



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper baccans* (MIQ.) C.DC: UMA ALTERNATIVA
NATURAL NO CONTROLE DO *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA:
CULICIDAE)

HERGEN VIEIRA DE SOUZA

MANAUS - AMAZONAS
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

HERGEN VIEIRA DE SOUZA

ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper baccans* (MIQ.) C.DC: UMA ALTERNATIVA
NATURAL NO CONTROLE DO *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA:
CULICIDAE)

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal do
Amazonas, como requisito para
obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lígia Leandrini de Oliveira

Coorientadora: Profa. Dra. Rosemary Aparecida Roque

MANAUS - AMAZONAS
2023

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S7296 Souza, Hergen Vieira de
Óleo essencial de *Piper baccans* (MIQ.) C.DC: uma alternativa natural no controle do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) / Hergen Vieira de Souza . 2023
62 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Ana Lúcia Leandrini de Oliveira
Coorientadora: Rosemary Aparecida Roque
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. *Aedes aegypti*. 2. Controle biológico. 3. Óleo essencial. 4. *Piper*
. I. Oliveira, Ana Lúcia Leandrini de. II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título


“ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper baccans* (MIQ.) C.DC: UMA ALTERNATIVA NATURAL NO CONTROLE DO *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE)”

DISCENTE: HERGEN VIEIRA DE SOUZA

PARECER:

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 31/03/2023.


Documento assinado digitalmente
 PATRÍCIA DANIELLE OLIVEIRA DE ALMEIDA
Data: 24/04/2023 15:57:14-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Patrícia Danielle Oliveira de Almeida
Coordenadora do PPGCF

A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:



Profa. Dra. Ana Lígia Leandrini de Oliveira
Orientador e Presidente da Banca (UFAM)

Documento assinado digitalmente
 JOELMA SOARES DA SILVA
Data: 10/04/2023 14:58:43-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Joelma Soares da Silva
Membro (UEMA)



Prof. Dr. João Antônio Cyrino Zequi
Membro (UEL)

Dedico

Aos meus pais Genise Vieira e Heraldo Souza e irmãos pelo carinho, amor e incentivo para realização deste trabalho.

“O importante é ter fé em alguma coisa e, principalmente, acreditar em você”.

Clarissa Corrêa

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar proporcionando momentos felizes em minha trajetória.

A minha família, especialmente aos meus pais Heraldo Souza e Genise Vieira, pelo incentivo e apoio.

A minha orientadora Profa. Dra. Ana Lígia Leandrini de Oliveira pelo apoio e contribuição, por ter me depositado confiança.

A minha coorientadora Profa. Dra. Rosemary Aparecida Roque, minha grande inspiração e respeito durante toda minha vida acadêmica. Obrigado pelos seus ensinamentos, conselhos, amizade e confiança a mim depositada.

Ao meu caro Dr. André Corrêa (Sagat) pela grande contribuição e ensinamentos durante a pós-graduação.

A minha grande amiga e irmã, que ganhei no laboratório, Msc. Cláudia Tavares, por momentos incríveis de amizade dentro e fora do laboratório.

Aos colegas do LMD/INPA; Aylane Andrade, Joaquim Ferreira, Suelen Costa, Eunice Medeiros, Junielson Soares, aos técnicos do laboratório Carlos Praia e Elias Pacheco pela amizade e troca de experiências.

Aos meus amigos e irmãos do coração Adrielle Neris e Irã Jr. por sempre estarem apoiando as minhas conquistas.

Agradeço a todos que me proporcionaram apoio durante esta jornada.

À FAPEAM pelo apoio financeiro, bem como ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFAM pelo apoio e assistência.

Aos membros da banca pela disponibilidade e contribuição deste trabalho.

A todos que compartilharam comigo a minha trajetória, muito obrigado.

RESUMO

Os inseticidas sintéticos têm sido a principal forma de controle de insetos vetores. No entanto, o uso indiscriminado desencadeou o desenvolvimento da resistência. Além disso, os inseticidas sintéticos são produtos extremamente tóxicos para o meio ambiente. Em contrapartida, os óleos essenciais (OEs) extraídos de plantas como as do gênero *Piper* são importantes larvicidas com ação neurotóxica e citotóxica contra insetos vetores como *A. aegypti*. Assim, o objetivo do estudo foi investigar o perfil químico do OE de *Piper baccans* e avaliar sua atividade biológica e mecanismo de ação contra *A. aegypti*, sua toxicidade contra animais aquáticos não-alvos. O OE extraído das folhas de *P. baccans* foi analisado por método cromatográfico (CG-MS), foi avaliado contra larvas de *A. aegypti*, enquanto os mecanismos de ação foram baseados em análises enzimática (AChE) e citológica. A toxicidade do OE foi investigada contra os predadores de larvas de culicídeos *Diplonychus indicus* e *Anisops bouvieri*. As análises por CG-MS do OE relevaram a presença majoritária de δ -cadineno (11,64%), elemol (10,12%), (-)-10-epi- γ -eudesmol (9,39%), isocaryopheleno (6,73%), γ -muuroleno (7,49%), óxido de cariofileno (7,09%) e epi- γ -eudesmol (5,5%). O OE apresentou atividade larvicida (CL₅₀ de 10,68 μ g/mL e CL₉₀ de 22,11 μ g/mL), ocasionada pela ação neurotóxica após a inibição da enzima AChE (IC₅₀ de 38,37 μ g/mL), como também pela ação genotóxica promovida pela má formação do micronúcleo e destruição cromossômica com células apoptóticas e necróticas, cromossomo metafásico com perda, grupos cromossomos metafásico e células binucleadas. O OE a 31,25 μ g/mL não foi tóxico contra *D. indicus* e *A. bouvieri*. Porém, demonstrou elevada toxicidade a 62,50 μ g/mL, matando 100% desses animais. Os resultados demonstram que o OE extraído das folhas de *P. baccans* é um larvicida natural contra larvas de *A. aegypti*, com modo de ação neurotóxico e citológico. Contudo, seu uso deve ser avaliado em concentrações abaixo de 31,25 μ g/mL.

Palavra-chave: *Aedes aegypti*, Controle biológico, Óleo essencial, *Piper*.

ABSTRACT

Synthetic insecticides have been the main way to control insect vectors. However, indiscriminate use has triggered the development of resistance. In addition, synthetic insecticides are highly toxic products for the environment. On the other hand, essential oils (EOs) extracted from plants such as the genus *Piper* are important larvicides with neurotoxic and cytotoxic action against insect vectors such as *A. aegypti*. Thus, the aim of the study was to investigate the chemical profile of the EO from *Piper baccans* and to evaluate its biological activity and mechanism of action against *A. aegypti*, as well as to evaluate its toxicity against non-target aquatic animals. The chemical profile of the EO extracted from *P. baccans* leaves analyzed by chromatographic methods (GC-MS) was evaluated against *A. aegypti* larvae, while the mechanisms of action were based on enzymatic (AChE) and cytological analyses. The toxicity of EO was investigated against predators of culicid larvae *Diplonychus indicus* and *Anisops bouvieri*. GC-MS analyses of the EO revealed the majority presence of δ -cadinene (11.64%), elemol (10.12%), (-)-10-epi- γ -eudesmol (9.39%), isocaryophellene (6.73%), γ -muurolene (7.49%), caryophyllene oxide (7.09%) and epi- γ -eudesmol (5.5%). The EO showed significant larvicidal activity (LC50 of 10.68 $\mu\text{g/mL}$ and CL90 of 22.11 $\mu\text{g/mL}$), caused by the neurotoxic action after inhibition of the AChE enzyme (IC50 of 38.37 $\mu\text{g/mL}$), as well as by genotoxic action promoted by micronucleus malformation and chromosomal destruction with apoptotic and necrotic cells, metaphase chromosome loss, metaphase chromosome groups and binucleated cells. EO at 31.25 $\mu\text{g/mL}$ was not toxic against *D. indicus* and *A. bouvieri*. However, showed high toxicity at 62.50 $\mu\text{g/mL}$, killing 100% of these animals. The results demonstrate that the EO extracted from leaves from *P. baccans* is a significant natural larvicide against *A. aegypti* larvae, with a neurotoxic and cytological mode of action. However, its use should be evaluated at concentrations below 31.25 $\mu\text{g/mL}$.

Keyword: *Aedes aegypti*, Biological control, Essential oil, Piper.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fêmea de <i>Aedes aegypti</i> realizando hematofagia.....	5
Figura 2. Macho e Fêmea de <i>Aedes aegypti</i>	5
Figura 3. Ciclo biológico do <i>Aedes aegypti</i>	6
Figura 4. Reserva Florestal Adolpho Ducke.....	14
Figura 5. Figura 5. (A) Registro da exsicata de <i>P. baccans</i> depositado no herbário-HUAM. (B) Exemplar de <i>P. baccans</i>	15
Figura 6. (A) Material em partes (folha, galho e inflorescência). (B) Folhas trituradas no moinho tipo faca.....	15
Figura 7. Extração do óleo essencial por meio de hidrodestilação em aparato de Clevenger.....	16
Figura 8. Armazenamento do óleo essencial de <i>Piper baccans</i> (OEPb).....	16
Figura 9. Solução estoque do óleo essencial de <i>Piper baccans</i> (OEPb) usado no bioensaio seletivo.....	18
Figura 10. Bioensaio seletivo contra larvas de <i>Aedes aegypti</i>	18
Figura 11. Curva cinética da obtenção do óleo essencial de <i>Piper baccans</i>	22
Figura 12. Estruturas químicas dos compostos presente no OE obtido a partir das folhas de <i>Piper baccans</i> : a) δ -Cadineno b) Elemol c) (-)-10-epi- γ -eudesmol.....	23
Figura 13. Cromatograma do óleo essencial de <i>Piper Baccans</i>	24
Figura 14. Resultado do teste seletivo do óleo essencial de <i>Piper baccans</i> contra larvas de <i>A. aegypti</i>	26
Figura 15. Resultado do teste dose resposta do óleo essencial de <i>Piper baccans</i> contra larvas de <i>A. aegypti</i>	27
Figura 16. Resultado da genotoxicidade do OE de <i>P. baccans</i> em larvas de 3 ^o estágio de <i>A. aegypti</i>	28
Figura 17. Resultado da genotoxicidade do controle negativo (DMSO) em larvas de 3 ^o estágio de <i>A. aegypti</i>	28
Figura 18. Percentual de toxicidade do OE de <i>Piper baccans</i> em predadores aquáticos não-alvos como <i>Diplonychus indicus</i> e <i>Anisops bouvieri</i> (hemiptera).....	30
Figura 19. Inibição <i>in vitro</i> da enzima acetilcolinesterase pelo OE de <i>Piper baccans</i>	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Inseticidas recomendados pela Organização Mundial da Saúde para o controle vetorial.....	8
Tabela 2. Rendimento do óleo essencial das folhas da espécie <i>Piper baccans</i>	20
Tabela 3. Compostos voláteis da espécie de <i>Piper baccans</i>	22
Tabela 4. Concentrações letais dos voláteis da espécie de <i>Piper baccans</i>	25

LISTA DE ABREVIações, SIGLAS E SÍMBOLOS

A. aegypti Aedes aegypti

WHO	World Health Organization
L1	Larva de 1º estágio
L2	Larva de 2º estágio
L3	Larva de 3º estágio
L4	Larva de 4º estágio
DENV-1	Vírus da Dengue tipo 1
DENV-2	Vírus da Dengue tipo 2
DENV-3	Vírus da Dengue tipo 3
DENV-4	Vírus da Dengue tipo 4
CHIKV	Vírus Chikungunya
ZIKV	Vírus Zika
OC	Organoclorado
OP	Organofosforado
CA	Carbamato
PI	Piretróide
IGR	Inseticida regulador de crescimento
OMS	Organização Mundial de Saúde
OE	Óleo essencial
Ach	Acetilcolina
AChE	Enzima acetilcolinesterase
MeOH	Metanol
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
LMD	Laboratório de Malária e Dengue
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
LAEQ	Laboratório de Abertura de Amostra e Ensaio Químicos
DMSO	Dimetilsulfóxido
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio anidro
CL50	Concentração letal mediana ou 50%
CL90	Concentração letal 90%
IC50	Concentração inibitória média

n	Número de amostras
α	Alfa
β	Beta
°C	Graus Celsius
>	Maior
<	Menor
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
μg	Micrograma
mm	Milímetros
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
L	Litro
cm	Centímetro
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus, 1762.....	4
2.2 Importância epidemiológica.....	6
2.3 Controle vetorial e resistência.....	7
2.5 Acetilcolinesterase - AChE.....	9
2.6 Família Piperaceae.....	10
2.7 Gênero <i>Piper</i> atividade contra vetores de patógenos	10
2.8 <i>Piper Baccans</i> (Mig) C.DC.....	11
3 OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo geral.....	13
3.2 Objetivos específicos	13
4 MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Licenças e registros.....	14
4.2 Material vegetal.....	14
4.2.1 Processamento do material vegetal	15
4.3 Extração do óleo essencial.....	16
4.3.1 Análises cromatográficas por CG-EM	17
4.4 Criação das larvas de <i>Aedes aegypti</i>	17
4.5 Teste seletivo de toxicidade.....	17
4.5.1 Teste da toxicidade aguda (dose-resposta).....	19
4.6 Ensaio do micronúcleo e outras alterações celulares em <i>A. aegypti</i>	19
4.6.1 Análises das preparações citológicas de <i>A. aegypti</i>	20
4.7 Caracterização do mecanismo de ação larvicida	20
4.8 Quantificação da toxicidade do óleo essencial em predadores aquáticos não- alvos	21
4.9 Análise estatística.....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1 Cinética de extração e composição química do óleo essencial.....	22
5.2 Teste seletivo do potencial larvicida do óleo essencial.....	25
5.3 Bioensaio dose-resposta do óleo essencial	26
5.4 Análises das preparações citológicas de <i>A. aegypti</i>	27
5.5 Teste de segurança dos predadores aquáticos não-alvos	29
5.6 Caracterização do mecanismo de ação pela inibição da AChE	30
6. CONCLUSÃO.....	31
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
ANEXOS	46

1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença viral aguda potencialmente fatal com grande potencial epidemiológico, ocorrendo em mais de 100 países. No Brasil, somente em 2022 foram reportados à Organização Mundial de Saúde, 1.450.270 casos de dengue, o que corresponde a um aumento de 162,5% de casos comparado ao ano anterior, em 2021. Desses, 5.440 casos foram registrados no estado do Amazonas (BRASIL, 2023).

