

**ASPECTOS ESTRUTURAIS, QUÍMICOS E POTENCIAL ANTI-*Aedes aegypti* DE  
FOLHAS DE *Varronia curassavica* (BORAGINACEAE)**

**MARCELA REZENDE CORDEIRO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

JULHO – 2023

**ASPECTOS ESTRUTURAIS, QUÍMICOS E POTENCIAL ANTI-*Aedes aegypti* DE  
FOLHAS DE *Varronia curassavica* (BORAGINACEAE)**

**MARCELA REZENDE CORDEIRO**

Dissertação apresentada ao Centro de  
Biotecnologia e Biotecnologia da  
Universidade Estadual do Norte Fluminense  
Darcy Ribeiro, como parte das exigências  
para obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Maura Da Cunha

Coorientador: Dr. Saulo Pireda

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

JULHO – 2023

## FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

C794

Cordeiro, Marcela Rezende.

Aspectos estruturais, químicos e potencial anti-*Aedes aegypti* de folhas de *Varronia curassavica* (Boraginaceae) / Marcela Rezende Cordeiro. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2023.

83 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2023.

Orientadora: Maura da Cunha.

Coorientador: Saulo Pireda Fernandes.

1. *Aedes aegypti*. 2. Bioprospecção. 3. Testes Histoquímicos. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 660.6

MARCELA REZENDE CORDEIRO

**ASPECTOS ESTRUTURAIS, QUÍMICOS E POTENCIAL ANTI-*Aedes aegypti* DE  
FOLHAS DE *Varronia curassavica* (BORAGINACEAE)**

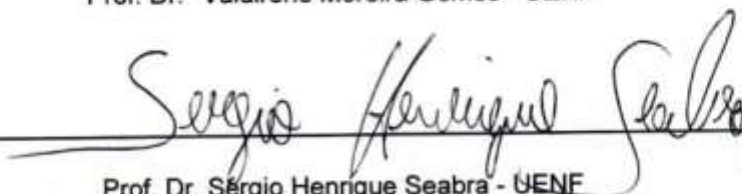
Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Vegetal.

Aprovada em 28 de julho de 2023

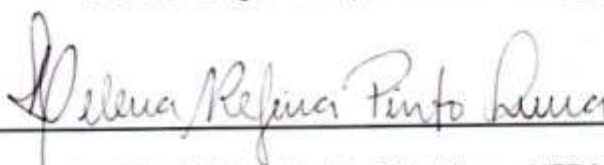
Comissão Examinadora:



Prof. Dr.ª Valdirene Moreira Gomes - UENF



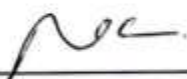
Prof. Dr. Sérgio Henrique Seabra - UENF



Prof.ª Dr.ª Helena Regina Pinto Lima – UERJ



Dr. Saulo Pireda Fernandes - UENF (coorientador)



Prof.ª Dr.ª Maura Da Cunha - UENF (orientadora)

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Jonas e Tânia, a  
minha avó Regina e aos meus  
sobrinhos Hugo e Victor.*

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Maura Da Cunha, na qual considero uma “mãe científica”, pela orientação guiada através do respeito, do carinho e da paciência, por todo o apoio desde o princípio de minha jornada ainda como graduanda, por acreditar em mim, por todo os ensinamentos que contribuem para meu crescimento pessoal e profissional e por acreditar na minha capacidade e no desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu coorientador Dr. Saulo Pireda, que me acompanhou durante toda a trajetória no mestrado, compartilhando seus conhecimentos, agradeço por confiar e acreditar em mim, por fazer parte da minha evolução neste trajeto, por todo o suporte e paciência, pelas palavras de apoio que me incentivaram muito durante a trajetória no mestrado e por todas as contribuições e dedicação para a realização deste trabalho. Mais do que um coorientador, um amigo!

Agradeço aos colaboradores do Setor de Biologia Vegetal do LBCT, Dr. Rodrigo Feitoza e a futura Mestre Nicolly Bautz, por todo o apoio, suporte nas técnicas em anatomia vegetal e histoquímica, e pelos conhecimentos que generosamente compartilharam comigo.

Agradeço as colaboradoras do LQFPP, a Profa. Dra. Kátia Fernandes, por me receber em seu laboratório, possibilitando o desenvolvimento da pesquisa. A Dra. Maria Aparecida Aride Bertonecelli por aceitar a colaboração, dedicando seu tempo e esforço para me orientar, pela paciência e apoio, por compartilhar generosamente os seus conhecimentos e as técnicas dos ensaios larvicidas, bem como também, por me apresentar aos colaboradores do LCQUI e do LBT, estendo os agradecimentos a todos do LQFPP.

Agradeço aos colaboradores do LCQUI, o Prof. Dr. Ivo Vieira, ao Prof. Dr. Raimundo Braz-Filho, por aceitarem a colaboração e me receberem no laboratório, compartilhando os ensinamentos da Química. Ao Prof. Dr. Carlos Matos pelas análises no CG-EM realizadas em seu laboratório. Agradeço a doutoranda Thalya Nogueira por sua generosidade e dedicação ao me orientar, por todo os conhecimentos que compartilhou pacientemente comigo, por me apresentar ao mundo da Química e me fazer adorar esse mundo e querer aprender mais e mais. Estendo os agradecimentos a todos do LCQUI.

Agradeço aos colaboradores Prof. Dr. Francisco José Alves Lemos e a técnica Rivea, do Insetário do laboratório LBT, onde foram realizadas as coletas das larvas de terceiro instar de *Aedes aegypti* utilizadas neste trabalho.

Agradeço a Profa. Dra. Cláudia Barros e sua equipe de técnicos do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, que permitiram e me auxiliaram com o ponto crítico das minhas amostras de larvas, que corresponde a parte fundamental do processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal. A coordenadora Profa. Dra. Claudete Santa Catarina pelas palavras de apoio. A secretária Margareth Paes que sempre está disposta a auxiliar os alunos. Aos docentes e discentes, pelos conhecimentos e experiências compartilhadas na caminhada do Mestrado.

A minha saudosa amiga e orientadora de monografia, Mestre Maria Isabel Titoneli Pacheco (*in memoriam*), que foi a primeira a acreditar em mim, a me orientar e instruir na trajetória acadêmica, por me acolher como uma irmã, por me apoiar e dar forças para prosseguir lá atrás, quando estava na minha graduação. Nunca me esqueço de quando dizia que um dia eu seria Mestre! Sei que ela está orgulhosa de mim!

Agradeço a Profa. Dra. Glaziele Campbell, que aceitou orientar-me há alguns anos, no desenvolvimento de minha monografia, em um momento tão difícil para todos nós

amigos de Bebel. Por todo o apoio, incentivo e por tudo que aprendi e ainda aprendo com você, na colheita dos frutos que plantamos com o nosso trabalho, sendo uma grande parceira até hoje.

Agradeço a todos da equipe da Profa. Maura, bem como, aos ex-membros e aos agregados do Setor de Biologia Vegetal. Vocês fazem parte dessa conquista.

Agradeço aos membros da banca, Profa. Dra. Helena Pinto Lima, Profa. Dra. Valdirene Gomes e Prof. Dr. Sérgio Seabra, pela disponibilidade e por aceitarem ao convite de avaliarem este trabalho, agregando conhecimento para a melhoria deste trabalho.

Agradeço aos funcionários e técnicos do LBCT, Beatriz, Giovanna, Márcia Adriana, Adrianinha, Arthur e Luciana e ao Chefe do setor, o Dr. Renato DaMatta, por proporcionarem as condições necessárias para o desenvolvimento dos trabalhos de discentes e docentes. Em especial agradeço a Técnica Beatriz, pelo auxílio no processamento de minhas amostras na reta final.

Aos meus amados pais, Tânia e Jonas, a minha eterna gratidão pela vida, por me darem condições para buscar os meus sonhos, por lutarem as minhas lutas, por não me deixarem sozinha, mesmo diante das dificuldades que enfrentamos, acreditando na luta pelo meu sonho e cuidando de mim com amor e carinho para que eu pudesse conquistar meus objetivos, por depositarem confiança e acreditarem em mim! Sem vocês eu nada seria, sem vocês eu não poderia chegar até aqui!

Aos meus avós, Dona Regina, minha amada e querida avó que apesar do pouco estudo, é uma das pessoas mais inteligentes que conheço e que sempre me incentivou a ir atrás dos meus objetivos, hoje, com 95 anos, ela ainda me diz: “Isso mesmo, minha filha, estude mesmo, tem que estudar.” Ao meu amado avô Paulo (*in memoriam*).

Aos meus sobrinhos Hugo e Victor, meus grandes amores, minhas razões para prosseguir e não desistir, meus motivos para buscar ser uma pessoa melhor, uma tia da qual eles tenham muito orgulho! A minha irmã Amanda pelo apoio durante a minha trajetória.

A minha amiga Paula, por ser mais do que uma amiga, uma irmã, que sempre me apoiou, me incentivou, me ajudou e esteve ao meu lado durante muitos momentos desde a nossa graduação, na caminhada do mestrado e na vida.

As minhas amigas que o CEDERJ e a UENF me deram de presente, Barbara Masieiro, Francine Menezes, Dalvania Domingues, por me apoiarem durante toda a minha trajetória na UENF, por me ajudarem a lidar com os percalços da trajetória acadêmica, pelas palavras de apoio nos momentos difíceis e pelos momentos de compartilhamento de conhecimentos e alegrias.

Aos meus amados amigos, Sabrina Venâncio, Wanessa Bastos, Bruno Frauches, por sempre me encorajarem a ir em busca dos meus sonhos e a não desistir, por tudo que compartilhamos juntos e por serem acalento em muitos momentos da minha vida.

Agradeço a equipe do Núcleo de Estudos Germinação, através do trabalho em equipe e de experiências que me proporcionaram evoluir como pessoa e profissional.

Aos colegas tutores, coordenadores, alunos e funcionários do CEDERJ, em especial aos do Polo Bom Jesus do Itabapoana e das disciplinas das quais sou tutora.

Agradeço a Universidade Estadual do Norte Fluminense e as agências de fomento: FAPERJ, CAPES E CNPQ.

A Deus, por tudo, pela saúde, força e sabedoria concedidas e pela vida de todas as pessoas que são importantes na minha vida e na minha trajetória!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>xii</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>xiii</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xv</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>16</b>
<b>2. Revisão de Literatura</b> .....	<b>18</b>
2.1 Mata Atlântica.....	18
2.2 Família Boraginacea Juss. e gênero <i>Varronia</i> P. Browne .....	19
2.3 Espécie <i>Varronia curassavica</i> .....	20
2.4 Estruturas secretoras: Tricomas .....	22
2.5 Revisão química do gênero <i>Cordia</i> e <i>Varronia</i> .....	24
2.6 Revisão química da espécie <i>Varronia curassavica</i> .....	26
2.7 Potencial biotecnológico da espécie <i>Varronia curassavica</i> .....	28
2.8 <i>Aedes aegypti</i> .....	31
2.9 Anatomia externa e interna da larva de <i>Aedes aegypti</i> .....	33
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>35</b>
3.1 Objetivo Geral .....	35
3.2 Objetivos Específicos .....	35
<b>4. Materiais e Métodos</b> .....	<b>36</b>
4.1 Área de estudos .....	36
4.2 Seleção de espécie e coleta de material .....	36
4.3 Microscopia óptica.....	36
4.4 Microscopia eletrônica de varredura .....	37
4.5 Testes histoquímicos dos tricomas glandulares.....	37
4.6 Preparação do extrato bruto metanólico das folhas de <i>Varronia curassavica</i> .....	38
4.7 Partição do extrato bruto metanólico das folhas de <i>Varronia curassavica</i> ..	39
4.8 Isolamento e purificação das substâncias.....	39
4.9 Análises cromatográficas da partição diclorometano obtido do extrato bruto metanólico das folhas de <i>Varronia curassavica</i> .....	40
4.10 Análise cromatográfica da fração VCFD 11 (0,3524g) .....	41
4.11 Identificação das substâncias na fração ativa VCFD 11.6 (0,0443g) por análises espectroscópicas e espectrométricas .....	41

4.12 Ensaio larvicida .....	42
4.13 Investigação de possíveis alterações morfológicas no exoesqueleto das larvas por microscopia eletrônica de varredura .....	42
<b>5. Resultados.....</b>	<b>43</b>
5.1 Aspectos estruturais dos tricomas foliares de <i>Varronia curassavica</i> .....	43
5.2 Caracterização histoquímica dos tricomas foliares de <i>Varronia curassavica</i> .....	47
5.3 Ensaio larvicidas .....	49
5.4 Efeitos da fração VCFD 11.6 na morfologia do exoesqueleto das larvas por microscopia eletrônica de varredura .....	53
5.5 Identificação de substâncias na fração ativa VCFD 11.6 .....	56
<b>6. Discussão .....</b>	<b>66</b>
<b>7. Conclusão.....</b>	<b>70</b>
<b>8. Referências.....</b>	<b>71</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Aspectos gerais da espécie <i>Varronia curassavica</i> Jacq. (Acervo pessoal)....	21
<b>Figura 2.</b> Tricomas. A. Tricomas tectores; B. Tricoma glandular. Fontes: Duarte & Siebenrock (2016); Ventrella & Marinho (2008). .....	23
<b>Figura 3.</b> Representação da estrutura molecular da cordiaquinona A e cordiaquinona B (Adaptado de Silva, 2013) .....	24
<b>Figura 4.</b> Representação da estrutura molecular do cordiacromo A e cordiacromo B (Adaptado de Silva, 2013) .....	25
<b>Figura 5.</b> Representação da estrutura molecular dos triterpenos de esqueleto damarano do tipo cordianol A e cordianol B (Adaptado de Silva, 2013) .....	25
<b>Figura 6.</b> Representação da estrutura molecular de dois dos flavonoides majoritários de <i>Cordia</i> e <i>Varronia</i> (Adaptado de Silva, 2013) .....	26
<b>Figura 7.</b> Representação da estrutura molecular dos dois principais marcadores químicos de <i>Varronia curassavica</i> (Adaptado de Gomes et al. 2019) .....	27
<b>Figura 8.</b> Ciclo de vida do Mosquito <i>Aedes aegypti</i> . Fontes: Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) e Centers for Disease Control and Prevention (CDC) .....	31
<b>Figura 9.</b> Esquema demonstrando a anatomia externa da larva de terceiro instar de <i>Aedes aegypti</i> . (Adaptado de Lemos, 2016) .....	34
<b>Figura 10.</b> Anatomia interna de larva de <i>Aedes aegypti</i> . Fonte: Christophers, 1960. (Adaptado de Lemos, 2016) .....	35
<b>Figura 11.</b> Características anatômicas dos diferentes tipos de tricomas presentes na folha de <i>Varronia curassavica</i> obtidos a partir da microscopia óptica .....	44
<b>Figura 12.</b> Aspectos micromorfológicos dos diferentes tipos de tricomas presentes na folha de <i>Varronia curassavica</i> obtidos a partir da microscopia eletrônica de varredura .....	46
<b>Figura 13.</b> Análise dos constituintes majoritários da secreção dos tricomas glandulares globulares de <i>Varronia curassavica</i> realizados através dos testes histoquímicos em microscopia óptica .....	48
<b>Figura 14.</b> Atividade larvicida de diferentes concentrações do extrato bruto das folhas de <i>Varronia curassavica</i> contra larvas de 3º instar de <i>Aedes aegypti</i> .....	50

<b>Figura 15.</b> Atividade larvicida das partições do extrato bruto das folhas de <i>Varronia curassavica</i> contra larvas de 3º instar de <i>Aedes aegypti</i> .....	51
<b>Figura 16.</b> Atividade larvicida das frações da partição de diclorometano das folhas de <i>Varronia curassavica</i> (VCFD) contra larvas de 3º instar de <i>Aedes aegypti</i> .....	52
<b>Figura 17.</b> % Porcentagem de mortalidade em partes por milhão (PPM) das larvas de 3º instar de <i>Aedes aegypti</i> , com a fração 11 (VCFD) da partição de diclorometano das folhas de <i>Varronia curassavica</i> por 24 h .....	52
<b>Figura 18.</b> Atividade larvicida das frações de VCFD 11 contra larvas de 3º instar de <i>Aedes aegypti</i> .....	53
<b>Figura 19.</b> Morfologia geral das larvas de 3º instar de <i>Aedes aegypti</i> expostas a 100 PPM da fração de VCFD 11.6 por 24 h observadas em estereomicroscópio ....	54
<b>Figura 20.</b> Aspectos micromorfológicos das larvas de 3º instar de <i>Aedes aegypti</i> observados através do microscópio eletrônico de varredura.....	55
<b>Figura 21.</b> Cromatograma obtido por CG/EM para a Fração VCFD 11.6 .....	56
<b>Figura 22.</b> Espectro de massas para o pico 3 (RT 8.075 min) da Fração VCFD 11.6.....	57
<b>Figura 23.</b> Espectro de massas para o pico 4 (RT 9.685 min) da Fração VCFD 11.6.....	58
<b>Figura 24.</b> Espectro de massas para o pico 5 (RT 9.816 min) da Fração VCFD 11.6.....	59
<b>Figura 25.</b> Espectro de massas para o pico 6 (RT 13.051 min) da Fração VCFD 11.6.....	60
<b>Figura 26.</b> Espectro de massas para o pico 7 (RT 13.123 min) da Fração VCFD 11.6 .....	60
<b>Figura 27.</b> Espectro de massas para o pico 8 (RT 13.490 min) da Fração VCFD 11.6 .....	61
<b>Figura 28.</b> Espectro de massas para o pico 10 (RT 14.283 min) da Fração VCFD 11.6..	63
<b>Figura 29.</b> Espectro de massas para o pico 11 (RT 17.572 min) da Fração VCFD 11.6. ....	64

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Atividades biológicas descritas para <i>Varronia curassavica</i> utilizando diferentes tipos de solventes extratores .....	29
<b>Tabela 2.</b> Reagentes utilizados para os testes histoquímicos realizados para identificar as substâncias presentes nos tricomas da folha de <i>Varronia curassavica</i> .....	38
<b>Tabela 3.</b> Quantidade de material coletado e extrato bruto obtido .....	39
<b>Tabela 4.</b> Quantidade de material obtido em cada partição .....	39
<b>Tabela 5.</b> Análise da partição diclorometano .....	40
<b>Tabela 6.</b> Análise da fração VCFD 11 .....	41
<b>Tabela 7.</b> Resultado dos testes histoquímicos realizados para tricomas globulares da folha de <i>Varronia curassavica</i> .....	49
<b>Tabela 8.</b> Substâncias identificadas com CG-EM na fração VCFD11.6. ....	65

**ABREVIATURAS**

$\delta$  Deslocamento químico

$\mu\text{g}$  Micrograma

Aw Clima tropical, com inverno seco.

CC Cromatografia em Coluna

CCDA Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CCDP Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CG/EM Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas

LC<sub>50</sub> Concentração letal média

m/z Relação massa/carga

PPM Partes por milhão RMN Ressonância Magnética Nuclear

RT Tempo de retenção

AcOET Acetato de etila

ButOH Butanol

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> Diclorometano

## RESUMO

*Aedes aegypti* é o principal vetor de arboviroses, como Dengue, Zica Vírus, Chicungunya e Febre Amarela, representando uma preocupação de saúde pública global, principalmente em países tropicais e subtropicais, devido à sua alta adaptabilidade a ambientes quentes e com disponibilidade hídrica. Dentre as arboviroses, a Dengue é considerada a mais relevante. A utilização de inseticidas químicos é uma das estratégias mais comumente empregadas para controlar esse vetor. No entanto, o surgimento de resistência dos mosquitos aos inseticidas químicos tem levado os pesquisadores a explorarem alternativas para o seu controle, e substâncias derivadas de plantas têm mostrado um potencial promissor como bioinseticidas. Entre as espécies de plantas destaca-se a *Varronia curassavica*. Essa planta é nativa da Mata Atlântica e é predominante nas áreas de restinga, apresentando características de arbusto, pioneira e heliófila. A *V. curassavica* possui substâncias bioativas de grande valor econômico devido ao seu potencial biológico. Nas suas folhas estão presentes estruturas secretoras, tais como os tricomas que armazenam os metabólitos secundários, como os óleos essenciais, que apresentam atividades biológicas diversas. Portanto, este estudo investigou os aspectos estruturais, anatômicos e histoquímicos dos tricomas folha de *V. curassavica* e identificou substâncias com potencial tóxico contra larvas de *A. aegypti*, indicando métodos alternativos para o seu controle a ser utilizado no combate do mosquito *A. aegypti*. As folhas foram coletadas na restinga, na RPPN Caruara em São João da Barra, RJ. Fragmentos foliares foram submetidos às técnicas usuais em anatomia vegetal para microscopia óptica (MO), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e histoquímica. Para as análises histoquímicas, foram submetidos aos reagentes: Azul Brillhante de Coomassie, Cloreto Férrico, NADI, Reagente de Wagner, Sudan IV e Vermelho de Rutênio. As folhas foram secas em estufa, moídas em moinho de facas e submetidas à maceração a frio com MeOH; a solução obtida foi destilada a pressão reduzida em evaporador rotativo para a obtenção do extrato bruto. Foi feita a partição líquido-líquido do extrato utilizando solventes de polaridades crescentes (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOET, ButOH e H<sub>2</sub>O). Foram aplicadas técnicas cromatográficas clássicas e foi utilizada a Espectrometria de Massas acoplada à Cromatografia Gasosa (CG/EM) para identificar as substâncias nas frações mais ativas. Foi realizado ensaio larvicida com larvas de *A. aegypti* de 3<sup>o</sup> instar, em triplicata por 24h. e posteriormente as larvas submetidas à fração tóxica foram analisadas em MEV para investigar as alterações morfológicas causadas pela fração. As análises realizadas com MO e MEV demonstraram que as folhas de *V. curassavica*, possuem tricomas glandulares do tipo globular e reniforme, tricomas tectores longos na face abaxial e tricomas curtos cônicos na face adaxial. Por meio de análises histoquímicas verificou-se a presença de óleos essenciais, substâncias fenólicas, lipídios e alcaloides na cabeça do tricoma glandular globular. Por meio de CG/EM identificamos substâncias das classes dos terpenos (diterpenos e sesquiterpenos) na fração ativa, sendo essas substâncias constituintes dos óleos essenciais, estes, que foram evidenciados nos testes histoquímicos, indicando que o tricoma glandular globular é o sítio de produção e armazenamento dessas substâncias bioativas. Os ensaios larvicidas dos extratos (em conformidade com normas da OMS) mostrou atividade larvicida positiva e foi possível verificar danos na epiderme, seco gástrico, desorganização e ruptura da camada cuticular que recobre as larvas submetidas à fração mais ativa (LC<sub>50</sub> = 61,25), através de análise em MEV. Os resultados obtidos demonstram que os extratos obtidos a partir das folhas de *V. curassavica* apresentam um grande potencial biotecnológico que pode ser utilizado no combate do mosquito *A. aegypti*.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, Bioprospecção e Testes histoquímicos

## ABSTRACT

*Aedes aegypti* is the main vector of arboviruses, such as Dengue, Zika Virus, Chikungunya and Yellow Fever, representing a global public health concern, mainly in tropical and subtropical countries, due to its high adaptability to hot environments and water availability. Among arboviruses, Dengue is considered the most relevant. The use of chemical insecticides is one of the most commonly used strategies to control this vector. However, the emergence of mosquito resistance to chemical insecticides has led researchers to explore alternatives for their control, and plant-derived substances have shown promising potential as bioinsecticides. Among the plant species, *Varronia curassavica* stands out. This plant is native to the Atlantic Forest and is predominant in restinga areas, presenting shrub, pioneer and heliophilous characteristics. *V. curassavica* has bioactive substances of great economic value due to its biological potential. Secretory structures are present in its leaves, such as trichomes that store secondary metabolites, such as essential oils, which have diverse biological activities. Therefore, this study investigated the structural, anatomical and histochemical aspects of *V. curassavica* leaf trichomes and identified substances with toxic potential against *A. aegypti* larvae, indicating alternative methods for its control to be used to combat the *A. aegypti* mosquito. The leaves were collected in the restinga, at RPPN Caruara in São João da Barra, RJ. Leaf fragments were subjected to the usual techniques in plant anatomy for optical microscopy (OM), scanning electron microscopy (SEM) and histochemistry. For histochemical analyses, the reagents were subjected to: Coomassie Brilliant Blue, Ferric Chloride, NADI, Wagner's Reagent, Sudan IV and Ruthenium Red. The leaves were dried in an oven, ground in a knife mill and subjected to cold maceration with MeOH; the solution obtained was distilled under reduced pressure in a rotary evaporator to obtain the crude extract. The extract was liquid-liquid partitioned using solvents of increasing polarities (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOET, ButOH and H<sub>2</sub>O). Classical chromatographic techniques were applied and Mass Spectrometry coupled to Gas Chromatography (GC/MS) was used to identify the substances in the most active fractions. Larvicidal assay was carried out with 3rd instar *A. aegypti* larvae, in triplicate for 24h. and subsequently the larvae subjected to the toxic fraction were analyzed in SEM to investigate the morphological changes caused by the fraction. The analyzes carried out with MO and SEM demonstrated that the leaves of *V. curassavica* have glandular trichomes of the globular and reniform type, long tector trichomes on the abaxial side and short conical trichomes on the adaxial side. Through histochemical analysis, the presence of essential oils, phenolic substances, lipids and alkaloids was verified in the head of the globular glandular trichome. Using GC/MS, we identified substances from the terpene classes (diterpenes and sesquiterpenes) in the active fraction, these substances being constituents of essential oils, which were evidenced in histochemical tests, indicating that the globular glandular trichome is the site of production and storage of these bioactive substances. The larvicidal tests of the extracts (in accordance with WHO standards) showed positive larvicidal activity and it was possible to verify damage to the epidermis, gastric dryness, disorganization and rupture of the cuticular layer covering the larvae subjected to the most active fraction (LC<sub>50</sub> = 61.25) through SEM analysis. The results obtained demonstrate that the extracts obtained from the leaves of *V. curassavica* have great biotechnological potential that can be used to combat the *A. aegypti* mosquito.

