. **Interpretação de Resultados Laboratoriais para Clínicos de Pequenos Animais.** São Paulo: Roca, 376 p, 2004.

CAMPBELL, M. A. *et al.* Reduced water intake: implications for rodent developmental and reproductive toxicity studies. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology,** v. 86, n. 3, p. 157-175, 2009.

CÂNDIDO, E. L.; SILVA, U. M.; CAVALCANTI, L. P.. New record and extended geographical distribution of *Aedes fluviatilis* (Lutz, 1904) in Ceará, northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v. 52, p. 1-3, 2019.

CAPEDING, M. R.; *et al.* Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. **The Lancet,** v. 384, n. 9951, p. 1358-1365, 2014.

CARNEIRO, F. M.; *et al.* Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais.** v. 3, n. 2, p. 44-75, 2014.

CARTAXO, S. L.; *et al.* Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of ethnopharmacology,** v. 131, n. 2, p. 326-342, 2010.

CARVALHO, A. P. T.; *et al.* **Perfil epidemiológico da dengue e seus determinantes no município de Uberlândia nos anos de 2011 a 2015.** 118 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

- CARVALHO, W. R. S.. Ensaio in vitro para determinação do potencial medicinal de extratos de plantas. In: HIDALGO, E. M. P (Org.). **VI Botânica no Inverno**. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, 2016. Cap. 11, p. 105-118.
- CAVALCANTI, L. P. G.; *et al.*. Competência de peixes como predadores de larvas de *Aedes aegypti*, em condições de laboratório. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 41, n. 4, p. 638-644, 2007.
- CHANG, S.; *et al.*. DDT exposure in early childhood and female breast cancer: Evidence from an ecological study in Taiwan. **Environment international**, v. 121, p. 1106-1112, 2018.
- CHAVES, E. M. F.; BARROS, R. F. M. Diversidade e uso de recursos medicinais do carrasco na APA da Serra da Ibiapaba, Piauí, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 476-486, 2012.
- CHEEKE, P. R. Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. In: **Saponins in food, feedstuffs and medicinal plants**. Springer, p. 241-254, 2000.
- CHENG, W. N, *et al.* Moringa extract attenuates inflammatory responses and increases gene expression of casein in bovine mammary epithelial cells. **Revista Animals**. v. 9, n.8, p 391. 2019.
- CHIELE, A. H. *et al.* Estudo da variabilidade genética e análise de possíveis mutações kdr no gene codificador dos canais de sódio relacionados à resistência do *Aedes aegypti* a inseticidas. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 3, p. e11312340474-e11312340474, 2023.
- CIGARROA-TOLEDO, N.; *et al.*. Chikungunya virus in febrile humans and *Aedes aegypti* mosquitoes, Yucatan, Mexico. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 10, p. 1804, 2016.
- CITADINI-ZANETTE, V.; *et al.*. Fitoterapia racional: aspectos taxonômicos, agroecológicos, etnobotânicos e terapêuticos. **Bioscience**. v. 6, n. 5, p. 8-13, 2017.
- CLEMONS, A.; *et al.*. Culturing and egg collection of *Aedes aegypti*. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2010, n. 10, p. e.2215, 2010.
- CLOSA, D. *et al.* Prostanoids and free radicals in C14C-induced hepatotoxicity in rats: effect of astilbin. **Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids**, v. 56, n. 4, p. 331-334, 1997.
- COLOMBO. **Introdução a fitoterapia: utilizando adequadamente as plantas medicinais**. Colombo: Herbarium Lab. Bot. Ltda. p. 92, 2008.
- CONSOLI, R. A.; DE OLIVEIRA, R. L.. **Principais mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 228, 1998.
- CORRÊA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N.. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, p. 500-506, 2011.

COUNCIL, N. R. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. Eighth Edition. Washington, D. C, 2010.

COUTINHO, A. L. **Conhecimento e utilização de plantas mágico-religiosas por rezadeiras no semiárido paraibano**. João Pessoa, 2018. p. 35-47

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 8, p. 1001–1043, 2009.

CRUZ, R. C. D.. **Avaliação do potencial inseticida das folhas de *Crotonargyrophyllus* (Euphorbiaceae) sobre o *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e toxicológica sobre *Mus musculus* (Rodentia: Muridae)**. 80 f. Dissertação de Mestrado - Itapetinga: UESB, 2016.

DA CRUZ SILVA, M. E. G. *et al.* HPLC-DAD analysis and antioxidant activity of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 2, p. 1160-1166, 2012.

CUNHA, L. C.; *et al.* Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v. 19, p. 403-411, 2009.

CUNHA, U. G. V. *et al.* Uso de inibidores da colinesterase em idosos com comorbidades clínicas. **Geriatrics & gerontologia**, v. 2, n. 4, p. 162-166, 2008.

DA COSTA, D. L.; *et al.* Multipropósito de *Hymenaea courbaril* L. em uma área de manejo florestal comunitário na Amazônia. **Advances in Forestry Science**, v. 6, n. 2, p. 681-690, 2019.

DA COSTA JÚNIOR, J.S. *et al.* Evaluation of possible antioxidant and anticonvulsant effects of the ethyl acetate fraction from *Platonia insignis* Mart.(Bacuri) on epilepsy models. **Epilepsy & Behavior**, v. 22, n. 4, p. 678-684, 2011.

DE SOUZA, G. A. *et al.* Discovery of novel dual-active 3-(4-(dimethylamino) phenyl)-7-aminoalcoxy-coumarin as potent and selective acetylcholinesterase inhibitor and antioxidant. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 34, n. 1, p. 631-637, 2019.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. **Journal of ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 1-23, 2004.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus. **Journal of ethnopharmacology**, v. 78, n. 2-3, p. 165-170, 2001.

DONALÍSIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.. Chikungunya in Brazil: an emerging challenge. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. 1, p. 283-285, 2015.

DUTRA, Valquíria Ferreira; GARCIA, Flávia Cristina Pinto; LIMA, Haroldo Cavalcante de. *Caesalpinioideae* (Leguminosae) nos Campos Rupestres do Parque Estadual do Itacolomi, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, p. 547-558, 2008.

DUTRA, H. L. C.; *et al.*. Wolbachia blocks currently circulating Zika virus isolates in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. **Cell host & microbe**, v. 19, n. 6, p. 771-774, 2016.

EVANS, G. Owen. **Animal hematotoxicology: a practical guide for toxicologists and biomedical researchers**. CRC press, 224 p. 2008.

FENALTI, J. M.; *et al.*. Diversidade das plantas brasileiras com potencial anti-helmíntico. **VITTALLE-Revista de Ciências da Saúde**, v. 28, n. 1, p. 38-49, 2016.

FERNANDES, C. P. M.; *et al.*. Toxicidade dos fitoterápicos de interesse do SUS: uma revisão. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 37, n. 1, p. 91-104, 2016.

FERNANDES, M. F.; QUEIROZ, L. P. Vegetação e flora da Caatinga. **Ciência e cultura**, v. 70, n. 4, p. 51-56, 2018.

FERREIRA, A. B. H.. **Novo Dicionário da Língua Portuguesa**. Segunda edição. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, p.1314, 1986.

FLORA DO BRASIL. **Fabaceae in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB115>>. Acesso em: 23 de março 2023

FORATTINI, O. P.. **Culicidologia Médica, vol 2: Identificação, Biologia e Epidemiologia**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002.

FRANCO, D. P. *et al.* A IMPORTÂNCIA DAS CUMARINAS PARA A QUÍMICA MEDICINAL E O DESENVOLVIMENTO DE COMPOSTOS BIOATIVOS NOS ÚLTIMOS ANOS. **Química Nova**, v. 44, p. 180-197, 2021.

FREITAS, M. Z.; *et al.*. Avaliação da atividade larvicida do extrato etanólico dos frutos de *Solanum crinitum* LAM.(Solanaceae) para o controle de imaturos de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 9, n. 3, p. 20-23, 2019.

FUNASA, Fundação Nacional De Saúde. **Dengue Manual para Pessoal de Combate ao Vetor – Manual de Normas Técnicas**, Brasília, 2012. Disponível em: <[https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man\\_dengue.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf)>. Acesso em: 13 de março de 2021.

GARCEZ, W. S.; *et al.*. Substâncias de origem vegetal com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 363-393, 2013.

GARCIA, K. K. S.. **Efeito de estações de disseminação de pyriproxyfen para controle de *Aedes aegypti* em São Sebastião**. Dissertação (mestrado). 80 f. Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Pós-graduação em Medicina Tropical, 2019.

GETTER, C. J.; NUNES, J. R. S.. Ocorrência de intoxicações por plantas tóxicas no Brasil. **Engenharia Ambiental**, v. 8, n. 1, p. 79-100, 2011.

GIRARDI, G. Breve História das Drogas. **Revista Galileu Especial**, n. 3, p. 6-7, Ed. Globo, 2003.

GOMES, A. S., SCIAVICO, C. J., EIRAS, A. E.. Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em laboratório e campo. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, v. 4 p. 39: 327-332. 2006.

GREEN, S.; ROTHMAN, A.. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. **Current opinion in infectious diseases**, v. 19, n. 5, p. 429-436, 2006.

GUARALDO, L. *et al.* Hydroalcoholic extract and fractions of *Davilla rugosa* Poiret: effects on spontaneous motor activity and elevated plus-maze behavior. **Journal of ethnopharmacology**, v. 72, n. 1-2, p. 61-67, 2000.

GUBLER, D. J.. Dengue, urbanization and globalization: the unholy trinity of the 21st century. **Tropical medicine and health**, 39.4SUPPLEMENT: S3-S11, 2011.

GUPTA, L. *et al.* Larvicidal activity of the  $\alpha$ -amylase inhibitor from the seeds of *Macrotyloma uniflorum* (Leguminosae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 31, n. 1-2, p. 69-74, 2011.

HARAPAN, H. *et al.* Covid-19 and dengue: double punches for dengue-endemic countries in Asia. **Reviews in medical virology**, v. 31, n. 2, p. e2161, 2021.

HARBONE, J. B.. Phytochemical Methods. **Chapman & Hall** - Londres, v. 3, p. 12-17, 1998.

HEUSSER, E. R.; STEIN, F. H.; NECKEL, I. E.. O bioma caatinga sob diferentes perspectivas brasileiras a partir de um olhar catarinense. In: Encontro Nacional De Geógrafos, 2018. João Pessoa. **Anais do XIX Encontro Nacional de Geógrafos**. João Pessoa. 2018.

IANCK, M. A. *et al.* Conhecimento e uso de plantas medicinais por usuários de unidades básicas de saúde na região de Colombo-PR. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 11, n. 8, p. 29-30, 2017.

IBGE. **Biomass e sistema costeiro-marinho do Brasil: compatível com a escala 1:250 000**. Rio de Janeiro: IBGE, 2019. Série relatórios metodológicos, v. 45. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/25798-ibge-lanca-mapa-inedito-de-biomass-e-sistema-costeiro-marinho>>. Acesso em: 10 de janeiro de 2020.

INFINITY PHARMA®. **Ashwagandha: Ginseng indiano**. 2017. Disponível em: <https://infinitypharma.com.br/uploads/insumos/pdf/a/ashwagandha-ginsensg-indiano.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2021.

JARDIM, J. B.; SCHALL, V. T.. Dengue prevention: focus on proficiency. **Cadernos de saúde pública**, v. 25, n. 11, p. 2529-2530, 2009.

- JESUS, N. A.; SUCHARA, E. A.. Cultivo de plantas tóxicas e a ocorrência de intoxicações em domicílios no município de Barra do Graças. **Revista Eletrônica da UNIVAR**, v.2; n.10, p.89-95, 2013.
- JESUS, N. Z. T. *et al.* Hippocratic screening and subchronic oral toxicity assessments of the methanol extract of *Vatairea macrocarpa* heartwood in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 22, n. 6, 2012.
- JOHNSTON, G. A. R.; BEART, P. M. Flavonoids: some of the wisdom of sage?. **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 5, p. 809, 2004.
- JORDAN, S. A.; CUNNINGHAM, D. G.; MARLES, R. J.. Assessment of herbal medicinal products: challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 243, n. 2, p. 198-216. 2010.
- JUDD, W. S. *et al.* **Sistemática Vegetal. Um Enfoque Filogenético**. Porto Alegre: Artmed. 2009.
- JÚNIOR, H. B. P. *et al.* Avaliação da toxicidade aguda do extrato hexânico de frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae) em camundongos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 4, p. 512-519, 2012.
- KABARU, J. M.; GICHIA, L. Insecticidal activity of extracts derived from different parts of the mangrove tree *Rhizophora mucronata* (Rhizophoraceae) Lam. against three arthropods. **African Journal of Science and Technology**, v. 2, n. 2, 2001.
- KABIR, K. E.; CHOUDHARY, M. I. Growthdisrupting, larvicidal and neurobehavioral toxicity effects of seed extract of *Seseli diffusum* against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 90, p. 52-60, 2013.
- KO, G. M.; LUCA, R. R. Camundongo. In: LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M.; **Cuidados e manejo de animais de laboratório**. São Paulo: Ateneu, 2009. p. 561-574.
- KRAEMER, M. U. G.; *et al.*. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **elife**, v. 4, p. e08347, 2015.
- LANGENHEIM, J. H.; *et al.*. Evolutionary implications of leaf resin pocket patterns in the tropical tree *Hymenaea* (Caesalpinioideae: Leguminosae). **American Journal of Botany**. v.4, n.69, p.595-607, 1982.
- LEE, Y. T.; LANGENHEIN, J. H.. Systematics of the genus *Hymenaea* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae). **Berkeley: University of California Press**. p. 105, 1975.
- LEICHTER, J.; LEE, M. Does dehydration contribute to retarded fetal growth in rats exposed to alcohol during gestation?. **Life sciences**, v. 35, n. 21, p. 2105-2111, 1984.
- LI, X. *et al.* Acute and subacute toxicity of ethanol extracts from *Salvia przewalskii* Maxim in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 110–115, 2010.