O vírus da dengue (DENV), pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, e possui 04 sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, (FARES, et al., 2015; WHO, 2019). Este vírus possui grande prevalência nas áreas urbanas e semiurbanas (WHO, 2019), representando significativo risco à saúde humana e por ser uma doença com características mórbidas, resulta em impactos negativos na economia (VALLE, et al., 2015).

No Brasil, a dengue é transmitida principalmente pelo mosquito da espécie *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) (GUIRADO; BICUDO, 2009). O ciclo de vida do vetor é dividido em quatro fases, sendo elas: ovo, larva, pupa e adulto (FORATTINI, 2002). As fêmeas do mosquito depositam entre 150 a 200 ovos próximos à linha d'água, em ambientes com temperatura de $28 \pm 5^{\circ}$ C e umidade relativa em torno de $85 \pm 5\%$, (BRASIL, 2019). A alimentação desses mosquitos é baseada em néctar de flores e suco de frutos. No entanto, a fêmea também realiza o repasto sanguíneo para maturação dos ovos (LUCENA, et al., 2011).

O mosquito *A. aegypti* é um dos mais eficientes vetores de arboviroses como dengue, zika e chikungunya, ocorrendo a transmissão durante a hematofagia (FORATTINI, 2002). Ademais, a ANVISA aprovou o imunizante Qdenga é a primeira aprovada no Brasil podendo ser utilizada por quem já teve dengue (BRASIL, 2023) sendo assim, uma vez que não existe vacina eficaz que confira proteção contra todas as arboviroses transmitidas pelo vetor, a principal medida de interromper a transmissão dessas doenças é interromper o ciclo de vida do mosquito utilizando inseticidas sintéticos (ZARA, et al., 2016) aplicados nos criadores, tais como recipientes artificiais que acumulam água como pneus, latas, garrafas e plásticos (GUBLER, KUNO, 1997).

Durante décadas, inseticidas sintéticos, como organofosforados, carbamatos e piretróides, têm sido os métodos utilizados continuamente no controle de diversos mosquitos vetores (ZARA, et al., 2016). No entanto, o uso indiscriminado desses inseticidas promoveu o desenvolvimento da resistência de diversos mosquitos, entre eles os *A. aegypti* (BRAGA, VALLE, 2007), tornando o controle do mosquito um importante problema de saúde pública no Brasil, sendo um dos fatores que contribui para as recorrentes epidemias de dengue no país (ZARA et al. 2016). Outro problema causado pelo uso dos produtos sintéticos é o risco ambiental, uma vez que devido a sua elevada toxicidade e não seletividade, causam a morte de animais não-alvos como peixes e outros predadores de larvas de mosquitos (DE OLIVEIRA, 2023). Estudos recentes demonstraram que os inseticidas sintéticos temefós e α -cipermitrina (CL₅₀ de 0,22 a 4,85 μ g/mL) foram extremamente tóxicos contra *Toxorhynchites splendens* (Culicidae), *Anisops bouvieri* (Hemiptera), *Gambusia affinis* (Poeciliidae) e *Diplonychus indicus* (Heteroptera) (DE OLIVEIRA, 2020). Por outro lado, inseticidas naturais como óleos essenciais e extratos obtidos de plantas são alternativas com menor impacto ecológico para o controle de mosquitos vetores de patógenos como *A. aegypti* (PEREIRA; ZARTMAN, 2019).

Os óleos essenciais (OE) são produtos do metabolismo secundário de diversas plantas (GOVINDARAJAN, et al., 2013), os quais são biossintetizados em diversos órgãos vegetais como flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas e raízes (BURT, 2004; SOONWERA; PHASOMKUSOLSIL, 2017). São caracterizados majoritariamente por monoterpenos e sesquiterpenos (ROSA, et al., 2016). As plantas do gênero *Piper*, da família Piperaceae, são consideradas boas produtoras de óleos essenciais, tanto em relação ao rendimento quanto às propriedades biológicas dos óleos extraídos (VILA, et al., 2010).

A família Piperaceae é constituída pelos gêneros *Zippelia*, *Peperomia*, *Piper*, *Verhuellia* e *Manekia* encontradas em diversos países tropicais e subtropicais como o Brasil (AL-MEHMADI, et al., 2010). *Piper* é o mais representativo dentre os gêneros, com aproximadamente 2 mil espécies (SALEHI, et al., 2019). Esse gênero é caracterizado por suas diversas atividades farmacológicas tais como: antitumoral, antioxidante, anticancerígenas, antimicrobianas, bem como atividades inseticidas (larvicida, adulticida e

pupicida) (MACHADO, et al., 2013). Estudos com óleos essenciais extraídos de *P. purusarum* C.DC e *P. alatipetiolatum* Yunck. demonstraram significativa atividade larvicida contra o *A. aegypti* e *An. darlingi* (CL₅₀ de 33,74 a 49,85 µg/mL), como também não apresentaram toxicidade significativa contra os animais não-alvos *T. splendens*, *A. bouvieri*, *G. affinis* e *D. indicus* (CL₅₀ de 2098,80 a 7707,13 µg/mL) (DE OLIVEIRA, 2020).

Piper baccans (Miq) C.DC é um arbusto de crescimento ereto com folhas lanceoladas, pecioladas cuja espigas têm aproximadamente 2 a 3 cm (SiBBr, 2020). Na Reserva Florestal Adolpho Ducke, localizada na cidade de Manaus, estado do Amazonas, a espécie apresenta ampla frequência de distribuição (f = 37) em áreas planas (GARCIA, 2016). Apesar da ampla distribuição, não há relatos na literatura científica sobre a composição química e propriedades biológicas desta espécie (buscas feitas nas bases de dados PUBMED, SCIENDIRECT, e SCIFINDER, com acesso em março de 2023). Por outro lado, o gênero *Piper* é caracterizado pela significativa produção de óleos essenciais caracterizados pela atividade inseticida (FRANÇA, 2015; ANDRADE, et al., 2011). Neste contexto, o óleo essencial de *P. baccans* pode apresentar potencial larvicida.

O objetivo do estudo foi caracterizar quimicamente o óleo essencial extraído das folhas de *P. baccans* e avaliar sua atividade larvicida contra o principal vetor da dengue, o mosquito *A. aegypti*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762

O mosquito *A. aegypti* foi descrito inicialmente no Egito, pertence ao filo Artropoda, classe Insecta, ordem Diptera, família Culicidae e gênero *Aedes* (BRAGA; VALLE, 2007; VALLE, et al., 2015). Sua distribuição entre os continentes Africano, Asiático, Americano, bem como Oceania ocorreu entre os séculos XV e XIX, principalmente em decorrência do intenso tráfego de mercadorias, as quais continham ovos do mosquito (FORATTINI, 2002; VALLE, et al., 2015; CARVALHO, MOREIRA, 2017). A distribuição atual do *A. aegypti* inclui regiões que concentra os países mais pobres do mundo, em grande parte, áreas de clima tropical e subtropical, onde as condições climáticas favorecem o seu desenvolvimento (IWAMURA, et al., 2020). É um mosquito predominantemente urbano e domiciliado vivendo próximo ao homem, sendo encontrado no intra e peridomicílio (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

No século XX, foi intensificado e sistematizado no Brasil, o combate ao mosquito, com o objetivo de reduzir o número de casos de febre amarela urbana, em decorrência do óbito de milhares de pessoas (ZARA, et al., 2016). Apesar da erradicação no país em 1955 (VALLE, et al., 2015), houve sua reintrodução em 1967 em Belém do Pará, no Estado do Rio de Janeiro em 1977 e em Roraima no início da década de 1980 (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). No Estado do Amazonas, o *A. aegypti* foi introduzido na cidade de Manaus em 1996, devido às condições climáticas ideais que favoreceram a dispersão do vetor (TADEI, 2001).

Dentre as características morfológicas do vetor destacam-se a cor escura, escamas brancas nas pernas, tórax, bem como no dorso em formato de lira (Figura 1). Além disso, os machos caracterizam-se pelas antenas plumosas e palpos longos, enquanto que nas fêmeas as antenas são pilosas e os palpos são curtos (Figura 2) (FORATTINI, 2002).



Figura 1. Fêmea de *Aedes aegypti* realizando hematofagia.
Fonte: cdc.gov (2022)



Figura 2. Macho (esquerda) e fêmea (direita) do *Aedes aegypti*.
Fonte: IOC.Fiocruz (2021)

O ciclo de vida do mosquito dura em média 10 a 15 dias entre a eclosão e a emergência do inseto adulto. O ciclo é do tipo holometábolo, ou seja, a metamorfose é completa, e o desenvolvimento ocorre em quatro fases evolutivas: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 3) (EIRAS, 2011). Após a cópula, a fêmea necessita de sangue para maturar seus ovos, que são depositados próximos à superfície da água, após a eclosão ocorre a fase de larva, que possui quatro estádios (L1, L2, L3 e L4). Durante seu ciclo de vida as larvas se alimentam de matérias orgânicas (FORATTINI, 2002), enquanto que a fase de pupa dura cerca de 2 a 3 dias, e não ocorre alimentação neste estágio. O mosquito passa por uma série de transformações internas até a forma adulta, em seguida ocorre a emergência do adulto completando o ciclo de vida do vetor (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

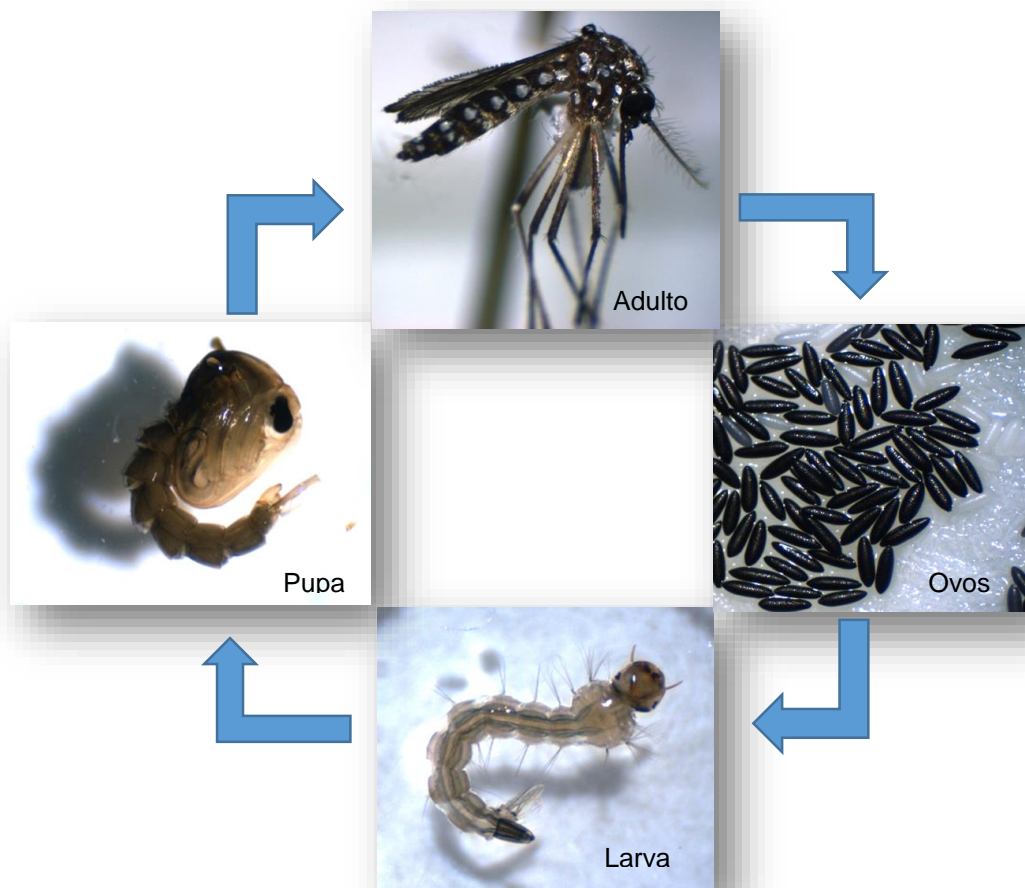


Figura 3. Ciclo biológico do mosquito *Aedes aegypti*.
Fonte: SOUZA, H.V (2023)

2.2 Importância epidemiológica

Atualmente, um dos principais desafios da saúde pública está relacionado às arboviroses como dengue, febre amarela urbana, Vírus Zika e chikungunya transmitidas pelo mosquito *A. aegypti*, principalmente em países de clima tropical e subtropical (MAIA, et al., 2019). Devido à sua elevada antropofilia, o *A. aegypti* é um dos mais eficientes vetores de arboviroses, já que durante a hematofagia pode contrair ou transmitir o vírus se o hospedeiro estiver contaminado (FORATTINI, 2002).

A dengue é uma doença viral causada por um vírus da família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus* e possui quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. O vírus é transmitido em regiões de clima tropical e subtropical, principalmente em áreas urbanas e semiurbanas (WHO, 2023). O vírus causa

uma diversidade de sintomas em humanos, desde a forma assintomática (sem sintomas), apresentando quadro leve, até a dengue com sinais de alarme e a dengue grave. Os sinais de alarme são assim chamados por sinalizar o extravasamento de plasma e/ou hemorragias que podem levar o paciente a choque grave e óbito. A forma grave da doença inclui dor abdominal intensa e contínua, náuseas, vômitos persistentes e sangramento de mucosas (BRASIL, 2023).

De acordo com a World Health Organization, a incidência global da dengue cresceu drasticamente nas últimas décadas e aproximadamente metade da população mundial está em risco de contrair a doença (WHO, 2023).