Keywords: *Aedes aegypti*, Bioprospection and Histochemical test

## 1. INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* é o vetor de importantes arboviroses, como a Dengue, Zika Vírus, Febre Amarela e Chicungunya, representando preocupação de saúde pública principalmente em países de clima tropical, como o Brasil. Este mosquito é cosmopolita e sobrevive facilmente em meio urbano, obtendo recursos necessários para o seu desenvolvimento, principalmente oriundos da ação antrópica, como acúmulo de objetos com água limpa e parada, que geralmente estão próximos às áreas de residências, tais como, os vasos de plantas, latinhas, caixas d'água, pneus e também em plantas que possuem locais que podem armazenar água, como nas bromélias (Fiocruz, 2021). Nestes locais, a fêmea do mosquito deposita os seus ovos nas paredes dos objetos, após a chuva, o ovo que foi depositado é molhado e retorna ao seu ciclo de desenvolvimento que tem início com ovo que ao eclodir dá origem a uma larva e depois a um mosquito, em até dez dias, o mosquito já é capaz de se reproduzir (Organização Pan-Americana da Saúde 2021).

Devido a sua reprodução rápida e abundância de recursos para a sua sobrevivência em meio urbano, o *A. aegypti* é considerado difícil de ser controlado. Devido à resistência de seus ovos que sobrevivem durante meses sem água até que o local em que está depositado receba novamente água e o ciclo continue (Zara et al., 2016). Dessa forma, as arboviroses causadas por esse vetor espalham-se rapidamente em todo o mundo. A dengue é uma das principais arboviroses e tem como sintomas, febre alta, dores de cabeça, musculares, olhos e ossos, manchas avermelhadas no peito e nos membros superiores, em casos mais severos pode evoluir para dengue hemorrágica, ou até mesmo ser assintomática (Brasil, Ministério da Saúde 2023). Estima-se que a dengue poderá atingir 3,9 bilhões de pessoas em 129 países, 40.000 mortes por ano e 96 milhões de formas assintomáticas da doença (OMS, 2021).

Apesar de existirem vacinas contra a dengue, as estratégias de controle da proliferação do mosquito continuam sendo uma das formas de prevenção. A principal forma de controlar a proliferação do *A. aegypti* é através da utilização de inseticidas químicos organoclorados (Braga & Valle, 2007). No entanto, ao longo dos anos, o *A. aegypti* tem se tornado resistente a esses produtos químicos, sendo necessário a substituição das formulações (Nauem, 2008; Zheng et al., 2019). Outra questão importante é criar formulações com substâncias que agridam menos o ambiente (Halsteade et al. 2015; Bertonceli et al., 2022).

Sendo assim, tem crescido os estudos para o descobrimento de novas substâncias extraídas de espécies vegetais nativas com aplicação em diversas áreas, tais como, na medicina popular e medicina convencional, agricultura, bioinseticidas, indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética, dentre outras (Vieira et al., 2015, Garcez, 2013; Sá et al., 2022; Bertonceli et al., 2022).

O Brasil é considerado um dos países mais biodiversos do planeta, muito em função das grandes variações latitudinais, longitudinais e altitudinais que moldam as características microclimáticas e edáficas de cada bioma e ecossistemas que compõem a sua paisagem florestal (Galindo-Leal & Câmara 2003; Ribeiro et al. 2009). A Mata Atlântica em especial é considerada um dos biomas mais biodiversos do planeta, sendo o reduto de aproximadamente 20 mil espécies vegetais, o que corresponde a ~35% das espécies existentes no Brasil (Brasil, Ministério do Meio Ambiente 2023). A alta diversidade de espécies vegetais da Mata Atlântica é considerada um repositório natural de compostos bioativos com potencial biotecnológico ainda obscuro que precisam ser revelados a fim de trazer avanços e bem-estar a sociedade.

A família Boraginaceae apresenta potencial para estudos de prospecção de compostos bioativos devido à grande presença de tricomas glandulares produtores de secreção rica em óleos essenciais e compostos fenólicos (Gilbert, 2012). A espécie *Varronia curassavica*, popularmente conhecida como erva-baleira, é uma representante dessa família que vem sendo utilizada na medicina popular devido suas propriedades anti-reumáticas, anti-inflamatórias, analgésicas (Sertié et al., 2005). Esta espécie vem sendo explorada pela indústria farmacêutica para produção de produtos terapêuticos (Rosa et al., 2008). O potencial biotecnológico de *V. curassavica*, assim como de outras espécies de Boraginaceae, estão vinculadas as características dos metabólitos secundários produzidos pelos seus tricomas glandulares (Ventrella et al., 2008).

Os tricomas glandulares são estruturas secretoras caracterizadas por apresentar uma cabeça secretora e um pedúnculo fixado a superfície dos diferentes órgãos vegetativos e reprodutivos das plantas (Evert & Esau 2013). Os tricomas glandulares são especializados na síntese e armazenamento de secreção que pode ser composta por diferentes metabólitos, tais como: alcaloides, óleo essencial, substâncias fenólicas, lipídios (Simões et al., 2010; Vieira et al., 2015). É importante destacar que os metabólitos secundários constituintes das secreções dos tricomas glandulares podem variar entre diferentes espécies e em função das condições ambientais onde a planta está localizada (Ferreira et al., 2019). De forma geral, esses metabólitos apresentam grande potencial biotecnológico para ser aplicado em estudos que buscam o estabelecimento de formulações de produtos que contribuem para a saúde do ser

humano e do ambiente (Alves et al., 2010). Nesse sentido, estudos fitoquímicos e histoquímicos são necessários para identificar os sítios de produção e os tipos de metabólitos presentes nas plantas.

Para *V. curassavica* as análises fitoquímicas e histoquímicas apontaram a presença de diversos metabólitos secundários como óleo essencial, ácidos graxos, flavonoides, monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos. Muitos estudos têm demonstrado a eficácia dos metabólitos produzidos por *V. curassavica* contra *Leishmania brasiliensis* e *Trypanosoma cruzi* (Pereira et al., 2021), *Staphylococcus aureus* (Matias et al., 2013), *Candida albicans* e *Candida krusei*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* (Rodrigues et al., 2012). No entanto, muito pouco se sabe sobre a eficiência desses metabólitos no combate a proliferação do mosquito *A. aegypti*. Nesse sentido, este estudo busca identificar as principais classes químicas produzidas pelos tricomas glandulares presentes na folha de *V. curassavica* e identificar moléculas com atividade larvicida, bem como, identificar os efeitos tóxicos dessas moléculas sobre as larvas de terceiro instar do mosquito *A. aegypti*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Mata Atlântica

A Mata Atlântica é um bioma muito extenso (1.131.460 km<sup>2</sup>) e heterogêneo, sendo constituído por um mosaico composto por diferentes fitofisionomias: Florestas Ombrófilas Densas e Mistas, Florestas Estacionais Semidecíduias e Deciduais, Campos de Altitude e ecossistemas primários como as restingas e manguezais (Joly et al., 1991). Devido sua grande variação latitudinal (-29.98127 a 0.91789), longitudinal (-55.33475 a -28.84777), e altitudinal (0 a 2.791 m) é comum encontrar fitofisionomias com características climáticas diferentes, com clima tropical e subtropical, e com regimes pluviométricos distintos (500 a 2500 milímetro anuais) (Galindo-Leal & Câmara 2003; Ribeiro et al., 2009).

A heterogeneidade topográfica e climáticas de cada fitofisionomia da Mata Atlântica tem impacto direto sobre a alta diversidade e endemismo de espécies vegetais. Segundo o Instituto Brasileiro de Florestas (2023) a Mata Atlântica apresenta cerca de 20 mil espécies de plantas, sendo 8 mil consideradas endêmicas. Essas características colocam a Mata Atlântica como um dos principais “hotspots” mundiais em termos de prioridade de conservação (Rezende et al., 2018). No entanto, a importância da Mata Atlântica não se resume apenas ao âmbito ecossistêmico, mas também a questões

sociais e econômicas, visto que 72 % da população brasileira e 70 % do PIB nacional estão concentrados sob seus domínios (SOS Mata Atlântica, 2023).

A sua grande biodiversidade florística faz da Mata Atlântica um relevante repositório genético, biológico e químico, com importância significativa para o desenvolvimento de pesquisas e produtos obtidos a partir de suas espécies nativas (Sousa et al., 2017). Alguns estudos tem demonstrado que muitas espécies nativas da Mata Atlântica possuem compostos químicos com propriedades bioativas e antioxidantes (Borges et al., 2011, Silva et al., 2022), antibacterianas (Rodrigues et al., 2021; Perigo et al., 2022), antifúngicas (Neto et al., 2018; Almeida-Silva et al., 2022), anti-Leishmania e Trypanosoma (Santos et al., 2018; Londero et al., 2020), antitumoral (Suffredini et al., 2007; Almeida et al., 2020), cosméticas (Biaviatti et al., 2007) e larvicida (Lima et al., 2019; Carneiro et al., 2020).

Nesse quesito a família Boraginaceae é uma das principais representantes, pois são caracterizadas por apresentar espécies com diferentes propriedades bioativas (Erdogan et al., 2020; Jabbar et al., 2022).

## 2.2 Família Boraginaceae Juss. e Gênero *Varronia* P. Browne

A Família Boraginaceae Juss. possui 200 gêneros e cerca de 2.600 espécies distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais, temperadas pelo mundo (Smith et al., 2004). No Brasil são 129 espécies distribuídas em quatro subfamílias e nove gêneros: Cordioideae (*Cordia*, *Varronia*), Ehretioideae (*Lepidocordia*, *Rotula*), Heliotropioideae (*Euploca*, *Heliotropium*, *Tournefortia*) e Boraginoideae (*Moritzia*, *Thaumatocaryon*) (Melo et al., 2014).

As espécies pertencentes à família Boraginaceae são caracterizadas por apresentarem **hábitos:** herbáceos, arbustivos ou arbóreos; **ciclo de vida:** anual ou perenes; **folhas:** geralmente alternas e raramente opostas; **inflorescência:** cimeira escorpióide ou helicoidal; **flores:** axilares ou terminais, bissexuais, gamopétalas, prefloração imbricada ou contorta, cálice partido ou dentado, corola glabra, actinomorfa ou zigomorfa, ovário súpero multilocular, estilete terminal ou ginobásico; **frutos:** esquizocárpico em núculas ou drupáceo (Miguel et al., 2010).

As espécies dessa família possuem significativa representação do ponto de vista químico, sendo utilizadas na medicina popular, pelo ramo farmacêutico e cosmético, por serem fontes de substâncias bioativas com diversas atividades biológicas (Oliveira, 2016). Através de estudos fitoquímicos em representantes da família Boraginaceae foram encontrados como classes majoritárias de substâncias álcoois terpênicos,

esteróides, flavonoides, hidroquinonas, quinonas, substâncias fenólicas, compostos hidrogenados, saponinas, taninos (Garcez, 2013).

O gênero *Varronia* P. Browne é um dos mais representativos da família Boraginaceae. Vale ressaltar que o gênero *Varronia* é resultante da reclassificação de algumas espécies que antes eram pertencentes ao gênero *Cordia* (APG IV 2016). O gênero possui em torno de 320 espécies (Judd *et al.*, 2002) caracterizadas por apresentar **hábito**: herbáceo, arbustivo e arbóreo; **folhas**: alternas, pecioladas ou sésseis, pubescentes, com tricomas simples e ocasionalmente estrelados; **flores**: terminais e intermodais, cálice tubuloso, corola afunilada ou tubular cilíndrica, ovário carpelar e multilocular; **frutos**: drupas, ovóides, elipsoidal; **sementes**: uma a duas por fruto, embrião cotiledonares plicados (Leite, 2006).

Do ponto de vista químico, o gênero *Varronia* possui as classes químicas: álcoois terpênicos, esteróides, flavonoides, hidroquinonas, quinonas, substâncias fenólicas, compostos hidrogenados, saponinas, taninos (Gibbs, 1974) que conferem diversas atividades biológicas: antimicrobiana, antioxidante (Okusa *et al.*, 2007), antitumoral (Parisotto *et al.*, 2011) analgésica, antiúlcera (Roldão *et al.*, 2008), larvicida do óleo essencial (Santos *et al.*, 2006) entre outras. Dentre as espécies do gênero, a *Varronia curassavica* Jacq., é uma das mais conhecidas devido sua importância fitoterápica e farmacológica (Brasil 2021).

### 2.3 Espécie *Varronia curassavica*

*Varronia curassavica* Jacq., (Boraginaceae) é uma espécie nativa da Mata Atlântica e possui como sinonímias *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. & Schult. e *Cordia verbenacea* (DC.) (Falkenberg, 2012), e é popularmente conhecida como erva-baleeira (Melo *et al.*, 2008; Falkenberg, 2012).

*Varronia curassavica* é uma espécie arbustiva, heliófila, medindo até 3 metros de altura, com ramos flexíveis, folhas simples e alternas com até 10 cm de comprimento, ápice pontudo e forma simétrica, lâmina foliar ovalada e lanceolada com margens irregulares com dentes e ondas, flores pequenas com corolas brancas e inflorescências vistosas (Lorenzi e Matos, 2002; Montanari *et al.*, 2011) (Figura 1 A – C). Os caracteres anatômicos das folhas são apresentados como hipoestomática, epiderme uniestratificada com grande densidade de tricomas tectores e glandulares (Ventrella *et al.*, 2008; Leal-Costa *et al.*, 2017). (Lorenzi e Matos, 2002; Montanari *et al.*, 2011).



**Figura 1.** Aspectos gerais da espécie *Varronia curassavica* Jacq. A - Visão geral de um indivíduo de *V. curassavica* com porte arbustivo. B. Morfologia e filotaxia das folhas de *V. curassavica*. C. Detalhe da inflorescência. (Acervo pessoal).

De acordo com a literatura, foram isoladas substâncias a partir dos extratos das folhas e das raízes que apresentam atividades biológicas importantes, tais como, anti-inflamatórias, antifúngicas, analgésicas, larvicidas (Sertié et al., 1991; Schlemper et al., 2000; Santos et al., 2006).

Os componentes identificados do óleo essencial mais característicos de *V. curassavica* são o  $\alpha$ -humuleno (Carvalho Júnior et al., 2004; Santos et al., 2007; Sciarrone et al., 2017),  $\alpha$ -pineno (Carvalho Júnior et al., 2004; Santos et al., 2007; Sciarrone et al., 2017; Alves et al., 2019),  $\alpha$ -santaleno (Sciarrone et al. 2017; Alves et al., 2019), trans-cariofileno (Carvalho Júnior et al., 2004; Santos et al., 2006; Sciarrone et al., 2017), alo-aromadendreno (Carvalho Júnior et al., 2004; Santos et al., 2006).

A espécie apresenta alto valor econômico, sendo uma espécie de interesse de estudos botânicos e fitoquímicos, devido ao elevado potencial medicinal, está incluída no Formulário Nacional de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (Brasil 2021). Outro dado importante sobre a espécie é a sua presença na Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS), listada entre as 71 espécies de plantas para uso nos serviços públicos de saúde, como medicamento fitoterápico nacional com atividade anti-inflamatória e cicatrizante produzido a partir de extratos vegetais (Basile et al., 1989) com o objetivo de avançar na produção de produtos naturais de interesse do SUS (Brasil 2009).

Os estudos anatômicos e histoquímicos de seus tricomas são importantes para auxiliar na identificação e na localização das estruturas secretoras, bem como das substâncias nelas produzidas e armazenadas que podem ser utilizadas na formulação de produtos que beneficiem a sociedade.

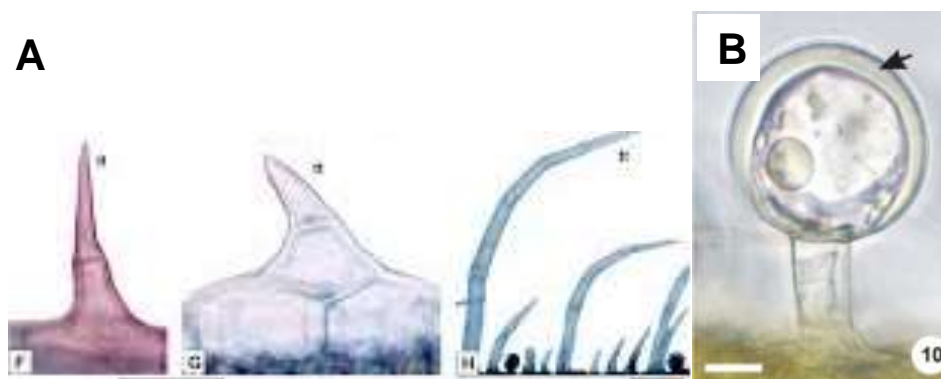
#### **2.4 Estruturas secretoras: Tricomas**

O interesse dos botânicos pelo estudo das estruturas secretoras surgiu a partir da chegada da microscopia óptica, no século XVII (Ascensão, 2007). As estruturas secretoras em plantas são definidas como tecidos ou células especializadas na produção de substâncias químicas exsudadas a partir do protoplasto com destino aos vacúolos das células ou para o meio externo (Fahn, 1979; Esau, 2013). Essas estruturas podem ser internas e externas, como exemplo de estruturas secretoras internas tem-se as células secretoras, cavidades e canais secretores, laticíferos e os idioblastos, como exemplo de estruturas externas, destacam-se os nectários florais e extraflorais, coléteres, osmóforos, hidropótios e hidatódios e os tricomas (Esau, 2013; Apezato-da-Glória; Carmello-Guerreiro, 2012; Dias, 2014).

A mesma estrutura secretora pode estar localizada em todos ou em apenas um órgão da planta e se apresentarem de diferentes tipos em diferentes partes do vegetal (Fahn, 1979). As estruturas secretoras internas e externas exercem diferentes funções nas plantas, tais como, defesa contra herbivoria e patógenos, atração de polinizadores e adaptação ambiental (Esau, 2013; Fahn, 1979). Essas funções estão relacionadas à produção de secreção, um fenômeno de síntese e isolamento de substâncias do protoplasto da célula secretora, para os espaços intercelulares ou para a superfície externa do corpo da planta (Pinheiro et al., 2019).

As substâncias secretadas, denominadas exsudatos, apresentam natureza química diversificada com múltiplos constituintes, denominados metabólitos primários e metabólitos secundários, que podem ser constituídos por soluções aquosas ricas em sais, aminoácidos, açúcares, óleos essenciais, resinas, látex, mucilagem, gomas, proteínas, enzimas proteolíticas, alcaloides, glicosídeos (Dickison, 2000; Ascensão, 2007; Castro e Machado, 2009). Os metabólitos primários são as substâncias que atuam essencialmente na função estrutural e na manutenção das atividades bioquímicas. Em contrapartida, os metabólitos secundários, estão mais diretamente ligados ao crescimento e desenvolvimento do vegetal e permitem que a planta reaja aos estímulos do ambiente em que se encontra, estabelecendo a relação de interação entre planta e o ambiente (Raven; Eichhorn; Evert, 2007; Taiz & Zeiger, 2013).

O alvo de estudo nesse trabalho, são as estruturas secretoras denominadas tricomas, uma vez que a espécie *V. curassavica* apresenta múltiplos tricomas tectores (Figura 2 A) e glandulares (Figura 2 B) distribuídos nas folhas. Os tricomas tectores tem um importante papel na tolerância a estresses abióticos e bióticos, uma vez que atuam na ampliação da área de reflexão dos raios solares, diminuição da temperatura foliar, e defesa da planta contra herbivoria (Fahn, 1986; Evert, 2013). Já os tricomas glandulares são especializados no armazenamento e secreção de substâncias que irão proteger as plantas contra a radiação UV-B, organismos patogênicos e insetos fitófagos (Ventrella et al., 2008; Leal-Costa & Amélia, 2017). Além disso, a secreção produzida pelos tricomas glandulares podem apresentar importante valor econômico, pois tem sido demonstrado que os constituintes da secreção desses tricomas apresentam propriedades antibióticas, antifúngicas e antivirais (Chagas et al., 2002; Monteiro; Andreato; Neves, 2007; Fumagali et al., 2008).