- LIN, L. *et al.* Immunogenicity of a live-attenuated dengue vaccine using a heterologous prime-boost strategy in a phase 1 randomized clinical trial. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 223, n. 10, p. 1707-1716, 2021.
- LINDSAY, S. W.; *et al.* Improving the built environment in urban areas to control Aedes aegypti-borne diseases. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 95, n. 8, p. 607, 2017.
- LITAUDON, M.; *et al.* Desenvolvimento de uma abordagem inovadora baseada em rede molecular para a descoberta e isolamento direcionado de novos metabólitos bioativos de plantas superiores. **Planta Médica**, v. 85, n. 18, p. SL D-01, 2019.
- LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C.. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.
- LORENZI, H.. Árvores brasileiras – Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa, SP: **Instituto Plantarum**, ed.4, p.384, 2002.
- MACENA, L. M., NASCIMENTO, A. S. S., KRAMBECK SILVA, F. A.. Plantas medicinais utilizadas por gestantes atendidas na unidade de saúde da família (usf) no bairro da Coahb Tuarumã no município de Taguará da Serra, Mato Grosso, **Revista Biologia e Farmácia**, v. 7, p. 1, 2012.
- MACÍAS, F.A.; *et al.* Plant biocommunicators: theirphytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models. **Phytochemistry**, v.7, p.179-94, 2008.
- MACLENNAN, K. M.; DARLINGTON, C. L.; SMITH, P. F. The CNS effects of Ginkgo biloba extracts and ginkgolide B. **Progress in neurobiology**, v. 67, n. 3, p. 235-257, 2002.
- MADEIRO, A. A. S; DE LIMA, C. R.. Estudos etnofarmacológicos de plantas medicinais utilizadas no brasil—uma revisão sistemática. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT-ALAGOAS**, v. 3, n. 1, p. 69-76, 2015.
- MALONE, M. H. The pharmacological evaluation of natural products—general and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **Journal of ethnopharmacology**, v. 8, n. 2, p. 127-147, 1983.
- MARANGONI, C.; DE 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. 92-112, 2013.
- MARTINS, V. E .P.; *et al.* Distribuição espacial e características dos criadouros de Aedes albopictus e Aedes aegypti em Fortaleza, Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p. 73-77, 2010.
- MATOS, F. J. A.. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2 ed. Fortaleza: Edições EUFC, 1988. 141p.

MELLO, P. B. *et al.* Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, p. 301-309, 2008.

MELO, M. G. D. *et al.* Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 8, n. 9, p. 1-6, 2012.

MENDES, F. R.; CARLINI, E. A. Brazilian plants as possible adaptogens: an ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. **Journal Ethnopharmacology**. V. 109, n.3, p. 493-500. 2007.

MENEZES FILHO, A. C. P.; OLIVEIRA FILHO, J. G. de; CASTRO, C. F. de S. Avaliações antioxidante e antifúngica dos óleos essenciais de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne e *Hymenaea courbaril* L. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 8, n. 2, p. 104-114, 2020.

MERCÊS, P. F. F.. **Variações da composição química e da atividade antifitopatogênica dos óleos essenciais das folhas e frutos de *Hymenaea courbaril* L. Var. *courbaril* (Fabaceae) coletadas em área de extrema importância biológica para a conservação.** 103 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

MESHALKINA, D. A.; KALUEFF, A. V. Commentary: Ethological Evaluation of the Effects of Social Defeat Stress in Mice: Beyond the Social Interaction Ratio. **Front Behav Neurosci**, v. 10, n., p. 155, 2016.

MIRANDA, F. R. **Desenvolvimento pós-embrionário do intestino médio e efeito da cafeína e da borra de café em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** 2019. Disponível em < <http://tot.dti.ufv.br/handle/123456789/12481>>. Acesso em: 18 de abril de 2021.

MOHANTY, L. *et al.* Safety and immunogenicity of a single dose, live-attenuated ‘tetraivalent dengue vaccine’ in healthy Indian adults; a randomized, double-blind, placebo controlled phase I/II trial. **Vaccine: X**, v. 10, p. 100142, 2022.

MOHAMMED, S. Y. *et al.* Proximate Composition of *Moringa oleifera* Lam. From Different Regions in Sudan. **International Invention of Scientific Journal**, vol. 02, n. 07, p. 268, 2018.

MONATH, T. P.. **The arboviruses: epidemiology and ecology.** CRC Press, 2019.

MONSENY, A. M.; *et al.* Poisonous plants: an ongoing problem. **Anales de Pediatría**, v. 85, n. 2, p. 347-353, 2015.

MORAES, L.; *et al.* Description and Validation of a Clinical Scoring System to Predict Chronic Arthralgia in Chikungunya Disease. **The Lancet Infectious Diseases**, 2019. Disponível em: < [https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract\\_id=3411730](https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=3411730)>. Acesso em: 18 de janeiro de 2022.

MORALES PERIÑAN, J.; *et al.*. **Análisis morfológico del mosquito *Aedes aegypti* y nivel de conocimiento de la enfermedad producida por el virus del dengue en las sede de la CURN Cartagena**. 43 f. Corporacion Universitaria Rafael Nuñez, 2019.

MOURA.O. B. D.; NEVES. S. O. C.; CORADIN, L. Biodiversidade para Alimentação e Nutrição: Promoção de Plantas Comestíveis Subutilizadas Brasileiras nas Políticas Nacionais de Segurança Alimentar e Nutricional. In: Jacob, MCM, Albuquerque, UP (eds). **Plantas Alimentícias Locais do Brasil**, 2021.

MUSTARD, J. A. The buzz on caffeine in invertebrates: effects on behavior and molecular mechanisms. **Cellular and molecular life sciences**, v. 71, n. 8, p. 1375-1382, 2014.

NAJAFI, Z. *et al.* Novel tacrine-coumarin hybrids linked to 1, 2, 3-triazole as anti-Alzheimer's compounds: In vitro and in vivo biological evaluation and docking study. **Bioorganic chemistry**, v. 83, p. 303-316, 2019.

NELSON, M. J.. ***Aedes aegypti*: biología y ecología**. [Sl: s.n], 1986. Disponível em:<<http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/>>. Acesso em: 8 de fevereiro de 2021.

NÓBREGA, J. S. *et al.* Avaliação do conhecimento etnobotânico e popular sobre o uso de plantas medicinais junto a alunos de graduação. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, v.11, n.1, p. 7-13, 2017.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. **Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method**. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001. Disponível em: <[https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method\\_9789264071001-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_9789264071001-en)>. Acesso em: 8 de fevereiro de 2021.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT, Growth in health spending slows in many OECD countries, according to OECD Health Data 2008. Paris, France: **Organisation for Economic Co-operation and Development**, 2008. Disponível em: <<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/fedddocs/oecd/oecd407-2008.pdf>>. Acesso em: 8 de fevereiro de 2021.

OGA, S.; CARVALHO, M.; BATISTUZZO, J.. Fundamentos de Toxicologia. 3. ed. São Paulo: Atheneu. 677 p. 2008.

OLIVEIRA, F. G. S. **Influência do método extrativo sobre a produção de compostos fenólicos em *Hymenaea martiana* (Fabaceae) e controle de qualidade da droga vegetal**. 208 f. Universidade Federal do Vale do São Francisco. Petrolina, 2015.

OLIVEIRA, F. G. S. *et al.* Influence of the extractive method on the recovery of phenolic compounds in different parts of *Hymenaea martiana* hayne. **Pharmacognosy research**. v. 8, n.4, p.270, 2016.

OLIVEIRA, F. G. S. *et al.* Photoprotective activity and HPLC-MS-ESI-IT profile of flavonoids from the barks of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae): development of topical formulations containing the hydroalcoholic extract. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 35, n. 1, p. 504-516, 2021

- OLIVEIRA, G. P.; *et al.*. Atividade larvicida do extrato etanólico da raiz de *Croton linearifolius* sobre *Aedes aegypti*. **Revista Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 442-448, 2014.
- OLIVEIRA, S. L.; *et al.* .. Mosquito transgênico: do paper para a realidade. **Revista da Biologia**, v. 6, p. 38-43, 2011.
- OLSON, H. *et al.* Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.32, n.1, p. 56 – 67, 2000.
- ONG, J.; *et al.*. A novel entomological index, *Aedes aegypti* Breeding Percentage, reveals the geographical spread of the dengue vector in Singapore and serves as a spatial risk indicator for dengue. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 17, 2019.
- OSTERA, G. R.; GOSTIN, L. O.. Biosafety concerns involving genetically modified mosquitoes to combat malaria and dengue in developing countries. **Revista Jama**, v. 305, n. 9, p. 930-931, 2011.
- PACHECO, A. G. M. *et al.* Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae) em camundongos. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2021.
- PADAYACHEE, B.; BAIJNATH, H. Uma revisão abrangente atualizada das propriedades medicinais, fitoquímicas e farmacológicas da *Moringa oleifera*. **South African Journal Of Botany**, v 1, p 1-13. 2019.
- PALENCIA, D. S.. Fauna de larvas de mosquitos (Diptera, Culicidae) da área urbana do município de Armação dos Búzios, Rio de Janeiro. **Revista Eletrônica de Biologia (REB)**, v. 5, n. 2, p. 13-30, 2012.
- PASA, M. C.. Saber local e medicina popular: a etnobotânica em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 1, n. 1, p. 179-196, 2011.
- PASSOS, C. S. *et al.* Terpenoids with activity in the central nervous system (CNS). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1A, p. 140-149, 2009.
- PASSOS, R. M. *et al.* Qualidade pós-colheita da moringa (*Moringa oleifera* Lam.) utilizada na forma in natura e seca. **Revista GEINTEC**, v.3, n.1, p.113-120, 2012.
- PEACOCK, B. M.; *et al.* Intoxicaciones por plantas tóxicas atendidas desde un servicio de información toxicológica. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 14, n. 2, p. 1-8, 2009.
- PEIXOTO, R. M. *et al.* Potencial antibacteriano de plantas nativas do bioma caatinga frente a *Staphylococcus* spp. isolados de mastite em pequenos ruminantes. **Revista Caatinga**, v. 29, n. 3, p. 758-763, 2016.
- PEREIRA, V. S. *et al.* Estudo químico, toxicidade e atividade antibacteriana do óleo essencial de *Ocimum gratissimum*. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, v. 2, n. 4, número especial, 2014.

PIMENTA NETO, A. A. *et al.* Bioatividade de óleos essenciais e extratos vegetais no controle de doenças causadas por *Phytophthora nicotianae* em solanáceas. *Summa Phytopathologica*, v. 46, n. 3, p. 267-272, 2020.

PINTO, R. B.; TOZZI, A.M.G.A.; MANSANO, V.F. Hymenaea in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB83203>>. Acesso em: 02 mar. 2023.

POLIZOPOULOU, Z. S. Haematological tests in sheep health management. **Small Ruminant Research**, v. 92, n. 1-3, p. 88 – 91, 2010.

PORTAL DA SAÚDE – SUS – 2016. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/>>. Acesso em: 12 de janeiro de 2020.

PORTO, K. R. A, *et al.* Screening of plants extracts and fractions on *Aedes aegypti* larvae found in the state of Mato Grosso do Sul (Linnaeus, 1762) (Culicidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 2, p. 895-906, 2017.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J.. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 11-17, 2013.

PROMPETCHARA, E.; *et al.*. Dengue vaccine: Global development update. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, v. 10, p. 178-185, 2019.

PRUD'HOMME, S. M.; *et al.*. Impact of micropollutants on the life-history traits of the mosquito *Aedes aegypti*: On the relevance of transgenerational studies. **Environmental Pollution**, v. 220, p. 242–254, 2017.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

PUGA, I. T.. **Obtenção de produtos naturais a partir da casca do fruto do jatobá (Hymenaea Courbaril)**. 2015. 55f. Dissertação de mestrado - Universidade de Brasília. Instituto de química – Brasília, 2015.

RABIU, A. T. *et al.* Dengue and COVID-19: a double burden to Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 7, p. 4092, 2021.

REGIS, L. N.; *et al.*. Sustained reduction of the dengue vector population resulting from an integrated control strategy applied in two Brazilian cities. **PloS one**. v. 8, n. 7, p. e67682, 2013.

REY, L.. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. In: **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos Trópicos Ocidentais**. p. 883-883. 2008.

REZENDE, F. M.; *et al.*. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. In: Hidalgo, E. M.P (Org.). **VI Botânica no Inverno**. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, São Paulo. Cap. 10, p. 93-104, 2016.