2.3 Controle vetorial e resistência

O controle do *A. aegypti* tem sido um desafio para mobilização da saúde pública, o combate para a eliminação de criadouros do mosquito é um grande desafio para a sociedade brasileira (ZARA, et al., 2016; BRASIL, 2023). Pois, de acordo com as Diretrizes Nacionais do Ministério da Saúde, o controle do mosquito, bem como a interrupção da transmissão da dengue deve ser realizado de forma integrada, pela sistematização do controle mecânico, biológico e químico (BRASIL, 2009).

O controle mecânico consiste na remoção ou modificação de potenciais criadouros como os recipientes que possam acumular água: pneus, latas, garrafas e suas respectivas tampas, além da drenagem de reservatórios de água quando possível (BRASIL, 2009; ZARA, et al., 2016; FUNASA, 2022).

O controle biológico é baseado na utilização de predadores naturais como *Toxorhynchites* spp. ou peixes *Gambusia affinis* cuja dieta alimentar são larvas de mosquitos (BRAGA; VALLE, 2007). Além desses, patógenos como bactérias ou fungos produtores de toxinas larvicidas também são ferramentas biológicas (BRASIL, 2009; ZARA, et al., 2016).

Os inseticidas químicos sintéticos ou semi-sintéticos tais como organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides foram, durante muito tempo, utilizados como a principal ferramenta para o controle de mosquitos (BRAGA; VALLE, 2007; TAVARES, 2021). Esses produtos possuem diversos mecanismos de ação para os quais a inibição do sistema nervoso via AChE (acetilcolinesterase) e GABA (ácido gama-aminobutírico) causa o acúmulo da

acetilcolina na fenda sináptica, resultando na morte dos insetos após intensa excitação involuntária muscular (Tabela 1) (TÕUGU, 2001; WOREK, et al., 2005; SILVA, 2012). Atualmente, esses produtos não são recomendados devido ao desenvolvimento de resistência em diversas espécies de vetores (WHO, 2006; BRAGA; VALLE, 2007; VALLE, et al., 2015). A resistência a inseticidas é a capacidade hereditária do inseto de sobreviver a concentrações letais para indivíduos da mesma espécie (suscetíveis). Para o *A. aegypti* a resistência ao larvicida temefós tem sido associada a alterações em seu sítio-alvo na acetilcolinesterase, relacionados com enzimas envolvidas na desintoxicação de compostos (ARAÚJO, et al., 2016).

Doravante, inseticidas naturais como espinosade desenvolvido com substâncias isoladas das bactérias *Saccharopolyspora spinosa* são produtos recomendados pelo Ministério da Saúde/Brasil no combate às larvas de *A. aegypti* (ZARA, et al., 2016; CARVALHO; MOREIRA, 2017). O Espinosade tem sido utilizado no controle de pragas, incluindo Lepidoptera, Diptera, Thysanoptera, Coleoptera, Orthoptera e Hymenoptera (DORNELAS, et al., 2018), além disso, a interação com este produto em grandes quantidades pode causar toxicidade aguda, considerado tóxico para homem e aos organismos aquáticos (BRASIL, 2021).

Tabela 1. Inseticidas empregados no controle vetorial.

Inseticida	Classe	Modo de ação	Sintomas	Risco ao meio ambiente
DDT	Organoclorados	Sistema nervoso central (axônio)	Tremores, paralisia, movimentos letárgicos e morte	Peixes ou mamíferos de pequeno porte e ao homem
Malathion	Organofosforados	Sistema nervoso Central (AChE, GABA)	Tremores, paralisia, movimentos letárgicos e morte	Peixes ou mamíferos de pequeno porte e ao homem
Carbaril	Carbamatos	Sistema nervoso Central (AChE, GABA)	Tremores, paralisia, movimentos letárgicos e morte	Peixes ou mamíferos de pequeno porte e ao homem
Delta metrina	Piretróides	Sistema nervoso Central (axônio)	Tremores, paralisia, movimentos	Peixes ou mamíferos de

Espinosade	Inseticida não sistêmico de origem bacteriana	Sistema nervoso Central (AChE, GABA	letárgicos e morte Tremores, paralisia, movimentos letárgicos e morte	pequeno porte e ao homem Peixes ou mamíferos de pequeno porte e ao homem
------------	---	-------------------------------------	--	---

Fonte: BRASIL, 2021

2.4 Óleo essencial: inseticidas naturais de origem vegetal

Com o desenvolvimento de resistência aos inseticidas tradicionais, intensificou-se a busca por substâncias naturais, eficazes no combate aos mosquitos adultos e as larvas do *Aedes* (SIMAS, et al., 2004). Os OEs são produtos do metabolismo secundário das plantas aos quais são importantes na adaptação do vegetal ao meio ambiente, como também exercem proteção à planta contra fitopatógenos, herbívoros, insetos, entre outros (MONTANARI, 2010). Os OEs são compostos por substâncias voláteis de ocorrência natural encontrados em uma variedade de plantas (GOVINDARAJAN, et al., 2013). São produtos sintetizados por diferentes órgãos vegetais tais como flores, folhas, galhos e raízes em diversas plantas como da família Piperaceae, podendo ser extraídos por diferentes métodos de baixo custo como hidrodestilação em aparato Clevenger modificado (DE OLIVEIRA, et al., 2022).

Devido à complexa composição química, por ser uma mistura majoritária de monoterpenos, sesquiterpenos, bem como fenilpropanóides, muitos óleos essenciais desempenham importantes atividades biológicas como: anti-inflamatória, antifúngica, antimicrobiana, antioxidante e inseticida (ROSA, et al., 2016; GNANKINÉ, 2017). A maioria dos monoterpenos e sesquiterpenos são tóxicos para os insetos ao penetrar no corpo pelo aparelho respiratório, pela cutícula ou pelo sistema digestivo em caso de ingestão (REGNAULT-ROGER, 1997; PRATES, et al., 1998; KOUL, et al., 2008; PAVELA, 2015; GNANKINÉ, 2017).

2.5 Acetilcolinesterase - AChE

A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas. A ACh atua nessas sinapses, passando informações de um neurônio para outro. As sinapses

colinérgicas são amplamente distribuídas nos sistemas nervoso central (SNC) e periférico (SNP) e desempenham papel fundamental na manutenção de várias funções fisiológicas do corpo humano (SILVA, 2012).

O uso de pesticidas, que apresentam como mecanismo de ação a inibição da AChE, resultam no acúmulo do neurotransmissor nas sinapses do SNC, nas terminações nervosas parassimpáticas e simpáticas e nas junções neuromusculares (TÕUGU, 2001).

Os organofosforados e carbamatos são capazes de inibir a AChE, atuam como neurotóxicos em diferentes espécies de vetores, pois são empregados na agricultura e no uso doméstico (WOREK, et al., 2005).

Na literatura, óleos essenciais extraídos de diversas espécies de plantas têm apresentado inibição da AChE em diferentes espécies de vetores. O uso desses compostos naturais têm relevância para o desenvolvimento de novos pesticidas (TAVARES, 2021).

2.6 Família Piperaceae

A família Piperaceae compreende os gêneros *Peperomia*, *Zippelia*, *Manekia*, *Verhuellia* e *Piper* caracterizadas como cosmopolitas (ANDRADE, et al., 2011). No Brasil, esses gêneros são amplamente distribuídos, principalmente na Amazônia e Mata Atlântica (SALEHI, et al., 2019). As piperáceas são caracterizadas pela presença de espigas, inflorescências, arbustos ou arvoretas que predominam em áreas úmidas (FRANÇA, 2015).

Estudos químicos reportam a presença de metabólitos ativos como alcalóides, terpenos, lignanas, fenóis, aminas, amidas, flavononas, entre outros com diversas atividades biológicas como antifúngico, anti-inflamatório, antimicrobiano e inseticida (ROSA, et al., 2016; PINTO, et al., 2012).

2.7 Gênero *Piper* atividade contra vetores de patógenos

O gênero *Piper* engloba cerca de 2 mil espécies arbustivas que predominam em regiões tropicais e subtropicais (SALEHI, et al., 2019). Dentro do gênero *Piper*, cerca de 260 a 450 espécies podem ser encontradas no Brasil, essas espécies possuem diversas atividades biológicas e são utilizadas na farmacopeia em todo o mundo (GUTIERREZ, et al., 2013; SAMAIN, et al., 2010). Vários estudos têm demonstrado atividade citotóxica (ORJALA, et al., 1994),

inseticida (LIMA, et al., 2009), bactericida (DOGNINI, et al., 2012), leishmanicida (GHOSAL, et al., 2012) e fungicida (PRAKASH, et al., 2012).

Derivados de *Piper permucronatum*, *Piper hostmanianum* e *P. marginatum* têm demonstrado atividade larvicida significativa contra *A. aegypti* com CL₅₀ 36 e 54 mg/ mL (DE MORAIS, et al., 2007) e 14,3 ppm (AUTRAN, et al., 2009), respectivamente. Estudos têm demonstrado potencial inseticida de diversas espécies como *P. aduncum*, *P. nigrum* e *P. hispidinervum* aos quais foram relacionados ao óleo essencial rico em substâncias como: safrol, sesamina e dilapiol (NERIO, et al., 2010; PINTO, et al., 2012).

Estudos recentes com óleos essenciais extraídos das folhas das espécies *P. purusanum*, *P. alatipetiolatum* (Piperaceae), *Tetradenia riparia* (Lamiaceae) apresentaram significativa atividade larvicida contra os principais vetores da dengue e malária, *Ae. aegypti* e *An. darlingi*, respectivamente, como também contra seus vetores secundários (CL₅₀ de 29,31 a 40,76 µg/mL) (DE OLIVEIRA, et al., 2022). Em adição, os autores também reportaram a inibição da AChE (IC₅₀ de 2,29 a 2,65 µg/mL) como principal mecanismo de ação larvicida destes óleos essenciais, além de relatarem sua baixa toxicidade contra animais não-alvos (CL₅₀ de 2098,80 a 7707,13 µg/mL) (DE OLIVEIRA, et al., 2020).

O óleo essencial de *P. sarmentosum* apresentou 100% de atividade inseticida contra *Brontispa longissima* (Coleoptera) (QUIN, et al., 2010). Extratos metanólicos obtidos das folhas *P. longum* apresentaram atividade larvicida contra *Ae. aegypti* (CL₅₀ 395,517 µg/mL), *An. Stephensi* (CL₅₀ 134,712 µg/mL) e *Culex quinquefasciatus* (CL₅₀ 315,359 µg/mL) (DEY et al. 2020). Estudo realizado por Quignard e colaboradores (2004) com o extrato metanólico de *P. aduncum* demonstrou mortalidade em 100% das larvas de *A. aegypti*, após 24 horas de exposição.

De acordo com os dados da literatura científica, a composição química das espécies do gênero *Piper* é bastante variável, e com isso podem apresentar diferentes atividades biológicas (FRANÇA, 2021).

2.8 Piper Baccans (Miq) C.DC

A espécie *Piper baccans* (Miq) C.DC é uma espécie arbustiva com crescimento ereto, folhas em formato lanceoladas, pecioladas e espigas com aproximadamente 2 a 3 cm (SiBBr, 2020), encontradas com abundância na

Reserva Florestal Adolpho Ducke (GARCIA, 2016). No entanto, não foram encontradas informações na literatura científica relacionadas à composição química e potencial inseticida de *P. baccans*. Entretanto, a característica inseticida reconhecida dos óleos essenciais de diversas espécies do gênero *Piper*, fundamentam a investigação química e biológica do óleo essencial dessa espécie contra *A. aegypti*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar o perfil químico e a atividade biológica do óleo essencial de *Piper baccans* sobre larvas de *Aedes aegypti*.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar e Identificar os constituintes dos óleo essencial de *P. baccans* através das análises por CG-EM;
- Avaliar a toxicidade aguda dos óleo essencial de *P. baccans* contra larvas de *A. aegypti*, por meio de bioensaios seletivo e de dose-resposta;
- Identificar a segurança dos óleo essencial de *P. baccans* em predadores aquáticos, não-alvos *Diplonychus indicus*, *Anisops bouvieri* (Hemiptera) e correlacioná-los aos organismos alvos;
- Avaliar o efeito genotóxico do óleo de *P. bacans* em larvas de *A. aegypti* após 72 h de exposição;
- Avaliar a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), como um possível mecanismo de ação do óleo essencial de *P. baccans*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Licenças e registros

A coleta da espécie vegetal *P. baccans* foi autorizada pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, de acordo com o N. 81031-1 (Em anexo).

O repasto sanguíneo das fêmeas de *A. aegypti* realizado em hamsters sírios da espécie *Mesocricetus auratus* (Cricetinae) foi previamente autorizada pelo Conselho de Ética de Uso de Experimentação Animal - CEUA, conforme parecer técnico N. 034/2021 (Em anexo).

O estudo foi devidamente registrado no Sistema Nacional de Patrimônio Genético e Gestão do Conhecimento Tradicional Associados - SisGen, sob o número de cadastro N. AA94F48 conforme as leis vigentes (Em anexo).

4.2 Material vegetal

A espécie vegetal *P. baccans* foi coletada na Reserva Florestal Adolpho Ducke – RFAD (Figura 4), do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA, localizado na rodovia Manaus – Itacoatiara, AM-010 KM 26 (2° 55' 36,4" Sul e 59° 58'39,88" Oeste). Posteriormente, o material (folha, galho e inflorescência) foi acondicionado em saco plástico na cor preta de 100 mL, e transportado ao laboratório de Farmacognosia e Farmacobotânica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM. A identificação taxonômica foi confirmada pela botânica Rosalba da Costa Bilby, e a exsicata foi depositada no Herbário Universitário do Amazonas – HUAM, onde se encontra registrado sob o nº12103 (Figura 5).



Figura 4. Reserva Florestal Adolpho Ducke localizado na rodovia Manaus – Itacoatiara, AM-010 KM 26

Fonte: SOUZA, H.V (2023)



Figura 5. (A) Registro da exsicata de *Piper baccans* depositado no herbário-HUAM. (B) Exemplar de *Piper baccans*.
Fonte: SOUZA, H.V (2023)

4.2.1 Processamento do material vegetal

Os órgãos vegetais de *P. baccans* (folha, galho e inflorescência) foram secos em estufa de ar circulante em temperatura de 40 °C por 72h, separados manualmente e triturados em moinho tipo faca (Figura 7).