**Figura 2.** Tricomas. A. Tricomas tectores; B. Tricoma glandular. Fontes: Duarte & Siebenrock (2016); Ventrella & Marinho (2008).

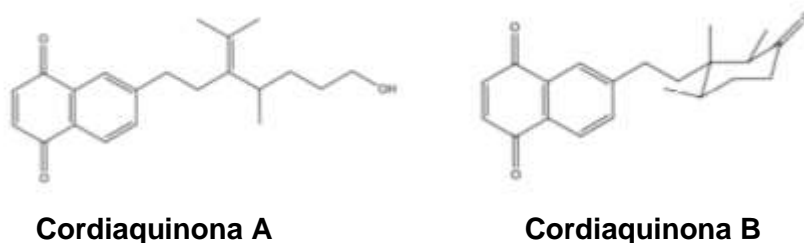
As principais substâncias do metabolismo secundário descritas na literatura são as substâncias fenólicas, terpênicas, esteróides e alcaloides, sendo os terpenos e os alcaloides as principais classes de metabólitos vegetais, essas substâncias representam alto valor econômico, pois, são utilizadas na indústria farmacêutica e cosméticas (Verpoorte, 2000; Castro; Pereira; Paiva, 2009).

Os estudos sobre as estruturas secretoras são de grande importância pois permitem relacionar os aspectos morfoanatômicos, histoquímicos e químicos a identificação dos principais sítios de produção de metabólitos secundários com grande potencial biotecnológico.

## 2.5 Revisão química do gênero *Cordia* e *Varronia*

Como mencionado anteriormente o gênero *Varronia* é resultado da reclassificação de algumas espécies que eram agrupadas anteriormente ao gênero *Cordia*, por isso muitas das revisões trazem os nomes antigos das espécies quando ainda eram classificadas como *Cordia* spp.

O gênero *Cordia* e *Varronia* apresentam características químicas peculiares. A maioria das espécies apresentam uma forma reduzida de quinona composta por apenas uma única unidade terpênica (meroterpenóides e hidroquinonas) que receberam o nome de cordiaquinonas, fazendo alusão ao nome do gênero (Silva, 2013). As cordiaquinonas apresentam um “core” principal constituído por dois anéis aromáticos ligado a uma ramificação linear com um grupamento -OH terminal (cordiaquinona A) ou a uma ramificação cíclica com uma função ester (cordiaquinona B) (Figura 3).

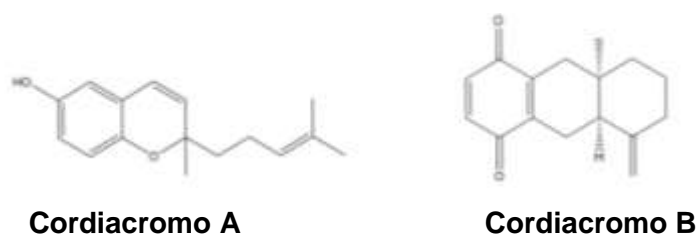


**Figura 3.** Representação da estrutura molecular da cordiaquinona A e cordiaquinona B (Adaptado de Silva, 2013).

As cordiaquinonas são caracterizadas por serem moléculas altamente reativas e apresentarem atividades citotóxicas, antifúngicas, larvicidas e tripanomicida (Parks et al., 2010; loset et al., 2000; loset et al., 1998; Dtrakul et al., 2009; Freitas et al., 2012; Marinho Filho et al., 2010; Vieira et al., 2008). As espécies de *Cordia* que apresentam as cordiaquinonas são: *C. linnaei* e *C. curassavica* (Loset et al., 1998 e 2000); *C. corymbosa* (Bieber et al., 1990 e 1994); *C. polycephala* (Freitas et al., 2012); e *C. leucocephala* (Diniz et al., 2009).

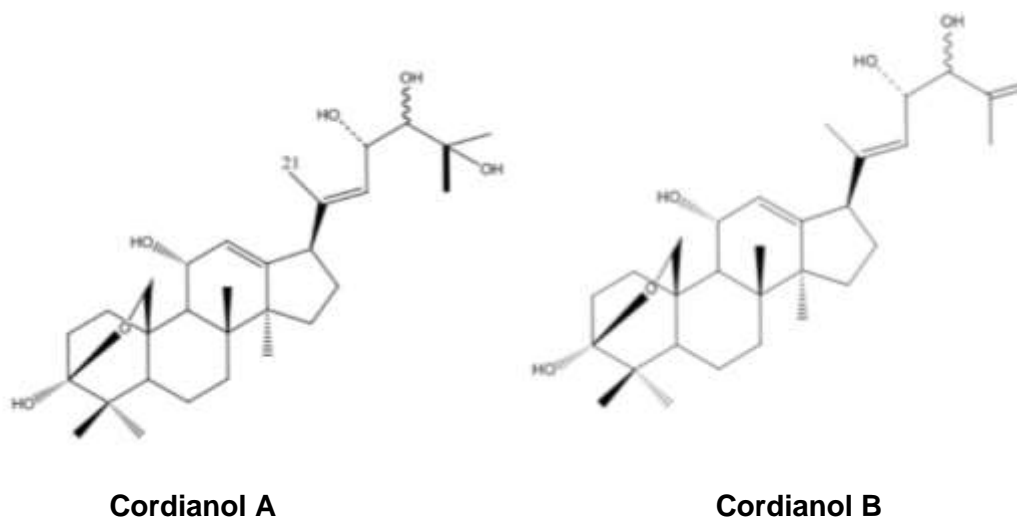
Outras substâncias características do gênero são as benzoquinonas globiferina isoladas de *C. globifera* (Silva 2013) importantes por apresentarem atividades antimicrobianas e citotóxicas (Parks et al., 2010). As hidroquinonas isoladas de *C. fragrantíssima* também merecem destaque por possuem atividade leishmanicida (Mori et al., 2008). Outro grupo importante são as benzoquinonas chamadas de cordiacromos que foram isoladas de *C. millenii* e apresentam atividade antimicrobianas (Kipo et al. 2023). Os cordiacromos apresentam dez isoformas classificadas de A a J (Moir e

Thomson, 1972; Mori et al., 2008; Manners e Jurd, 1977; Dettrakul et al., 2009). A Figura 4 apresenta as estruturas moleculares das isoformas A e B de cordiacromos.



**Figura 4.** Representação da estrutura molecular do cordiacromo A e cordiacromo B (Adaptado de Silva, 2013).

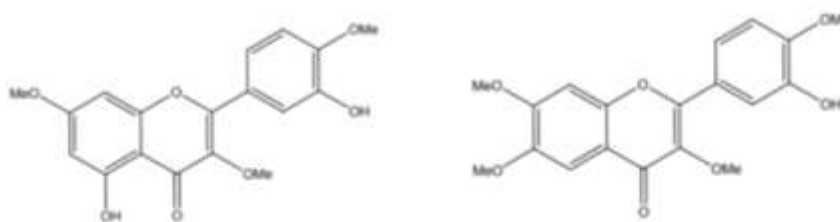
Os triterpenos é outra classe química majoritária em espécies pertencentes ao gênero *Cordia* e *Varronia*. Os triterpenos foram encontrados em *C. spinescens* (Nakamura et al., 1997), *C. piauiensis* (Santos et al., 2005), *C. verbenacea* (Vincent et al., 1982) e *C. multispicata* (Kuroyanagi et al., 2003; Kuroyanagi et al., 2001). Esses triterpenos foram classificados em 27 grupos diferentes, sendo dez com esqueletos damarano (cordianóis A-I e cordialina A) (Figura 5), seis de esqueleto ursano, e sete que apresentam esqueleto diversificado (ácido lantanólico, ácido 3- epimólico, ácido lântico, icterogenina, lantadeno A, lantadeno B, ácido ursômico e ácido pomônico) (Silva, 2013).



**Figura 5.** Representação da estrutura molecular dos triterpenos de esqueleto damarano do tipo cordianol A e cordianol B (Adaptado de Silva, 2013).

Adicionalmente, foram isolados diterpenos com atividade nematicida em *C. latifolia* (Bina et al., 2006); sesquiterpenos com atividade anti-inflamatória em *C. trichotoma* e *C. verbenacea* (Medeiros et al., 2007; Menezes et al., 2005); saponinas e derivados das vias dos fenilpropanóides com atividades antifúngica e larvicida em *C. piauiensis*, *C.*

*alliodora* e *C. globosa* (Loiset et al., 2000; Da-Silva et al., 2004; Menezes et al., 2005; Santos et al., 2005); alcaloides pirrolizidínicos e glutarimídicos com atividade citotóxica em *C. myxa* e *C. globifera* (Afzal et al., 2007; Parks et al., 2010), e alguns flavonoides com atividades anti-inflamatórias em *C. multispicata* (Kuroyanagi et al., 2001), *C. polycephala* (Freitas et al., 2012), *C. trichotoma*, *C. dichotoma* e *C. sinensis* (Nawal et al., 2011). A Figura 6 apresenta as estruturas moleculares dos flavonoides mais comumente encontrados em representantes do gênero *Cordia* e *Varronia*: 5,3'-Dihidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona e 5,3'-Dihidroxi-3,6,7,4'-trimetoxiflavona.



**5,3'-Dihidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona**

**5,3'-Dihidroxi-3,6,7,4'-trimetoxiflavona**

**Figura 6.** Representação da estrutura molecular de dois dos flavonoides majoritários de *Cordia* e *Varronia* (Adaptado de Silva, 2013).

## 2.6 Revisão química da espécie *Varronia curassavica*

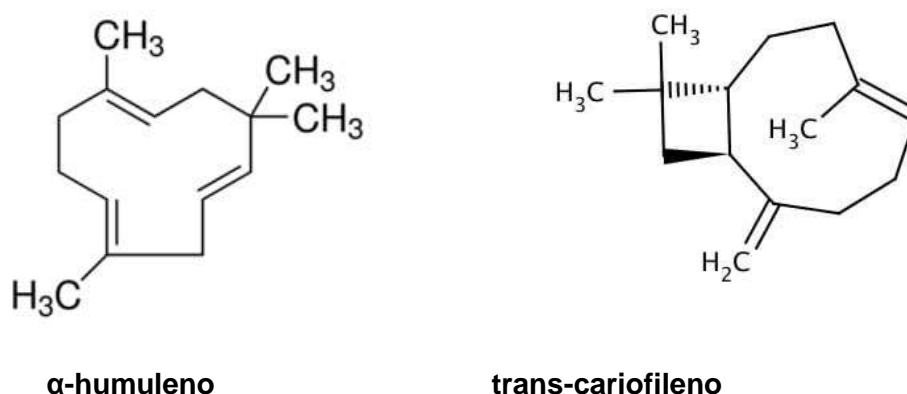
As principais classes químicas identificadas para *V. curassavica* são os ácidos graxos, flavonoides, monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, triterpenos (Gilbert et al., 2022).

Alguns estudos realizados com folhas frescas demonstraram uma alta diversidade de terpenoides, como por exemplo  $\alpha$ -pineno, trans-cariofileno, alo-aromadendreno e  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -felandreno, acetato de citronelol,  $\beta$ -elemeno,  $\beta$ -gurjuneno, biciclogermacreno,  $\delta$ -cadineno, espatulenol e epoxicariofileno (Carvalho Jr. et al., 2004); monoterpenos, sesquiterpenos, cccc-pineno,  $\beta$ -pineno, biciclogermacreno (Santos et al., 2006);  $\alpha$ -santaleno, (E)- $\alpha$ -santalal e (E)- $\alpha$ -bergamotenal (Sciarrone et al., 2017). Segundo Gomes et al. (2019) o  $\alpha$ -humuleno é terpenoide de maior importância encontrada no óleo essencial de *V. curassavica*, sendo considerado um dos seus principais marcadores químicos (Figura 6).

Os terpenos possuem a maior e mais diversificada classe de produtos naturais, que incluem as estruturas tipo C-10 (monoterpenos), C-15 (sesquiterpenos), C-20 (diterpenos), C-30 (triterpenos) e C-40 (tetraterpenos) (Felipe e Bicas 2017). Destes apresentados, os monoterpenos e sesquiterpenos são os responsáveis pelo aroma característico da *V. curassavica* (Farkas & Mohácsi-Farka, 2014). Os diterpenos são os

principais constituintes de oleoresinas (resina e óleo), utilizado nas indústrias cosméticas, na fabricação de perfumes (Hartmann, 2007), os tetraterpenos ou carotenóides dão cores as plantas (Yan et al., 2015; Ferreira, 2019).

Alguns triterpenos, como a cordialina A e B, e o trans-cariofileno também foram isolados de *V. curassavica* (Velde et al., 1982; Fernandes et al., 2022). Gomes et al. (2019) consideram o trans-cariofileno (Figura 7) como o segundo marcador químico mais importante para espécie e destaca a sua importância para fins dermatológicos.



**Figura 7.** Representação da estrutura molecular dos dois principais marcadores químicos de *V. curassavica* (Adaptado de Gomes et al. 2019).

As classes dos flavonoides também foram identificadas, representada principalmente pela flavona artemetina (Sertié et al., 1990; Bayeux et al., 2009) e isoflavonas 7,4'-dihidroxi-5'-carboximetoxi- e 7,4'-dihidroxi-5'-metil-isoflavona (Lameira et al., 2009). Os fenilpropanoides, como o ácido rosmarínico foram extraídos das suas folhas (Hagemel, 2009), enquanto, o ácido cafeico foram encontrados das sementes (Seigler et al., 1970). A presença de ácidos graxos, ácido gama-linolênico, e lipídios cianogênico diéster graxo de hidroximetilacroleína-cianidrina foram extraídos a partir das sementes da espécie (Seigler et al., 1970; Arrebola et al., 2004; Gilbert et al., 2022).

Fernandes et al. (2022) por meio de análises de cromatografia gasosa, acoplada à espectrometria de massas (HS-CG-EM) conseguiu identificar dezessete substâncias da folha de *V. curassavica*: α-pineno; β-pineno; β-cariofileno; γ-adineno; α-gurjuneno; β-mirceno; germacreno B; aloaromadendreno; copaeno; β-bourboneno; β-elemenno; α-humuleno; silvestreno; eucaliptol; hex-2-enal; canfeno; β-ocimeno.

A presença de compostos monoterpenos oxigenados, hidrocarbonetos monoterpenos, sesquiterpenos oxigenados, hidrocarbonetos sesquiterpenos e hidrocarbonetos não terpenos são comumente encontrados em *V. curassavica*, o que

segundo Fernandes et al. (2022) são bons indicativos do potencial biotecnológico da espécie em questão.

## **2.7 Potencial Biotecnológico da espécie *Varronia curassavica***

O potencial biotecnológico da espécie *V. curassavica* é evidenciado através do depósito de patentes e de relatos na literatura. Ao realizar-se busca na Base de Patentes *PatentScope* e Internacional *World Intellectual Property Organization* (WIPO) com as palavras chaves: *Varronia curassavica*, *Cordia curassavica* e *Cordia verbenaceae*, foram encontrados os depósitos de patentes da ACHÉ LABORATÓRIOS FARMACÊUTICOS S/A, relacionados aos processos de obtenção de extratos ativos e de processo de isolamento cromatográfico de  $\alpha$ -humuleno do óleo essencial da espécie, através da palavra-chave *Cordia curassavica*.

A patente BR 122014000828-7 B1 descreve o processo de obtenção de um extrato metanólico ativo de *C. curassavica*, utilizando as folhas frescas, secas à sombra e armazenadas em potes escuros, posteriormente foram processadas, e a partir da realização dos processos, obtiveram diferentes concentrações de extratos metanólicos que apresentaram propriedades anti-inflamatórias, antinociceptivas e imunomodulatórias.

A patente BR 122014000807-4 B1 descreve o processo de obtenção de extrato ativo de *C. curassavica* a partir do acetato de etila, utilizando folhas frescas, secas à sombra e armazenadas em potes escuros e processadas, em seguida foram obtidas diferentes concentrações de extratos de acetato de etila com propriedades anti-inflamatórias, antinociceptivas e imunomodulatórias.

A patente PI 0203068-3 B1 descreve o processo de obtenção de um extrato hidroalcolólico ativo de *C. curassavica*, utilizando folhas secas à sombra e armazenadas em potes escuros, posteriormente processadas, a partir da realização dos processos, onde obtiveram diferentes concentrações de extratos hidroalcolólicos, metanólicos e acetato de etila que apresentaram propriedades anti-inflamatórias, antinociceptivas e imunomodulatórias.

A patente PI 0300600-0 B1 descreve os processos de isolamento cromatográfico de  $\alpha$ -humuleno do óleo essencial da *C. curassavica* e composição farmacêutica, utilizando folhas secas à sombra e armazenadas em potes escuros, posteriormente processadas, a partir da realização dos processos, é isolado do óleo essencial, o seu constituinte  $\alpha$ -humuleno que apresenta propriedade anti-inflamatórias, antinociceptivas e imunomodulatórias, e os produtos obtidos a partir dele.

Diversos estudos também descrevem as atividades biológicas dos óleos essenciais e dos extratos obtidos da espécie *V. curassavica*, e suas respectivas atividades biológicas como pode ser verificado na Tabela 1.

**Tabela 1:** Atividades biológicas descritas para *Varronia curassavica* utilizando diferentes tipos de solventes extratores. (Adaptada de Basting 2018).

<b>Extratos hidroalcolóico</b>	
<b>Atividade Biológica</b>	<b>Referência</b>
1. Não apresentou efeitos tóxicos ou mudanças nos parâmetros do plasma sanguíneo e na função cardíaca após 30 dias da administração oral, sugerindo um efeito não tóxico 2. Ação anti-inflamatória, administrado por via oral ou tópica. Ação protetora da mucosa gástrica	1. Oliveira et al., 1998 2. Sertié et al., 1991
<b>Extratos etanólicos</b>	
<b>Atividade Biológica</b>	<b>Referência</b>
1. Atividade antifúngica 2. Antiulcerogênica 3. Atividade antifúngica moderada sobre <i>Candida albicans</i> e <i>C. krusei</i> e que possui alta toxicidade em bioensaios realizados com <i>Artemia salina</i> 4. Antioxidante 5. Redução da secreção de histamina em células mastócitas de ratos em modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , demonstrando um efeito antialérgico	1. Schlemper et al., 2000 2. Roldão et al., 2008 3. Oliveira et al., 2010 4. Michielin et al., 2011 5. Costa de Oliveira et al., 2011
<b>Extratos metanólicos</b>	
<b>Atividade Biológica</b>	<b>Referência</b>
1. Diminuição na formação de edemas e diminuição da miotoxicidade induzida pelo veneno de <i>Bothrops jararacuçu</i> 2. Eficácia no tratamento de infecções causadas por bactérias, com ação fototóxica contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> 3. Atividade antibacteriana moderada para <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1. Ticli et al., 2005 2. Matias et al., 2010 3. Matias et al., 2016
<b>Extratos obtidos por fluido supercrítico</b>	
<b>Atividade Biológica</b>	<b>Referência</b>
1. Atividade anticâncer, citotoxicidade e a apoptose de células de carcinoma de Ehrlich 2. Atividade <i>in vitro</i> antitumoral na redução, viabilização e proliferação de células tumorais e redução na expressão de COX-2	1. Kwiecinski et al., 2010 2. Parisotto et al., 2012
<b>Acheflan®</b>	

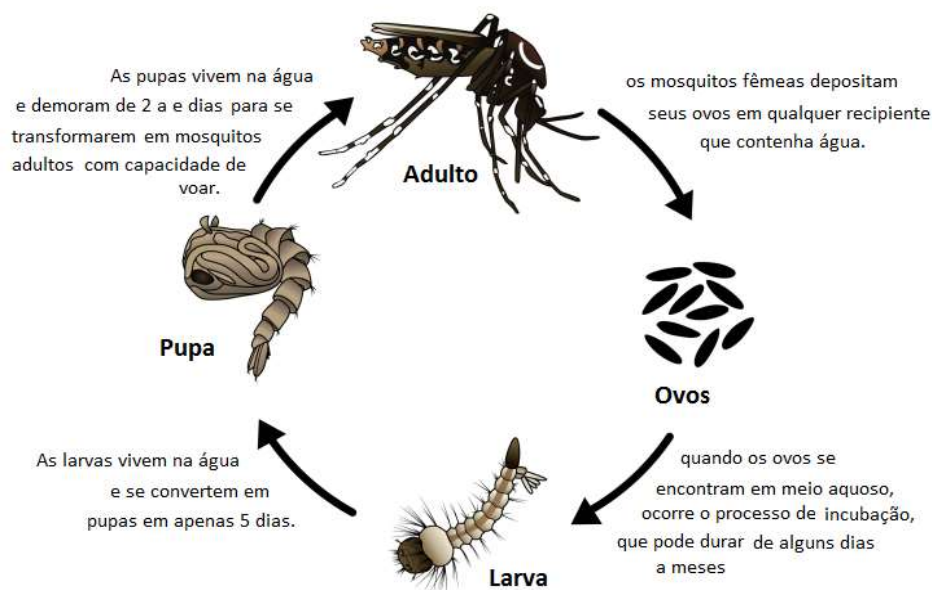
Atividade Biológica	Referência
O fitoterápico Acheflan® demonstrou propriedades terapêuticas para cicatrização de feridas <i>in vivo</i> , provavelmente devido ao seu envolvimento com o aumento da angiogênese e remodelação dérmica.	Perini et al., 2015
Óleos essenciais	
Atividade Biológica	Referência
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Atividade antifúngica</li> <li>2. Antibacteriana para bactérias Gram positivas</li> <li>3. Larvicida para <i>Aedes aegypti</i></li> <li>4. Compostos isolados do óleo essencial: <math>\alpha</math>-Humuleno e <i>trans</i>-Cariofileno apresentaram atividade anti-inflamatória e antialérgica contra veneno de abelha</li> <li>5. Os compostos isolados do óleo essencial <math>\alpha</math>-Humuleno e <i>trans</i>-Cariofileno apresentaram redução do edema de pata em ratos induzido por bradicinina e carragenina, redução da atividade plaquetária. Também reduziram a produção de prostaglandina E2 (PGE2), indução da sintase de óxido nítrico (iNOS) e expressão de Ciclooxigenase (COX-2).</li> <li>6. O composto <math>\alpha</math>-Humuleno apresentou redução do edema de pata induzido por histamina, prevenção da geração do TNF-<math>\alpha</math> e da IL-1<math>\beta</math> na geração do edema</li> <li>7. O composto <i>trans</i>-Cariofileno diminui a liberação do TNF-<math>\alpha</math> na geração do edema de pata</li> <li>8. Os compostos <math>\alpha</math>-Humuleno e <i>trans</i>-Cariofileno inibiram a ativação do NFkB induzida por LPS e migração de neutrófilos em modelo de inflamação aguda na pata induzido por LPS, embora apenas <math>\alpha</math>-Humuleno teve a capacidade de impedir a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF-<math>\alpha</math> e IL-1<math>\beta</math>)1.</li> <li>9. Antibacteriana para as gram-positivas <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 e <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212</li> <li>10. Formulação em gel base provocou o aumento de fibroblastos em pele de ratos Wistar, sem aumento do número de leucócitos, sugerido a redução da reação inflamatória</li> <li>11. Antimicrobiana e antifúngica, apresentando resultados positivos para a inibição de <i>Candida albicans</i> e <i>C. krusei</i> e para as linhagens de bactérias gram-positivas e gram-negativas multirresistentes</li> <li>12. Diminuição da reabsorção alveolar do osso, em modelo de periodontite em ratos, além de reduzir a frequência de detecção de <i>P. gingivalis</i></li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Schlemper et al., 2000</li> <li>2. De Carvalho et al., 2004</li> <li>3. Santos et al., 2006</li> <li>4. Passos et al., 2006</li> <li>5. Fernandes et al., 2007</li> <li>6. Fernandes et al., 2007</li> <li>7. Fernandes et al., 2007</li> <li>8. Medeiros et al., 2007</li> <li>9. Meccia et al., 2009</li> <li>10. Leonardi et al., 2010</li> <li>11. Rodrigues et al., 2012</li> <li>12. Pimentel et al., 2012</li> </ol>

Tendo como base a Tabela 1 é evidente a atividade biológica de *V. curassavica* contra diferentes agentes patogênicos e demais finalidades. No entanto, poucos são os estudos que buscam avaliar os efeitos biológicos da espécie contra larvas do mosquito *A. aegypti*.