RHIOUANI, H.; *et al.*. Acute and sub-chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniaria glabra* in rodents. **Journal of ethnopharmacology**, v. 118, n. 3, p. 378-386, 2008.

ROCHA, L. S., *et al.*, Data on elemental composition of the medicinal plant *Hymenaea martiana* Hayne (Jatobá), **Data in brief**, v. 19, p. 959-964, 2018.

ROSA, R. L.; BARCELOS, A. L. V.; BAMPI, G.. Investigação do uso de plantas medicinais no tratamento de indivíduos com diabetes melito na cidade de Herval D' Oeste - SC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.2, p.306-310, 2012.

RYAN, S. J. *et al.* Socio-ecological factors associated with dengue risk and *Aedes aegypti* presence in the galápagos Islands, Ecuador. **International journal of environmental research and public health**, v. 16, n. 5, p. 682, 2019.

SANTANA, T. C. **Uso do extrato de folhas do Jatobá (*Hymenaea martiana* Hayne) na redução das contagens de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em leite cru**. 2015. 52f. Dissertação de mestrado – Programa de Pós graduação em agricultura e Biodiversidade. Universidade federal de Sergipe. São Cristovão, 2015.

SANTOS, C. C.; VOLPATO, R. S. **Toxicidade aguda oral e atividade antimalárica in vivo do extrato etanólico das cascas de *Geissospermum vellosii* Allemão (*Apocynaceae*)**. 2015. 54 f. Monografia (Graduação em Ciências Farmacêuticas) –Universidade Federal do Pará, Instituto Ciências da Saúde, Belém, 2015.

SANTOS, L. D. Avaliação da Toxicidade Reprodutiva do Óleo Essencial de *Rosmarinus officinalis* L. em Ratos Wistar. 2017. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). 99p. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

SANTOS, M. A. V.. de *Aedes aegypti* (Diptera: Culcidae). Estudos proporcionais estratégias integradas de controle vetorial em municípios da região metropolitana do Recife, no período de 2001 a 2007. Tese. 223p. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. **Fundação Oswaldo Cruz**, 2008.

SANTOS, S. C.; PAZ, L. C. M.; LIMA, M. O. A. Prospecção tecnológica sobre métodos de controle do mosquito *Aedes aegypti*. **Cadernos de Prospecção**, v. 12, n. 1, p. 105, 2019.

SANTOS-LIMA, T. M. *et al.* Plantas medicinais com ação antiparasitária: conhecimento tradicional na etnia Kantaruré, aldeia Baixa das Pedras, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 240-247, 2016.

SAVI, D. C.; ALUIZIO, R.; GLIENKE, C. Brazilian Plants: An Unexplored Source of Endophytes as Producers of Active Metabolites. **Planta Medica**, v. 85, n. 8, p. 619–636, 2019.

SCHAFFNER, F.; MATHIS, A.. Dengue and dengue vectors in the WHO European region: past, present, and scenarios for the future. **The Lancet Infectious Diseases**, v.14, n.12. p. 1271-1280, 2014.

SCHMIDT, E. C. **Structure of mutualistic networks between bats and plants and other feeding strategies in a semiarid caatinga forest of Rio Grande do Norte, Brazil**. 2016. 81f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

SCOTT, T. W.; TAKKEN, W.. Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission. **Trends in parasitology**, v. 28, n. 3, p. 114-121, 2012.

SEEFF, L. B.. Herbal hepatotoxicity. **Clinics in liver disease**, v. 11, n. 3, p. 577-596, 2007.

SHI, D. H. *et al.* Synthesis, characterization, crystal structure and evaluation of four carbazole-coumarin hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Molecular Structure**, v. 1209, p. 127897, 2020.

SHIN, J. *et al.* Constructing a knowledge-based database for dermatological integrative medical information. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013

SHIVKUMARA, K. T. Botanical insecticides; prospects and way forward in India: A review. **Journal of Entomology and Zoology studies**, v. 7, n. 3, p. 206-211, 2019.

SILVA OLIVEIRA, F. G. *et al.* The genus *Hymenaea* (Fabaceae): A chemical and pharmacological review. **Studies in natural products chemistry**, v. 58, p. 339-388, 2018.

SILVA, E. S. *et al.* Alterações comportamentais em ratos administrados com preparações da *Datura suaveolens*. **VITTALLE-Revista de Ciências da Saúde**, v. 7, n. 1, p. 33-50, 2017a.

SILVA, J. S.; MARIANO, Z. F.; SCOPEL, I. A.. dengue no Brasil e as políticas de combate ao *Aedes aegypti*: da tentativa de erradicação às políticas de controle. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 3, n. 6, p. 163-175, 2008.

SILVA, M. O. M.; MOREIRA, L. M. C. C.; FELISMINO, D. C. Levantamento Etnofarmacológico de Espécies Medicinais em Área da Reserva Florestal de Caatinga no Município de Santa Cruz do Capibaribe, PE. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v.13, n.1, p.35-40, 2017.

SILVA, N. C. S. *et al.* A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos em prol da saúde. **ÚNICA Cadernos Acadêmicos**, v. 3, n. 1, 2017b.

SILVA, O.; POLETO, C.. Monitoramento do *Aedes albopictus* em pequenas comunidades. **Uningá Review**, v.10, n. 1, p. 25-32, 2012. SILVA

SILVA, S. L. **Prospecção fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante de extratos e frações enriquecidas a partir de *Hymenaea eriogyne* Benth.** 2019. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2019.

SILVA, T. S.; FREIRE, E. M. X. Abordagem etnobotânica sobre plantas medicinais citadas por populações do entorno de uma unidade de conservação da caatinga do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.12, n.4, p.427-435, 2010.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed Editora, 502p. 2016.

SIMÕES, C. M. O.; *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRS/ UFS. 1.104p. 2010.

SIQUEIRA, J. B.; *et al.* Dengue no Brasil: Tendências e mudanças na epidemiologia, com ênfase nas epidemias de 2008 e 2010. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, MS. p15, 2010.

SOUZA, C. A. S.; *et al.* Controle de qualidade físico-químico e caracterização fitoquímica das principais plantas medicinais comercializadas na feira-livre de Lagarto-SE. **Scientia Plena**, v. 13, n. 9, p. 1-8, 2017.

SOUZA, I. M.; FUNCH, L. S.; DE QUEIROZ, L. P.. Flora da Bahia: Leguminosae–Hymenaea (Caesalpinioideae: Detarieae). **SITIENTIBUS série Ciências Biológicas**, v. 16, p. 1-18, 2016.

SOUZA, P.F.; *et al.* Germinação e crescimento inicial entre matrizes de duas espécies do gênero *Hymenaea*. **Floresta e Ambiente**. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/101590/2179-8087.067613>>. Acesso em: 2 dezembro de 2020.

SOUZA, T. M. *et al.* Toxicity of Brazilian plant seed extracts to two strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and nontarget animals. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 4, p. 846-851, 2011.

SPARG, S. G.; *et al.* J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of ethnopharmacology**, v. 94, n. 2-3, p. 219-243, 2004.

STANAWAY, J. D.; *et al.* The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet Infect Dis**. v.16, n. 6, p. 712–23. 2016.

SUK, K. T. *et al.* A prospective nationwide study of drug-induced liver injury in Korea. **The American journal of gastroenterology**, v. 107, n. 9, p. 1380-1387, 2012.

TERRA, M. R. *et al.* *Aedes aegypti* e as arbovíroses emergentes no Brasil. **Uningá review**, v. 30, n. 3, 2017.

THAKUR, M.; *et al.* Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 12, p. 1-12, 2019.

TIAGO, P. V. *et al.* Caracterização morfoanatômica, fitoquímica e histoquímica de *Hymenaea courbaril* (Leguminosae), ocorrente na Amazônia Meridional. **Rodriguésia**, v. 71, 2020.

TIAGO, P. V.; *et al.* Levantamento etnobotânico do jatobá (*Hymenaea courbaril* L., Fabaceae) no norte do estado de Mato Grosso, Brasil. **Gaia Scientia**, [S. l.], v. 13, n. 1, 2019.

TORRES, M.; *et al.* Mosquito Alert Annual Report 2017 - Citizen science project results. 2018. Disponível em: <[http://www.mosquitoalert.com/wp-content/uploads/2018/11/Informe-anual-Mosquito-Alert\\_2018\\_en.pdf](http://www.mosquitoalert.com/wp-content/uploads/2018/11/Informe-anual-Mosquito-Alert_2018_en.pdf)>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2020.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S.. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

VALADARES, S N. S. Composição química, toxicidade e atividade biológica de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke (Leguminosae). 2017. 90 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Recursos Genéticos Vegetais)- Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2017.

VALE, C. R. do *et al.* Assessment of toxic, genotoxic, antigenotoxic, and recombinogenic activities of *Hymenaea courbaril* (Fabaceae) in *Drosophila melanogaster* and mice. **Genetics and molecular research**. 2013.

VALLE, D.. **Aedes e dengue: vetor e doença**. Instituto Oswaldo Cruz, 2017. Disponível em: <<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/aedesvetoredoenca.html>> Acesso em: 10 de fevereiro de 2020.

VAREJÃO, J. B. M.; *et al.* Criadouros de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em bromélias nativas na cidade de Vitória, ES. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 238-240. 2005.

VASCONCELOS, J.; *et al.* Plantas tóxicas: conhecer para prevenir. **Revista Científica da UFPA**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2009.

VÀZQUEZ-SALAT, N.; HOUDEBINE, L. M.. Will GM animals follow the GM plant fate?. **Transgenic research**, v. 22, n. 1, p. 5-13, 2013.

VIEIRA, D. S. *et al.* Atividade antitumoral da folha da *Hymenaea martiana* hayne em células mamárias de cães. **Pubvet**, v. 12, n. 8, p.133, 2018.

VILLAR, L.; *et al.* Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 2, p. 113-123, 2015.

WALKER, K.; LYNCH, M. Contributions of Anopheles larval control to malaria suppression in tropical Africa: review of achievements and potential. **Medical and veterinary entomology**, v. 21, n. 1, p. 2-21, 2007.

WATANABE, M. H. C. *et al.* The in vivo neuromodulatory effects of the herbal medicine ginkgo biloba. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 12, p. 6577-6580, 2001.

WHO, World Health Organization. **Global Strategy For Dengue Prevention and Control, 2012 - 2020**. 2012. Disponível em:

<http://www.who.int/denguecontrol/9789241504034/en/>. Acesso em: 29 janeiro de 2020.

WHO, World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. **Geneva**, 2009. Disponível em: < [https://reliefweb.int/report/world/dengue-guidelines-diagnosis-treatment-prevention-and-control?gclid=CjwKCAjwkaSaBhA4EiwALBgQaFetmh2kvQem27jVw30AtQdFGeEalgSG1NFAz737b970MKpvaL9ZkhoCYA4QAvD\\_BwE](https://reliefweb.int/report/world/dengue-guidelines-diagnosis-treatment-prevention-and-control?gclid=CjwKCAjwkaSaBhA4EiwALBgQaFetmh2kvQem27jVw30AtQdFGeEalgSG1NFAz737b970MKpvaL9ZkhoCYA4QAvD_BwE)>. Acesso em: 22 de agosto de 2019.

WHO, World Health Organization. Doc. TRS/443. Genève: **WHO**. 1970.

WILKERSON, R. C.; LINTON, Y. M.; STRICKMAN, D. **Mosquitoes of the world**.

Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2021.

WONG, S. S. Y.; POON, R. W. S.; WONG, S. C. Y.. Zika virus infection-the next wave after dengue? **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 115, n. 4, p. 226–242, 2016.

YOU DIM, K. A.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J. A. Flavonoids and the brain: interactions at the blood–brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 11, p. 1683-1693, 2004.

YU, X. *et al.* Progress towards understanding the mosquito-borne virus life cycle. **Trends in parasitology**, v. 35, n. 12, p. 1009-1017, 2019.

ZARA, L. S. A.; *et al.* Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 1–2, 2016.

ZIANE, B. E. C. *et al.* Detailed Chemical Composition and Functional Properties of *Ammodaucus leucotrichus* Cross. & Dur. and *Moringa oleifera* Lamarck. **Journal of Functional Foods**, vol. 53, p. 237, 2019.