Figura 6. (A) Material em partes (folha, galho e inflorescência). (B) Folhas trituradas no moinho tipo faca
Fonte: SOUZA, H.V (2023)

4.3 Extração do óleo essencial

As folhas trituradas (100 g) de *P. baccans* foram submetidas à hidrodestilação em aparato Clevenger modificado (Figura 8) durante 4h, em triplicada. Em seguida, o óleo essencial foi coletado, centrifugado, seco com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), armazenado em frascos âmbar tipo vial (Figura 9) e mantidos sob refrigeração constante a $-4\text{ }^\circ\text{C}$ até o momento das análises químicas e biológicas. O rendimento foi calculado pela fórmula: $R = \text{massa do óleo obtido} / \text{biomassa seca total das folhas (g)} \times 100$ (DE OLIVEIRA, et al., 2020a).

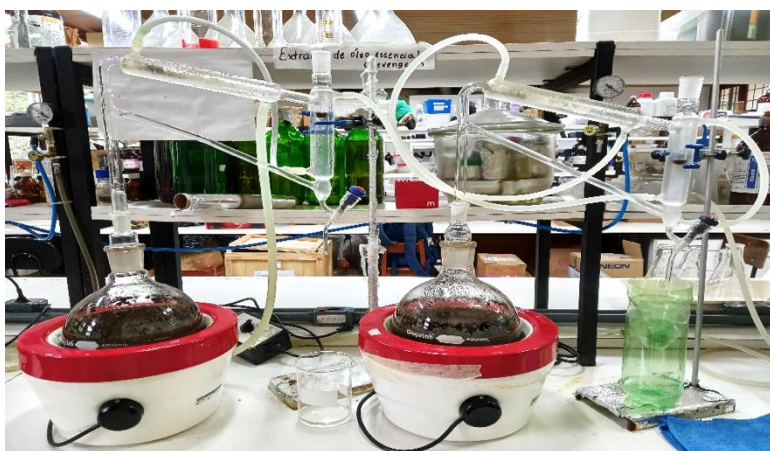


Figura 7. Extração do óleo essencial por meio de hidrodestilação em aparato de Clevenger
Fonte: SOUZA, H.V (2023)



Figura 8. Armazenamento do óleo essencial de *Piper baccans* (OEPb).
Fonte: SOUZA, H.V (2023)

4.3.1 Análises cromatográficas por CG-EM

O óleo essencial extraído das folhas de *P. baccans* foi analisado pelo método de cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM), seguindo o método descrito por DE OLIVEIRA, et al., (2020) nas seguintes condições: 1 mg do óleo essencial foi diluído em 1 mL acetato de etila (HPLC) e injetado o volume de 1 µL, coluna capilar TR-5 contendo 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, com a temperatura do forno de 40 a 240°C acrescido de 4°C/min. O hélio foi utilizado como gás de arraste em uma temperatura de injeção de 250°C, temperatura da fonte de íons de 220°C com a faixa de massa m/z na ordem de 40-400 e velocidade de varredura de 0.5 s. O software Xcalibur v.2.2 foi usado para processamento dos dados. A identificação de cada constituinte obtido foi realizada em comparação com o índice de retenção obtido com os índices das literaturas de Adams (2017) e NIST (2020).

4.4 Criação das larvas de *Aedes aegypti*

Os imaturos de *A. aegypti* foram criados no Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia em temperatura (27 ± 2 °C), umidade relativa ($75 \pm 5\%$) e fotoperíodo (12 horas de luz e 12 horas de escuro) controlados. Papéis de filtro contendo ovos do mosquito *A. aegypti* foram imersos em 2 L de água de torneira para eclosão. As larvas foram alimentadas com uma mistura de ração para gatos (Whiskas®) e roedores (Zootekna®) na proporção de 1:1 até atingirem o estágio L4. As pupas foram transferidas para recipientes com 50 mL de água de torneira e acondicionadas em gaiolas entomológicas (30 cm x 30 cm x 30 cm) para emergência dos adultos que foram alimentados com solução de sacarose à 10% (BESERRA, et al., 2009). O repasto sanguíneo das fêmeas foi realizado em hamster *Mesocricetus auratus* (Cricetinae) (DE OLIVEIRA, et al., 2020b).

4.5 Teste seletivo de toxicidade

Testes seletivos para identificação do potencial larvicida do óleo essencial foram realizados de acordo com o protocolo da WHO (2005), com modificações

feitas pelo Laboratório de Malária e Dengue (DE OLIVEIRA, et al., 2020a). Os testes foram realizados com larvas de 3° estágio de *A. aegypti* (n=250) distribuídos em grupos de 10 em cada recipientes (150 mL) contendo 50 mL de água destilada e concentrações de 500 a 31,25 µg/mL (Figura 11) obtidas de solução estoque preparado com 145,43 mg do óleo essencial diluído em 2,345 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) (Figuras 10 e 11). Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes. O percentual de morte das larvas em cada concentração foi calculado nos intervalos de 24, 48 e 72h usando a fórmula: Total de larvas mortas / Total de larvas expostas x 100.

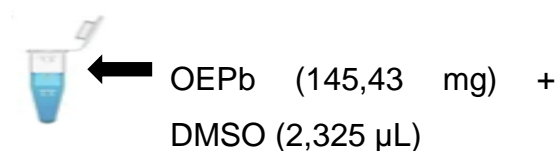


Figura 9. Solução estoque do óleo essencial de *Piper baccans* (OEPb) utilizada no bioensaio seletivo.

Fonte: SOUZA, H.V (2023)

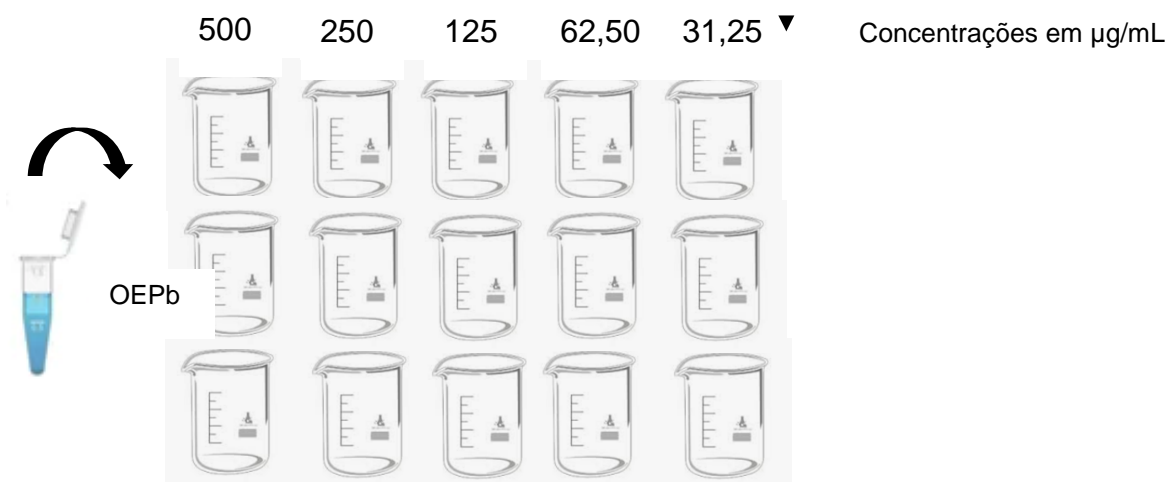


Figura 10. Bioensaio seletivo contra larvas de *Aedes aegypti*

Fonte: SOUZA, H.V (2023)

4.5.1 Teste da toxicidade aguda (dose-resposta)

Os experimentos de dose-resposta (toxicidade aguda) foram realizados de acordo com o protocolo da WHO (2005), com adaptações do Laboratório de Malária e Dengue (DE OLIVEIRA, et al., 2020b) visando identificar as concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀) do óleo essencial de *P. baccans* com atividade larvicida previamente identificada nos testes seletivos. As concentrações de dose-resposta foram desenvolvidas a partir da menor concentração que causou 100% de mortalidade das larvas de *A. aegypti* nos testes seletivos. Os experimentos foram realizados com grupos de 10 larvas de 3º estágio de *A. aegypti* (n=250) distribuídos em recipiente (150 mL) contendo 50 mL de água destilada e concentrações 1,95 a 31,25 µg/mL. O controle negativo DMSO (n=50) foi avaliado nas mesmas concentrações, enquanto que o espinosade (n=100) (controle positivo) foi avaliado de acordo com as orientações do fabricante (1 a 10 µg/mL). Os experimentos foram realizados em quintuplicata e repetidos três vezes em dias alternados. O percentual de morte das larvas em cada concentração foi calculado nos intervalos de 24, 48 e 72h usando a fórmula: Total de larvas mortas / Total de larvas expostas x 100.

4.6 Ensaio do micronúcleo e outras alterações celulares em *A. aegypti*

As larvas que sobreviveram ao bioensaio de toxicidade aguda do óleo essencial (15,62, 7,81 e 3,90 µg/mL) de *P. baccans* e do controle negativo foram utilizadas nas análises citológicas realizadas no Laboratório de Citogenética, Genômica e Evolução de Mosquito (LCGEM), coordenado pela Dra. Miriam Silva Rafael.

Foi preparado 20 lâminas citológicas do gânglio cerebral das larvas de *A. aegypti*, sendo cinco de cada concentração e do controle negativo, pelo ensaio do micronúcleo e outras alterações nucleares e cromossômicas, conforme RAFAEL, et al., (2008) e SILVA, et al., (2021). Os gânglios cerebrais foram dissecados e espalhados sobre as lâminas em microscópio estereoscópico Zeiss Stemi DV4 (zoom 1,5x), na presença do fixador I (1,5 mL ácido acético glacial - 100% + 1,5 mL de etanol P.A + 2 mL água). Após 5 min adicionou-se o fixador II (1 mL de etanol P.A + 1 mL ácido acético glacial - 100%), passados mais 5

minutos, adicionou-se o fixador III (1 mL de ácido acético glacial - 100%). As lâminas permaneceram em temperatura ambiente (T.A) por 4 horas, foram coradas pelo método de Giemsa (pH 6,8) e orçéina-lacto-acética a 2%, por 10 minutos. Estas foram lavadas em água destilada e secas em T.A. Após 24, foi adicionada sobre as lâminas uma gota de Entellan®, e sobre esta, uma lamínula, removendo com *Xilol Merck* o excesso de Entellan®.

4.6.1 Análises das preparações citológicas de *A. aegypti*

As lâminas permanentes foram analisadas em microscópio de luz *Axioplan Zeiss*, objetiva de imersão 100x, quanto a presença de micronúcleo, quebra cromossômica, broto nuclear, apoptose, necrose, ponte nuclear ou anafásica, dentre outras alterações nas fases da divisão celular. As microfotografias foram obtidas com a câmera *AxioCam MRc*, acoplada ao microscópio.

4.7 Caracterização do mecanismo de ação larvicida

A investigação do mecanismo de ação larvicida do óleo essencial de *P. baccans* foi mensurado pela inibição da enzima AChE realizado por método espectrofotométrico (ELLMAN, et al., 1961; GÉLINAS, et al., 2013). A neostigmina (1 mg) e AChE (10 µL) foram preparados em tampão fosfato (1 mL) em solução de 0,1 M a pH 8, enquanto o óleo essencial (1 mg) foi preparado em MeOH (1 mL). O controle positivo, neostigmina (0,07 a 10 µg/mL) e o óleo essencial (10 a 100 µg/mL) foram avaliados em diferentes concentrações, enquanto que o MeOH foi utilizado como controle negativo. As leituras das absorbâncias foram medidas a 405 nm a cada 5 minutos por 30 minutos em leitor de microplacas (ELx800, Biotek, EUA). A porcentagem de inibição em cada concentração foi calculada de acordo com a equação inibição (%) = $A_2 - (A_1 - A_3) \times 100 / A_2$; onde: A1 é a absorção das amostras e da enzima, A2 é a absorção da enzima sem a amostra e A3 é a absorção da amostra sem a enzima.

4.8 Quantificação da toxicidade do óleo essencial em predadores aquáticos não-alvos

A avaliação da toxicidade do óleo essencial de *P. baccans* nos predadores aquáticos não-alvos *D. indicus*, *A. bouvieri* (Hemiptera) foi realizada seguindo método descrito por SIVAGNANAME E KALYANASUNDARAM (2004), com modificações. Os animais *D. indicus* e *A. bouvieri* (Hemiptera) foram coletados no lago do Centro de Estudo de Quelônios da Amazônia – CEQUA/INPA, foram coletadas em armadilhas instaladas nas dependências do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Campus I. Os predadores foram aclimatados, separadamente, em condições de 27 ± 3 °C e 90% de umidade relativa durante 24h em recipientes (90 cm de diâmetro e 40 cm de profundidade) contendo 5 L de água natural, coletada no lago. Em seguida, os animais foram transferidos individualmente para recipientes contendo 100 mL de água do lago. Posteriormente, foram aplicadas as concentrações de 1,95 a 31,25 µg/mL do óleo essencial preparado em 1 mL de DMSO. O controle negativo (DMSO) também foi avaliado nessas concentrações. O N amostral do experimento foi 10 animais, sendo que apenas um predador foi mantido nos recipientes para evitar canibalismo. A mortalidade, movimentos lentos ou redução da capacidade de natação foram registrados após 24h de exposição. O percentual de toxicidade em cada concentração avaliada foi calculado usando a equação: Total de insetos aquáticos mortos / Total de insetos aquáticos utilizados x 100.