## 2.8 *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes aegypti*, pertence à família Culicidae subfamília Culinae, da ordem Diptera, subordem Nematocera, classe Insecta e ao filo Arthropoda (Gadelha & Toda, 1985). É conhecido mundialmente por ser o principal transmissor de importantes arboviroses, responsável por assíduas epidemias e considerado um dos grandes motivos de preocupação de Saúde Pública em todo o mundo, apresentando maior ocorrência nos países subtropicais e tropicais (WHO 1997; WHO 2004), fato que se deve a preferência da espécie aos ambientes de elevadas temperaturas e água acumulada, por serem fatores que proporcionam melhores condições para a eclosão de seus ovos (BRASIL. Ministério da Saúde 2023).

O ciclo de vida do mosquito *A. aegypti*, consistem em quatro estágios: ovo, larva, pupa e a forma adulta (Figura 8). O ciclo é influenciado por condições, como temperatura, recursos alimentares e o quanto de larvas foram depositadas num mesmo recipiente. Esse ciclo pode acontecer de 7 a 10 dias, por isso, recomenda-se a limpeza dos possíveis criadouros do mosquito, como recipientes que armazenam água parada e limpa, dentre outros. (Fiocruz, 2021).



**Figura 8.** Ciclo de vida do Mosquito *Aedes aegypti*. Fontes: Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) e Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

O mosquito possui como característica a cor preta com listras brancas pelo tronco, na cabeça e nas pernas, as asas são transparentes. A fêmea é quem deposita os ovos, sendo assim, ela se alimenta de sangue para que aconteça o amadurecimento dos ovos

que ela deposita em superfícies com água parada e limpa. Por outro lado, o macho da espécie tem as frutas como recurso alimentar. O tempo de vida médio em que o mosquito pode viver é de trinta dias e a fêmea pode colocar de 150 a 200 ovos (Zara et al.; 2016). A transmissão das arboviroses, como a dengue, se dá por meio do depósito de ovos, por uma fêmea contaminada por um dos sorotipos da dengue, causando as epidemias (Ministério da Saúde, 2021).

As epidemias recorrentes causadas pelo *A. aegypti* são referentes às arboviroses, Dengue, Chikungunya, Febre amarela e Zica Vírus (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Lozovei, 2001; Forantini, 2002). Destas, a dengue é uma das mais relevantes mundialmente, sendo conhecidos quatro sorotipos antígenicamente diferentes: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 (Nhantumbo et. al., 2012).

Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), nas Américas, estima-se que em torno de 500 milhões de pessoas estão em risco de contraírem dengue, no ano de 2013 registraram 2 milhões de casos, sendo 37.692 casos da forma grave e 1.280 mortes. A incidência global da doença subiu significativamente nas últimas décadas, onde meio mundo corre risco eminente de contrair a dengue. Ainda de acordo com a OPAS, a detecção precoce reduz para 1% as chances de mortalidade por dengue, as medidas adotadas para o controle do vetor, representam papel fundamental na prevenção da dengue (Organização Pan-Americana da Saúde 2021).

Dada a importância para a saúde pública mundial, diversos estudos com substâncias extraídas de plantas, estão sendo realizados como alternativa ao combate do mosquito *A. aegypti*, representando métodos de controle larvicida e inseticida de origem natural, orgânica ou inorgânica (Rose, 2001; Macoris, 2007). Por representarem fontes de recursos renováveis e mais ecológicos, podem diminuir os resíduos químicos no meio ambiente (Roel, 2001) por meio da substituição de inseticidas químicos que são ainda bastante utilizados (OMS, 2021) e que vem acarretando no desenvolvimento de resistência pelo mosquito.

Devido a essa resistência aos inseticidas químicos, os organoclorados presentes nos inseticidas, foram trocados pelos organofosforados e posteriormente, foram trocados pelos piretróides (Nauen, 2008). Contudo, está sendo relatada a resistência pelo mosquito a essa substância (Zheng et al., 2019). Dessa forma, é crescente a busca por substâncias a base de plantas, com objetivo de aumentar o controle do mosquito e propiciando usos alternativos de diversos inseticidas que inibam a resistência desse vetor (Bertoncelli et al., 2022).

Garcez et al. (2013), descrevem substâncias de origem vegetal com atividades larvicidas contra *A. aegypti*, em sua maioria, oriundas de extratos de raízes. Foram

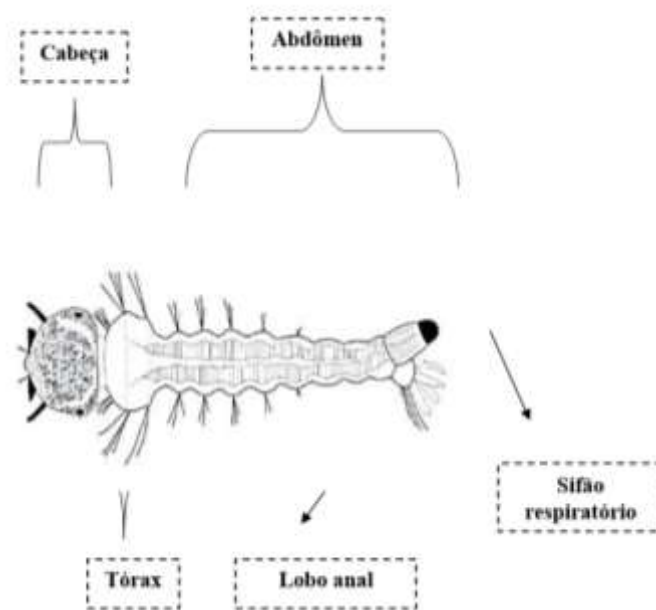
descritas dezoito substâncias da família Fabaceae, treze substâncias da família Rutaceae, onze substâncias da família Piperaceae e oito substâncias da família Boraginaceae. As demais substâncias bioativas estão distribuídas em 16 famílias (Annonaceae, Apiaceae, Asteraceae, Cupressaceae, Erythroxylaceae, Lauraceae, Meliaceae, Monimiaceae, Moraceae, Phymaceae, Simaroubaceae, Sterculiaceae, Targionaceae, Taxodiaceae e Zingiberaceae).

Ainda segundo Garcez et al. (2013), na família Boraginaceae, as oito substâncias com potencial larvicida foram obtidas do gênero *Cordia* (*Varronia*), mais especificamente de três espécies: *C. curassavica*; *C. linnaei*; *C. alliodora*. *C. curassavica*, apresentou cordiaquinona A, cordiaquinona B, cordiaquinona J, cordiaquinona K. Em *Cordia linnaei*, foram identificadas as substâncias cordiaquinona E, cordiaquinona G, cordiaquinona F. Nessas duas espécies as substâncias identificadas como quinonas. Para a terceira espécie, a *Cordia alliodora*, foi identificada a classe de substâncias Fenilpropanoide e a substância 2,4,5-trimetóxi-dihidrocinamoato de metila.

Os óleos essenciais da espécie *V. curassavica*, foi descrito por Santos et al. (2006) por sua ação larvicida contra *A. aegypti*, os autores utilizaram o óleo essencial das folhas da espécie que foram obtidos através de hidroestilação e foram identificados monoterpenos (47,3%) e sesquiterpenos (43,9%), entre os quais  $\alpha$ -pineno (20,5%),  $\beta$ -pineno (13,1%), (E)-cariofileno (12,4%) e biciclogermacreno (13,8%).

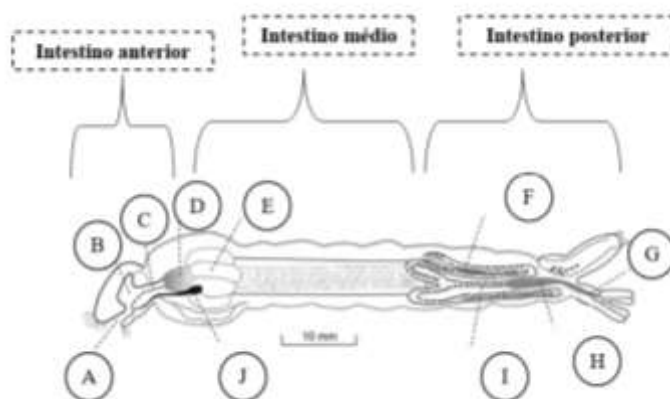
## **2.9 Anatomia externa e anatomia interna da larva do *Aedes aegypti***

Os estágios larvais são chamados de ínstars e correspondem a quatro: primeiro instar; segundo instar; terceiro instar e quarto instar. A anatomia externa da larva possui aspecto vermiforme e corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen (Figura 9). (Consoli & Lorenço-de-Oliveira, 1998).



**Figura 9.** Esquema demonstrando a anatomia externa da larva de terceiro instar de *A. aegypti*. Adaptado de (Lemos, 2016).

Na figura 10 é apresentada a anatomia interna da larva de *A. aegypti*, onde A corresponde a boca, para onde vão os materiais em suspensão na água através de um movimento gerado a partir das escovas orais, que possuem como função o direcionamento do alimento até a boca da larva, esse tipo de alimentação é por filtração. (Consoli & Lorenço-de-Oliveira, 1998). A boca (A), faringe (B), o esôfago (C) e o proventrículo (D) encontram-se no intestino anterior (estomodeu) (Christophers, 1960). A absorção de nutrientes ocorre no intestino médio (mesêntero), é formado por cecos gástricos (E) e se estende até o começo do íleo nos túbulos de Malpighi (F) (Christophers, 1960; Nation, 2008). O intestino posterior (proctodeu) começa nos túbulos de Malpighi (F), formado por íleo, cólon (H) e reto (G), finalizando na região de abertura anal (Christophers, 1960; Clements, 1963).



**Figura 10.** Anatomia interna de larva de *Aedes aegypti*. Trato digestório. A. Boca; B. Faringe; C. Esôfago; D. Proventrículo; E. Cecos gástricos; F. Túbulos de Malpighi; G. Reto; H. Cólon; I. Glândulas salivares. Fonte: Christophers, 1960. Adaptado por (Lemos, 2016).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo gerais

Caracterizar os atributos anatômicos e histoquímicos dos tricomas da folha de *Varronia curassavica* (Jacq.) (Boraginaceae), e identificar substâncias com potencial tóxico contra larvas de terceiro instar de *Aedes aegypti* e alterações morfológicas das larvas.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a anatomia e a composição química dos tricomas;
- Identificar os atributos micromorfológicos e a distribuição dos tricomas;
- Obter extrato bruto metanólico das folhas;
- Realizar partição líquido-líquido do extrato utilizando os solventes em diferentes polaridades: Diclorometano, Acetato, Butanol e Água;
- Avaliar a toxicidade dos extratos e frações frente a larvas de terceiro instar de *A. aegypti*;
- Identificar substâncias da fração mais tóxica através de cromatografia gasosa acoplada à detector de espectrometria de massas (GC-EM) de folhas de *V. curassavica*;

- Investigar possíveis alterações morfológicas no exoesqueleto das larvas de terceiro instar de *A. aegypti* tratadas com as substâncias tóxicas isoladas através de microscopia eletrônica de varredura.

## **4. MATERIAIS E METÓDOS**

### **4.1 Área de estudos**

O estudo foi realizado em área de restinga da Mata Atlântica, na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Fazenda Caruara, localizada no município de São João da Barra – RJ (21°79'71" S, 41°04'25" W). Considerada a maior área de restinga do Complexo Lagunar de Grussaí/Iquipari, com aproximadamente 5.000 ha. O clima da região é do tipo Aw (Alvarez et al., 2013), com inverno seco e verão chuvoso, apresenta precipitação média anual que varia entre 800 e 1200 mm, temperatura média anual que varia entre 20 e 30 °C, umidade relativa do ar de 58%, e déficit de pressão de vapor elevado = 2.2 (KPa). A área de coleta da espécie compreende uma fitofisionomia de moitas espaçadas, sem formação de dossel, com irradiância média de 1368,8 ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (Pireda et al., 2019). O solo é arenoso, com baixa capacidade de retenção de água e pobre em nutrientes (Pireda et al., 2019).

### **4.2 Seleção de espécie e coleta de material**

A escolha da *V. curassavica* como espécie de estudo foi baseada em inventários realizados pela Empresa Prumo para a RPPN Fazenda Caruara, como também através de reconhecimento das espécies na área de estudo, demonstrando uma alta ocorrência da espécie na região. Além disso, levou-se em consideração a quantidade de estudos na literatura sobre a química da espécie. Para estudos da anatomia, estrutura e histoquímica da folha da espécie, foram coletadas folhas aparentemente saudáveis do indivíduo, nos meses de outubro de 2021 e abril de 2022. Cabe ressaltar que exsicata da espécie se encontra depositada no Herbário HUENF, pertencente ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, sob o seguinte registro: HUENF 00013477.

### **4.3 Microscopia óptica**

Para avaliar a anatomia dos tricomas presentes na folha, foram coletadas folhas adultas e aparentemente sem sinais de herbivoria. As folhas foram seccionadas em ápice, terço mediano, base e bordo. Os diferentes fragmentos foliares foram fixados em solução aquosa contendo glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e tampão cacodilato de sódio 0,05M em pH 7.2, a temperatura ambiente (Karnovsky, 1965 modificado por

Da Cunha et al., 2000). Em seguida, os fragmentos foram lavados no mesmo tampão e pós-fixados em tetróxido de Ósmio 1% e tampão Cacodilato de Sódio 0,05M e pH 7,2. Em seguida os fragmentos foram desidratados em uma série crescente de acetona, embebidos e emblocados em resina epóxi (Epon<sup>®</sup> Leica). Secções transversais semifinas de ~ 0.7 µm foram obtidas usando um ultramicrotomo (Reichert Ultracuts Leica Instruments<sup>®</sup>) e coradas com azul de Toluidina 1% em tampão de Bórax 1% (Johansen, 1940). Lâminas permanentes foram montadas em Entellan<sup>®</sup> (Merck, EUA). Todas as imagens foram obtidas em microscópio óptico de campo claro (Axioplan, ZEISS, Alemanha), acoplado a um sistema de captura de imagens (Moticam Pro 282B, Hong Kong).

#### **4.4 Microscopia eletrônica de varredura**

Para avaliar a micromorfologia dos tricomas presentes na folha, os fragmentos foliares do ápice, do terço mediano, da base e do bordo, foram fixados, pós-fixados e desidratados seguindo a mesma metodologia descrita no tópico 4.3. Microscopia óptica. Em seguida as amostras foram submetidas à secagem em ponto crítico de CO<sub>2</sub> (CPD 030, Baltec). Os fragmentos foram então fixados em suportes metálicos com fita de carbono e cobertos com camada de ouro de aproximadamente 20 nm (SCD 050, Baltec, Suíça). As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura ZEISS EVO 40 (Alemanha) com voltagem de 15 kV.

#### **4.5 Testes histoquímicos dos tricomas glandulares**

Para analisar a composição química dos tricomas, os fragmentos foliares do ápice, terço médio, base e bordo, foram fixados em solução aquosa de glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M em pH 7,2 (Karnovsky, 1965 modificado por Da Cunha et al., 2000). Posteriormente foram submetidos a cortes à mão livre para testes histoquímicos (Tabela 1) e examinados em microscópio óptico de campo claro (Axioplan ZEISS).

**Tabela 2.** Reagentes utilizados para os testes histoquímicos realizados para identificar as substâncias presentes nos tricomas da folha de *Varronia curassavica*.

Reagentes	Substância química de afinidade	Coloração	Tempo de exposição
Azul Brillhante de Comassie (Fisher, 1968)	Proteínas	Azul	3 minutos
Cloreto Férrico (Johansen, 1940)	Substâncias fenólicas não estruturais	Marrom a negro	15 minutos
Reagente NADI (David & Carde, 1964)	Óleos essenciais e óleo resinas	Violeta a púrpura	60 minutos
Reagente de Wagner (Furr & Mahlberg, 1981)	Alcalóides	Castanho avermelhado	10 minutos
Sudan IV (Pearse, 1972)	Lipídios	Vermelho	15 minutos
Vermelho de Rutênio (Johansen, 1940)	Pectinas	Rosa brilhante	10 minutos

Obs.: Os protocolos utilizados para as análises em Histoquímica seguem Kraus & Arduin (1997).

#### 4.6 Preparação do extrato bruto metanólico das folhas de *Varronia curassavica*

Após a coleta do material vegetal, realizada em outubro de 2021 na área de estudo, as folhas de *V. curassavica* foram secas por 24 horas em uma estufa com temperatura controlada a 28° C para evitar a contaminação por fungos e posteriormente, trituradas até a obtenção de uma farinha fina, através do moinho de facas (SL – 30 SOLAB), e subsequente peneiramento, através de peneira de malha de 48 mesh. Em seguida, o material vegetal triturado passou por maceração exaustiva, utilizando-se o solvente metanol. Esse procedimento resultou em uma solução que ao ser concentrada, em pressão reduzida no evaporador rotativo, forneceu os extratos brutos. As metodologias referentes à preparação do extrato bruto metanólico até a Identificação das substâncias foi realizada no Laboratório de Ciências Químicas (LCQUI) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Na Tabela 3 encontra-se a quantidade de material coletado e de extrato bruto obtido para a coleta.

**Tabela 3.** Quantidade de material coletado e extrato bruto obtido

<b>Material vegetal</b>	<b>Massa de material coletada (g)</b>	<b>Massa do extrato bruto (g)</b>
Folhas	400	57,605

#### 4.7 Partição do extrato bruto metanólico das folhas de *Varronia curassavica*

Antes do procedimento de separação de substâncias através de técnicas cromatográficas, o extrato bruto metanólico foi submetido a partição líquido-líquido utilizando diferentes solventes a fim de facilitar a separação das substâncias. A primeira partição foi obtida solubilizando o extrato bruto em água e diclorometano. A parte solúvel em diclorometano foi reservada, enquanto a parte solúvel em água foi utilizada para a partição seguinte, onde foi utilizado acetato de etila. Seguindo o mesmo procedimento realizado na primeira partição, a parte solúvel em água seguiu para próxima partição, utilizando-se nesta, o butanol. Desta forma, foram obtidas quatro partições (diclorometano, acetato de etila, butanol e água). Os materiais coletados e as massas de cada partição obtida a partir do extrato, podem ser vistos na Tabela 4.

**Tabela 4:** Quantidade de material obtido em cada partição

<b>Material</b>	<b>Código</b>	<b>Massa (g)</b>
Partição diclorometano	VCD	22,3741
Partição Acetato de etila	VCA	1,1074
Partição butanol	VCB	2,4362
Partição água	VCH	15,2337

#### 4.8 Isolamento e purificação das substâncias

Para realizar o isolamento e purificação de substâncias presentes no extrato bruto metanólico, técnicas cromatográficas clássicas foram aplicadas, tais como: Cromatografia em Coluna (CC) e Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP). Além disso, também foi utilizada a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para análise do perfil cromatográfico e Cromatografia em Fase Gasosa. Gel de sílica foram utilizados para realização das análises por cromatografia em coluna. Já na Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP), utilizando, respectivamente, gel de sílica 60 (0,063-0,200 mm) e gel de sílica 60 PF254, ambos da marca Merck. Para execução das análises por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) foram empregues cromatofolhas de alumínio com gel de sílica 60 F254 Merck. Em todas

as técnicas cromatográficas foram utilizados os solventes como fase móvel n-hexano (98,5%), diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  – 99,5%), acetato de etila (AcOEt, 99,5%), acetona (99,5%) e metanol (MetOH, 99,8%). Todos os solventes são da marca Synth. As substâncias foram observadas por irradiação com lâmpada ultravioleta (Spencer) com comprimento de onda de 254 nm e 365 nm e/ou quando revelada com o reagente cromogênico (solução de vanilina sulfúrica 2%), seguido de aquecimento.

#### 4.9 Análises cromatográficas da partição diclorometano obtida do extrato bruto das folhas de *Varronia curassavica*

Os fracionamentos foram realizados de acordo com os ensaios larvicidas que foram bioguiados, realizados segundo a atividade positiva do extrato e suas frações contra larvas de *A. aegypti*. Inicialmente a partição de diclorometano (VCD) foi submetida à Cromatografia em Coluna (CC) com gel de sílica e eluída com hexano:acetona com gradiente de concentração de 0 a 100% de acetona. Foram coletados 81 frascos que foram agrupados em 13 frações, após análise cromatográfica de camada delgada analítica (CCDA). Na Tabela 5 é possível visualizar os dados obtidos a partir dessa análise da partição VCD.

**Tabela 5.** Análise da partição diclorometano

Fração	Código	Massa Fração (g)
0-8	VCFD 1	0,8445
9-16	VCFD 2	0,2911
17-23	VCFD 3	0,1805
24-28	VCFD 4	2,1217
29-34	VCFD 5	1,6597
35-45	VCFD 6	2,2016
46-52	VCFD 7	1,2717
53-59	VCFD 8	1,4540
60-70	VCFD 9	2,2140
67	VCFD 10	0,1990
71	VCFD 11	0,3524
72-78	VCFD 12	0,9082
79-81	VCFD 13	0,2838

#### 4.10 Análise cromatográfica da fração VCFD 11 (0,3524g)

A fração VCFD 11 foi submetida à CC utilizando gel de sílica e eluída com hexano:acetona em concentração crescente de 0 a 100% de acetona. Deste procedimento foram coletados 256 frascos, os quais foram analisadas por CCDA e agrupadas em 6 frações (Tabela 6).

**Tabela 6.** Análise da fração VCFD 11

Fração	Código	Massa Fração (g)
0-79	VCFD 11.1	0,2028
80-126	VCFD 11.2	0,1086
127-180	VCFD 11.3	0,1183
181-220	VCFD 11.4	0,0842
221-255	VCFD 11.5	0,1159
256	VCFD 11.6	0,0443

#### 4.11 Identificação das substâncias na fração mais ativa VCFD 11.6 (0,0443) por análises espectroscópicas e espectrométricas

A fim de identificar as substâncias na fração mais ativa foi utilizada a seguinte técnica espectroscópica: Espectrometria de Massas acoplada à Cromatografia Gasosa (CG/EM) comparado com os espectros fornecidos pela biblioteca (NIST/EPA/NIH).