**APÊNDICE A – ARTIGO 1****Revista Contribuciones de las ciencias sociales – Qualis Capes 2017-2020: A4**

Chemical composition of the ethanolic extract of the leaves of *Hymenaea martiana* Hayne (FABACEAE) and its potential to combat *Aedes aegypti* larvae and pupae

Composição química do extrato etanólico das folhas de *Hymenaea martiana* Hayne (FABACEAE) e seu potencial no combate a larvas e pupas de *Aedes Aegypti*

DOI: 10.55905/revconv.16n.2-024

Recebimento dos originais: 24/02/2023

Aceitação para publicação: 21/03/2023

**Raíra Justino Oliveira Costa**

Doutoranda em Ciências Farmacêuticas com ênfase em Obtenção e Avaliação de Produtos Naturais e Compostos Bioativos  
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)  
Endereço: Recife-PE, Brasil  
E-mail: rairajustino@hotmail.com

**Cleonice Regis de Figueiredo Neta**

Graduada em Farmácia pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)  
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)  
Endereço: Recife-PE, Brasil  
E-mail: cleofigueiredo012@gmail.com

**Rômulo Carlos Dantas da Cruz**

Doutor em Ciências Farmacêuticas com ênfase em Obtenção e Avaliação de Produtos Naturais e Compostos Bioativos  
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)  
Endereço: Recife-PE, Brasil  
E-mail: romulo.carlos@hotmail.com

**Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino**

Doutora em Biotecnologia pelo programa Renorbio da Universidade Federal do Pernambuco (UFPE) com ênfase em Microbiologia e Biologia Molecular  
Instituição: Universidade Regional do Cariri (URCA)  
Endereço: Crato –CE, Brasil  
E-mail: datianemoraes@hotmail.com

**Ivone Antonia de Souza**

Doutora em Farmacologia pela Universidade de Coimbra  
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)  
Endereço: Recife-PE, Brasil. E-mail: idesouza5@gmail.com

ABSTRACT

The researches using vegetable oils and extracts have increased a series of actions in the control of vectors of diseases and pests, such as *Aedes aegypti*. The objective of this research was to perform a phytochemical prospection of the crude ethanolic extract of the leaves of *Hymenaea martiana* Hayne (EEBHm) and to evaluate its toxicity on larvae and pupae of *Ae. aegypti*. The leaves after being collected and dried were immersed in absolute alcohol, the material was filtered and rotary evaporated to obtain the ethanolic extract. For the chemical analysis of the extract, we followed the methodologies of thin layer chromatography and chemical reaction proposed by Harbone (1982) and Wagner and Bladt (1996). To evaluate the larvicidal and pupicidal activity, concentrations of 10 mg/mL, 7.5 mg/mL, 5 mg/mL and 2.5 mg/mL of BSEBHm were used. After analyzing the mortality data of larvae and pupae, in relation to the control, the Average Lethal Concentration (ML50) was calculated using GraphPad Prism 8® software. In the chemical analysis performed, the presence of flavonoids, coumarins, terpenes and saponins were identified in the BSEBHm. After 24 hours of the larvicidal experiment, it was observed that the exposed larvae presented a mortality rate higher than 90% in all concentrations used. In relation to the pupicide test during the 24 hours of exposure, the concentrations of 10, 7.5 and 5 mg/mL showed more than 90% mortality. The LC50 for *Aedes aegypti* in the larval stage was calculated as 1.79 mg/mL and for the pupal stage as 2.36 mg/mL. From the results generated it was observed that EEBHm had larvicidal and pupicidal action on *Ae. aegypti*, this biological activity may be related to the metabolic classes found in the extract as coumarins, flavonoids and saponins.

**Keywords:** plant extracts, chemical analysis, vector control, *Aedes aegypti*.

## 1. INTRODUÇÃO

Um dos maiores vetores em importância médica no Brasil atualmente é *Aedes aegypti*, esse mosquito chegou no Brasil no período da colonização e é o vetor do vírus causador de doenças em crescimento, como dengue, zika, chikungunya e febre amarela. Essas doenças virais são caracterizadas como um importante problema de saúde pública no país, de expansão global, e com predisposição de rápida expansão de distribuição geográfica do vetor e dispersão do vírus (FONSECA *et al.*, 2019; LUCENA *et al.*, 2019).

Nos últimos anos é constante o alto número de casos associados a arboviroses, destacando-se a dengue. No Brasil, nos anos de 2020 foram notificados 968.939 casos prováveis de dengue e em 2021 cerca de 534.743, mantendo altos índices mesmo durante a pandemia causada pelo Sars-Cov-2, que durante esse período de tempo foi responsável pela subnotificação de diversos tipos de doenças (BRASIL, 2021).

Essa disseminação global da dengue é quase totalmente dependente dos ambientes criados pelos humanos e de fatores importantes como a urbanização não planejada, condições de vida susceptível, ineficiência da Vigilância Epidemiológica e da Vigilância em Saúde Ambiental no controle do vetor. Outros fatores incluem variações e flutuações climáticas, como

o aumento da temperatura, variações na pluviosidade e umidade do ar, pois favorecem a disseminação e desenvolvimento do vetor. Os mosquitos passam por quatro etapas de desenvolvimento (ovo, larva, pupa e vida adulta), sendo que, cada etapa é sensível as condições ambientais (MOUSTAID; JOHNSON, 2019).

No Brasil, o controle de *Ae. aegypti* se concentra basicamente na redução do número de mosquitos imaturos e adultos com o uso de produtos químicos larvicidas ou inseticidas. Porém essas medidas intervencionais são de dependência contínua, apresentam altos custos e está ameaçada pela seleção de espécies resistentes (LINDSAY, 2017).

Contudo, existem estratégias promissoras e sustentáveis de prevenção e controle biológico da dengue, como extração de óleos essenciais de plantas que apresentam compostos com atividade inseticida e podem ser utilizados para controlar o mosquito (BARRERA-LANDEZABAL; DUQUE; MENDEZ-SANCHEZ, 2020)

Os produtos naturais representam uma fonte inesgotável para a descoberta de novos agentes terapêuticos. Suas estruturas complexas conferem a eles propriedades biológicas extraordinárias, dando-lhes um papel importante nos programas de descoberta de novas drogas (LITAUDON *et al.*, 2019).

Os vegetais reconhecem os sinais de ameaça e criam respostas de defesa como, por exemplo, a síntese de metabólitos secundários. Esses compostos servem a diversos propósitos que auxiliam na sobrevivência, persistência e competitividade da planta e muitos possuem atividades biológicas importantes para os seres humanos, incluindo o desenvolvimento de produtos farmacêuticos industrialmente importantes (THAKUR *et al.*, 2019).

O Brasil é um país rico em diversidade e que oferece um grande número de espécies vegetais que podem ser utilizadas no desenvolvimento de produtos. Dessas plantas podemos destacar as que fazem parte da caatinga, e em especial a espécie *Hymenaea martiana* Hayne (MOURÃO, 2021; SILVA, 2019).

Essa espécie, conhecido popularmente como “jatobá” é comumente encontrada na região nordeste do Brasil e possui diversas atividades comprovadas como: antinociceptiva e antiinflamatória (PACHECO *et al.*, 2021), antioxidante (OLIVEIRA *et al.*, 2021), antibacteriana (PEIXOTO *et al.*, 2016) e hepatoprotetora (CLOSA *et al.*, 1997).

Tendo como base a literatura, os relatos a respeito desse gênero e os problemas relacionados ao controle de *Ae. aegypti*, o objetivo desse trabalho foi analisar a composição química do extrato etanólico das folhas de *Hymenaea martiana* Hayne e verificar seu potencial no controle de *Ae. aegypti*.

## 2. METODOLOGIA

## 2.1 MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO DO EXTRATO

Esta pesquisa está cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SISGEN sob número de protocolo AAE34B3 e segue todos os protocolos para trabalhos utilizando a flora brasileira.

A coleta do material vegetal (folhas de *Hymenaea martiana*) foi realizada no período matutino, no mês de dezembro de 2019 na região do Parque Nacional do Catimbau, situada no Estado de Pernambuco, apresentando as seguintes coordenadas: latitude 8° 35' 46" Sul e longitude 37° 14' 32" Oeste. A espécie foi identificada no Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA e a exsicata depositada sob tombo nº 94668.

### 2.1.1 Processamento do material vegetal

Após a obtenção, a planta foi encaminhada ao Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental (LAFAC) para processamento e obtenção do extrato bruto etanólico. Inicialmente, as folhas foram separadas dos caules e lavadas em água corrente. Em seguida, as folhas foram secas com papel toalha e pesadas, obtendo-se o valor de 700 g de folhas frescas, e posteriormente submetidas à estufa de circulação de ar modelo NT 513 – Novas Técnica, durante 72 horas, sob a temperatura de 30-36°C.

### 2.1.2 Preparação do extrato bruto etanólico

Depois de submetidas à secagem, as folhas foram pesadas novamente, pesando 427,5 g e foram fragmentadas com auxílio de tesoura em pequenos pedaços, os quais foram triturados manualmente e submetidas ao processo de maceração, usando como solvente o etanol a 95%, em uma proporção de 4 L de etanol para 200 g das folhas secas, obtendo o extrato fluído. Em seguida, o extrato foi colocado para agitação em agitador automático por cerca de 10h, filtrado em papel filtro qualitativo gramatura (80 g/m<sup>2</sup>), e logo após, concentrado em evaporador rotativo a temperatura de  $\pm 40^\circ$  C para obtenção do Extrato Etanólico Bruto das folhas de *Hymenaea martiana* (EEBHm).

## 2.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA

Para a realização da prospecção fitoquímica, seguiu-se, inicialmente, a técnica de cromatografia em camada delgada, visando verificar, inicialmente, a presença dos seguintes compostos: alcaloides, cumarinas, flavonoides, saponinas, taninos, terpenos e quinonas.

A verificação da presença de saponinas foi realizada de acordo com Harbone (1998). Após a separação dos metabólitos, foram utilizados reveladores adequados e sistema de desenvolvimento empregando padrões cromatográficos (Quadro 1).

**Quadro 1** - Metabólitos secundários, fases móveis, reveladores e padrões usados no perfil fitoquímico do EEBHm.

Classe	Fase móvel	Revelador	Padrão
Alcaloides	AcOEt-HCOOH-AcOH-H <sub>2</sub> O (100:11:11:27 v/v)	Dragendorff	Pilocarpina
Cumarinas e Quinonas	CHCl <sub>3</sub> -MeOH (98:2 v/v)	KOH 10%	Cumarina e lapachol
Flavonoides, derivados cinâmicos e fenilpropanoglicosídeos	AcOEt-HCOOH-AcOH-H <sub>2</sub> O (100:11:11:27 v/v)	NP-PEG (NEU)	Quercetina, rutina e ácido clorogênico
Saponinas	---	Teste de formação de espuma	Extrato aquoso de casca de <i>Zizipus joazeiro</i> (juá)
Protoantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas	AcOEt-HCOOH-AcOH-H <sub>2</sub> O (100:11:11:27 v/v)	Vanilina clorídrica	Catequina
Triterpenos e esteroides	Tolueno:AcOEt (90:10 v/v)	Lieberman & Burchard	β-sitosterol
Mono e sesquiterpenos	Tolueno:AcOEt (90:10 v/v)	Anisaldeído sulfúrico	Timol

Fonte: Adaptado de Wagner e Bladt (1996).

## 2.3 ENSAIOS INSETICIDAS

### 2.3.1 Estabelecimento e manutenção da colônia

Os ovos de *Ae. aegypti*, foram cedidos pelo Insetário do Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ), os quais foram depositados em recipientes plásticos (15,0 cm x 5,0 cm) contendo água deionizada, na proporção de, aproximadamente, 1000 ovos para 1 L de água deionizada e 1 g de alimentação. As vasilhas com os ovos e a água deionizada foram acondicionadas em uma sala climatizada regulada para  $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , sendo a umidade relativa do ar ideal entre 70 e 80%.

Após o sexto dia, as larvas atingiram a fase de pupa, as quais foram coletadas e colocadas dentro de recipientes plásticos para posterior emergência. Esses recipientes foram colocados dentro de gaiolas (40,0 cm x 15,0 cm). Após a emergência dos adultos, machos e fêmeas foram alimentados com solução açucarada, obtida a partir de água mineral e açúcar refinado comercial, na proporção de 1:9 (p/v), sendo que, uma vez por semana, foi realizado o repasto sanguíneo às fêmeas com sangue de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), conforme as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), com o número de protocolo 23076.049863/2015-91. No terceiro dia, após o repasto sanguíneo, foi estimulada a oviposição, sendo colocados recipientes com papel-filtro para a deposição dos ovos.

### **2.3.2 Avaliação da atividade larvicida do EEBHm**

Para avaliação da atividade inseticida do EEBHm, foram utilizadas larvas de terceiro e quarto instar. O extrato seco bruto obtido foi ressuspendido em água estéril contendo 1% (v/v) de tensoativo monoláurico (Tween 80) para facilitar a dissolução, ajustando a concentração final para 1 g de extrato seco em 1 mL de solução. Do volume total do extrato concentrado foram feitas diluições com água destilada estéril e foram obtidas as concentrações da amostra de 10; 7,5; 5,0 e 2,5 mg/mL. Para a preparação do grupo controle, também foi utilizado Tween 80 e água destilada nas mesmas proporções definidas.

No bioensaio, foram usadas 30 larvas por repetição, e três repetições por tratamento. As observações da mortalidade das larvas foram realizadas nos intervalos de 30 min, 1h, 2h, 4h, 8h, 16h e 24h, após o início do experimento (WHO, 1970).

### **2.3.3 Avaliação da atividade pupicida do EEBHm**

Para avaliação da atividade inseticida do EEBHm, foram utilizadas pupas. O extrato seco bruto obtido foi ressuspendido em água estéril contendo 1% (v/v) de tensoativo monoláurico (Tween 80) para facilitar a dissolução, ajustando a concentração final para 1 g de extrato seco em 1 mL de solução. Do volume total do extrato concentrado foram feitas diluições

com água destilada estéril e foram obtidas as concentrações da amostra de 10; 7,5; 5,0 e 2,5 mg/mL. Para a preparação do grupo controle, também foi utilizado Tween 80 e água destilada nas mesmas proporções definidas.