4.9 Análise estatística

As concentrações letais (CL_{50} e CL_{90}) foram calculadas utilizando o método de Probit (FINNEY, 1971) por meio do programa estatístico POLO-PLUS. Os dados de mortalidade foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($p < 0,05$) com auxílio do programa estatístico GraphPad Prism 7.0.4 para identificar diferenças entre os tratamentos. No teste enzimático, as absorbâncias foram transformadas para LogX, normalizadas e analisadas usando regressão não-linear para estimar o valor da concentração inibitória mediana (IC_{50}).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cinética de extração e composição química do óleo essencial

O processo de extração do óleo essencial das folhas de *P. baccans* demonstrou cinética linear de saturação após 90 min, resultando em $2,2 \pm 0,05$ mL (Figura 12), massa de 2,2 g e rendimento de 2,2 % (Tabela 2). As análises qualitativas e quantitativas realizadas demonstraram a presença de 33 picos (Figura 13), correspondendo a 100% do óleo essencial identificado, dos quais 0,44% de monoterpene, 52,33% sesquiterpenos e 44,65% de sesquiterpenos oxigenados. Porcentagem similar de sesquiterpenos (oxigenados e não oxigenados) foi identificado no óleo essencial de *P. dilatatum* (ANDRADE, et al., 2011).

Tabela 2. Rendimento do óleo essencial das folhas da espécie *P. baccans*

Órgão vegetal	Massa triturada (g)	Massa do óleo (g)	Rendimento %
Folha	100	2,2	2,2

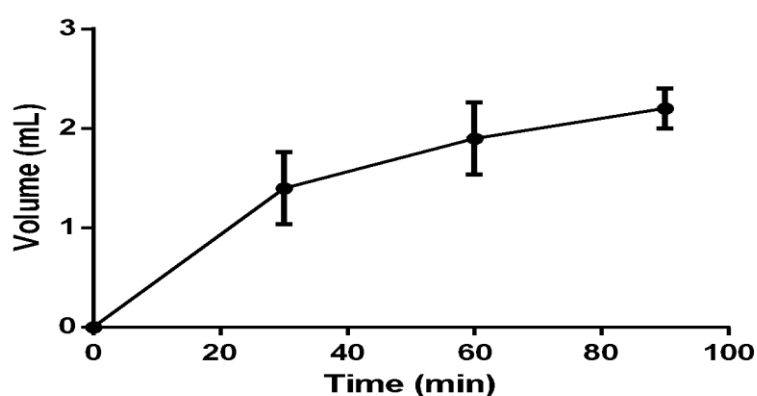


Figura 11. Curva cinética da obtenção do óleo essencial de *P. baccans*.

RT: 8.70 - 35.34

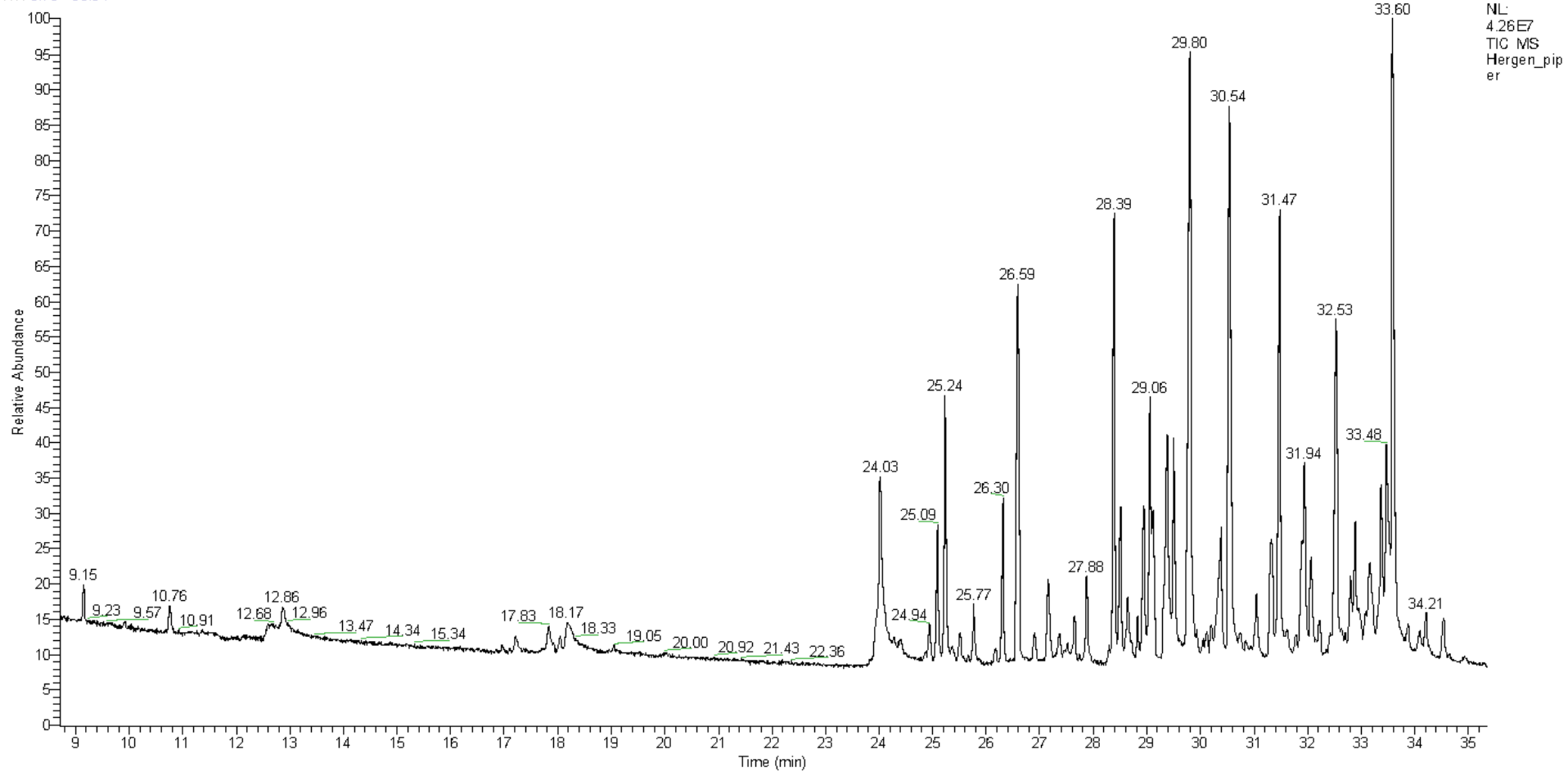


Figura 12. Cromatograma do óleo essencial de *P. baccans*

As substâncias majoritárias identificadas no óleo essencial de *P. baccans* foram: δ -cadineno (11,64%), elemol (10,12%) e (-)-10-epi- γ -eudesmol (9,39%), γ -muuroleno (7,49%), óxido de cariofileno (7,09%), isocaryopheleno (6,73%) e epi- γ -eudesmol (5,5%) (Figura 14), seguido dos minoritários α -copaeno (4,44%), muloran-3,9-(11)-dieno-10-peróxido (2,96%), muurola-4,9-dieno (2,79%), β -eudesmol (2,34%), α -gurjuneno (2,66%), α -ylangeno (2,29%), β -muuroleno (2,23%), α -muuroleno (2,16%). O percentual das demais substâncias ficou abaixo de 2% (Tabela 3).

Significativos percentuais de δ -cadineno também foram identificados nos óleos essenciais extraídos das folhas das espécies *P. gaudichaudianum* (45,3%) (BERNUCI et al., 2016), e *P. dilatatum* (8,5%) (ANDRADE et al., 2011), como também nas inflorescências de *P. umbelata* (15,02%) (MORANDIM et al., 2010).

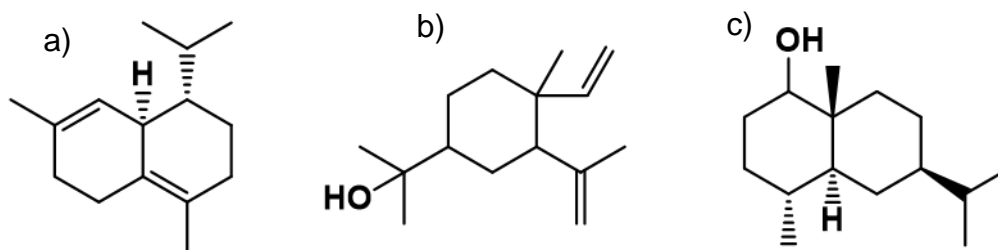


Figura 13 Estruturas químicas dos compostos presentes em folhas de *Piper baccans*.
a) δ -Cadineno b) Elemol c) (-)-10-epi- γ -eudesmol

Tabela 3. Compostos voláteis da espécie de *P. baccans*

Substâncias	TR	IAC	IAL	%Área
1 (+)-4-Careno	9,5	1022	1030	0,44
2 α -Ylangeno	25,09	1373	1375	2,29
3 α -Copaeno	25,24	1374	1376	4,44
4 Germacreno D-4-ol	25,51	1480	1481	0,43
5 δ -Elemeno	25,77	1335	1338	0,9
6 α -Gurjuneno	26,3	1409	1409	2,66
7 Iso-cariofileno	26,59	1417	1419	6,73
8 α -Copaeno	26,9	1374	1376	0,46
9 trans- α -Bergamoteno	27,15	1432	1434	1,49
10 α -Humuleno	27,66	1452	1454	0,73

11	Aromadendreno	27,88	1439	1441	1,27
12	γ -Muuroleno	28,39	1478	1479	7,49
13	α -Muuroleno	28,51	1500	1500	2,16
14	α -Himachaleno	28,65	1449	1451	0,71
15	α -Patchouneolo	28,83	1379	1381	0,59
16	β -Muuroleno	28,93	1478	1479	2,23
17	Dihidroagarofurano	29,06	1503	1503	1,67
18	α -Muuroleno	29,12	1500	1500	0,36
19	Muurolo-4,9-dieno	29,51	1478	1479	2,79
20	δ -Cadineno	29,8	1522	1523	11,64
21	Mulan-3,9-(11)-dieno-10-peróxido	30,38	1726	1729	2,96
22	Elemol	30,54	1548	1549	10,12
23	Palustrol	31,05	1567	1568	1,16
24	Espatuleno	31,33	1582	1583	1,76
25	Óxido de cariofileno	31,47	1582	1583	7,09
26	γ -Eudesmol	31,94	1630	1632	0,98
27	Viridiflorol	32,07	1592	1592	1,15
28	epi- γ -Eudesmol	32,53	1630	1632	5,5
29	Cubenol	32,8	1645	1646	0,72
30	Cubenol	33,17	1645	1646	1,38
31	7-epi- β -Eudesmol	33,38	1649	1650	1,39
32	β -Eudesmol	33,47	1649	1650	2,34
33	(-)-10-epi- γ -eudesmol	33,6	1630	1632	9,39

*TR-tempo de retenção, IAC-índice aritmético calculado, IRL-índice aritmético da literatura.

5.2 Teste seletivo do potencial larvicida do óleo essencial

O óleo essencial de *P. baccans* nas concentrações de 125 a 500 $\mu\text{g/mL}$ apresentou 100% de atividade larvicida em 24h, enquanto que em 72h houve 100% de mortalidade apenas nas concentrações de 61,50 e 31,25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 15). De acordo com o protocolo da WHO (2005), a concentração de 31,25 $\mu\text{g/mL}$ foi selecionada para a realização dos bioensaios de dose-resposta. Os percentuais de mortalidade obtidos no presente estudo foram superiores aos observados no óleo essencial de *P. aduncum* (OLIVEIRA, et al., 2013) e *P.*

capitarianum (FRANÇA, 2015), quando avaliados nas concentrações de 25 a 500 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram atividade larvídica de 12,6 a 100% contra *A. aegypti* entre 24 a 72h.

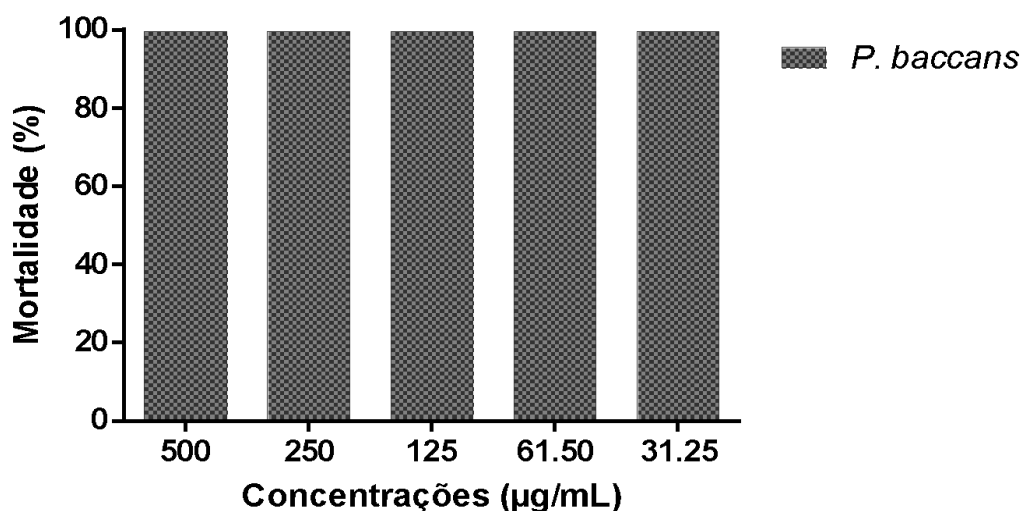


Figura 14. Resultado do teste seletivo do óleo essencial de *Piper baccans* contra larvas de *A. aegypti*.

5.3 Bioensaio dose-resposta do óleo essencial

O óleo essencial de *P. baccans* avaliado nas concentrações de 1,95 a 31,25 $\mu\text{g/mL}$ apresentou atividade larvídica contra *A. aegypti* (Figura 16), com valores de CL_{50} de 10,68 $\mu\text{g/mL}$ e CL_{90} de 22,11 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 4). No controle positivo Espinosade (0,032 $\mu\text{g/mL}$) verificou-se 100% mortalidade, enquanto que no controle negativo DMSO (31,25 $\mu\text{g/mL}$) não foi observado mortalidade.

Comparado a outros estudos, a atividade larvídica do óleo essencial de *P. baccans* foi superior aos óleos essenciais de *P. alatipetiolatum* (CL_{50} de 33,74 $\mu\text{g/mL}$ e CL_{90} de 100,69 $\mu\text{g/mL}$) (DE OLIVEIRA, et al., 2020b), *P. purusanum* (CL_{50} de 45,98 a 48,60 $\mu\text{g/mL}$ e CL_{90} de 94,52 a 103,99 $\mu\text{g/mL}$) e *S. guianensis* (CL_{50} de 24,87 $\mu\text{g/mL}$ e CL_{90} de 34,32 $\mu\text{g/mL}$) (TAVARES, 2021) avaliados contra os vetores primários e secundários da dengue e da malária.