Os espectros de massas foram obtidos por cromatografia gasosa (modelo 7890A) acoplada ao espectrômetro de massas (modelo 5975C Inert XL EI/CI/MS), sendo ambos os equipamentos da marca Agilent Technologies. Para a realização das análises utilizou-se coluna HP-5ms (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de filme de (5% fenil) - metilpoli siloxano). Foi injetado 1 µL de amostra por meio de um injetor automático (modelo 7693A), utilizando uma seringa de 10 µL, em modo de divisão (split) 1:10, a 280 °C. Programação de temperatura do forno: 10°C/min até atingir 280°C, sendo 80°C a temperatura inicial. Utilizou-se gás Hélio como gás de arraste em fluxo constante de 1,0mL/min. O detector de massas do equipamento possui modo de ionização por impacto de elétrons (EI) a 70 eV, e operou sob as seguintes condições de temperatura: 280°C na interface, 230°C na fonte de ionização e 150°C no analisador quadrupolo.

#### 4.12 Ensaio Larvicida

O ensaio larvicida dos extratos e frações foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela OMS (2005). As larvas de terceiro instar de *A. aegypti* foram coletadas no Insetário do Laboratório de Biotecnologia (LBT) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). A partir de uma solução estoque inicial (10 mg/mL), onde o extrato metanólico foi solubilizado em DMSO 3%, para preparar as diluições de 0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL e 1 mg/mL para os testes. O experimento consistiu de 10 larvas por concentração e foi realizado em triplicata, totalizando 30 larvas por ensaio. O controle negativo foi feito com H<sub>2</sub>O destilada e DMSO 3%. O controle positivo foi o descrito por Bertonecchi et al. (2022). As larvas foram incubadas nas diferentes concentrações por 24 e 48 h a 28° C. Todas as partições líquido-líquido obtidas do extrato bruto metanólico (AcOET, ButOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O) e as frações obtidas a partir da cromatografia em gel de sílica da partição CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (frações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13) foram testadas na concentração 0,1 mg/ml e controle negativo H<sub>2</sub>O destilada e DMSO 3%. Sendo que, para as partições líquido-líquido utilizamos 10 larvas por partição em um volume final de 20 ml e para as frações cromatográficas utilizamos 5 larvas por fração em um volume final de 10 ml, ambos ensaios foram feitos em triplicata, totalizando 30 e 15 larvas respectivamente. As frações obtidas da cromatografia em gel de sílica da fração VCFD 11 (frações 1, 2, 3, 4, 5 e 6) foram testadas na concentração de 100 PPM. Foi adicionado 3 larvas de terceiro instar para cada 3 ml de solução, ensaios feitos em triplicata totalizando 9 larvas por fração e o controle negativo H<sub>2</sub>O destilada e DMSO 3%. As larvas foram incubadas por 24 h a 28° C. Após esse período de incubação, a mortalidade foi analisada pela movimentação das larvas, sendo estas também observadas em estereomicroscópio. A análise estatística dos dados e LC<sub>50</sub> foram obtidos usando o programa Graph Pad Prism 6.

#### 4.13 Investigação de possíveis alterações morfológicas no exoesqueleto das larvas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As larvas foram fixadas em uma solução aquosa contendo glutaraldeído 2.5%, paraformaldeído 4% e tampão fosfato a 0,1 M. Posteriormente, as amostras foram submetidas a três lavagens com tampão de fosfato 0,1 M por 30 min e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1 % e tampão de fosfato 0,1 M por 1 h, lavadas novamente no mesmo tampão. As larvas foram desidratadas em uma série crescente de acetona (20 %, 50 %, 70 %, 90 % e 3 vezes 100 % super-seco) por 1 h cada etapa, seguida pela secagem em ponto crítico de CO<sub>2</sub> (CPD 030, Baltec). As larvas foram então fixadas em suportes metálicos com fita de carbono e cobertas com camada de ouro de

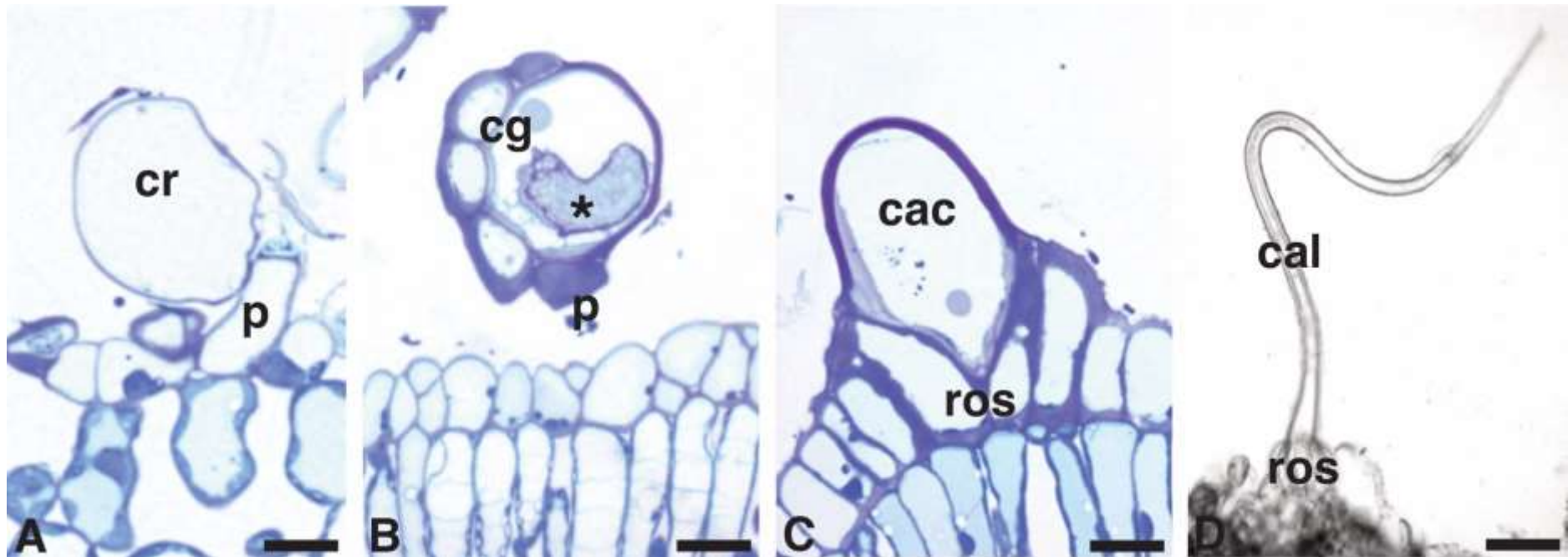
aproximadamente 20 nm (SCD 050, Baltec, Suíça). As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura ZEISS EVO 40 (Alemanha) com voltagem de 15 KVa.

## 5. RESULTADOS

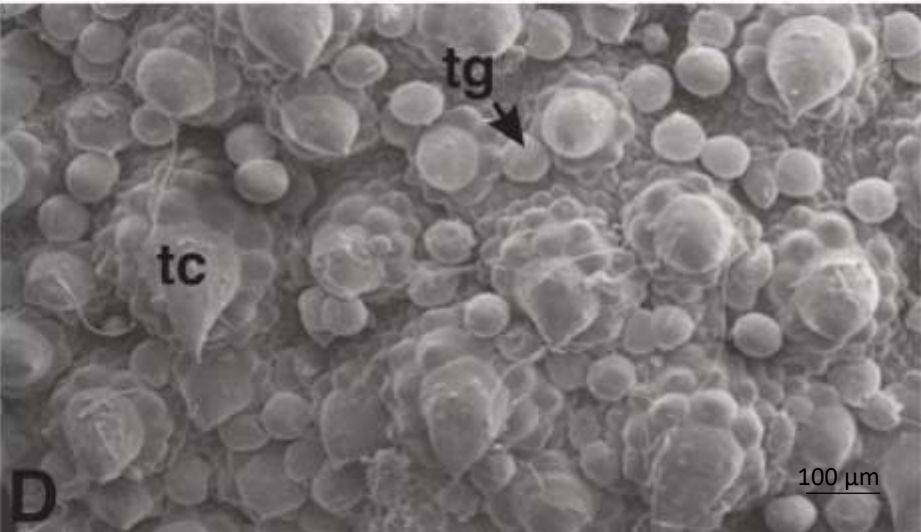
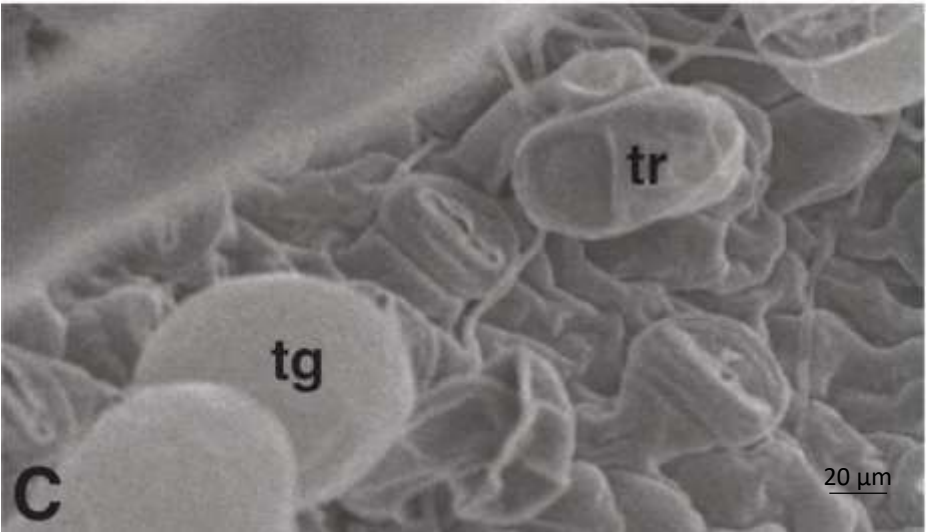
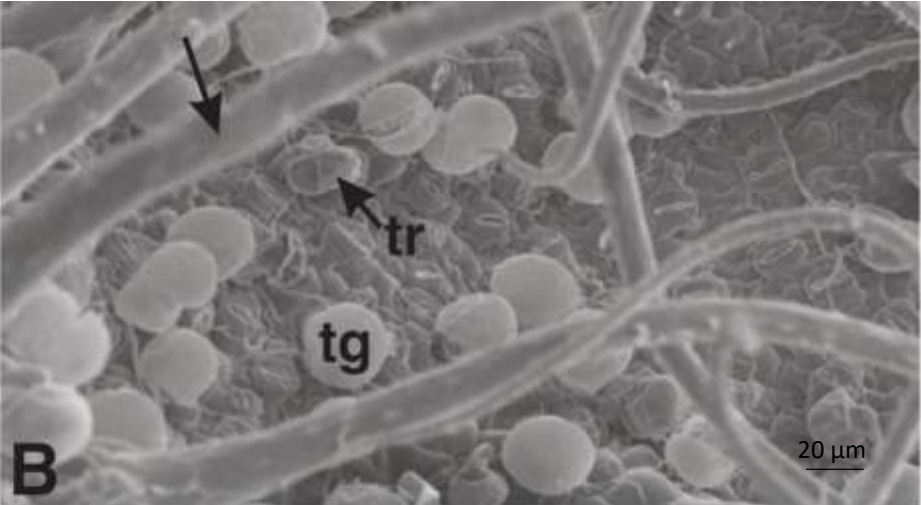
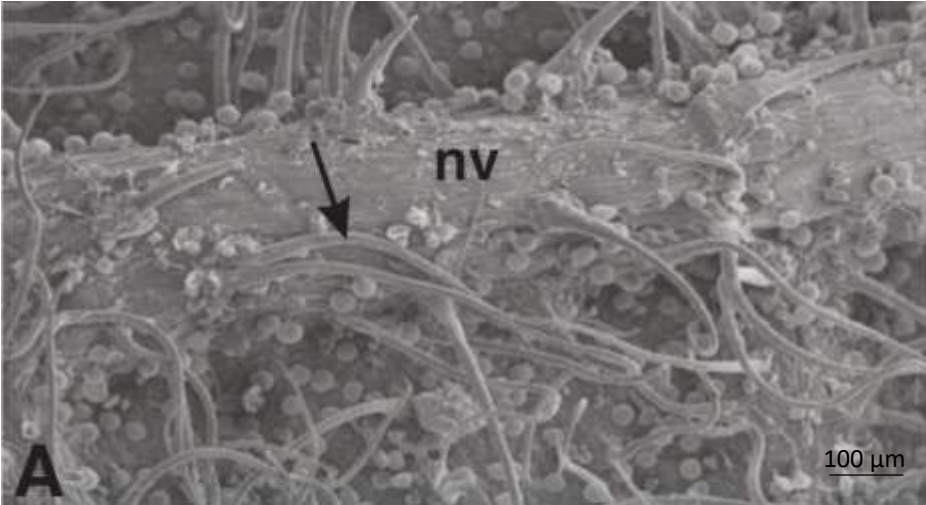
### 5.1 Aspectos estruturais dos tricomas foliares de *Varronia curassavica* (Jacq.) (Boraginaceae)

A folha de *V. curassavica* é caracterizada por apresentar uma grande quantidade e diversidade de tricomas. Através das análises de microscopia óptica foi possível identificar quatro tipos de tricomas. Os tricomas glandulares reniformes, caracterizados por apresentar uma cabeça elíptica unicelular ocupada praticamente por um vacúolo central e um pedúnculo formado por uma ou duas células (Figura 11 A; Figura 12 B e C). Os tricomas glandulares globulares apresentam uma cabeça globular multicelular composta de duas a cinco células, com algumas células contendo elementos da secreção no interior dos vacúolos e um pedúnculo unicelular (Figura 11 B, Figura 12 B, C e D). Os tricomas tectores cônicos curtos são constituídos por uma célula apical mais proeminente e uma base multicelular organizada em forma de roseta (Figura 11 C, Figura 12 D). Os tricomas tectores longos também são constituídos por uma base multicelular em forma de roseta, porém a cabeça é formada por uma única célula alongada (Figura 11 D, Figura 12 A e B).

Os tricomas foram observados em microscopia eletrônica de varredura onde foi possível verificar que os tricomas tectores longos e os glandulares reniformes ocorriam exclusivamente na superfície abaxial, sendo que os tectores longos estavam distribuídos preferencialmente sobre as nervuras foliares (Figura 12 A – C). Os tricomas glandulares globulares ocorrem tanto na face adaxial e abaxial, enquanto, os tricomas tectores cônicos curtos ocorrem apenas na face adaxial (Figura 12 D).



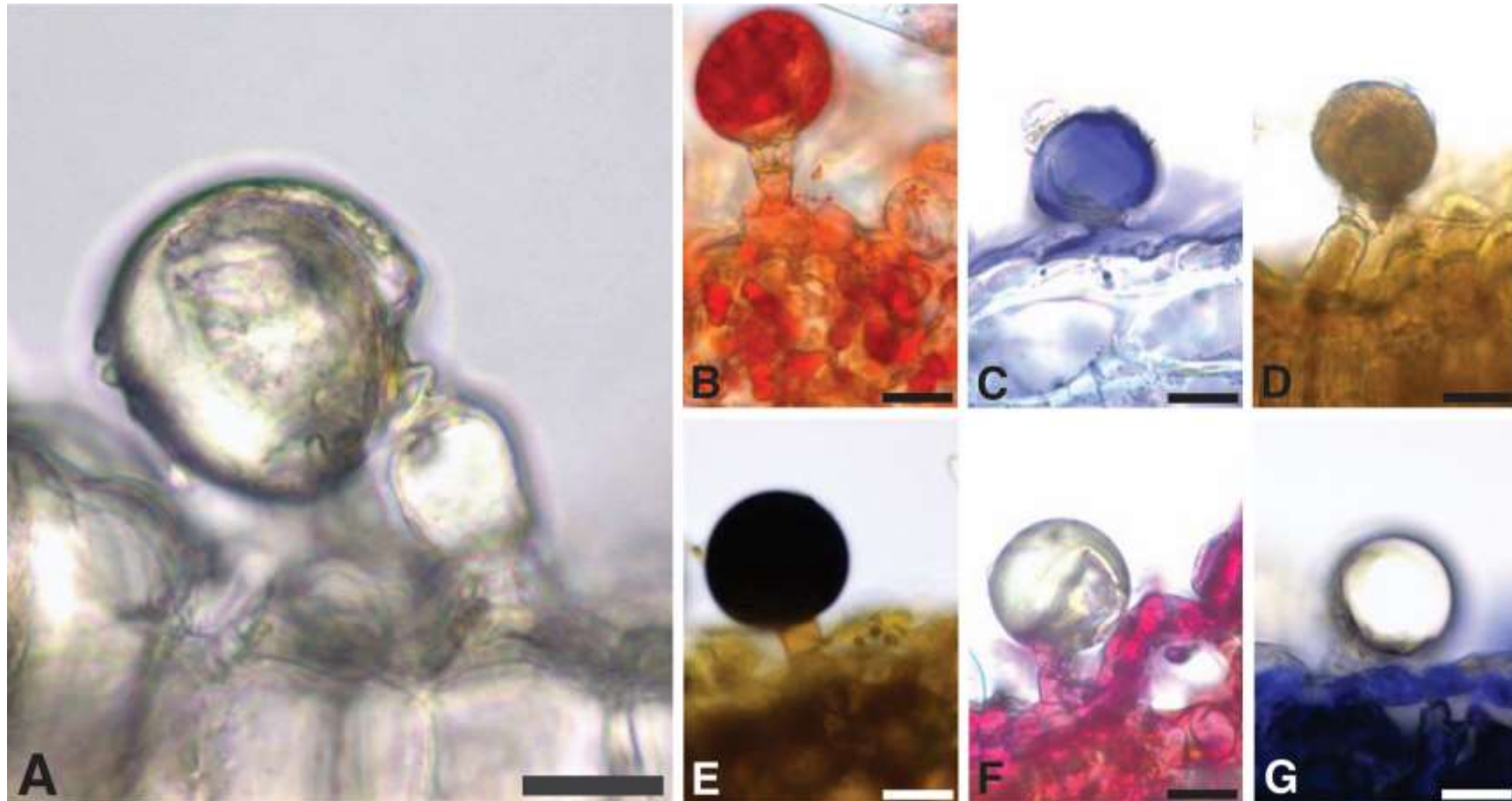
**Figura 11.** Características anatômicas dos diferentes tipos de tricomas presentes na folha de *V. curassavica* obtidos a partir da microscopia óptica. A - tricoma glandular reniforme. B - tricoma glandular de cabeça globular. C - tricoma tector cônico curto. D - tricoma tector longo. cr = cabeça reniforme; p = pedúnculo; cg = cabeça globular; cac = célula apical curta; cal = célula apical longa; ros = células basais em roseta; asterisco = demonstrando a presença de conteúdos da secreção nas células da cabeça dos tricomas glandulares. Barra: A – D: 50  $\mu$ m.



**Figura 12.** Aspectos micromorfológicos dos diferentes tipos de tricomas presentes na folha de *V. curassavica* obtidos a partir da microscopia eletrônica de varredura. A – Superfície abaxial demonstrando a presença de tricomas tectores longos e glandulares globulares sobre as nervuras foliares. B – Superfície abaxial evidenciando a presença dos tricomas glandulares reniformes e globulares dispersos pela lâmina foliar. C – Detalhe dos tricomas glandulares reniformes e globulares. D – Superfície adaxial demonstrando a presença de tricomas tectores curtos e tricomas glandulares globulares. seta = tricomas tectores longos; tr = tricomas glandulares reniformes; tg = tricomas glandulares globulares; tc = tricomas tectores cônicos curtos. Barras: A – 100  $\mu\text{m}$ ; B – 20  $\mu\text{m}$ ; C – 20  $\mu\text{m}$ ; D – 100  $\mu\text{m}$ .

## 5.2 Caracterização histoquímica dos tricomas foliares de *Varronia curassavica* (Jacq.) (Boraginaceae)

Os testes histoquímicos revelaram uma composição mista da secreção dos tricomas glandulares globulares de *V. curassavica*. Levando em consideração a imagem do controle dos tricomas (Figura 13 A) sem nenhum tipo de marcação específica foi possível constatar a partir do teste com Sudan IV que a secreção dos tricomas globulares é rica em compostos lipídios devido a forte marcação em vermelho na cabeça globular (Figura 13 B). O reagente de Nadi também demonstrou uma forte marcação azulada na cabeça globular revelando a presença de óleos essenciais na secreção (Figura 13 C). O teste com cloreto férrico marcou em marrom a cabeça globular evidenciando a presença de compostos fenólicos na secreção (Figura 13 D). O reagente de Wagner demonstrou uma forte marcação em marrom escuro na cabeça globular mostrando uma quantidade considerável de alcaloides na secreção (Figura 13 E). O vermelho de rutênio corou em rosa a região do pedúnculo dos tricomas, mas não reagiu positivamente na cabeça globular (Figura 13 F). Por fim, o teste com azul Brillhante de Coomassie não detectou a presença de proteínas na secreção dos tricomas globulares (Figura 13 G). Na Tabela 7 é apresentado os resultados dos testes histoquímicos de forma resumida.



**Figura 13.** Análise dos constituintes majoritários da secreção dos tricomas glandulares globulares de *V. curassavica* realizados através dos testes histoquímicos em microscopia óptica. A – Imagem controle dos tricomas. B - Sudan IV, evidenciando a presença de lipídios corados em vermelho na cabeça globular do tricoma glandular. C - Reagente NADI, evidenciando a presença de óleos essenciais corados em azul na cabeça globular do tricoma glandular; D - Cloreto Férrico, evidenciando a presença de substâncias fenólicas corados em marrom na cabeça globular do tricoma glandular. E - Reagente de Wagner, evidenciando a presença de alcaloides corados em marrom escuro na cabeça globular do tricoma glandular. F - Vermelho de Rutênio evidenciando a presença de pectina corada em rosa no pedúnculo e reação negativa na cabeça globular do tricoma glandular. G - Azul Brilhante de Comassie, evidenciando a ausência de proteína na secreção dos tricomas. Barras: A – G: 50  $\mu\text{m}$ .