No bioensaio, foram usadas 30 pupas por repetição, e três repetições por tratamento. As observações da mortalidade das pupas foram realizadas nos intervalos de 30min, 1h, 2h, 4h, 8h, 16h e 24h, após o início do experimento (WHO, 1970).

## 2.4 ANÁLISE DOS DADOS E TABULAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados dos ensaios foram tabulados em uma planilha eletrônica do programa *Microsoft Office Excel 2016* e, a partir dos resultados obtidos, foram elaborados os elementos gráficos. Com os resultados da análise dos dados de mortalidade de larvas e pupas, em relação ao controle, foram calculadas as médias  $\pm$  desvio padrão e Concentração Letal Média (CL<sub>50</sub>) utilizando o *software GraphPad Prism 8*®.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização dos ensaios propostos nessa pesquisa, a seguir, estão os resultados obtidos através das atividades testadas. O perfil fitoquímico é um estudo preliminar que busca detectar a presença dos compostos de determinada planta e caracterizá-los. Servem de base para a investigação de plantas medicinais e como orientação para análises mais específicas e produção de fitoterápicos ou medicamentos de origem vegetal.

A análise fitoquímica preliminar do EEBHm coletadas no município de Buíque – PE, encontra-se descrita na Tabela 1.

**Tabela 1** – Prospecção fitoquímica preliminar do EEBHm.

<b>Metabólitos secundários avaliados</b>	<b>Resultado</b>
Saponinas	+
Flavonóides	+
Fenilpropanóides	-
Triterpenos e esteroides	+
Mono e sesquiterpenos	+
Alcaloides	-
Proantocianidinas e leucoantocianidinas	+
Taninos hidrolisáveis	Tr
Cumarinas	+
Quinonas	-

Legenda: (+) positivo; (tr) traços e (-) ausente.

Fonte: Dados da pesquisa.

Conforme demonstrado nas tabelas 1, foram reveladas através dessas técnicas a presença de: catequinas, cumarinas, flavonoides, taninos, terpenos e saponinas. O gênero *Hymenaea* é conhecido por apresentar alguns compostos, dentre eles, o ácido isocítrico, ácido isopimárico, ácidooleico, ácido protocatecuíco, terpenos, cumarinas, flavonoides, taninos e compostos fenólicos, corroborando com os resultados obtidos na prospecção fitoquímica (SILVA OLIVEIRA, *et al.*, 2018).

Segundo Tiago e colaboradores (2019 e 2020) as espécies pertencentes ao gênero *Hymenaea* possuem compostos terpênicos e fenólicos e essas substâncias são algumas das responsáveis pelas ações antifúngicas, antibacterianas e moluscidas que comumente são apresentadas por espécies pertencentes a esse gênero.

A presença dos flavonoides é constantemente encontrada em espécies de *H. martiana*, sendo citadas em pesquisa como as de Silva e colaboradores (2012), Vieira e colaboradores (2018) e Oliveira e colaboradores (2021). Em uma pesquisa realizada por Oliveira *et al.* (2016), utilizando os frutos da espécie, além de flavonoides também foi identificada a presença de monoterpenos e diterpenos e saponinas, corroborando com os dados da pesquisa.

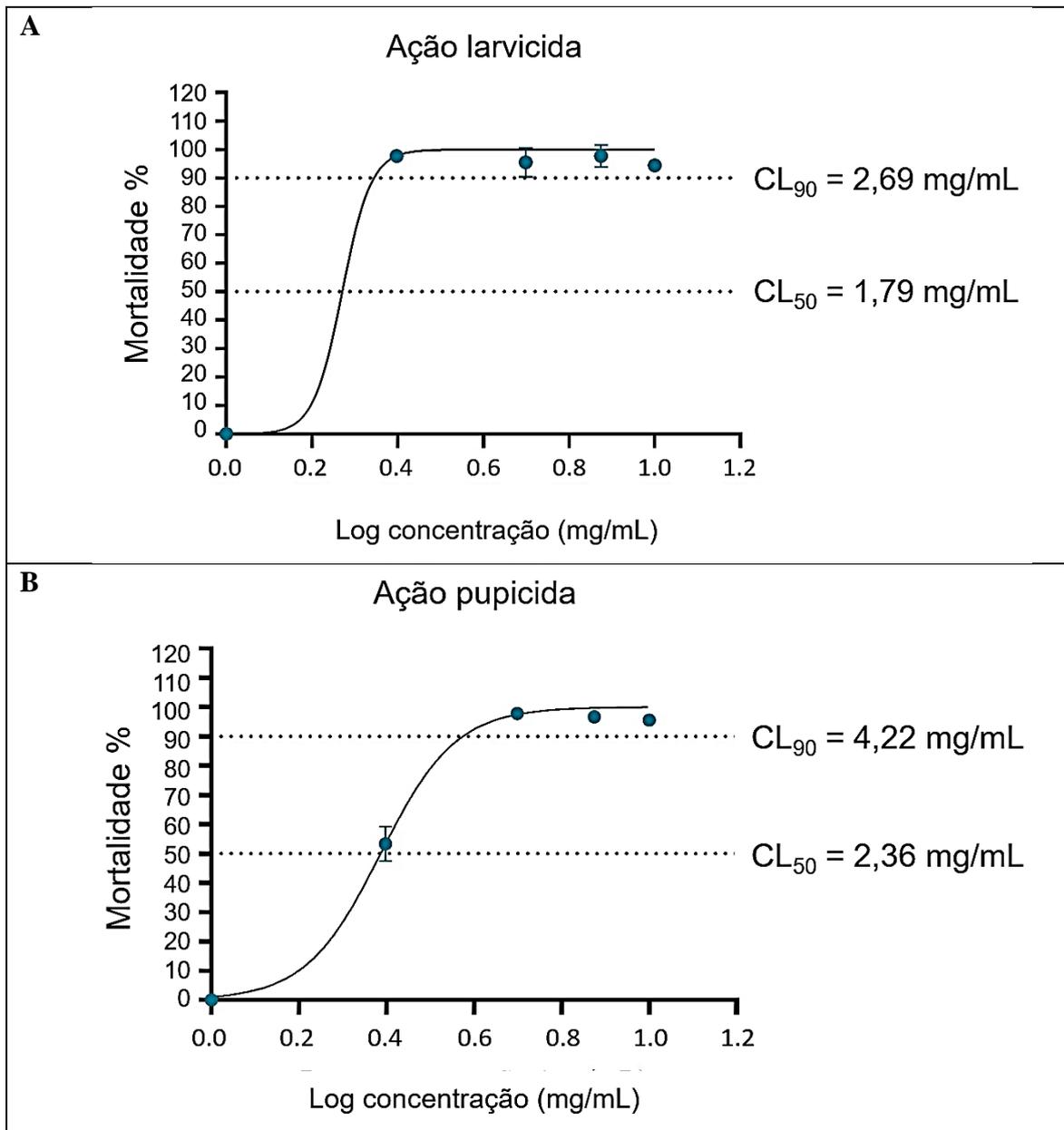
Quanto aos compostos encontrados nessa pesquisa e que não foram citados por outros autores, essa diferença justifica-se em fatores como: Sazonalidade, ritmo circadiano e clima em que uma vegetal é coletada, além da forma de processamento do extrato, também podem influenciar na quantidade e natureza dos constituintes bioativos presente no vegetal no fato dos metabólitos secundários serem diversos e representarem atividades biológicas distintas (MOHAMMED *et al.*, 2018; ZIANE *et al.*, 2019; PASSOS *et al.*, 2012).

Em relação à atividade larvívica sobre *Ae. aegypti*, a maior dose (10 mg/mL) atingiu a taxa de mortalidade de 94,4%, durante as 24 horas de acompanhamento do experimento. Todas as doses mantiveram a sua taxa de mortalidade acima desse percentual. Nas doses 7,5 mg/mL, 5,0 mg/mL, 2,5 mg/mL, as taxas de mortalidade foram respectivamente 97,8%, 95,6% e 97,8%.

Em relação à avaliação da atividade insetívica do EEBHm sobre a fase evolutiva de pupa de *Ae. aegypti*, obteve-se um percentual de mortalidade acima de 50% em todas as concentrações. Sendo eles, 95,6% na concentração de 10,0mg/mL, 96,7% na concentração de 7,5 mg/mL, 97,8% na concentração de 5,0 mg/mL e 53,3% na concentração de 2,5 mg/mL.

Após a avaliação da mortalidade foram calculadas as concentrações letais 50 e 90 (CL<sub>50</sub>, CL<sub>90</sub>) e os resultados estão demonstrados na Figura 1

**Figura 1.** Avaliação da CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> do extrato etanólico bruto de *Hymenaea martiana* sobre larvas (A) e pupas (B) de *Aedes aegypti*.



Fonte: Dados da pesquisa.

Analisando os dados acima é possível observar que o EEBHm atingiu altos índices de mortalidade tanto em larvas quanto em pupas. Além da presença das cumarinas, anteriormente

citada como um dos metabólitos secundários responsáveis por essa ação, podemos citar também a presença dos flavonoides que foram encontrados no EEBHm.

Em sua pesquisa, Crozier, Jaganath e Clifford (2009) associaram o poder inseticida dos flavonoides e antocianinas ao seu potencial de atração apresentado devidos a suas cores; dessa forma, elas poderiam atuar como sinais visuais para a atração de insetos e devido à sua adstringência, atuam como um sistema de defesa contra os insetos que são prejudiciais às plantas.

Comparando os testes realizados em larvas e pupas pode se notar pontos de divergência como o atraso na mortalidade das pupas quando comprado as larvas e a ausência de diminuição de motilidade. Beserra e colaboradores (2008) explica em sua pesquisa que na fase pupal, *Ae. aegypti* não se alimenta, apresenta movimentos reduzidos e é mais resistente a condições adversas. Esses fatos podem explicar o atraso na mortalidade, tanto pela ausência da alimentação, o que pode diminuir a interação das pupas com o extrato, quanto pelo fato de nesse estágio elas serem mais resistentes a mudanças ambientais.

Sobre tal fato, Souza e colaboradores (2011), bem como, Gupta e colaboradores (2011) ratificam que, como as pupas não se alimentam, os compostos com ação pupicida tem mecanismo de ação através da absorção pela superfície corporal ou causam danos nas trompas respiratórias. Dessa forma, as diferenças entre o efeito larvicida e pupicida do EEBHm podem indicar uma maior ação do extrato no trato digestivo das larvas e/ou sobre o seu epitélio.

Sobre as altas taxas de mortalidade encontradas nos testes tanto larvicidas como pupicida, Porto e colaboradores (2017) estudando o efeito larvicida de extratos de mais de 40 plantas nativas do Brasil contra *Ae. aegypti* mostraram que os extratos com maior letalidade eram os obtidos com solventes metanólicos e etanólicos, principalmente quando as extrações dos produtos eram realizadas a partir das folhas das plantas. Tal fato, consolida os resultados encontrados nessa pesquisa, onde foi utilizado nos testes um extrato etanólico obtido a partir das folhas de *Hymenaea martiana*.

Em relação aos altos percentuais de mortalidade atingidos pelo EEBHm tanto contra larvas como contra pupas, Kabarou e Gichia (2001) destacam essas características como qualificadoras de bons inseticidas, pois estes produtos devem ser capazes de interferir no ciclo de vida do vetor em seus diferentes estágios de maturação.

Também foram observadas as alterações comportamentais das larvas e pupas durante o experimento. Em contato com o EEBHm, as larvas alteraram a motilidade já nos primeiros trinta minutos de experimento. Com o passar do tempo, os movimentos larvais foram sendo gradualmente comprometidos, ficando parcialmente imobilizadas na primeira hora de

experimentação, comportamento estes não observados no grupo controle, cujos movimentos continuaram normais. Já em relação as pupas não foram observadas mudanças comportamentais significativas quando comparadas as concentrações e o controle negativo.

Esse efeito causado nas larvas de *Ae. aegypti* após entrarem em contato com o extrato pode estar relacionado à penetração dos compostos bioativos no corpo das mesmas. De acordo com Sparg et. al. (2004), a interação com as saponinas presentes nas substâncias bioativas e os esteróis presentes na membrana celular da larva, ocasiona uma ruptura gerada pelo aumento da permeabilidade e desbalanço hidrolítico. Cheeke (2000) afirma que as saponinas são consideradas um surfactante natural de alto potencial biológico, o que explicaria a facilidade de penetração do EEBHm nas células larvais.

#### 4. CONCLUSÃO

Após análise fitoquímica, foi possível observar que o EEBHm mostrou a presença de classes metabólicas associados as atividades biológicas apresentadas pelo EEBHm. Através dos bioensaios de atividade insetida realizados foi possível averiguar que o EEBHm apresenta atividade inseticida contra duas formas evolutivas de *Ae. aegypti*, as larvas e as pupas, podendo ser considerado um promissor método de controle alternativo para o combate deste mosquito.