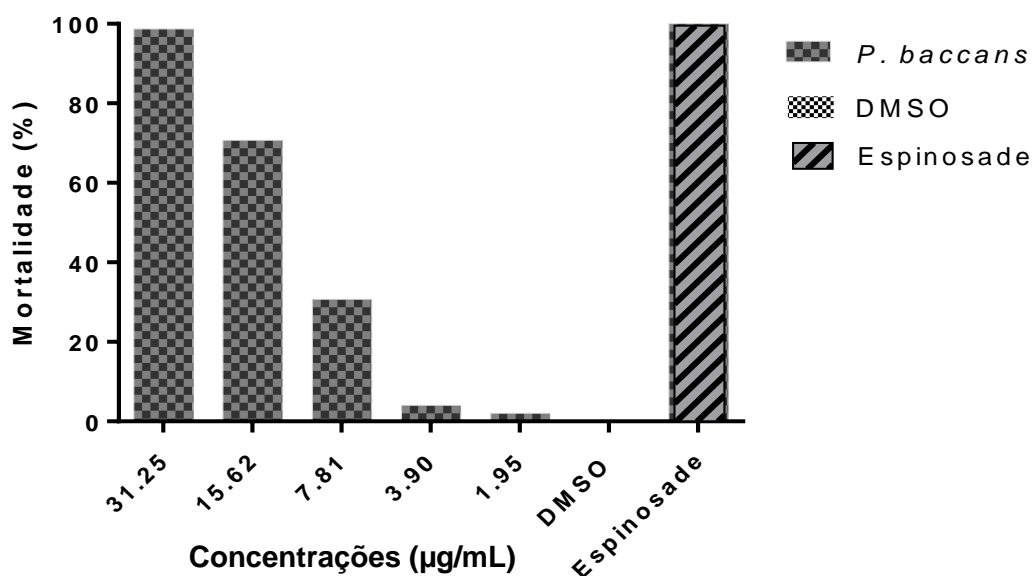


Figura 15. Resultado teste dose-resposta do óleo essencial de *Piper baccans* contra larvas de *A. aegypti*.

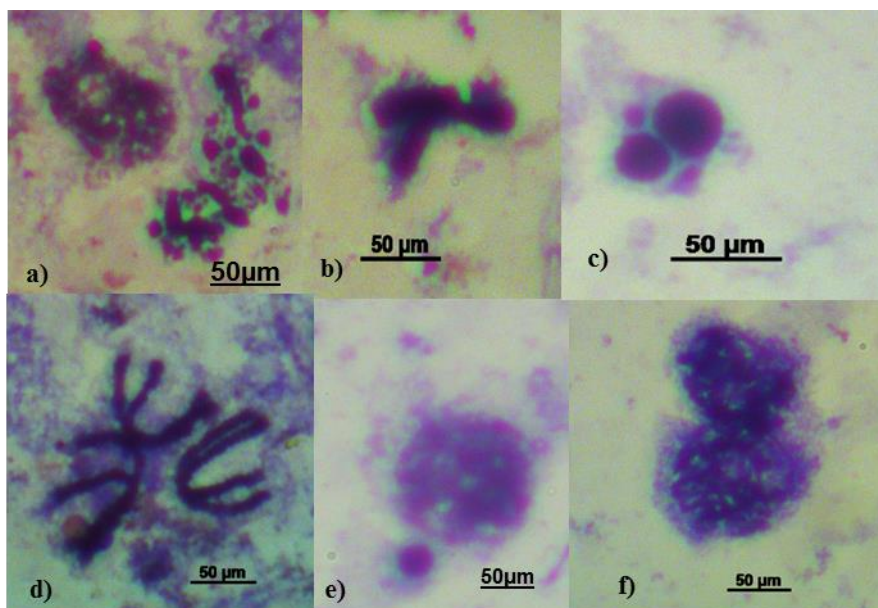
Tabela 4. Concentrações letais, CL₅₀ e CL₉₀, dos voláteis do óleo essencial de *P. baccans*.

	CL ₅₀ (µg/mL) (LCI–LCS)	CL ₉₀ (µg/mL) (LCI–LCS)	χ ² (g.l)
<i>Aedes aegypti</i>	10,689 (8,643 - 13,232)	22,119 (17,095 - 34,808)	2,9 (4)

CL₅₀ e CL₉₀ – Concentrações letais para matar 50 e 90% das larvas, respectivamente. LCI – Limite de confiança inferior. LCS – Limite de confiança superior. X² – Chi quadrado ($p < 0,05$). g.l – Grau de liberdade.

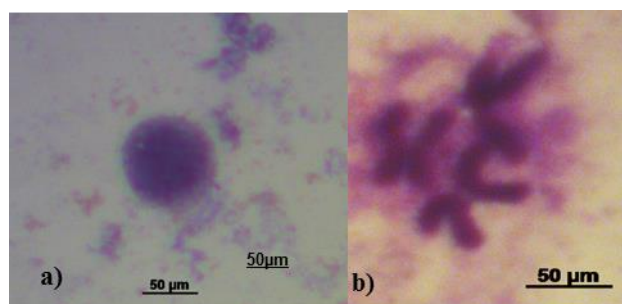
5.4 Análises das preparações citológicas de *A. aegypti*

O óleo essencial de *P. baccans* promoveu efeitos genotóxicos nas larvas de *A. aegypti*, causando anormalidades em núcleos e mitoses de células de neuroblastos, além da presença de micronúcleo em intérfase e metáfase, perda cromossômica, células binucleadas, como também apoptose e necrose, cromossomo metafásico com perda, grupos cromossomos metafásico e células binucleadas (Figura 16). Efeitos não observados no controle negativo (Figura 17).



Neuroblastos a – f de larvas de *A. aegypti* tratadas com OEPb. a) Célula em apoptose e em necrose; b) Cromossomo com perda de braço, c) Célula binucleada com micronúcleo, d) Metáfase com micronúcleo, e) Intérfase com micronúcleo f) Célula binucleada.

Figura 16. Análise dos gânglios cerebrais de larvas de 3º estágio de *A. aegypti* expostas ao OE de *P. baccans*



Neuroblastos a – b de larvas de *A. aegypti* controle/DMSO. a) Intérfase normal, b) Metáfase normal.

Figura 17. Análise dos gânglios cerebrais de larvas de 3º estágio de *A. aegypti* expostas ao controle negativo (DMSO)

Esses achados são similares ao de Rafael, et al., (2008) que verificaram que o óleo essencial de *Piper aduncum*, rico em dilapiol, provocou efeito genotóxico em larvas de *A. aegypti*. As larvas desta espécie também apresentaram danos genotóxicos após serem tratadas com derivados do dilapiol: éter etil e éter n-butil (Domingos et al. 2014), isodilapiol (SANTOS, et al., 2020) e éter metil (SILVA. et al., 2021). Análises citogenéticas de substâncias no

organismo de *A. aegypti* têm sido úteis para detectar a genotoxicidade de suas concentrações subletais (RAFAEL, et al., 2008; DOMINGOS, et al., 2014; MEIRELES, et al., 2016; SANTOS, et al., 2020; SILVA, et al., 2021).

Devido ao desenvolvimento de resistência às classes de inseticidas utilizadas no controle químico do *A. aegypti* (MACORIS, et al., 2014; CHEDIAK, et al., 2016), faz-se necessário o desenvolvimento de novos compostos de origem vegetal, presentes em óleos essenciais de plantas com atividade larvicida (SANTOS, et al., 2010; GOVINDARAJAN, 2011; MARIMUTHU, et al., 2012; PEREIRA, et al., 2014).

5.5 Teste de segurança dos predadores aquáticos não-alvos

O OE de *P. baccans* avaliado nas concentrações de 1,95 a 31,25 µg/mL não apresentou toxicidade contra *D. indicus* e *A. bouvieri*. Por outro lado, nas concentrações de 62,50 a 500 µg/mL foi detectada elevada toxicidade, com 100% de mortalidade desses animais (Figura 17). Os resultados demonstraram que o óleo essencial em concentrações abaixo de 31,25 µg/mL não apresenta risco tóxico para *D. indicus* e *A. bouvier*, mas é extremamente tóxico contra larvas de *A. aegypti*.

Estudos realizados por SIVAGNANAME e KALYANASUNDARAM (2004), com extratos metanólicos das folhas de *Atlantia monophylla* (Rutaceae) apresentou CL₅₀ de 0,14 mg/mL contra *A. bouvieri*, concentração muito abaixo da encontrada no presente estudo, indicando que o uso do extrato metanólico das folhas de *Atlantia monophylla* não deve ser utilizado em habitats aquáticos.

Oliveira e colaboradores (2022), avaliaram o OE de *P. purusanum* nos predadores não-alvos, *D. indicus* (CL₅₀ de 2506,56 µg/mL) e *A. bouvieri* (CL₅₀ de 7707,13 µg/mL) e observaram concentrações letais muito superiores às do OE de *Piper baccans* evidenciando a segurança do uso do OE de *P. purusanum* nos ambientes aquáticos.

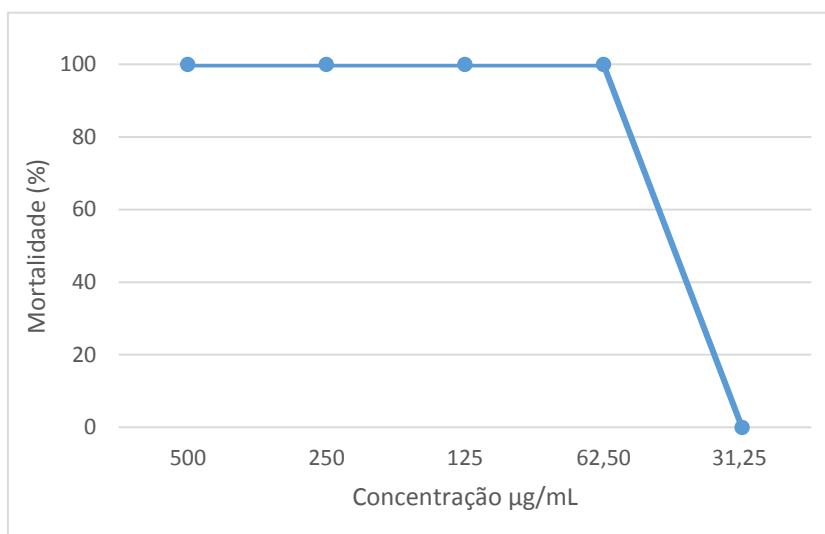


Figura 18. Percentual de toxicidade do OE de *Piper baccans* em predadores aquáticos não-alvos, *Diplonychus indicus* e *Anisops bouvieri* (hemiptera).

5.6 Caracterização do mecanismo de ação pela inibição da AChE

A inibição da AChE é um importante mecanismo de identificação neurotóxica relacionada com a atividade larvicida promovida por inseticidas sintéticos e produtos naturais como óleos essenciais (DE OLIVEIRA, et al., 2020). Assim, o óleo essencial de *P. baccans* promoveu ação larvicida pela atividade neurotóxica promovida pela inibição da enzima AChE (IC_{50} de 38,37 $\mu\text{g/mL}$), comparada ao controle positivo neostigmina (IC_{50} de 6,79 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 18). Em adição, essa atividade pode ser relacionada com às substâncias δ -cadineno, elemol e (-)-10-epi- γ -eudesmol (IC_{50} de 0,67 mM a 10 mM) (MIYAZAMA, et al., 1998; PERRY, et al., 2000).

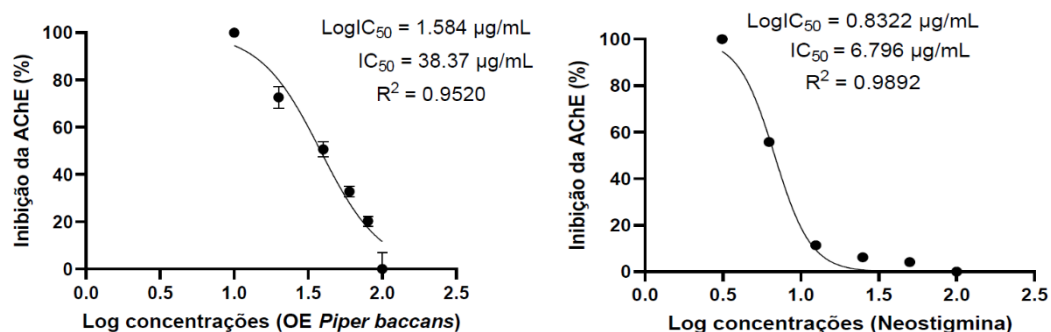


Figura 19. Inibição *in vitro* da enzima acetilcolinesterase do OE de *Piper baccans*

6. CONCLUSÃO

- O OE extraído das folhas secas de *Piper baccans* possui como constituintes majoritários δ -Cadineno, Elemol e (-)-10-epi- γ -Eudesmol, compostos terpênicos, aos quais são atribuídas importantes atividades biológicas.
- OE de *Piper baccans* apresentou toxicidade contra larvas de *A. aegypti*.
- O OE de *P. baccans* apresentou efeito genotóxico em larvas de *A. aegypti* incluindo várias anormalidades, presenças de células em apoptose e em necrose, cromossomo metafásico com perda, grupos cromossomos metafásico e células binucleadas.
- Observou-se que na concentração de 31,25 $\mu\text{g/mL}$, que causou a mortalidade de 100% das larvas de *A. aegypti*, não foi observada toxicidade aos predadores *Diplonychus indicus* e *Anisops bouvieri* (hemíptera).
- O OE de *Piper baccans* causou a inibição da enzima acetilcolinesterase, evidenciando o mecanismo de ação que causou a mortalidade das larvas de *A. aegypti*.
- Os resultados demonstraram que o OE de *P. baccans* apresenta potencial para ser utilizado com ferramenta de controle de *A. aegypti* e novos estudos devem ser realizados para avaliar sua segurança e eficácia contra outros vetores endêmicos da região amazônica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.P. 2017. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th edn. Allured Publishing Corporation, Carol Stream 809 p.