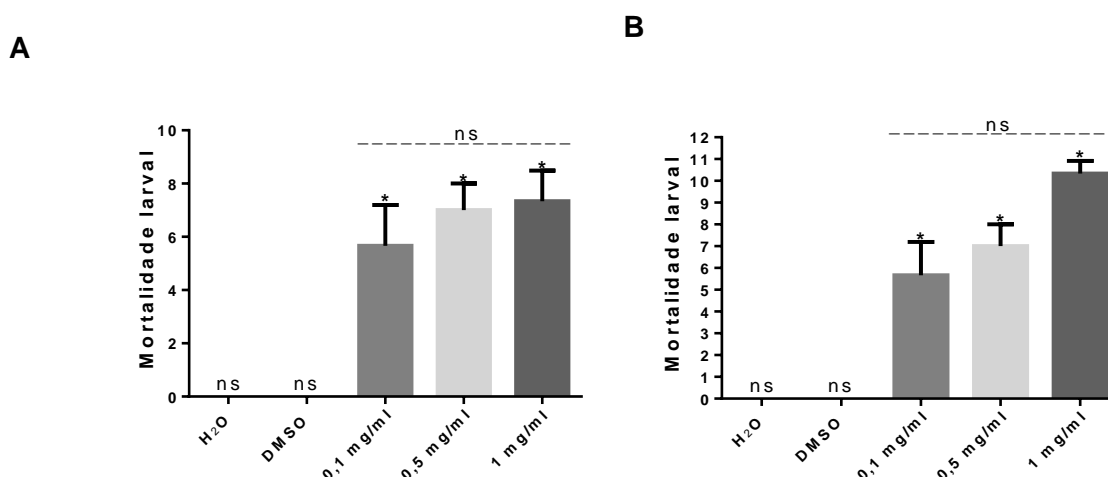
**Tabela 7.** Resultado dos testes histoquímicos realizados para tricomas globulares da folha de *V. curassavica*. Reação positiva (+); reação negativa (-); reação inespecífica (RI).

Reagentes	Substância química de afinidade	Tricoma glandular globular
Azul Brillhante de Comassie (Fisher, 1968)	Proteínas	-
Cloreto Férrico (Johansen, 1940)	Substâncias fenólicas	+
Reagente NADI (David & Carde, 1964)	Óleos essenciais	+
Reagente de Wagner (Furr & Mahlberg, 1981)	Alcaloides	+
Sudan IV (Pearse, 1972)	Lipídios	+
Vermelho de Rutênio (Johansen, 1940)	Pectinas	-

### 5.3 Ensaios Larvicidas

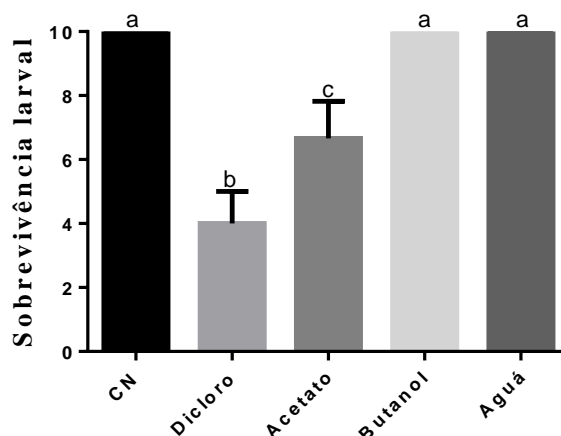
Inicialmente foi avaliada a atividade larvicida do extrato bruto metanólico extraído das folhas de *V. curassavica* contra as larvas de 3º instar de *A. aegypti* utilizando-se diferentes concentrações (0,1 mg/L; 0,5 mg/L; 1 mg/mL ou 100 PPM, 500 PPM e 1000 PPM) e os controles negativos (H<sub>2</sub>O; DMSO 3%) em dois tempos 24h e 48h (Figura 14 A e B). Os resultados demonstraram que em ambos os tempos a concentração de 1 mg/mL foi a mais tóxica matando em torno de 85% das larvas, seguida da concentração de 0,5 mg/mL que apresentou em torno de 80% de letalidade, da concentração de 0,1 mg/mL que apresentou em torno de 65% de letalidade quando comparados aos controles negativos (Figura 14 A e B).

De acordo com o resultado positivo de letalidade das larvas nas concentrações testadas, deu-se prosseguimento com a realização de partição líquido-líquido do extrato utilizando os solventes AcOET, ButOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, que foram submetidas a ensaio larvicida, na concentração 0,1 mg/ml. Os ensaios larvicidas bioguiaram o processo de isolamento das frações.



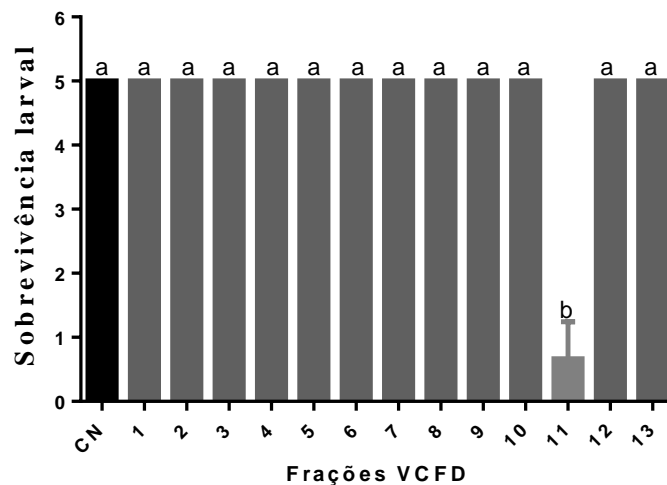
**Figura 14.** Atividade larvicida de diferentes concentrações do extrato bruto das folhas de *Varronia curassavica* contra larvas de 3º instar de *Aedes aegypti*. A – 24 h e B – 48 h. H<sub>2</sub>O e DMSO 3%. Diferenças estatisticamente significativas foram calculadas de acordo com ANOVA (Tukey's múltipla comparação) (A -  $P < 0.0074$ ; B –  $P < 0.0006$ ; ns – não possui diferença significativa). O experimento consistiu de 10 larvas por concentração e foi realizado em triplicata, totalizando 30 larvas por ensaio.

O próximo passo consistiu em avaliar a atividade larvicida das partições líquido-líquido obtidas a partir do extrato bruto metanólico utilizando os solventes AcOET, ButOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O na concentração (0,1 mg/ml) e os controles negativos H<sub>2</sub>O e DMSO 3%. O resultado obtido a partir desse ensaio demonstrou que as frações que apresentaram atividade larvicida foram as de diclorometano com 55% e acetato de etila com 20% de mortalidade larval, indicando que a fração de diclorometano foi a mais eficiente. Por outro lado, as frações de butanol e água não apresentaram letalidade uma vez que não diferiu estatisticamente do controle negativo (CN) H<sub>2</sub>O e DMSO 3% (Figura 15). Posteriormente deu-se prosseguimento com os ensaios larvicidas para as frações obtidas da partição de diclorometano, mais promissora em comparação à partição de acetato de etila.



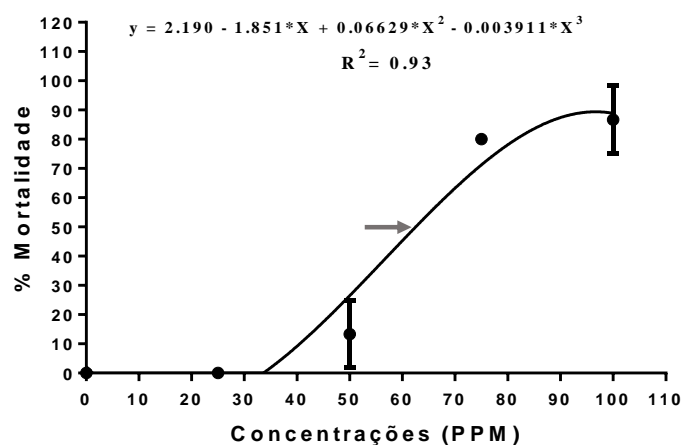
**Figura 15.** Atividade larvicida das partições do extrato bruto das folhas de *Varronia curassavica* contra larvas de 3<sup>o</sup> instar de *Aedes aegypti*. Todas as partições foram testadas na concentração de 0,1 mg/ml por 24 h. Controle negativo H<sub>2</sub>O e DMSO - 3%. Diferenças estatisticamente significativas foram calculadas de acordo com ANOVA (Tukey's multipla comparação) ( $P < 0.0001$ ). O experimento consistiu de 10 larvas por concentração e foi realizado em triplicata, totalizando 30 larvas por ensaio.

De acordo com o resultado de maior letalidade das larvas obtida na partição de diclorometano, foram realizadas cromatografias clássicas para separação das substâncias desta fração. Após as etapas cromatográficas foram obtidas 13 frações que foram testadas para verificar qual apresentava melhor atividade larvicida. Para isso foi adotada uma concentração de 100 PPM por 24h e o controle negativo H<sub>2</sub>O e DMSO - 3%. Apenas a fração VCFD 11 apresentou atividade larvicida resultando em uma letalidade de 85% das larvas de *A. aegypti* (Figura 16). Posteriormente foi realizada uma cromatografia de coluna aberta (CCA) da fração VCFD 11 para separar as substâncias para novos ensaios larvicidas.



**Figura 16.** Atividade larvicida das frações da partição de diclorometano das folhas de *Varronia curassavica* (VCFD) contra larvas de 3º instar de *Aedes aegypti*. Todas as frações (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13) foram testadas na concentração de 100 PPM por 24 h. Controle negativo H<sub>2</sub>O e DMSO - 3%. Diferenças estatisticamente significativas foram calculadas de acordo com ANOVA (Tukey's múltipla comparação) ( $P < 0.0001$ ). O experimento consistiu de 5 larvas por concentração e foi realizado em triplicata, totalizando 15 larvas por ensaio.

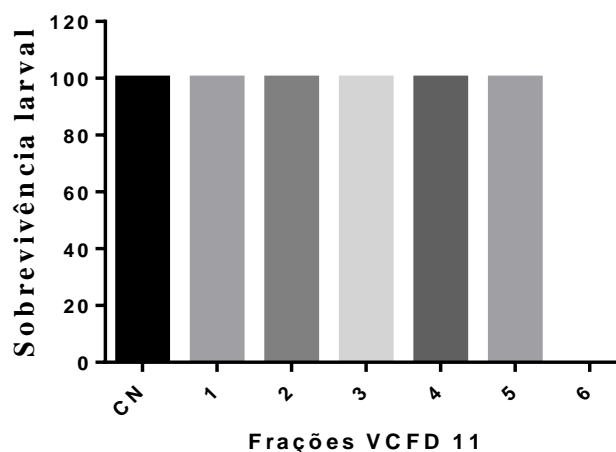
Um novo ensaio larvicida foi realizado para determinarmos o LC<sub>50</sub> da fração VCFD 11 obtida da partição de diclorometano das folhas de *V. curassavica*. Através das análises de regressão polinomial cúbica ( $P < 0,05$ ) foi estimado que o LC<sub>50</sub> da fração VCFD 11 é de 61,25 PPM (Figura 17).



**Figura 17.** % Porcentagem de mortalidade em partes por milhão (PPM) das larvas de 3º instar de *Aedes aegypti*, com a fração 11 (VCFD) da partição de diclorometano das

folhas de *Varronia curassavica* por 24 h. Controle positivo – 100 PPM de espinosade e 0% de sobrevivência. Controle negativo DMSO - 3%.  $LC_{50} = 61,25$  PPM (seta cinza) calculado usando GraphPad Prism 6. Diferenças estatisticamente significativas foram calculadas por regressão não linear polinomial cúbica ( $P < 0,05$ ). O experimento consistiu de 5 larvas por concentração e foi realizado em triplicata, totalizando 15 larvas por ensaio.

A partir da realização de cromatografia clássica para a fração VCFD 11, foram obtidas seis frações que foram testadas na concentração de 100 PPM por 24 h e o controle  $H_2O$  e DMSO- 3%. Como resultado, a fração VCFD 11.6 apresentou 100% de letalidade contra as larvas de 3º instar de *A. aegypti* (Figura 18).



**Figura 18.** Atividade larvicida das frações de VCFD 11 contra larvas de 3º instar de *Aedes aegypti*. Todas as frações (1,2,3,4,5,6) foram testadas na concentração de 100 PPM por 24 h. Controle negativo  $H_2O$  e DMSO - 3%. O experimento consistiu de 3 larvas por concentração e foi realizado em triplicata, totalizando 9 larvas por ensaio.

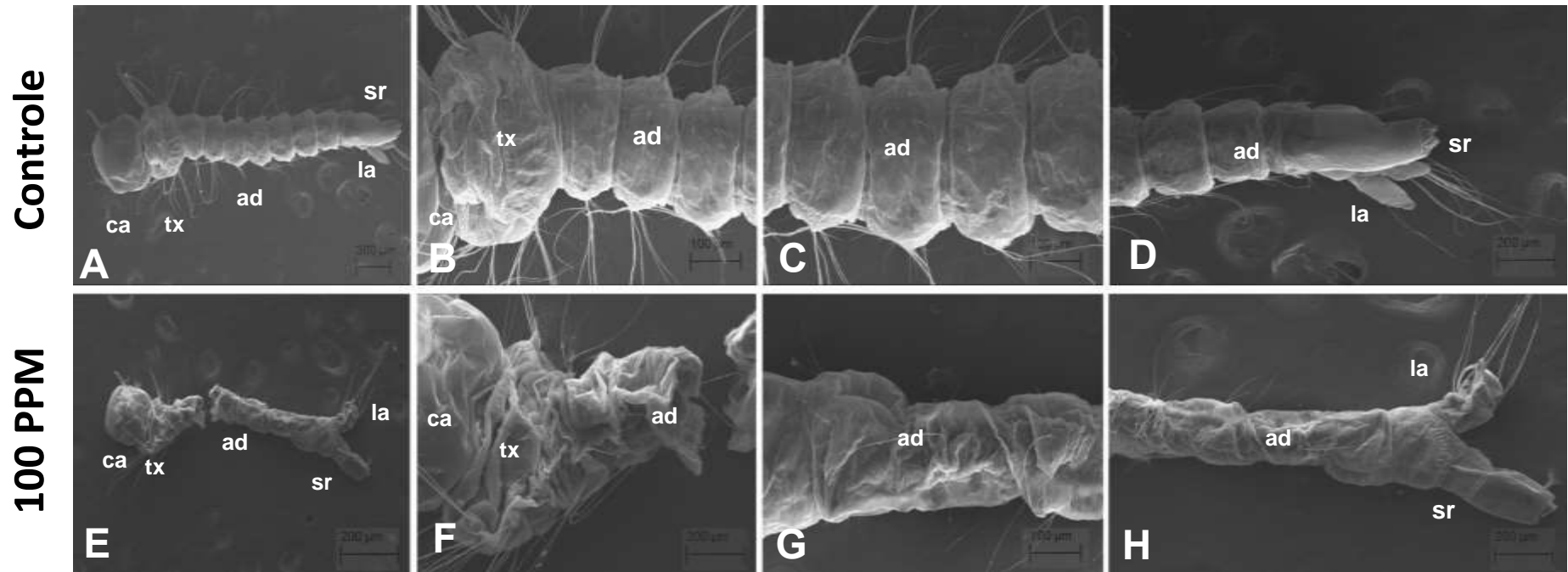
#### 5.4 Efeitos da fração VCFD 11.6 na morfologia do exoesqueleto das larvas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Após verificarmos que a fração VCFD 11.6 era a mais letal para as larvas de *A. aegypti*, as larvas submetidas à essa fração foram coletadas e analisadas em esteriomicroscópio. As larvas submetidas ao tratamento com a fração VCFD 11.6 apresentaram sobreposição da cutícula nos segmentos abdominais, encurtamento corporal, maior fragilidade, e uma coloração mais escura principalmente na região do tórax e sifão respiratório. Em contrapartida, as larvas controle, apresentavam uma aparência transparente, corpo com aspecto alongado e vermiforme, com segmentos bem definidos, e epiderme mais resistente (Figura 19 A e B).



**Figura 19.** Morfologia geral das larvas de 3º instar de *Aedes aegypti* expostas a 100 PPM da fração de VCFD 11.6 por 24 h observadas em estereomicroscópio. A – Larva do controle negativo DMSO 3%. B – Larva tratada com 100 PPM da fração de VCFD 11.6. O experimento consistiu de 3 larvas por concentração e foi realizado em triplicata, totalizando 9 larvas por ensaio.

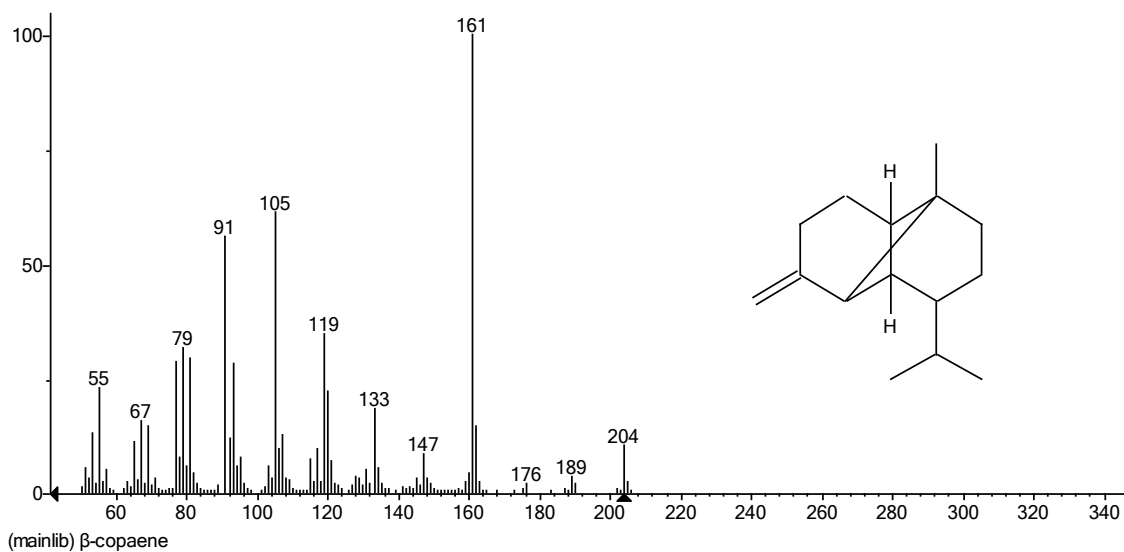
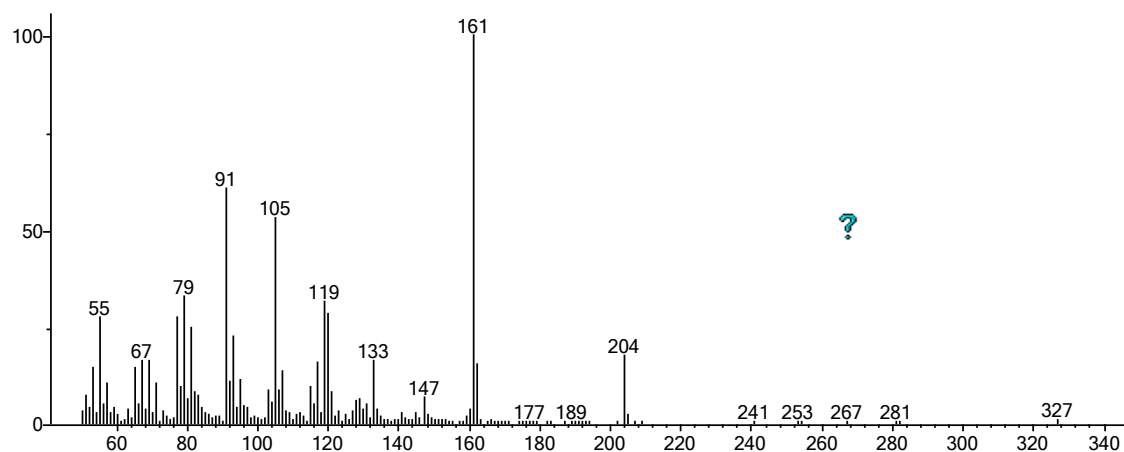
A fim de avaliarmos as alterações micromorfológicas, as larvas submetidas à fração VCFD 11.6 foram observadas através do microscópio eletrônico de varredura. As larvas do controle apresentaram aparência vermiforme e alongada, com os segmentos do corpo bem definidos – cabeça, tórax, abdome, sifão respiratório e lobo anal, exibindo uma morfologia vigorosa, resistente e bem delimitada (Figura 20 A – D). Por outro lado, as larvas submetidas ao tratamento com a Fração VCFD 11.6 apresentaram alterações em tamanho, com aspectos encolhido e curvado e grande fragilidade, o que causou o rompimento do corpo da larva na região abdominal. Além disso foi observada uma ausência da delimitação dos segmentos em todo o exoesqueleto, com destaque ao segmento abdominal. A região do sifão respiratório e lobo anal também apresentaram sinais de encolhimento, perda de segmentação e maior fragilidade (Figura 20 E – H).



**Figura 20.** Aspectos micromorfológicos das larvas de 3º instar de *Aedes aegypti* observados através do microscópio eletrônico de varredura. A a D – Larva controle negativo H<sub>2</sub>O e DMSO 3%. E a H – Larva tratada com 100 PPM da Fração VCFD 11.6. ca = cabeça; tx = tórax; ad = abdome; la = lobo anal; sr = sifão respiratório. Barras: A – 200 µm; B – 100 µm; C – 100 µm; D – 200 µm. E – 200 µm; F – 200 µm; G – 100 µm.

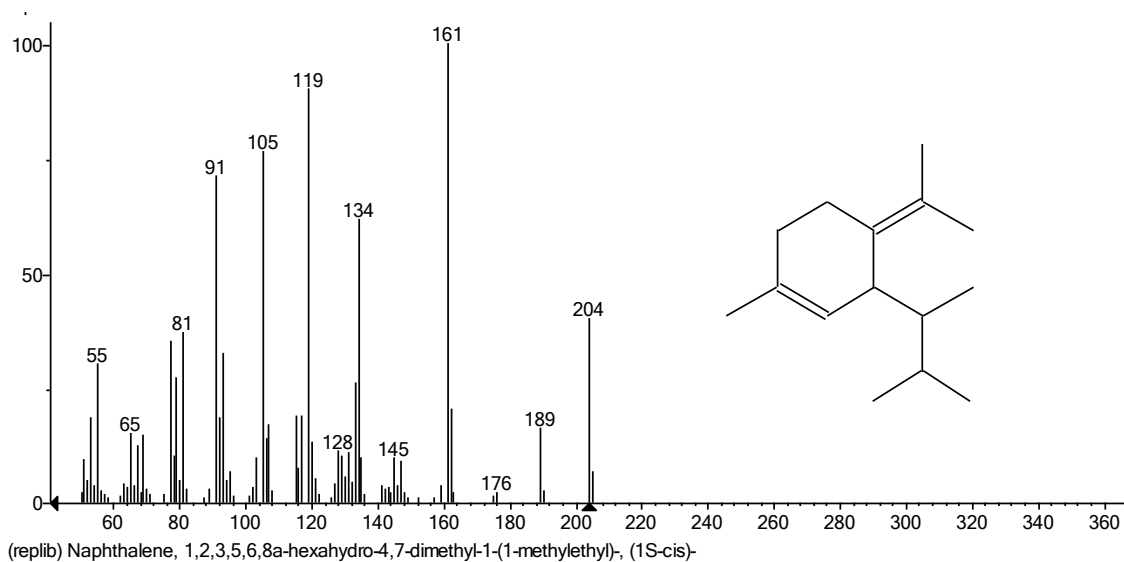
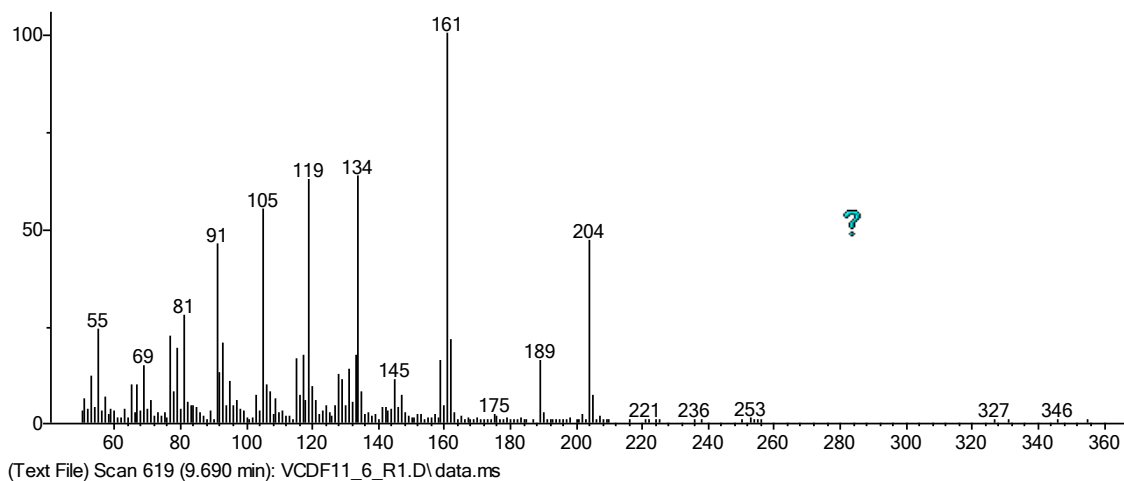


O pico 3 (RT 8.075 min) apresenta o sinal do íon molecular em  $m/z$  204  $[M+]$  (Figura), coerente com a fórmula molecular  $C_{15}H_{24}$ . Os valores dos sinais foram 93% similares aos valores do espectro do  $\beta$ -copaeno disponível na biblioteca (NIST/EPA/NIH) (Figura 22).