A análise das diferentes concentrações testadas evidenciou índices de mortalidade acima de 95% para todas as concentrações testadas como larvicidas e para as três maiores doses testadas como pupicida. Os resultados de mortalidade tanto no estágio de larvas como no de pupas, bem como as alterações de motilidade das larvas, sugerem que o EEBHm possa ter ação tanto no trato digestivo das larvas e também pela penetração dos compostos bioativos no corpo das larvas.

Diante do potencial apresentado pelo EEBHm, é de suma importância o desenvolvimento de estudos futuros que busquem realizar ensaios farmacológico voltados para o desenvolvimento de fórmulas farmacêuticas bioinseticidas que sejam seguras para a população e eficazes com combate ao mosquito *Ae. aegypti*.

#### REFERÊNCIAS

BESERRA, E. B.; *et al.* Biologia comparada de populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) da Paraíba. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 1, p. 81-85, 2008.

BORRERO-LANDEZABAL, M. A.; DUQUE, J. E.; MENDEZ-SANCHEZ, S. C. Model to design insecticides against *Aedes aegypti* using in silico and in vivo analysis of different pharmacological targets. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 229, p. 108664, 2020.

BRASIL, Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 30 de 2019 e levantamento rápido de índices para *Aedes aegypti* (LIRAA). **Secretaria De Vigilância Em Saúde**. 2019. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos>>. Acesso em setembro de 2021.

CHEEKE, Peter Robert. Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. **Saponins in food, feedstuffs and medicinal plants**, p. 241-254, 2000.

CLOSA, D. *et al.* Prostanoids and free radicals in Cl<sub>4</sub>C-induced hepatotoxicity in rats: effect of astilbin. **Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids**, v. 56, n. 4, p. 331-334, 1997.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 8, p. 1001–1043, 2009.

EL MOUSTAID, F.; JOHNSON, L.R. Modeling temperature effects on population density of the dengue mosquito *Aedes aegypti*. **Insects**, v. 10, n. 11, p. 393, 2019.

FONSECA, E. O. L. *et al.* Experimental study on the action of larvicides in *Aedes aegypti* populations collected in the Brazilian municipality of Itabuna, Bahia, under simulated field conditions. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 28, 2019.

HARBONE, J. B. Phytochemical Methods. **Chapman & Hall** - Londres, v. 3, p. 12-17, 1998.

KABARU, J. M.; GICHIA, L. Insecticidal activity of extracts derived from different parts of the mangrove tree *Rhizophora mucronata* (Rhizophoraceae) Lam. against three arthropods. **African Journal of Science and Technology**, v. 2, n. 2, 2001.

LINDSAY, S. W.; *et al.* Improving the built environment in urban areas to control *Aedes aegypti*-borne diseases. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 95, n. 8, p. 607, 2017.

LITAUDON, M.; *et al.* Desenvolvimento de uma abordagem inovadora baseada em rede molecular para a descoberta e isolamento direcionado de novos metabólitos bioativos de plantas superiores. **Planta Medica**, v. 85, n. 18, p. SL D-01, 2019.

MOHAMMED, S. Y. *et al.* Proximate Composition of *Moringa oleifera* Lam. From Different Regions in Sudan. **International Invention of Scientific Journal**, vol. 02, n. 07, p. 268, 2018.

MOURÃO, E. D. S. *et al.* Identification of molecular scaffolds from Caatinga Brazilian biome with potential against *Aedes aegypti* by molecular docking and molecular dynamics simulations. **Journal of Molecular Structure**, v. 1229, p. 129621, 2021.

OLIVEIRA, F. G. S. *et al.* Influence of the extractive method on the recovery of phenolic compounds in different parts of *Hymenaea martiana* hayne. **Pharmacognosy research**. v. 8, n.4, p.270, 2016.

OLIVEIRA, F. G. S. *et al.* Photoprotective activity and HPLC-MS-ESI-IT profile of flavonoids from the barks of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae): development of topical formulations containing the hydroalcoholic extract. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 35, n. 1, p. 504-516, 2021.

PACHECO, A. G. M. *et al.* Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae) em camundongos. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2021.

PASSOS, M. M. B. *et al.* The cultural dissemination of garrafadas in Brazil: a parallel between popular medicine and sanitary legislation. **Saúde em Debate**, v. 42, p. 248-262, 2018.

PEIXOTO, R. M. *et al.* Potencial antibacteriano de plantas nativas do bioma caatinga frente a *Staphylococcus* spp. isolados de mastite em pequenos ruminantes. **Revista Caatinga**, v. 29, n. 3, p. 758-763, 2016.

PORTO, K. R. A. *et al.* Screening of plants extracts and fractions on *Aedes aegypti* larvae found in the state of Mato Grosso do Sul (Linnaeus, 1762) (Culicidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 2, p. 895-906, 2017.

SILVA OLIVEIRA, F. G. *et al.* The genus *Hymenaea* (Fabaceae): A chemical and pharmacological review. **Studies in natural products chemistry**, v. 58, p. 339-388, 2018.

SILVA, O.; POLETO, C. Monitoramento do *Aedes albopictus* em pequenas comunidades. **Uningá Review**, v.10, n. 1, p. 25-32, 2012.

SILVA, P.T. *et al.* Variação sazonal na composição química e atividade larvicida contra *Aedes aegypti* de óleos essenciais de *Vitex gardneriana* Schauer. **South African Journal of Botany**, v. 124, p. 329-332, 2019.

SOUZA, T. M. *et al.* Toxicity of Brazilian plant seed extracts to two strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and nontarget animals. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 4, p. 846-851, 2011.

SPARG, S.G.†; LIGHT, M. E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of ethnopharmacology**, v. 94, n. 2-3, p. 219-243, 2004.

THAKUR, M.; *et al.* Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 12, p. 1-12, 2019.

TIAGO, P. V. *et al.* Caracterização morfoanatômica, fitoquímica e histoquímica de *Hymenaea courbaril* (Leguminosae), ocorrente na Amazônia Meridional. **Rodriguésia**, v. 71, 2020.

TIAGO, P. V. *et al.* Levantamento etnobotânico do jatobá (*Hymenaea courbaril* L., Fabaceae) no norte do estado de Mato Grosso, Brasil. **Gaia Scientia**, v. 13, n. 1, p. 80-90, 2019.

VIEIRA, D. S. *et al.* Atividade antitumoral da folha da *Hymenaea martiana* hayne em células mamárias de cães. **Pubvet**, v. 12, n. 8, p.133, 2018.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. **Springer Science & Business Media**, 1996.

WHO, World Health Organization. Doc. TRS/443. Genève: WHO. 1970.

ZIANI, B. E. C *et al.* Detailed chemical composition and functional properties of *Ammodaucus leucotrichus* Cross. & Dur. and *Moringa oleifera* Lamarck. **Journal of Functional Foods**, v. 53, p. 237-247, 2019.

**APÊNDICE B – ARTIGO 2****Revista Contribuciones de las ciencias sociales – Qualis Capes 2017-2020: A4**

Chemical profile and acute toxicity evaluation of the ethanolic extract of the leaves of  
*Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae)

Perfil químico e avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico das folhas de *Hymenaea  
martiana* Hayne (Fabaceae)

DOI:10.55905/revconv.16n.2-025

Recebimento dos originais: 24/02/2023

Aceitação para publicação: 21/03/2023

**Raíra Justino Oliveira Costa**

Doutoranda em Ciências Farmacêuticas com ênfase em Obtenção e Avaliação de Produtos  
Naturais e Compostos Bioativos  
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)  
Endereço: Recife-PE, Brasil  
E-mail:rairajustino@hotmail.com

**Cleonice Regis de Figueiredo Neta**

Graduada em Farmácia pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)  
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)  
Endereço: Recife-PE, Brasil  
E-mail:cleofigueiredo012@gmail.com

**Rômulo Carlos Dantas da Cruz**

Doutor em Ciências Farmacêuticas com ênfase em Obtenção e Avaliação de Produtos  
Naturais e Compostos Bioativos  
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)  
Endereço: Recife-PE, Brasil  
E-mail:romulo.carlos@hotmail.com

**Marcilene Souza da Silva**

Mestranda em Ciências Farmacêuticas com ênfase em Obtenção e Avaliação de Produtos  
Naturais e Compostos Bioativos  
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)  
Endereço: Recife-PE, Brasil  
E-mail: marcilene.souzasilva@ufpe.br

**Marília Gabriela Muniz Arruda**

Doutoranda em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)  
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)  
Endereço: Recife-PE, Brasil  
E-mail:marilia.gabrielamuniz@ufpe.br

**Maira Rodrigues Martins**

Especialista em Educação Física Escolar com ênfase em Ciência do Comportamento  
Instituição: Universidade Regional do Cariri (URCA)

Endereço: Crato-CE, Brasil  
E-mail:maira\_martins@hotmail.com

**Ivone Antonia de Souza**

Doutora em Farmacologia pela Universidade de Coimbra  
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)  
Endereço: Recife-PE, Brasil.E-mail:idesouza5@gmail.com

ABSTRACT

*Hymenaea martiana* is popularly used in the treatment of several diseases due to the pharmacological properties of its bioactive compounds. Despite its wide use in popular medicine, there is a lack of studies in the literature on the toxicity of this species. Thus, the objective of the present study was to perform the phytochemical analysis and evaluate the acute toxicity of the ethanolic extract of *Hymenaea martiana* Hayne leaves. After being collected, the leaves were dried in an oven and immersed in absolute alcohol. The material was filtered and rotary evaporated to obtain the ethanolic extract. The phytochemical profile research was based on the methodology proposed by Matos (1997) and the Thin Layer Chromatography (TLC) technique. To evaluate the toxicity of the BSEBHm, female Swiss (*Mus musculus*) mice were used. Acute toxicity followed the protocol proposed by OECD (2001) starting with a dose of 2000 mg/mL. Afterwards, the data were tabulated and the results were analyzed. In the chemical analysis performed, the presence of flavonoids, coumarins, terpenes, tannins and saponins were identified in the BSEBHm. In the acute toxicity test the assay results classified the extract in category 5 (as reference the Globally Harmonised System -GHS) and its Lethal Dose<sub>50</sub> (LD<sub>50</sub>) was stipulated as  $\geq 5000$  mg. During the observation of the animals stimulant effects at the Nervous System level could also be observed. From the results generated it was observed that EEBHm has indicative of safety for its use and that the secondary metabolites found in the extract may be useful for the development of drugs that stimulate brain functions.

**Keywords:** plant extracts, chemical analysis, acute toxicity tests, central nervous system stimulant.

## 1. INTRODUÇÃO

Historicamente, os produtos naturais e seus análogos estruturais têm contribuído constantemente para a farmacoterapia, oferecendo características especiais em comparação às moléculas sintéticas convencionais, que conferem vantagens e desafios para o processo de descoberta de medicamentos. Nos últimos anos, os avanços nos desenvolvimentos tecnológicos e científicos estão abrindo novas oportunidades e, conseqüentemente, facilitando os estudos na área farmacológica (ATANASOV, 2021).

Esses vegetais sintetizam compostos químicos bioativo e apresentam-se como uma fonte inesgotável para a descoberta de novos agentes terapêuticos. Suas estruturas complexas conferem a eles propriedades biológicas extraordinárias, dos quais podem ser obtidos

medicamentos fitoterápicos ou substâncias com propriedades farmacológicas, dando-lhes um papel importante nos programas de descoberta de novas drogas (LITAUDON *et al.*, 2019; MOURA; NEVES; CORADIN, 2021).

Visto a importância do uso de plantas como possibilidade terapêutica para a ciência, é necessário que haja um controle de qualidade e segurança desses produtos, para que seu uso seja realizado de maneira segura e se tenha informações a respeito da toxicidade, preparo, indicações, contraindicações e dosagens. As substâncias bioativas presentes nas plantas são conhecidas pelos benefícios obtidos através de seus usos, mas esses compostos também podem ser nocivos à saúde (CARNEIRO *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2017a).

De forma geral, as intoxicações provocadas por plantas medicinais não são notificadas, uma vez que as manifestações clínicas apresentadas não são associadas à utilização ou exposição a um determinado vegetal, já que grande parte dos usuários, não tem conhecimento que as plantas podem possuir efeitos tóxicos ao organismo. Também há a crença de que o natural não oferece riscos à saúde, disseminando uma ideia de segurança para seu uso (PADAYACHEE & BAIJNATH, 2019).

Além disso, o diagnóstico do paciente com intoxicação e a identificação da espécie em casos de acidentes, pode ser uma tarefa difícil. Essa dificuldade é atribuída em grande parte a escassez de informações acerca das espécies e da utilização correta dessas plantas por parte dos pacientes. Esse conjunto de fatores faz com que muitos casos não sejam relatados ou são registrados como intoxicação por agente desconhecido (MONSENY *et al.*, 2015; PEACOK *et al.*, 2009).

Por todos os motivos expostos, as pesquisas realizadas para avaliação da ação dos compostos bioativos presente nos vegetais devem priorizar a qualidade e segurança desses produtos. Os estudos associando conhecimentos com base nas ações farmacológicas e toxicológicas, a posologia e aspectos clínicos associados às substâncias naturais, evitam uma propagação de uso inadequado e permitem que o seu uso seja eficaz e não danoso (JORDAN, CUNNINGHAM, MARLES, 2010; SEEFF, 2007).