AL-MEHMADI, R.M.; AL-KHALAF, A.A. 2010. Larvicidal and histological effects of *Melia azedarach* extracts on *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). *Journal of King Saud University*. 22: 77-85.

ANDRADE, E.H.A., ALVES, C.N., GUIMARÃES, E.F., CARREIRA, L.M.M., MAIA, J.G.S., 2011. Variability in essential oil composition of *Piper dilatatum* L.C. Rich. *Biochemical Systematics and Ecology* 39, 669–675.

AUTRAN, E.S., NEVES, I.A., SILVA, C.S.B., SANTOS, G.K.N., CAMARA, .A.G., NAVARRO, D.M.A.F., 2009. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). *Bioresour. Technol.* 100, 2284e2288.

ARAÚJO A, ARAUJO DINIZ D, HELVECIO E, DE BARROS R, DE OLIVEIRA CM, AYRES CF, 2016. A suscetibilidade de populações de *Aedes aegypti* exibindo resistência de temefós a *Bacillus thuringiensis israelensis* : uma base para o manejo. *Parasitas e Vetores* 6(1):297.

BERNUCI, K. Z., IWANAGA, C. C., FERNANDEZ-ANDRADE, C. M. M., LORENZETTI, F. B., TORRES-SANTOS, E. C., FAIÕES, V. D. S., ... & CORTEZ, D. A. G. 2016. Evaluation of chemical composition and antileishmanial and antituberculosis activities of essential oils of Piper species. *Molecules*, 21(12), 1698.

BESERRA, E. B., FREITAS, E. M., SOUZA, J. T., FERNANDES, C. R. M., SANTOS, K. D., 2009. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. *Iheringia, Sér. Zoo.*, 99 (3): 281-285.

BIANCO, E.M., PIRES, L., SANTOS, G.K.N., DUTRA, K.A., REIS, T.N.V., VASCONCELOS, E.R.T.P.P., COCENTINO, A.L.M., NAVARRO, D.M.A.F., 2013. Larvicidal activity of seaweeds from northeastern Brazil and of a halogenated sesquiterpene against the dengue mosquito (*Aedes aegypti*). *Industrial Crops and Products* 43, 270–275.

BURT, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International journal of food microbiology*, v. 94, n. 3, p. 223-253,

BRAGA, I. A., & VALLE, D. 2007. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência.

BRASIL - Ministério da Saúde do Brasil. 2019. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde: volume único. Brasília, DF: Ministério da Saúde. Acesso em: 29/03/2023

BRASIL- MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2009. Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue. 2009. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_prevencao_controle_dengue.pdf> Acessado em: 14/07/2021

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2021. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Bol Epidemiol*, v. 52, n. 21, 2021. Disponível <gov.br/saude/ptbr/media/pdf/2021/junho/07/boletim_epidemiologico_svs_21.pdf> Acessado em: 11/07/2021.

BRASIL- MINISTÉRIO DA SAÚDE.2023. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes aegypti* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 14, 2023. *Boletim Epidemiológico* 01, volume 54 Acessado;24/01/2023.

BRASIL- MINISTÉRIO DA SAÚDE.2023. Anvisa aprova nova vacina contra a

dengue. Disponível <gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2023/anvisa-aprova-nova-vacina-para-a-dengue> Acessado: 20/04/2023.

BRASIL- MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2023. Combate ao *aedes aegypti*: prevenção e controle da dengue, chikungunya e zika. Disponível: <gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/aedes-aegypti> Acessado: 24/04/2023.

CARVALHO, F. D.; MOREIRA, L. A. 2017. Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so Successful as a Species? Neotropical entomology, v. 46, n. 3, p. 243-255.

CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS. 42º. 2016. Serra Negra/SP. Eficiência do inseticida Tracer® (espinosade) no controle da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae), na cultura do cafeeiro. Embrapa. Anais 422: 2018.2p

CONSOLI, R. A.; OLIVEIRA, R. L. D., 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. SciELO-Editora FIOCRUZ.

CHEDIAK, M.; PIMENTA-JR., F.G.; COELHO, G.E.; BRAGA, I.A.; LIMA, J.B.P.; CAVALCANTE, K.R.L.J.; SOUSA, L.C.; MELO-SANTOS, M.A.V.; MACORIS, M.L.G.; ARAÚJO, A.P.; AYRES, C.F.J.; ANDRIGHETTI, M.T.M.; GOMES, R.G.A. CAMPOS, K.B.; GUEDES, R.N.C. 2016. Spatial and temporal country-wide survey of temephos resistance in Brazilian populations of *Aedes aegypti*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 111 (5): 311-321.

DE MORAIS, S.M., FACUNDO, V.A., BERTINI, L.M., CAVALCANTI, E.S.B., DOS ANJOS JÚNIOR, J.F., FERREIRA, S.A., DE BRITO, E.S., DE SOUZA NETO, M.A., 2007. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. Biochem. Syst. Ecol. 35, 670e675.

DE OLIVEIRA, A.C., 2020a. Nanoemulsão carregadas com óleos essenciais de *Piper alatipetiolatum* e *Piper purusanum* (Piperaceae): eficientes biodefensivos no controle dos vetores da malária e dengue. Tese. Programa de Pós-Graduação

em Inovação Farmacêutica. Universidade Federal do Amazonas. 141p.

DE OLIVEIRA, A.C., SÁ, I.S.C., MESQUITA, R.S., PEREIRA, B.L., POCRIFKA, L.A., DE SOUZA, T.P., RODRIGUEZ AMADO, J.R., AZEVEDO, S.G., SANCHES, E.A., NUNOMURA, S.M., ROQUE, R.A., TADEI, W.P., NUNOMURA, R.C.S., 2020b. Nanoemulsion Loaded with Volatile Oil from *Piper alatipetiolatum* as an alternative agent in the control of *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*.

DE OLIVEIRA, A.C., SIMÕES, R.C., TAVARES, C.P.S., LIMA, C.A.P., Sá, I.S.C., SILVA, F.M.A., FIGUEIRA, A.A.G., NUNOMURA, S.M., S.M., Roque, R.A., 2022. Toxicity of the essential oil from *Tetradenia riparia* (Hochstetter.) Codd (Lamiaceae) and its principal constituent against malaria and dengue vectors and non-target animals. *Pesticide Biochemistry and Physiology* Volume 188, November 2022, 105265

DEY, P., GOYARY, D., CHATTOPADHYAY, P., KISHOR, S., KARMAKAR, S., VERNA, A., 2020. PEvaluation of larvicidal activity of Piper longum leaf against the dengue vector, *Aedes aegypti*, malarial vector, *Anopheles stephensi* and filariasis vector, *Culex quinquefasciatus*. *South African Journal of Botany* 132: 482-490.

DOGNINI, J., MENEGHETTI, E.K., TESKE, M.N., BEGNINI, I.M., REBELO, R.A., DALMARCO, E.M., VERDI, M., DE GASPER, A.L., 2012. Antibacterial activity of high safrole contain essential oils from *Piper xylosteoides* (Kunth) Steudel. *J. Essent. Oil Res.* 24, 241e244.

DORNELAS, ASP., LT PESTANA, J., DE SOUZA SARAIVA, A., BARBOSA, RS, CAVALLINI, GS, GRAVATO, C., ... & SARMENTO, RA., 2018. Os efeitos combinados de inseticidas microbianos e cloreto de sódio sobre desenvolvimento e emergência de *Chironomus xanthus*. *Ciência do Manejo de Pragas* .

ELLMAN G.L., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity Biochem. Pharmacol. 7:88-95.1961.

FARES, R. C., SOUZA, K. P., AÑEZ, G., RIOS, M., 2015. Epidemiological scenario of dengue in Brazil. BioMed research international, v.

FINNEY, D. J. 1971. Probit analysis. Cambridge (UK): Cambridge University Press;.FORATTINE, O.P. 2002. Culicidologia Médica. Universidade de São Paulo, São Paulo Brasil. 880pp.

FRANÇA, L. P., 2015. Avaliação da atividade larvívica de extratos e óleo essencial de *Piper capitarianum* Yunck, 1966 (Piperaceae) sobre *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 e *Anopheles* sp (Culicidae) em laboratório.

FRANÇA, L.P., 2021. Estudo químico e biológico de *Piper capitarianum* (piperaceae) para o controle de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (culicidae).

FORATTINI OP., 2002. Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia. São Paulo(SP):Edusp.

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde. 2022. Programa Nacional de controle da dengue (PNCD).

GARCIA, A.R.M., 2016. Distribuição e abundância de arbustos do gênero *Piper* (Piperaceae), na Reserva Florestal Adolpho Ducke – Manaus, Amazonas – Brasil. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ecologia. 50p.

GÉLINAS M, LAJEUNESSE A, GAGNON C, GAGNÉ F., 2013. Temporal and seasonal variation in acetylcholinesterase activity and glutathione-S-transferase in amphipods collected in mats of *Lyngbya wollei* in the St-Lawrence River (Canada). Ecotoxicol Environ Saf. 2013 Aug;94:54-9.

GHOSAL, S., DEB, A., MISHRA, P., VISHWAKARMA, R., 2012. Leishmanicidal

compounds from the fruits of *Piper longum*. *Planta Med.* 78, 906e908.

GNANKINÉ, O., & BASSOLÉ, I. H. N. 2017. Essential oils as an alternative to pyrethroids' resistance against *Anopheles* species complex giles (Diptera: Culicidae). *Molecules*, v. 22, n. 10, p. 1321.

DOMINGOS, P.R.C.; PINTO, A.C.; SANTOS, J.M.M; RAFAEL, M.S. 2014. Insecticidal and genotoxic potential of two semi-synthetic derivatives of dillapiole for the control of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Diptera: Culicidae). *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 772: 42-52.

GOVINDARAJAN, M., SIVAKUMAR, R., RAJESWARY, M., & YOGALAKSHMI, K., 2013. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Ocimum basilicum* (L.) against *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus* and *Anopheles subpictus* (Diptera: Culicidae). *Experimental parasitology*, v. 134, n. 1, p. 7-11.

GOVINDARAJAN, M. 2011. Evaluation of *Andrographis paniculata* Burm.f. (Family: Acanthaceae) extracts against *Culex quinquefasciatus* (Say.) and *Aedes aegypti* (Linn.) (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4 (3): 76-181.

GUIRADO, M. M.; BICUDO, H. E. M. D. C. HERMIONE ELLY MELARA DE CAMPOS. 2009. Alguns aspectos do controle populacional e da resistência a inseticidas em *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online)*, v. 6, n. 64, p. 5-14, 2009.

GUBLER & KUNO.1997. Dengue and dengue hemorrhagic fever. New York. CAB international ed, p.1-22.

GUTIERREZ, R.M.P., GONZALEZ, A.M.N., HOYO-VADILLO, C., 2013. Alkaloids from *Piper*: a review of its phytochemistry and pharmacology. *Mini Rev. Med. Chem.* 13,163e193.

IWAMURA, T., GUZMAN-HOLST, A. MURRAY, K.A. 2020. Accelerating invasion potential of disease vector *Aedes aegypti* under climate change. *Nat Commun* 11, 2130.

KOUL, O., WALIA, S., & DHALIWAL, GS 2008. Óleos essenciais como pesticidas verdes: potencial e limitações. *Biopesticides international* , 4 (1), 63-84.

LIMA, R.K., CARDOSO, M.G., MORAES, J.C., MELO, B.A., RODRIGUES, V.G., GUIMARÃES, P.L., 2009. Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Amaz.* 39, 377e382.

LUCENA, LA; LARISSA, O.B; ANA, CA; FELIPE, SA; ALESSANDRO, CPS; DIANA, BAPV; DHELIO, BP; JUAN, MVS. 2011 Dengue na Amazônia: aspectos epidemiológicos no Estado de Rondônia, Brasil, de 1999 a 2010. *Rev Pan-Amaz Saúde*, 2:19-25.

MACHADO, M.P.; BERGO, C.L.; DESCHAMPS, C.; BIZZO, H.R.; BIASI, L.A. 2013. Effect of the natural and artificial drying of the leaf biomass of *Piper hispidinervum* on the chemical composition of the essential oil. *Semina: Agrarian Sciences*. 34: 265-270

MACORIS, M.L.G.; ANDRIGHETTI, M.T.M.; WANDERLEY, D.M.V.; RIBOLLA, PE.M. 2014. Impact of insecticide resistance on the field control of *Aedes aegypti* in the State of São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47 (5): 573-578.

MAIA, J. D., LA CORTE, R., MARTINEZ, J., UBBINK, J., & PRATA, A. S., 2019. Industrial Crops & Products Improved activity of thyme essential oil (*Thymus vulgaris*) against *Aedes aegypti* larvae using a biodegradable controlled release system. *Industrial Crops & Products*, v. 136, n. October 2018, p. 110–120, 2019.

MARIMUTHU, G.; RAJAMOHAN, S.; MOHAN, R.; KRISHNAMOORTHY, Y. 2012. Larvicidal and ovicidal properties of leaf and seed extracts of *Delonix elata* (L.) Gamble (family: Fabaceae) against malaria (*Anopheles stephensi* Liston) and dengue (*Aedes aegypti* Linn.) (Diptera: Culicidae) vector mosquitoes. *Parasitology Research*, 111: 65-77.

MEIRELES, S.F.; DOMINGOS, P.R.; PINTO, A.C.; RAFAEL, M.S. 2016. Toxic effect and genotoxicity of the semisynthetic derivatives dillapiole ethyl ether and dillapiole n-butyl ether for control of *Aedes albopictus* (Diptera:Culicidae). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 807: 1-7.

MESQUITA, J.M.O.; CAVALEIRO, C. CUNHA, A.P.; LOMBARDI, J.A.; OLIVEIRA, A.B., 2005. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.15, n.1, p.6-12.

MIYAZAMA, M.; WATANABE, H.; UMEMOTO, K.; KAMEOKA, H.,1998. Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oils of *Mentha* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (9): 3431-3434.