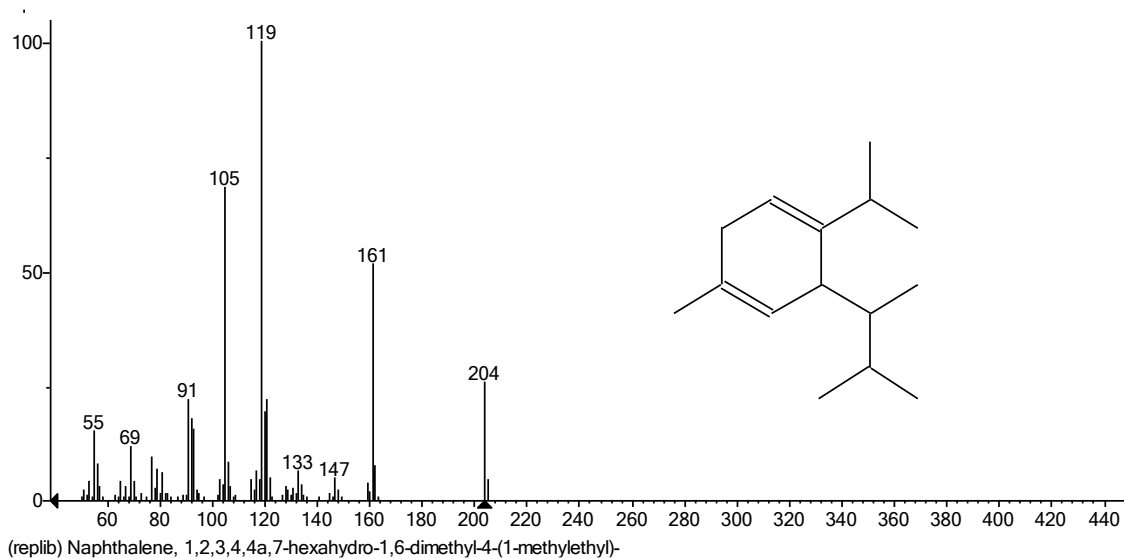
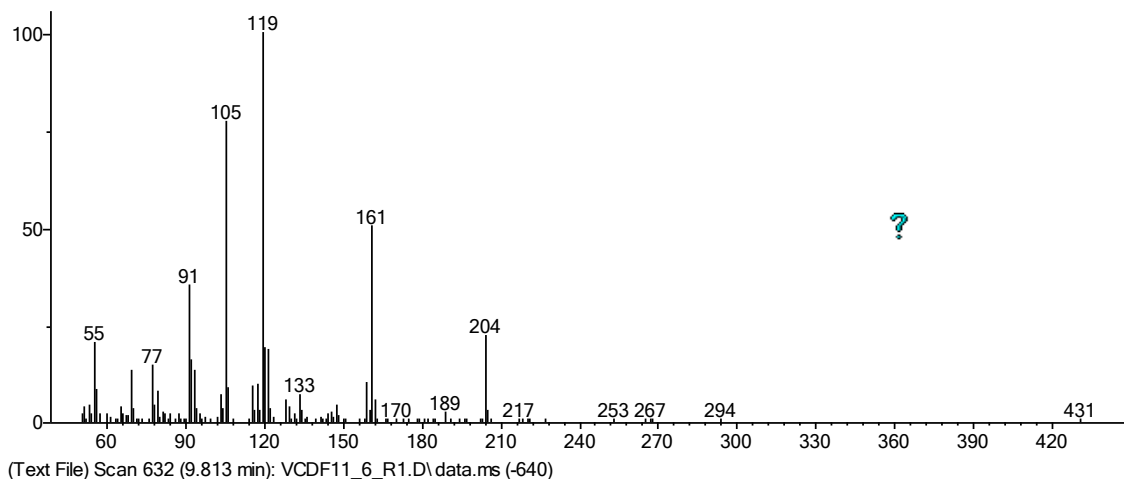
**Figura 22.** Espectro de massas para o pico 3 (RT 8.075 min) da Fração VCFD 11.6 comparado com o espectro de  $\beta$ -copaeno da biblioteca (NIST/EPA/NIH).

O pico 4 (RT 9.685 min) apresenta o sinal do íon molecular em  $m/z$  204  $[M+]$  coerente com a fórmula molecular  $C_{15}H_{24}$ . Os valores dos sinais foram 92% similares aos valores do espectro do  $\delta$ -cadinene disponível na biblioteca (NIST/EPA/NIH) (Figura 23).



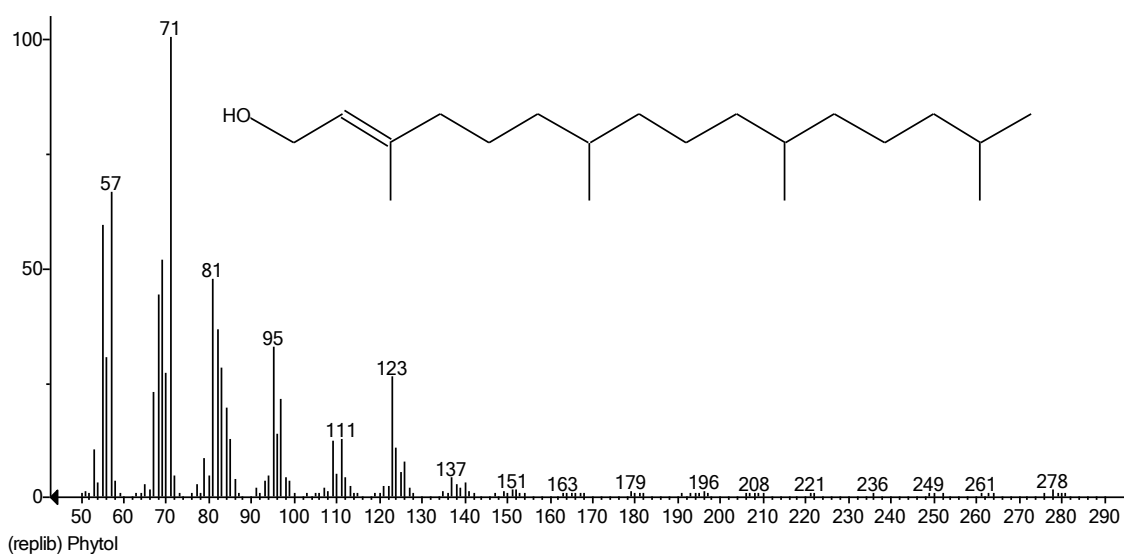
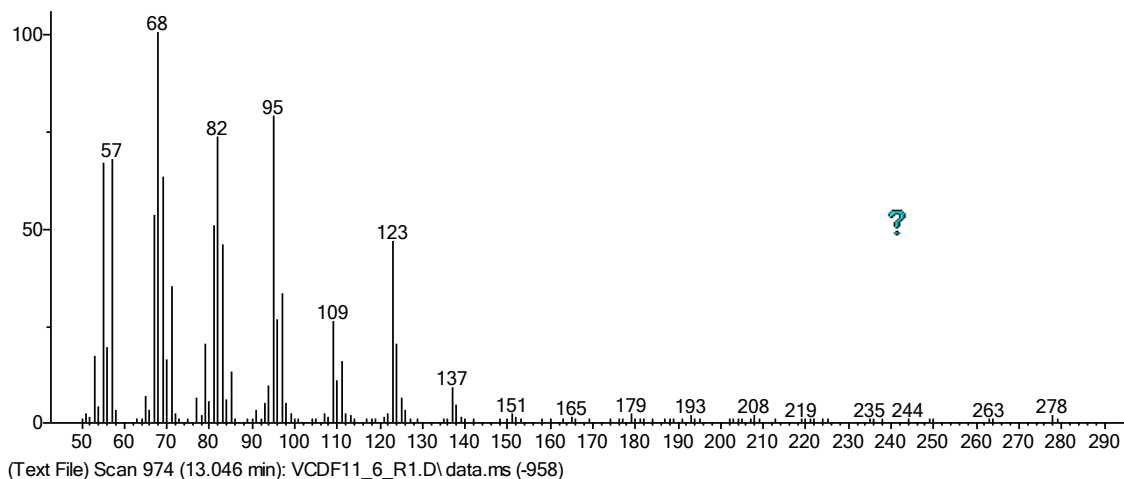
**Figura 23.** Espectro de massas para o pico 4 (RT 9.685 min) da Fração VCFD 11.6 comparado com o espectro de  $\delta$ -cadinene da biblioteca (NIST/EPA/NIH).

O pico 5 (RT 9.816 min) apresenta o sinal do íon molecular em  $m/z$  204  $[M+]$  coerente com a fórmula molecular  $C_{15}H_{24}$ . Os valores dos sinais foram 93% similares aos valores do espectro naftaleno,1,2,3,4,4a,7-hexadidro-1,6-dimetil-4-(1-metiletil) disponível na biblioteca (NIST/EPA/NIH) (Figura 24).



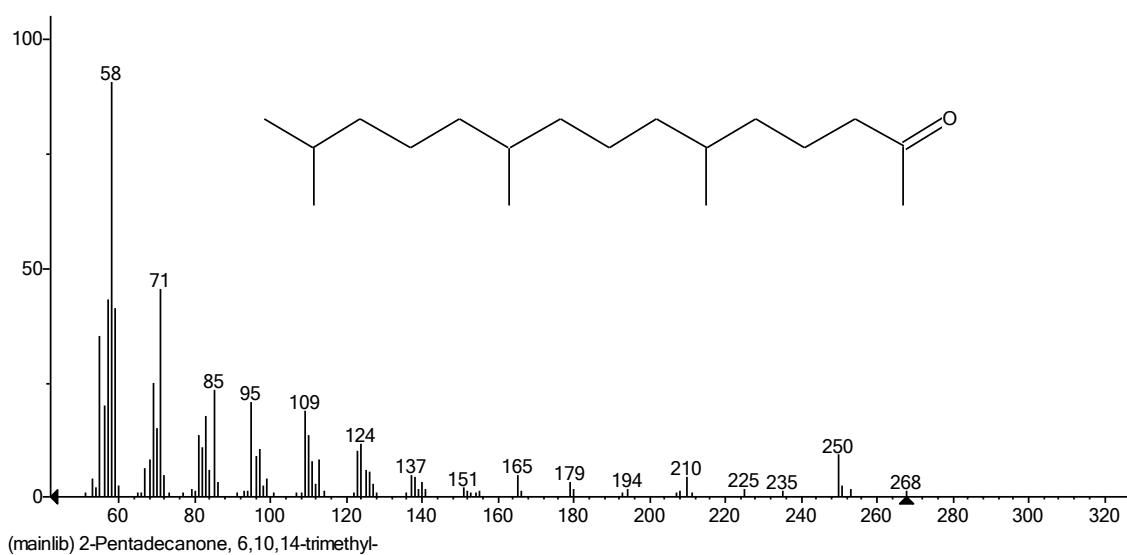
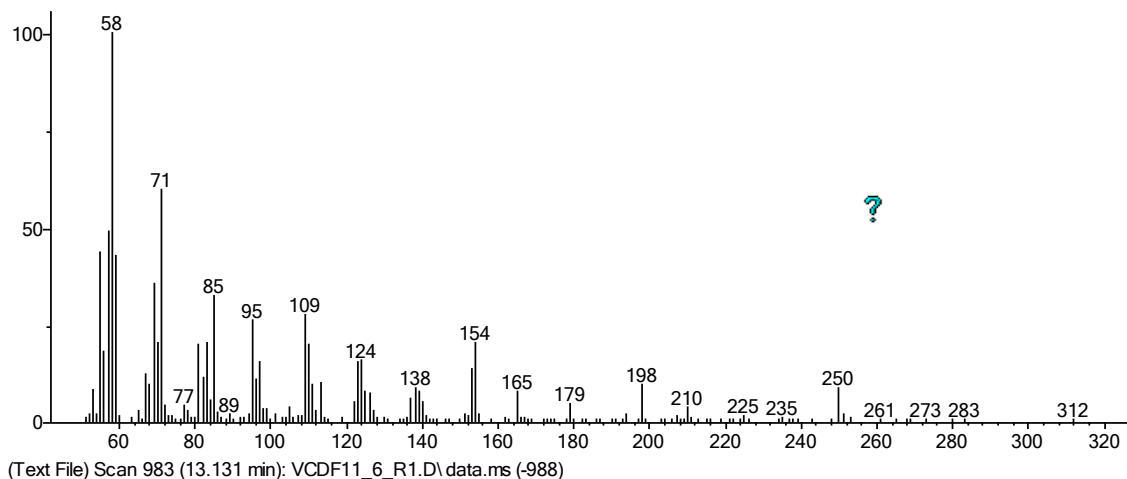
**Figura 24.** Espectro de massas para o pico 5 (RT 9.816 min) da Fração VCFD 11.6 comparado com o espectro de naftaleno,1,2,3,4,4a,7-hexadidro-1,6-dimetil-4-(1-metiletil) da biblioteca (NIST/EPA/NIH).

O pico 6 (13.051 min) apresenta o sinal do íon molecular ausente, coerente com a fórmula molecular  $C_{20}H_{40}O$ . Os valores dos sinais foram 94,4% similares aos valores do espectro do fitol disponível na biblioteca (NIST/EPA/NIH) (Figura 25).



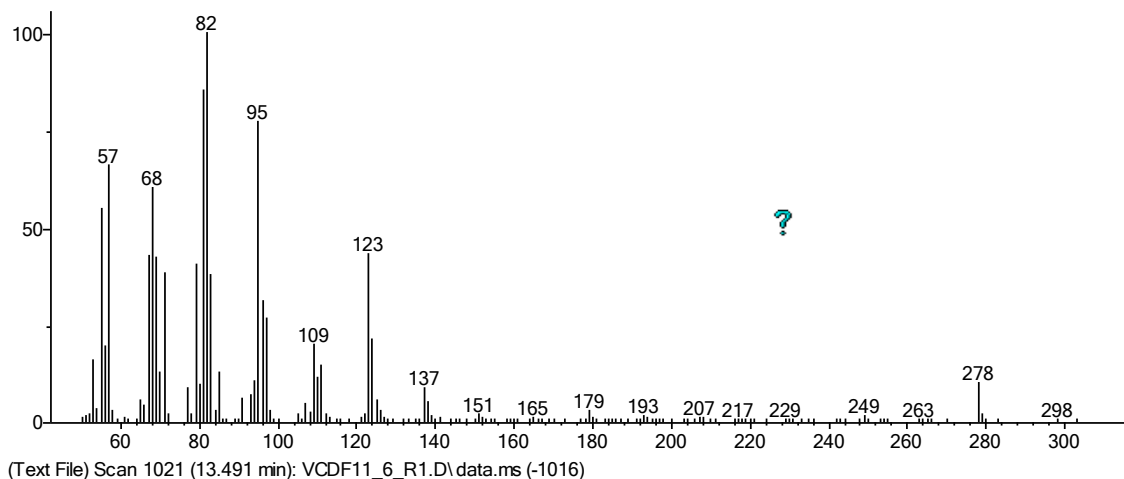
**Figura 25.** Espectro de massas para o pico 6 (RT 13.051 min) da Fração VCFD 11.6 comparado com o espectro de fitol da biblioteca (NIST/EPA/NIH).

O pico 7 (RT 13.123) apresenta o sinal do íon molecular em  $m/z$  268  $[M^+]$  coerente com a fórmula molecular  $C_{18}H_{36}O$ . Os valores dos sinais foram 95% similares aos valores do espectro do hexahidrofarnesil acetona disponível na biblioteca (NIST/EPA/NIH) (Figura 26).



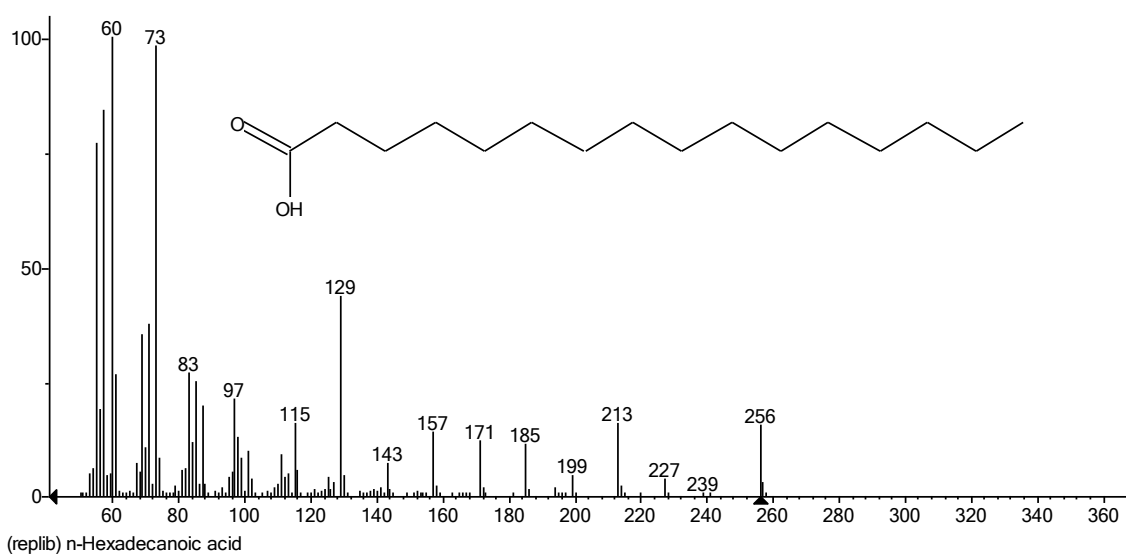
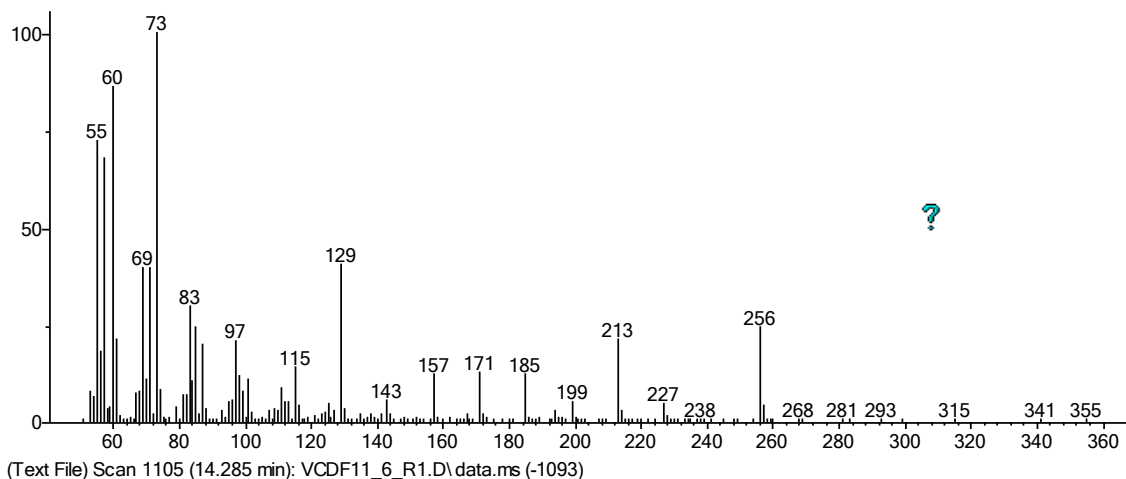
**Figura 26.** Espectro de massas para o pico 7 (RT 13.123 min) da Fração VCFD 11.6 comparado com o espectro de hexahidrofarnesil acetona da biblioteca (NIST/EPA/NIH).

O pico 8 (RT 13.490 min) apresenta o sinal do íon molecular ausente, coerente com a fórmula molecular  $C_{22}H_{42}O_2$ . Os valores dos sinais foram 93,2% similares aos valores do espectro do acetato de fitol disponível na biblioteca (NIST/EPA/NIH) (Figura 27).