Dentre os gêneros que apresentam grande potencial para estudos farmacológicos e toxicológicos está *Hymenaea* sp. Esse gênero pertence à família Fabaceae, possuindo 18 espécies registradas no Brasil, sendo 12 delas endêmicas e 07 delas encontradas no bioma Caatinga, dentre essas, podemos destacar *Hymenaea martiana* Hayne (PINTO, TOZZI, MANSANO; 2023).

*Hymenaea martiana* é uma espécie popularmente conhecida no Nordeste do Brasil como “jatobá” e figura entre as espécies de *Hymenaea* de maior expressão econômica e

medicinal. Este vegetal é amplamente utilizado pela população na construção civil, em ornamentação e principalmente na cura ou amenização de doenças (BATISTA *et al*; 2011; JUDD *et al.*, 2009).

Dessa forma, faz-se necessários estudos que visem identificar e caracterizar as potencialidades dessa espécie uma vez que suas substâncias podem auxiliar a na fabricação de medicamento e no tratamento de muitas doenças. Dito isso, esta pesquisa teve como objetivo realizar a análise fitoquímica e avaliar a toxicidade aguda do extrato etanólico das folhas de *Hymenaea martiana* Hayne.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1 MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO DO EXTRATO**

Esta pesquisa está cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SISGEN sob número de protocolo AAE34B3 e segue todos os protocolos para trabalhos utilizando a flora brasileira.

A coleta do material vegetal (folhas de *Hymenaea martiana*) foi realizada no período matutino, no mês de dezembro de 2019, na região do Parque Nacional do Catimbau, situada no Estado de Pernambuco, apresentando as seguintes coordenadas: latitude 8° 35' 46" Sul e longitude 37° 14' 32" Oeste. A espécie foi identificada no Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA e a exsicata depositada sob tombo nº 94668.

#### **2.1.1 Processamento do material vegetal**

Após a obtenção, a planta foi encaminhada ao Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental (LAFAC) para processamento e obtenção do extrato bruto etanólico. Inicialmente, as folhas foram separadas dos caules e lavadas em água corrente. Em seguida, as folhas foram secas com papel toalha e pesadas, obtendo-se o valor de 700 g de folhas frescas, e posteriormente submetidas à estufa de circulação de ar modelo NT 513 – Novas Técnica, durante 72 horas, sob a temperatura de 30-36°C.

#### **2.1.2 Preparação do extrato bruto etanólico**

Depois de submetidas à secagem, as folhas foram pesadas novamente, pesando 427,5 g e foram fragmentadas com auxílio de tesoura em pequenos pedaços, os quais foram triturados manualmente e submetidas ao processo de maceração, usando como solvente o etanol a 95%, em uma proporção de 4 L de etanol para 200 g das folhas secas, obtendo o extrato fluído. Em seguida, o extrato foi colocado para agitação em agitador automático por cerca de 10h, filtrado em papel filtro qualitativo gramatura (80 g/m<sup>2</sup>), e logo após, concentrado em evaporador rotativo a temperatura de  $\pm 40^\circ \text{C}$  para obtenção do Extrato Etanólico Bruto das folhas de *Hymenaea martiana* (EEBHm).

## 2.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Para a realização da triagem fitoquímica tomou-se como base a metodologia proposta por Matos (1997) e a técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em placas de gel de sílica (MERCK-Germany,15553), empregando-se o sistema de solventes. As técnicas foram trabalhadas com algumas adaptações a fim de realizar a prospecção das seguintes substâncias: Alcaloides, Cumarinas, Flavonóides, Taninos, Terpenos e Saponinas.

Os alcalóides foram revelados com reagente de Dragendorff e utilizado escopolamina como substância padrão. Para flavonoides, uma alíquota do extrato foi solubilizada em álcool 70 % (ETOH 70 %), adicionado Clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) e agitado para obtenção de duas fases, clorofórmica e hidroalcolica. Empregou-se uma mistura de acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26 v/v) como fase móvel e foi revelada com o reagente de NEU, com observação em câmara de U.V. (365 nm), que utilizou como substância padrão a quercetina.

Para a pesquisa de terpenos empregou-se como fase móvel uma mistura, tolueno: acetato de etila (93:7 v/v), revelada com vanilina sulfúrica a 1 %, seguida de aquecimento em estufa (100°C). O surgimento de manchas com coloração roxo/verde/azul foi usado como critério diagnóstico. Para as Cumarinas, a fase móvel utilizada foi éter (1:1) após secagem utilizou-se o revelador KOH/EtOH e colocou sob uma luz UV. Para taninos o efluente utilizado foi *acetato de metila*: tolueno: ácido fórmico: água (80:10:5:5) e o *Revelador FeCl<sub>3</sub>* e para as saponinas foi usado o índice de espuma após a agitação.

## 2.3 ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA

Os testes foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob protocolo de nº 0053/2019. Os experimentos foram conduzidos no Laboratórios de Farmacologia e Cancerologia Experimental (LAFAC) do Departamento de Antibióticos da UFPE.

No ensaio de toxicidade, foram utilizadas fêmeas (nulíparas e não grávidas) de camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) provenientes do biotério do LAFAC, do Departamento de Antibióticos da UFPE. Os animais pesavam entre 30 e 45 gramas e tinham idades entre 90 e 120 dias, receberam água e ração “ad libitum” e foram mantidos em condições normais de temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e umidade ( $60 \pm 1\%$ ), sob ciclo natural claro e escuro de 12-12 horas.

O teste de toxicidade oral aguda foi realizado segundo o protocolo experimental Guideline 423 (OECD 423; 2001) com doses sequenciais, seguindo a proposta da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Como sugerido pelo protocolo, quando houver estudos anteriores que indiquem baixos efeitos tóxicos relacionados à substância testada, deve-se iniciar a avaliação a partir da dose de 2000 mg/kg, onde a próxima dose a ser testada é determinada a partir do resultado da primeira aplicação.

Os animais foram divididos em grupos experimentais de três animais e a alimentação foi suspensa por 4 horas, antes do experimento e a água liberada. A alimentação foi reintegrada após 3 horas da administração. O EEBHm foi solubilizado em Tween 80 1% (v/v) e em salina e posteriormente, a solução foi administrada por via oral nos camundongos, introduzida no trato digestório dos animais, através de cânula metálica acoplada à seringa (gavagem). O manejo e cuidado com os animais seguiram os princípios éticos da experimentação animal, segundo critérios estabelecidos pelo CEUA.

Após a administração da dose por via oral, os animais foram acompanhados na primeira hora, periodicamente (6 em 6 horas) nas primeiras 24 horas e diariamente por 14 dias. Cada animal foi marcado, de forma diferente, para posterior acompanhamento. As marcações foram realizadas com uma caneta marcadora permanente correspondente aos números ordinais de 1 a 3. Os animais foram observados quanto às diversas reações comportamentais relacionadas com o Sistema Nervoso Central (SNC) (efeitos estimulantes e depressores) e com o Sistema Nervoso Autônomo (SNA).

A massa corporal de cada animal e os parâmetros fisiológicos (consumo de ração e produção de excretas) foram acompanhados diariamente. Ao fim do período de observação, todos os animais sobreviventes foram eutanasiados e autopsiados.

Posteriormente, os dados foram tabulados utilizando o Microsoft Office Excel® versão 2016. A relação entre o peso corporal dos camundongos e o tempo de observação foi obtida segundo a análise de regressão linear. Tal relação foi avaliada pelo cálculo do Coeficiente de correlação de Pearson. Diferenças significativas foram analisadas pelo teste t de Student a 5% de probabilidade.

### 3. RESULTADO E DISCUSSÃO

As plantas utilizadas pelo homem com a finalidades curativas têm instigado pesquisas que pretendem avaliar as suas atividades biológicas e os metabólitos secundários. Para elucidar e caracterizar as substâncias presentes nesses vegetais, tem se investido em estudos fitoquímicos buscando registrá-las e caracterizá-las. A análise fitoquímica preliminar do EEBHm encontram-se descritos na Tabelas 1.

Tabela 1 – Resultado da prospecção fitoquímica do extrato etanólico bruto das folhas de *Hymenaea martiana*

Classe de metabólitos	Presença/Ausência
Alcaloides	-
Cumarinas	+
Flavonoides	+
Taninos	+
Terpenos	Tr
Saponinas	+

Legenda: Resultado positivo (+), Resultado negativo (-), Traços (Tr).

Fonte: Dados da pesquisa.

Como é possível observar na tabela 1, a análise dos fitoconstituintes demonstrou a presença de cumarinas, flavonóides, taninos, terpenos e saponinas.

A presença dos flavonoides é comumente apontada em espécies de *H. martiana*, sendo citadas em pesquisa como as de Da Cruz Silva e colaboradores (2012), Vieira e colaboradores (2018) e Oliveira e colaboradores (2021).

Em uma pesquisa realizada por Oliveira *et al.* (2016), utilizando os frutos da espécie, além de flavonoides também foi identificada a presença de terpenos e saponinas, corroborando com os dados da pesquisa.

No ensaio de toxicidade, o primeiro grupo (G1) exposto a dose de 2000 mg/kg não apresentou mortalidade ou morbidade nas primeiras 24 horas, após a exposição ao extrato e nem durante o estudo. Sendo assim, seguiu-se o protocolo e realizou a exposição de um segundo grupo de animais (G2), novamente a dose de 2000 mg/kg, onde também não foi verificada morbidade ou mortalidade. A dose de 5000 mg/kg não foi realizada, pois a OECD (2008) indica o seu uso apenas em casos excepcionais, onde exista a necessidade de sua utilização.

De acordo com os resultados obtidos diante das doses testadas, o extrato foi classificado na categoria 5 de acordo com o GHS e sua Dose Letal<sub>50</sub> (DL<sub>50</sub>) foi estipulada como  $\geq 5000$  mg (OECD; 2008).

Após a exposição dos animais às doses 2000 mg/kg foram observados os sinais clínicos em relação a um grupo controle (CT), em que os animais receberam apenas solução salina + tween 80, na mesma proporção das doses.

Os resultados foram tabulados segundo Malone (1983) e estão demonstrados na tabela 2. Observou-se que os efeitos mais pronunciados foram no sistema nervoso central (SNC), principalmente desencadeando atividade estimulante, tais como aumento da ambulação, saltos, tremores, hiperatividade e movimentos circulares. Além do mais, efeitos positivos intensos como movimento estereotipado foi observado. Em relação ao sistema nervoso autônomo (SNA), houve a presença de sinais como refluxo e excreção fecal, além de sinais moderados, como espasmos e posição estática, não havendo mortalidade no grupo tratado.

Tabela 2. Sinais clínicos e taxa de mortalidade em Camundongos *Mus musculus* após administração por via oral do extrato etanólico bruto no teste de toxicidade aguda.

Sinais Clínicos	Doses via oral (mg/kg)					
	2000					
	Grupo 1			Grupo 2		
	CM	LM	RM	CM	LM	RM
<b>1. Sist. Nervoso Central</b>						
<b>Ausência de coord. Motora</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Convulsão tônica crônica</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Parada cardiorrespiratória</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Refluxo</b>	++	++	+++	+	++	++
<b>1.1 Efeitos estimulantes</b>						
<b>Agressividade</b>	-	+	-	-	-	-
<b>Ambulação aumentada</b>	+++	+	++	++	+	+
<b>Aumento da respiração</b>	++	+	++	++	++	++
<b>Autolimpeza</b>	-	++	+	-	-	-
<b>Bocejo</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Ereção de cauda</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Espasmos</b>	++	+	+++	++	+	+

<b>Frêmito vocal</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Inversão de macha</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Irritabilidade</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Movimento circular</b>	++	++	++	++	++	++
<b>Movimento das vibrissas</b>	+	-	-	-	-	-
<b>Movimento estereotipado</b>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<b>Reação de fuga</b>	+++	+++	+	+	++	+
<b>Sacudir a cabeça</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Saltos acrobáticos</b>	+++	++	+	++	+	++
<b>Tremores grosseiros</b>	+++	++	+++	++	+	+
<b>1.2 Efeitos depressores</b>						
<b>Ambulação diminuída</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Ataxia</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Catatonía</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Cauda em <i>straub</i></b>	-	-	-	-	-	-
<b>Perda do reflexo auricular</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Ptose palpebral</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Prostração</b>	++	-	++	-	+	+
<b>Resposta ao toque diminuída</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Sedação</b>	-	-	-	-	-	-
<b>2. Sist. Nervoso Autônomo</b>						
<b>Cianose</b>	-	-	+	-	-	-
<b>Contorções</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Diarreia</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Dispneia</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Distensão abdominal</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Diurese</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Edema de focinho</b>	+	+	++	-	+	-
<b>Excreção fecal</b>	+	-	-	+	-	+
<b>Piloereção</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Taquipneia</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Salivação</b>	-	-	-	-	-	-
<b>3. Mortalidade (%)</b>	0	0	0	0	0	0

Legenda: Resultado negativo (-), Resultado positivo (+), Resultado positivo moderado (++) e Resultado positivo intenso (+++).

Fonte: Dados da pesquisa.