MONTANARI, R.M. 2010. Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de *Anacardiaceae*, *Siparunaceae* e *Verbaceae*. Tese de Doutorado em Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MORANDIM-GIANNETTI, ANDREIA DE ARAUJO. PIN, ALINE RINGIS. PIETRO, NATALIA AMA SANTO. OLIVEIRA, HAROLDO CESAR DE. MENDES-GIANNINI, MARIA JOSÉ SOARES. ALÉCIO, KATO, MASSUO JORGE ALBERTO CAMILO. OLIVEIRA, JOSÉ EDUARDO DE. FURLAN, MAYSÁ., 2010. Composition and antifungal activity against *Candida albicans*, *C. parapsilopsis*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans* of essential oils from leaves of *Piper* and *Peperomia* species. *Journal of Medicinal Plant Research*, v. 4, n. 17, p. 1810-1814.

NERIO L.S., Olivero-Verbel J., and Stashenko E., 2010, Repellent activity of essential oils: A review, *Bioresource Technol.*, 101: 372–378

NIST - National Institute of Standards and Technology Standard reference database 69. 2020. Chemistry WebBook.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). 2001. Dengue hemorrágica – Diagnóstico, Tratamento, Prevenção e Controle. 2ª ed. São Paulo. Livraria Santos Editora Com. Imp. Ltda. N° 548

ORJALA, J., WRIGHT, A.D., BEHRENDTS, H., FOLKERS, G., STICHER, O., RÜEGGER, H., RALI, T., 1994. Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*. *J. Nat. Prod.* 57, 18 e 26.

OLIVEIRA, G. L., CARDOSO, S. K., LARA JUNIOR, C. R., VIEIRA, T. M., GUIMARÃES, E. F., FIGUEIREDO, L. S., & KAPLAN, M. A. C., 2013. Chemical study and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Piper aduncum* L.(Piperaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 85, 1227-1234.

PARMAR, V. S., JAIN, S. C., BISHT, K. S., JAIN, R., TANEJA, P., JHA, A., ... & BOLL, P. M., 1997. Phytochemistry of the genus Piper. *Phytochemistry*, 46(4), 597-673.

PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: a review. *Industrial crops and products*, v. 76, p. 174-187, 2015.

PEREIRA, A.I.S.; PEREIRA, A.G.S.; LOPES-SOBRINHO, O.P.; CANTANHEDE, E.K.P.; SIQUEIRA, L.F.S. 2014. Atividade antimicrobiana no combate às larvas do mosquito *Aedes aegypti*: homogeneização dos óleos essenciais do linalol e eugenol. *Educ Química*, 25(4): 446-449.

PEREIRA, M.R., ZARTMAN, C.E., 2019. Chemical compositions of essential oil

of Piper species from atlantic forest of amazonia, Brazil. Records of Natural Products. 4, 324–332.

PERRY, N.S.L.; HOUGHTONP, J.; THEOBALD, A.; JENNER, P.; PERRY, E.K., 2000. In-vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituents terpenes. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 52 (7): 895-902.

PINTO, A. C. S., NOGUEIRA, K. L., CHAVES, F. C. M., DA SILVA, L. V. S., TADEI, W. P., & POHLIT, A. M., 2012. Adulticidal activity of dillapiol and semi-synthetic derivatives of dillapiol against adults of *Aedes aegypti* (L.)(Culicidae).

PRAKASH, B., SINGH, P., MISHRA, P.K., DUBEY, N.K., 2012. Safety assessment of *Zan thoxylumatum* Roxb. essential oil, its antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activity and efficacy as antimicrobial in preservation of *Piper nigrum* L. fruits. Int. J. Food Microbiol. 153, 183e191.

PRATES, HT, SANTOS, JP, WAQUIL, JM, FABRIS, JD, OLIVEIRA, AB, & FOSTER, JE., 1998. Atividade inseticida de monoterpenos contra *Rhyzopertha dominica* (F.) e *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of stored products Research* , 34 (4), 243-249.

PUBMED, 2023. Disponível: <pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>. Acessado: 01.01.2023.

QUIN, W.; HUANG, S.; LI, C.; CHEN, S.; PENG, Z., 2010. Biological activity of the essential oil from leaves of *Piper sarmentosum* Roxb. (Piperaceae) and its chemical constituents on *Brontispa longissima* (Gestro) (Coleoptera: Hispididae). Pesticide Biochemistry and Physiology. 96: 132-139.

QUIGNARD, E. L. J. NUNOMURA, S. M., POHLIT, A. M., ALECRIM, A. M., DA SILVA PINTO, A. C., PORTELA, C. N., ... & SILVA, S. G., 2004. Median lethal concentrations of Amazonian plant extracts in the brine shrimp assay. *Pharmaceutical Biology*, 42(3), 253-257.

RAFAEL, M.S.; HEREIRA-ROJAS, W.J.; ROPER, J.J.; NUNOMURA, S.M.; TADEI, W.P. 2008. Potential control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) with *Piper duncum* L. (Piperaceae) extracts demonstrated by chromosomal biomarkers and toxic effects on interphase nuclei. *Genetics and Molecular Research*, 7 (3): 772-781.

REGNAULT-ROGER, C. 1997. The potential of botanical essential oils for insect pest control. *Integrated Pest Management Reviews*, v. 2, n. 1, p. 25-34.

ROSA, C. S., VERAS, K. S., SILVA, P. R., LOPES NETO, J. J., CARDOSO, H. L. M., ALVES, L. P. L., MORAES, D. F. C., 2016. Chemical composition and toxicity against *Aedes aegypti* L. and *Artemia salina* Leach of the essential oil from *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. leaves. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 18, n. 1, p. 19-26.

SAMAIN, M.-S., VRIJDAGHS, A., HESSE, M., GOETGHEBEUR, P., JIMENEZ RODRIGUEZ, F., STOLL, A., NEINHUIS, C., WANKE, S., 2010. Verhuellia is a segregate lineage in Piperaceae: more evidence from flower, fruit and pollen morphology, anatomy and development. *Ann. Bot.* 105, 677e688.

SALEHI, B., ZAKARIA, Z. A., GYAWALI, R., IBRAHIM, S. A., RAJKOVIC, J., SHINWARI, Z. K., ... & SETZER, W. N. 2019. *Piper* species: A comprehensive review on their phytochemistry, biological activities and applications. *Molecules*, 24(7), 1364.

SANTOS, S.R.; SILVA, V.B.; MELO, M.A.; BARBOSA, J.D.; SANTOS, R.L.; SOUSA, D.P. 2010. Toxic effects on and structure-toxicity relationships of phenylpropanoids, terpenes, and related compounds in *Aedes aegypti* larvae. *Vector Borne Zoonotic*, 10 (10): 1049-1054.

SANTOS, L. H. F. D., DOMINGOS, P. R. C., MEIRELES, S. D. F., BRIDI, L. C., PINTO, A. C. D. S., & RAFAEL, M. S., 2020. Genotoxic effects of semi-synthetic

isodillapiole on oviposition in *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)(Diptera: Culicidae).
Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 53.

SCIENCEDIRECT. Disponível <sciencedirect.com>. Acessado: 01.01.2023

SICFINDER. Disponível: <sso.cas.org>. Acessado: 01.01.2023.

SILVA, K. C., 2012. Caracterização da Acetilcolinesterase cerebral de tucunaré, *Cichlaocellaris* (BLOCH & SCHNEIDER, 1801): efeito de íons e pesticidas organofosforados e carbamatos sobre sua atividade. p.12-80.

SIMAS, N. K., LIMA, E. D. C., CONCEIÇÃO, S. D. R., KUSTER, R. M., OLIVEIRA FILHO, A. M. D., & LAGE, C. L. S., 2004. Natural products for dengue transmission control: larvicidal activity of *Myroxylon balsamum* (red oil) and of terpenoids and phenylpropanoids. *Quimica Nova*, v. 27, n. 1, p. 46-49.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO SOBRE A BIODIVERSIDADE BRASILEIRA (SiBBR). disponível <ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/294664> acessado em: 09/11/2020

SIVAGNANAME, N., KALYANASUNDARAM, M., 2004. Laboratory evaluation of methanolic extract of *Atlantia monophylla* Family: Rutaceae against immature stages of mosquitoes and non-target organisms 99, 115–118.

SOONWERA, M., PHASOMKUSOLSIL, S., 2017. Adulticidal, larvicidal, pupicidal and oviposition deterrent activities of essential oil from *Zanthoxylum limonella* Alston (Rutaceae) against *Aedes aegypti* (L.) and *Culex quinquefasciatus* (Say). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 7, n. 11, p. 967-978.

TADEI, W.P., 2001. Controle da malária na Amazônia. Anais/ Resumo da 7 Reunião Especial da SBPC [CD ROOM]. Manaus: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência 1-6

TAVARES, C. P. S., 2021. Atividade larvívica do óleo essencial de *Siparuna guianensis* aubl. (Siparunaceae) em *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) e toxicidade em organismo aquático não-alvo em condições de laboratório. 25-65.

TÕUGU, V., 2001. Acetylcholinesterase: mechanism of catalysis and inhibition. *Curr. Med. Chem.* 1, 155-170.

VALLE, D., PIMENTA, D. N., & DA CUNHA, R. V., 2015. Dengue: teorias e práticas. SciELO-Editora FIOCRUZ.

VAN DEN DOOL, H., & KRATZ, P. D. A., 1963. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography.

VILA, R.; SANTANA, A.I.; PÉRES-ROSÉS, R.; VALDERRAMA, A.; CASTELLI, M.V.; MENDONÇA, S.; ZACCHINO, S.; GUPTA, M.P.; CAÑIGUERAL, S., 2010. Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampanensis*, a new source of α -bisabolol. *Bioresource Technology.* 101: 2510-2514.

ZARA, A. L. D. S. A., SANTOS, S. M. D., FERNANDES-OLIVEIRA, E. S., CARVALHO, R. G., & COELHO, G. E., 2016. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 25, p. 391-404.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. World Health Organization, 2005. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69101/WHO_CDS_WHOPEP_G_CDPD_2005.13.pdf> Acesso em: 14/07/2021.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2006. WOPES. Pesticides pesticides and their applica and their application. For the control of vectors and pests of public health importance.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue and severe dengue. Key facts. 2019. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue -and-severe-dengue](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue)> Acessado em:14/07/2021.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2023. Dengue and severe dengue Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Acessado em: 20.02.2023

WOREK. F; KOLLER, M.; THIERMANN, H.; SZINICZ,L., 2005. Diagnostic aspects) of organophosphate poisoning. Toxicology, 214,182.

ZARA, A. L. D. S. A., SANTOS, S. M. D., FERNANDES-OLIVEIRA, E. S., CARVALHO, R. G., & COELHO, G. E., 2016. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. Epidemiologia e Serviços de Saúde, v. 25, p. 391-404.

ANEXOS

SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Ativar o
 Acesso as
 ativar o V

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 81083-1	Data da Emissão: 16/11/2021 13:14:10
-----------------	--------------------------------------

Dados do titular

Nome: HERGEN VIEIRA DE SOUZA	CPF: 006.101.372-20
------------------------------	---------------------

Observações e ressalvas

1	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidrófitos, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidrófitos para fins científicos.
2	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
3	Esse documento não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; II) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indisponível à segurança nacional; III) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; IV) do Departamento Nacional de Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; V) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
4	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
5	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, e espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/igen .

Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	Fora de UC Federal

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	Espécie	Plantae > Magnoliophyta > Magnoliopsida > Piperales > Piperaceae > Piper > Baccans

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

28/11/2021 15:15 SEI/MCTI - 8731309 - Parecer Técnico



INPA
INSTITUTO NACIONAL DE
PESQUISAS DA AMAZÔNIA
CONSELHO DE PESQUISA DE MCTI



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÕES

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PARECER TÉCNICO Nº 130/2021/SEI-INPA
PARECER CONSUBSTANCIADO E CERTIFICADO SOBRE PROTOCOLOS DE PESQUISAS NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "Óleos voláteis e extratos de *Piper baccans* (Miq.) C.DC. e *Piper mourai* Yuncck (Piperaceae): uma alternativa natural no controle do principal vetor da dengue no Brasil, *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1976) (Diptera: Culicidae)", registrada com o nº 034/2021, SEI 01280.001452/2021-13, sob a responsabilidade de Hergen Vieira Souza - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filio Chordata, subfilio Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA, em reunião de 27/11/2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização:	Início: 16/01/2022 a Final: 01/03/2023
Espécie/linhagem/raça:	Hamster sírios (<i>Mesocricetus auratus</i>)
Número de animais:	12
Peso/Idade:	120g - Adultos
Sexo:	Machos
Origem:	Biotério Central do INPA

Data de liberação do Parecer: 26.11.2021

Raimunda Liege Souza de Abreu - Presidente CEUA-INPA - PO 194/2017




Documento assinado eletronicamente por Raimunda Liege Souza de Abreu, Pesquisador(a) em Ciência e Tecnologia, em 26/11/2021, às 12:20 (horário oficial de Brasília), com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <http://sei.mctic.gov.br/verifica.html>, informando o código verificador 8731309 e o código CRC 388BCDA4.

Referência: Processo nº 01280.001452/2021-13 SEI-INPA nº 8731309

SISGEN – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
 Cadastro nº AA94F48

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: AA94F48
 Usuário: HERGEN VIEIRA DE SOUZA
 CPF/CNPJ: 006.101.372-20
 Objeto do Acesso: Patrimônio Genético
 Finalidade do Acesso: Pesquisa

Espécie
 Piper baccans


Título da Atividade: Óleos voláteis e extratos de Piper baccans (Miq.) C.DC. e Piper moural Yuncck (Piperaceae): uma alternativa natural no controle do principal vetor da dengue no Brasil, Aedes aegypti (Linnaeus, 1756) (Diptera: Culicidae)

Equipe

HERGEN VIEIRA DE SOUZA	UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Rosemary Aparecida Roque	INPA
André Correa de Oliveira	INPA
Claudia Patricia da Silva Tavares	INPA
Ana Ligia Leandrini de Oliveira	UFAM

Data do Cadastro: 10/11/2021 11:33:00
 Situação do Cadastro: Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 11:33 de 10/11/2021.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - SISGEN