O comportamento estereotipado complexo e o aumento da ambulação observado nos camundongos tratados com o extrato, sugere uma possível atividade sobre o SNC considerando que, a atividade locomotora espontânea e o movimento repetitivo estão relacionados com os níveis de excitabilidade desse sistema (DA COSTA JÚNIOR *et al.*, 2011). Prut e Belzung (2003), relataram em seus estudos que sinais como locomoção aumentada podem ser um indicativo de um efeito estimulante.

A maioria dos efeitos clínicos relacionados ao SNC e SNA, como agitação intensa, irritabilidade, reação de fuga, prostração, refluxo, espasmos, possivelmente estão relacionados com os potenciais ativos dos metabólitos secundários encontrados no EEBHm.

Diversos autores já relataram a capacidade de metabólitos secundários extraídos de plantas demonstrarem atividades nesse sistema (ALMEIDA *et al.*, 2012; GIRARD, 2003; MUSTAD, 2014; SILVA *et al.*, 2017b). Alguns dos metabólitos encontrado no EEBHm são conhecidos por causarem alterações a nível de SNC. MacLennan, Darlington e Smith (2002) afirmam que os terpenos constituem o grupo de metabolitos com ações sobre o SNC, em seu estudo os diterpenóides encontrados no extrato de *Ginkgo biloba* L. (*Ginkgoaceae*), atuaram modulando sistemas neurotransmissores, tais como serotoninérgicos, noradrenérgico, dopaminérgico e colinérgico, aumentando o fluxo sanguíneo.

Outra ação conhecida dos terpenos é a estimulação da geração do segundo mensageiro Trifosfato de Inositol (IP3), que mobiliza o cálcio intracelular, levando a excitotocidade celular. Esse processo colabora com a consolidação de memória e também apresentam resultados na redução do tempo de sono induzido por pentobarbital sódico, aumentando assim, o tempo de latência para início do sono (MACLENNAN; DARLINGTON; SMITH, 2002; PASSOS *et al.*, 2009). Baseado nesse fato, podemos pressupor que esses transmissores tenham contribuído para alguns efeitos apresentados pelos animais como aumento da ambulação, e de forma geral nas características de estimulação do SNC.

Outro grupo de metabólitos encontrado no EEBHm e que possui muitos estudos voltados a sua atividade no sistema nervoso, são os flavonoides. Diversas pesquisas estão sendo realizadas com a intenção de compreender como esse metabólito consegue atuar no SNC. Uma das suas características interessantes descoberta nos últimos anos foi a capacidade de ultrapassarem a Barreira Hemato-Encefálica (BHE) e atingir os neurônios.

Youdim, Shukitt-Hale e Joseph (2004) executaram um estudo *in vitro* e *in situ* para determinar a permeabilidade da BHE a flavonoides, utilizando culturas celulares e um modelo de perfusão cerebral *in situ*, com ratos. Os flavonoides foram captados em todas as regiões cerebrais analisadas (cerebelo, córtex, hipocampo, hipotálamo, estriato, colículo superior e medula) após perfusão *in situ*, o que permitiu a conclusão de que foram capazes de ultrapassar a BHE sem sofrerem transformações.

Os avanços no conhecimento da neurofarmacologia dos flavonoides sugerem que eles têm potencial para tratamento de diversas condições neurológicas e mentais. A ação de moléculas como, por exemplo, a hispidulina, que é capaz de atingir o receptor do Ácido Gama-Aminobutírico (*Gamma-AminoButyric Acid* – GABA)- A, e tem demonstrado importante papel

na regulação da ansiedade e epilepsia, outrora outros flavonoides são úteis em condições de neurodegeneração (JOHNSTON; BEART, 2004); e uma gama de estudos sugerem que os flavonoides têm propriedades neuro ativas, o que condiz com os efeitos estimulantes apresentados no teste de toxicidade (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; DHAWAN; KUMAR; SHARMA, 2001; GUARALDO *et al.*, 2000; WATANABE *et al.*, 2001).

Outro metabólito encontrado no EEBHm que pode estar envolvidos nos efeitos apresentados no teste de toxicidade são as cumarinas. São substâncias amplamente distribuídas em plantas, assim como, em espécies de fungos e bactérias. Sua capacidade de exercer interações não covalentes com muitas enzimas e receptores em organismos vivos leva as cumarinas a exibir uma ampla gama de atividades e aplicações biológicas, entre elas ações antioxidantes e antineurodegenerativos (FRANCO *et al.*, 2021).

No que diz respeito à avaliação da massa corpórea dos animais, após submetidos ao EEBHm na dose de 2000 mg/kg, não houve uma redução significativa nos animais do grupo teste ( $P > 0,05$ ).

Segundo Júnior *et al.* (2012), a variação de peso é um dos parâmetros mais utilizados em estudos toxicológicos e pode indicar de forma precoce sinais da toxicidade de uma substância em um animal. Logo, os dados deste estudo não sugerem efeitos tóxicos de ordem física nos animais, causados pelas aplicações das diferentes doses de EEBHm na dose testada.

#### 4. CONCLUSÃO

Após análise fitoquímica, foi possível observar que o EEBHm mostrou a presença de algumas classes metabólicas como: saponinas, flavonoides, terpenos, cumarinas, taninos condensados e hidrolisáveis. Esses metabólitos secundários possuem na literatura ampla discussão sobre suas ações e puderam ser associados as atividades biológicas apresentadas pelo EEBHm.

O extrato foi avaliado em relação a sua toxicidade aguda, mostrando ausência de efeitos tóxicos graves sobre *Mus musculus*. Tal fato, indica uma maior segurança quanto a utilização desta espécie pela população e para o desenvolvimento de fórmulas farmacêuticas, uma vez que essa espécie tem sido alvo de diversos estudos sobre seu potencial farmacológico.

Ainda em relação aos testes de toxicidade, foi possível observar ações do EEBHm sobre o SNC, onde o extrato apresentou diversas ações associadas a substâncias estimulante. Esses resultados podem servir de base para posteriores pesquisas a fim de investigar o EEBHm como coadjuvante no tratamento de doenças que atingem o sistema nervoso.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. *et al.*. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)- limonene epoxide and its anxiolytic-like action. **Brain Research**, v. 1448, p. 56-62, 2012.
- ATANASOV, A. G. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature reviews Drug discovery**, v. 20, n. 3, p. 200-216, 2021.
- BATISTA, A. G. *et al.* Chemical composition of jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) flour and its effect on growth of rats. **Alimentos e Nutrição**, v. 22, n. 2, 2011.
- CARNEIRO, F. M.; *et al.*. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**. v. 3, n. 2, p. 44-75, 2014.
- DA COSTA JÚNIOR, J.S. *et al.* Evaluation of possible antioxidant and anticonvulsant effects of the ethyl acetate fraction from *Platonia insignis* Mart.(Bacuri) on epilepsy models. **Epilepsy & Behavior**, v. 22, n. 4, p. 678-684, 2011.
- DA COSTA, D. L.; *et al.*. Multipropósito de *Hymenaea courbaril* L. em uma área de manejo florestal comunitário na Amazônia. **Advances in Forestry Science**, v. 6, n. 2, p. 681-690, 2019.
- DA CRUZ SILVA, M. E. G. *et al.* HPLC-DAD analysis and antioxidant activity of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 2, p. 1160-1166, 2012.
- DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. **Journal of ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 1-23, 2004.
- DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus. **Journal of ethnopharmacology**, v. 78, n. 2-3, p. 165-170, 2001.
- FRANCO, D. P. *et al.* A IMPORTÂNCIA DAS CUMARINAS PARA A QUÍMICA MEDICINAL E O DESENVOLVIMENTO DE COMPOSTOS BIOATIVOS NOS ÚLTIMOS ANOS. **Química Nova**, v. 44, p. 180-197, 2021.
- GIRARDI, G. Breve História das Drogas. **Revista Galileu Especial**, n. 3, p. 6-7, Ed. Globo, 2003.
- GUARALDO, L. *et al.* Hydroalcoholic extract and fractions of *Davilla rugosa* Poiret: effects on spontaneous motor activity and elevated plus-maze behavior. **Journal of ethnopharmacology**, v. 72, n. 1-2, p. 61-67, 2000.
- JOHNSTON, G. A. R.; BEART, P. M. Flavonoids: some of the wisdom of sage?. **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 5, p. 809, 2004.

JORDAN, S. A.; CUNNINGHAM, D. G.; MARLES, R. J.. Assessment of herbal medicinal products: challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 243, n. 2, p. 198-216. 2010.

JUDD, W. S. *et al.* **Sistemática Vegetal. Um Enfoque Filogenético**. Porto Alegre: Artmed. 2009.

JÚNIOR, H. B. P. *et al.* Avaliação da toxicidade aguda do extrato hexânico de frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae) em camundongos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 4, p. 512-519, 2012.

LITAUDON, M.; *et al.* Desenvolvimento de uma abordagem inovadora baseada em rede molecular para a descoberta e isolamento direcionado de novos metabólitos bioativos de plantas superiores. **Planta Medica**, v. 85, n. 18, p. SL D-01, 2019.

MACLENNAN, K. M.; DARLINGTON, C. L.; SMITH, P. F. The CNS effects of Ginkgo biloba extracts and ginkgolide B. **Progress in neurobiology**, v. 67, n. 3, p. 235-257, 2002.

MALONE, M. H. The pharmacological evaluation of natural products—general and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **Journal of ethnopharmacology**, v. 8, n. 2, p. 127-147, 1983.

MATOS, F. J. A.. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2 ed. Fortaleza: Edições EUFC, 1988. 141p.

MONSENY, A. M.; *et al.* Poisonous plants: an ongoing problem. **Anales de Pediatría**, v. 85, n. 2, p. 347-353, 2015.

MOURA, O. B. D.; NEVES, S. O. C.; CORADIN, L.. Biodiversity for Food and Nutrition: Promoting Brazilian Underutilized Edible Plants into Food and Nutrition Security National Policies. In: **Local Food Plants of Brazil**. Cham: Springer International Publishing, . p. 51-64, 2021.

MUSTARD, J. A. The buzz on caffeine in invertebrates: effects on behavior and molecular mechanisms. **Cellular and molecular life sciences**, v. 71, n. 8, p. 1375-1382, 2014.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. **Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method**. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001. Disponível em: < [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method\\_9789264071001-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_9789264071001-en)>. Acesso em: Fevereiro de 2021.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT, Growth in health spending slows in many OECD countries, according to OECD Health Data 2008. Paris, France: **Organisation for Economic Co-operation and Development**, 2008. Disponível em: <<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/fedddocs/oecd/oecdtg407-2008.pdf>>. Acesso em: Fevereiro de 2021.

OLIVEIRA, F. G. S. *et al.* Influence of the extractive method on the recovery of phenolic compounds in different parts of *Hymenaea martiana* hayne. **Pharmacognosy research**. v. 8, n.4, p.270, 2016.

OLIVEIRA, F. G. S. *et al.* Photoprotective activity and HPLC-MS-ESI-IT profile of flavonoids from the barks of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae): development of topical formulations containing the hydroalcoholic extract. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 35, n. 1, p. 504-516, 2021.

PACHECO, A. G. M. *et al.* Identification of flavonoids in *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae) by HPLC-DAD-MSn analysis. **Natural product research**, v. 35, n. 14, p. 2414-2419, 2021.

PADAYACHEE, B.; BAIJNATH, H. Uma revisão abrangente atualizada das propriedades medicinais, fitoquímicas e farmacológicas da *Moringa oleifera*. **South African Journal Of Botany**, v 1, p 1-13. 2019.

PASSOS, C. S. *et al.* Terpenoids with activity in the central nervous system (CNS). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1A, p. 140-149, 2009.

PEACOCK, B. M.; *et al.* Intoxicaciones por plantas tóxicas atendidas desde un servicio de información toxicológica. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 14, n. 2, p. 1-8, 2009.

PEREIRA, V. S. *et al.* Estudo químico, toxicidade e atividade antibacteriana do óleo essencial de *Ocimum gratissimum*. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, v. 2, n. 4, número especial, 2014.

PINTO, R.B.; TOZZI, A.M.G.A.; MANSANO, V.F. **Hymenaea in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:  
<<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB22971>>. Acesso em: 06 mar. 2023

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

SEEFF, L. B.. Herbal hepatotoxicity. **Clinics in liver disease**, v. 11, n. 3, p. 577-596, 2007.  
SILVA, E. S. *et al.* Alterações comportamentais em ratos administrados com preparações da *Datura suaveolens*. **VITTALLE-Revista de Ciências da Saúde**, v. 7, n. 1, p. 33-50, 2017b.

SILVA, N. C. S. *et al.* A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos em prol da saúde. **ÚNICA Cadernos Acadêmicos**, v. 3, n. 1, 2017a.

VIEIRA, D. S. *et al.* Atividade antitumoral da folha da *Hymenaea martiana* hayne em células mamárias de cães. **Pubvet**, v. 12, n. 8, p.133, 2018.

WATANABE, M. H. C. *et al.* The in vivo neuromodulatory effects of the herbal medicine ginkgo biloba. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 12, p. 6577-6580, 2001.

YOUDIM, K. A.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J. A. Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 11, p. 1683-1693, 2004.