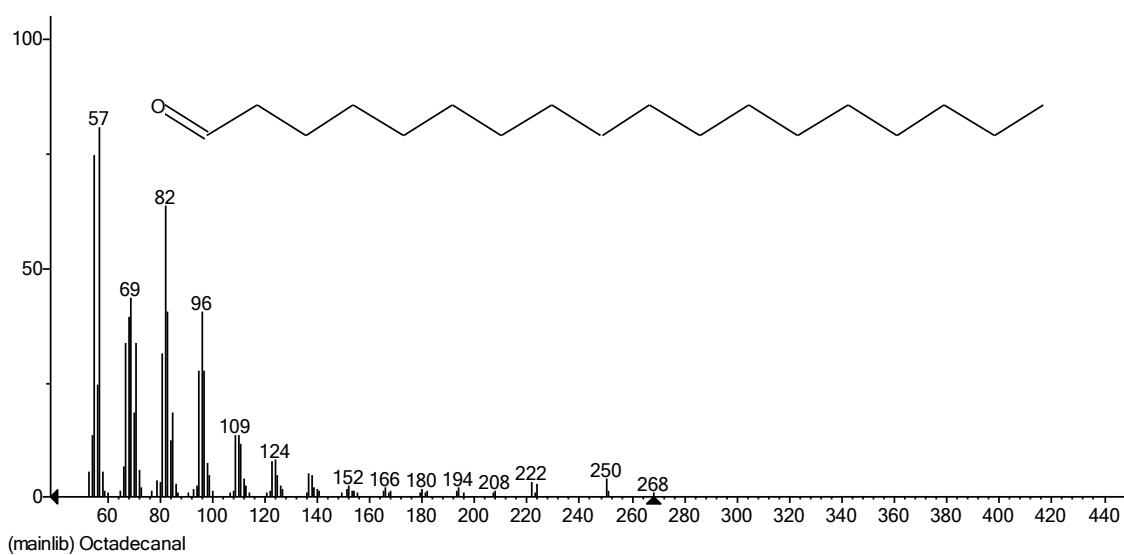
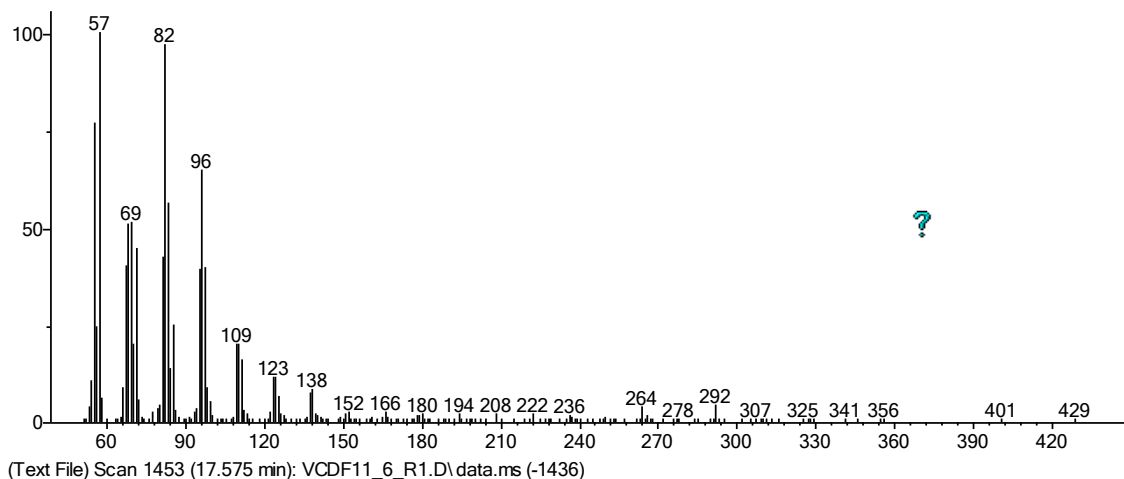
**Figura 27.** Espectro de massas para o pico 8 (RT 13.490) da Fração VCFD 11.6 comparado com o espectro de acetato de fitol da biblioteca (NIST/EPA/NIH).

O pico 10 (RT 14.283 min) apresenta o sinal do íon molecular em  $m/z$  256  $[M^+]$  coerente com a fórmula molecular  $C_{16}H_{32}O_2$ . Os valores dos sinais foram 87% similares aos valores do espectro do ácido hexadecanóico disponível na biblioteca (NIST/EPA/NIH) (Figura 28).



**Figura 28.** Espectro de massas para o pico 10 (RT 14.283 min) da Fração VCFD 11.6 comparado com o espectro de ácido hexadecanóico da biblioteca (NIST/EPA/NIH).

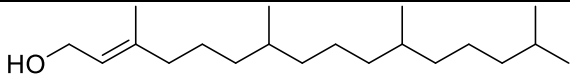
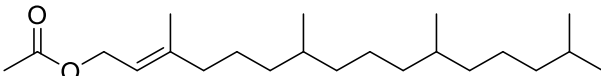
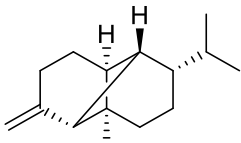
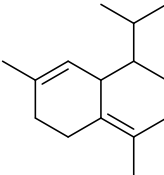
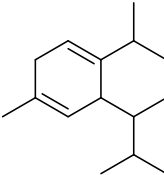
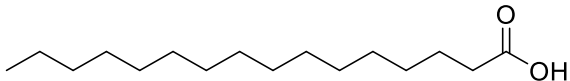
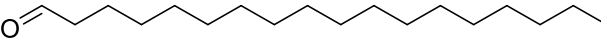
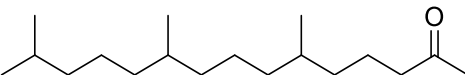
O pico 11 (RT 17.572 min) apresenta o sinal do íon molecular em  $m/z$  268  $[M^+]$  coerente com a fórmula molecular  $C_{18}H_{36}O$ . Os valores dos sinais foram 83% similares aos valores do espectro do octadecanal disponível na biblioteca (NIST/EPA/NIH) (Figura 29).



**Figura 29.** Espectro de massas para o pico 11 (RT 17.572 min) da Fração VCFD 11.6 comparado com o espectro de octadecanal da biblioteca (NIST/EPA/NIH).

Os resultados das análises através da CG-EM da fração VCFD11.6, que foram obtidas da partição diclorometano do extrato bruto metanólico das folhas de *V. curassavica*, permitiu identificar, ao todo, 08 substâncias com porcentagem de similaridade acima de 80% comparado com os espectros disponíveis na biblioteca (NIST/EPA/NIH). Foi possível identificar terpenos e substâncias de outras classes. A Tabela 8 indica a estrutura química, nome, classe, fórmula molecular das substâncias identificadas.

Tabela 8. Substâncias identificadas com CG-EM na fração VCFD11.6.

Estrutura química	Nome	Classe	Fórmula molecular	Fração identificada
	fitol	Terpeno (diterpeno)	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	VCFD11.6
	acetato de fitol	Terpeno (diterpeno)	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	
	$\beta$ -copaeno	Terpeno (sesquiterpeno)	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	
	1,2,3,5,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metietil)-naftaleno	Terpeno (sesquiterpeno)	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	
	$\delta$ -cadinene	Terpeno (sesquiterpeno)	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	
	ácido hexadecanóico	Outras	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	
	octadecanal	Outras	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O	
	hexahidrofarnesil acetona	Outras	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O	

## 6. DISCUSSÃO

Nossa pesquisa buscou integrar a caracterização anatômica e histoquímica das folhas de *V. curassavica*, com a bioprospecção de suas substâncias bioativas, que conferiram atividade larvicida contra larvas de terceiro instar de *A. aegypti*. Através desse estudo conseguimos demonstrar que os tricomas glandulares (figura 11 B) são os principais sítios de produção de metabólitos secundários que apresentaram atividade larvicida contra *A. aegypti*.

A presença de múltiplos tipos de tricomas em ambas as faces da folha é uma característica marcante da família Boraginaceae (Metcalf & Chalk 1979). Os tricomas tectores curtos de formato cônico (Figura 11 C) são um dos mais característicos da família e são os responsáveis por conferir o aspecto enrugado da superfície foliar da maioria das espécies de Boraginaceae (Solereider, 1908; Metcalfe & Chalk, 1957; Gottschling, 2003). No caso específico de *V. curassavica* os tricomas tectores curtos estão presentes em abundância apenas na face adaxial da folha sendo o responsável por conferir o aspecto piloso das folhas (Ventrella & Marinho, 2008).

Adicionalmente, a presença dos tricomas tectores longos (Figura 11 D) com células subsidiárias organizadas em forma de roseta dispostas acima da epiderme, também foi encontrado em maior abundância na face abaxial da folha, principalmente sobre as nervuras de *V. globosa* e *V. leucephala*, o que parece ser uma característica taxonômica importante para a família Boraginaceae (Tölkey et. al., 2013 e 2015; Leal-Costa, 2017). Os tricomas tectores geralmente não estão envolvidos diretamente na produção e armazenamento de metabólitos secundários bioativos, embora possam estabelecer ligações covalentes entre elementos da parede celular e compostos fenólicos (Gostin, 2023). No entanto, é uma característica mais relacionada a eventos de fotoproteção e restrições a perda de água pelas plantas do que efetivamente na resistência a estressores bióticos (Karabourniotis & Liakopoulos 2020).

A presença dos tricomas glandulares globulares (Figura 11 B) e reniformes (Figura 11 A) também foi descrito por Leal-Costa (2017) e Ventrella & Marinho (2008) nas folhas de *V. curassavica*. No entanto, os autores demonstraram que a distribuição desses tricomas ocorriam em ambas as faces foliares, o que difere dos nossos resultados, uma vez que, identificamos a presença dos tricomas reniformes apenas na face abaxial das folhas. Essa diferença na distribuição dos tricomas pode ser justificada pela plasticidade apresentada pela espécie em decorrência das variadas condições ambientais as quais estão submetidas (Feijó et al., 2014).

Em geral, os tricomas glandulares são descritos como sítios de produção e armazenamento de metabólitos secundários, como óleo essencial, que são responsáveis pelas atividades anti-inflamatória, antimicrobiana e larvicida de *V. curassavica* (Carvalho Jr. et al., 2004; Ventrella & Marinho, 2008; Feijó et al., 2014; Santos et al., 2006). A externalização da secreção dos tricomas glandulares ocorrem pelo rompimento das cabeças em regiões mais sensíveis da cutícula ou através de poros (Ascensão & Pais, 1987; Figueiredo & Pais, 1994; Ascensão et al., 1995; Serrato-Valenti et al., 1997; Biso et al., 1999). No caso de *V. curassavica* a provável externalização da secreção ocorre através da ruptura da cabeça, uma vez que não foram encontrados poros secretores (Ventrella & Marinho 2008).

Os resultados obtidos através das análises histoquímicas dos tricomas glandulares de *V. curassavica* convergem em grande parte com os encontrados por Ventrella & Marinho (2008), onde compartilhamos a presença de lipídios, óleos essenciais e substâncias fenólicas nos tricomas glandulares globulares.

A marcação positiva para lipídios e principalmente para os óleos essenciais nos tricomas glandulares de *V. curassavica* destacam a bioatividade da secreção desses tricomas. Segundo Sá et al. (2022) óleos essenciais são alvos de diversos estudos que apontam o seu potencial bioinseticida a partir de partes de plantas (Gosh, 2012). Os óleos essenciais são compostos por terpenos lipofílicos, fenilpropanoides ou derivados de hidrocarbonetos alifáticos com cadeias curtas e peso molecular baixo (Viegas Júnior, 2003). Os monoterpenos, diterpenos e sesquiterpenos são um dos principais constituintes dos óleos essenciais e tem demonstrado excelentes atividades inseticidas contra o mosquito *A. aegypti* (Viegas Júnior, 2003; Simas et. al., 2004).

A presença de óleos essenciais em extratos vegetais é uma característica considerada promissora na obtenção de inseticidas botânicos, pois representam menores riscos ao ambiente e menor toxicidade aos seres humanos, além disso, os inseticidas botânicos podem ser produzidos a partir da composição de substâncias bioativas, que em conjunto, agem sinergicamente, reduzindo as possibilidades de desenvolvimento de resistência dos insetos-alvo aos inseticidas (Kumar et al., 2020; Goodarzi et al., 2019; Bilal et al., 2017; Sá et al., 2022).

Para ser considerado um extrato ativo, devem apresentar LC<sub>50</sub> na concentração de 100 µg/mL ou 100 PPM (Koma lamisra et al., 2005; Cheng et al., 2003). Sendo assim, neste presente trabalho, realizamos a extração total dos metabólitos secundários das folhas de *V. curassavica*, utilizando metanol 100% e o extrato bruto foi submetido ao ensaio larvicida contra as larvas de terceiro instar de *A. aegypti*, mostrando-se um extrato ativo, visto que, apresentou LC<sub>50</sub> de 100 µg/mL ou 100 PPM (Figura 14). Por

isso, demos seguimento ao isolamento bioguiado das substâncias que apresentam tal potencial larvicida. Para isso, fizemos as partições líquido-líquido e observamos que apenas a partição de diclorometano foi capaz de reduzir a sobrevivência larval em aproximadamente 50% (Figura 15), sendo, portanto, considerada um extrato ativo como relatado anteriormente.

Na literatura são descritos trabalhos que demonstram a atividade larvicida para *A. aegypti* de extratos vegetais, de acordo com Bakar et al. (2018), o extrato metanólico da espécie *Melaleuca cajuputi* apresentou  $LC_{50} = 183 \mu\text{g/mL}$ . Hari & Mathew (2018), relataram  $LC_{50} = 50 \mu\text{g/mL}$  para extrato de derivado de éter de petróleo de *Tecoma stans*.

Em seguida, com o fracionamento da partição diclorometano obtivemos 13 frações (VCFD 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13), dentre estas, a fração VCFD 11 foi a que mostrou potencial larvicida contra larvas de terceiro instar de *A. aegypti*, apresentando  $LC_{50} = 61,25 \text{ PPM}$  (Figura 17), mostrando melhor atividade larvicida do que os resultados apresentados por Santos et al. (2006) para óleo essencial de *V. curassavica* e *Cordia leucomalloides* que relatou  $LC_{50} = 97,7 \mu\text{g/mL}$  e  $63,1 \mu\text{g/mL}$  respectivamente. Fizemos então um novo fracionamento da fração VCFD 11 e obtivemos 6 frações (VCFD 11.1, 11.2, 11.3, 11.4, 11.5 e 11.6) todas elas foram testadas na concentração de 100 PPM e observamos que esta foi a concentração letal, levando a 100% de mortalidade das larvas na fração VCFD 11.6 (Figura 18), enquanto os resultados dos óleos essenciais descritos por Santos et al. (2006) mostrou letalidade de 100% nas concentrações de 500 e 250 PPM para ambas as espécies estudadas. Dessa forma, concluímos que o método de fracionamento bioguiado do extrato vegetal de *V. curassavica*, mostrou um melhor resultado como larvicida do que a utilização do óleo essencial da mesma espécie.

Sendo assim, com o objetivo de identificar as substâncias responsáveis por esta promissora atividade larvicida, realizamos CG-EM da fração ativa (VCFD 11.6) (Figura 21) e como resultado foram identificadas as substâncias descritas na Tabela 8. Observamos que a maior parte das substâncias encontradas nessa fração pertencem à classe dos terpenos (diterpenos e sesquiterpenos), estes resultados corroboram com os relatos da revisão de literatura dessa espécie que apontam a classe dos terpenos como substâncias bioativas (Viegas Júnior et al., 2003). Os resultados obtidos nas análises histoquímicas (Figura 13) no presente estudo, evidenciaram que os tricomas glandulares globulares são os responsáveis pela produção e armazenamento dessas substâncias da classe dos terpenos, visto que, estes são os principais constituintes dos

óleos essenciais (Figura 13 C), podendo variar sua composição de acordo com as diferentes condições abióticas (Fracassetti et al., 2019).

Por fim, o presente estudo buscou analisar os efeitos na morfologia das larvas submetidas à fração mais tóxica (VCFD 11.6). Para tal, as larvas foram observadas em estereomicroscópio (Figura 19). Nityasree (2020) descreveu os resultados encontrados na observação das larvas de terceiro instar de *A. aegypti* submetidas ao extrato metanólico de *Solanum lycopersicum* em microscópio óptico: larvas altamente danificadas; enrolamento das larvas; alterações morfológicas diferentes com danos no trato digestivo; danos no trato respiratório; cabeça encolhida com manchas escuras, enquanto que para as larvas do controle, nenhuma alteração foi observada. Os resultados se assemelham aos encontrados nesse estudo. Outro fator concomitante é a composição química do extrato obtido por Nityasree (2020) que identificou o acetato de fitol, mesmo diterpeno identificado no presente estudo para o extrato de folhas de *V. curassavica*. Aciole (2009) submeteu às larvas de terceiro instar de *A. aegypti* ao óleo essencial de *V. curassavica* e observou as alterações morfológicas das larvas, que apresentaram escurecimento elevado na cabeça e em ambas as extremidades do corpo, sendo mais evidente no lobo anal.

A fim de investigar os efeitos micromorfológicos da fração mais tóxica (VCFD 11.6) sobre as larvas de terceiro instar de *A. aegypti* foi realizada a microscopia eletrônica de varredura (Figura 12). Torres (2014) demonstrou que as larvas de terceiro instar de *A. aegypti* submetidas aos óleos essenciais das espécies *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya* apresentaram morfologia corporal e tegumentar intactas, com aspecto de desidratação por todo a epiderme. Os nossos resultados demonstraram que a fração afeta significativamente a estrutura e epiderme das larvas, indicando que a fração composta majoritariamente por sesquiterpenos e diterpenos alteram morfológicamente as larvas de terceiro instar de *A. aegypti*.

O mecanismo de ação dos metabólitos secundários obtidos das plantas, ainda é uma incógnita (Nityasree, 2020). Autores relatam que produtos naturais a base de plantas causa danos ao intestino médio das larvas e danificam a enzima acetilcolinesterase (AChE) (Ramam, 2012; Wang, 2019). Segundo Yadav (2014) os constituintes fitoquímicos, como os alcaloides, terpenos e substâncias fenólicas isolados ou em conjunto, podem causar a destruição dos mosquitos, agindo como repelentes, larvicidas ou agentes de oviposição. Já o comportamento lento, quase estático das larvas, pode estar relacionado a ação das substâncias no sistema nervoso da larva, causando dificuldades na movimentação, o encurtamento e encurvamento apresentado no corpo

da larva, pode ser devido a contrações musculares, o escurecimento visto em estereomicroscópio, principalmente nas extremidades do corpo larval, pode ser devido à sobreposição das cutículas dos segmentos do abdome (Abed et al., 2007).

## 7. CONCLUSÃO

- Os tricomas identificados nas folhas de *V. curassavica* são de quatro tipos: tector longo; tector cônico curto; glandular globular e globular reniforme;
- As análises histoquímicas identificaram a presença de lipídios; óleo essencial; substâncias fenólicas e alcaloides;
- O extrato bruto metanólico das folhas de *V. curassavica* apresentou atividade larvicida promissora contra as larvas de terceiro instar de *A. aegypti*;
- A partição diclorometano foi a que apresentou maior toxicidade contra as larvas de terceiro instar de *A. aegypti*;
- A partir da fração (VCFD 11.6) foram identificadas oito substâncias: fitol; acetato de fitol;  $\beta$ -copaeno; 1,2,3,5,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metietil) -naftaleno;  $\delta$ -cadinene; ácido hexadecanóico; octadecanal e hexahidrofarnesil acetona.
- Apresentando uma mistura complexa da partição diclorometano, com majoritariedade de classes dos terpenos (diterpenos e sesquiterpenos);
- Foi possível relacionar a morfologia e a biologia da secreção pela presença positiva de óleo essencial na cabeça do tricoma glandular globular, visto que foram encontrados terpenos nas análises de CG-EM;
- A fração VCFD 11.6 apresentou alta toxicidade contra as larvas de terceiro instar de *A. aegypti*, onde foram observadas alterações no exoesqueleto, danos na epiderme, cutícula, encurtamento do corpo larval e escurecimento das extremidades;
- Foi possível relacionar a ação sinérgica das substâncias fenólicas, dos terpenos e dos alcaloides com o efeito morfológico da fração VCFD 11.6 nas larvas;
- Os extratos das folhas de *V. curassavica* apresentam potencial biotecnológico de suas substâncias bioativas frente às larvas de terceiro instar de *A. aegypti*.
- A integração de estudos que abrangem diferentes áreas (anatomia, fitoquímica e atividade biológica), nos fornece uma visão ampla sobre as potencialidades biotecnológicas de espécies nativas da Mata Atlântica, destacando a necessidade de ampliarmos os estudos de prospecção de compostos bioativos ainda escondidos na biodiversidade florística inerente desse bioma

## 8. REFERÊNCIAS

1. Abed, R.A.; Cavasin, G.M.; Silva, H.H.G.; Geris, R.G.; Silva, I.G. 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*, v.36, p.87-95, 2007.
2. ACHE. Acheflan. Disponível em: Acesso em: 26 julho 2023.
3. 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). Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente) – Universidade de Lisboa, 2009.
4. Afzal, M.; Obuerkwe, C.; Shuiab, N.; Barakat, H. Photosynthetic pigment profile of *Cordia myxa* L. and its potential in folklore medicinal application. *International journal of food agriculture and environment*, v. 2, p. 114-120, 2007.
5. Almeida-Silva, F., Bernardes-Engemann, A. R., Bérenger, A. L. R., da Silva, V. P., Figueiredo, M. R., & Freitas, D. F. S. (2022). In vitro activity of *Schinus terebinthifolius* extract and fractions against *Sporothrix brasiliensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 117.
6. Almeida, A. A., Lima, G. D., Simão, M. V., Moreira, G. A., Siqueira, R. P., Zanatta, A. C., ... & Leite, J. P. (2020). Screening of plants from the Brazilian Atlantic Forest led to the identification of *Athenaea velutina* (Solanaceae) as a novel source of antimetastatic agents. *International Journal of Experimental Pathology*, 101(3-4), 106-121.
7. Alvares, C. A.; Stape, J.L.; Sentelhas, P.C.; De Moraes Gonçalves, J.L.; Sparovek, G. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, v. 22, p. 711–728, 2013.
8. Alves, L. F. 2010. Plantas medicinais e fitoquímica no Brasil: uma visão histórica. Tese (Doutorado em História das Ciências e das Técnicas e Epistemologia) – Rio de Janeiro, RJ, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
9. Alves, M.A.S., Pacheco, J.F., Gonzaga, L.A.P., Cavalcanti, R.B., Raposo, M.A., Yamashita, C., Maciel, N.C. Castanheira, M., 2000. Aves. Em: A Fauna Ameaçada de Extinção do Estado do Rio de Janeiro. Bergallo, H.G., Rocha, C.F., Alves, M.A. and Van Sluys, M. (Eds.) Rio de Janeiro: Ed. UERJ, 113–124p.
10. Alves, M. et al. Essential Oils Chemical Diversity from UFRRJ Botanical Garden and Other Locations Plants Based on Analysis of Image and Multivariate Statistic. *Revista Virtual de Química*, v. 11, n. 5, p. 1635–1656, 2019.
11. Appezzato-da-Glória, Beatriz; Estelita, Maria Emília Maranhão. Desenvolvimento, estrutura e distribuição de coléteres em *Mandevilla illustris* e *M. velutina* (Apocynaceae). *Revista Bras. Robô*; 23 (2). 2000.
12. Arrebola, M. R. B.; Peterlin, M. F.; Bastos, D. H. M.; Rodrigues, R. F. O.; Carvalho, P. O.; Estudo dos componentes lipídicos das sementes de três espécies do gênero *Cordia* L. (Boraginaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2004, 14, 57.
13. Arruda W, Oliveira GMC, Silva IG. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 17-25, 2003a.
14. Arruda W, Oliveira GMC, Silva IG. Alterações morfológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) submetidas à ação do extrato bruto etanólico da casca do caule da *Magonia pubescens* St. Hil. *Entomol Vect* 10: 47-60, 2003b.

15. Ascensão, L. & PAIS, M.S.S. 1987. Glandular trichomes of *Artemisia campestris* (ssp. *maritima*): ontogeny and histochemistry of the secretory product. *Botanical Gazette* 148:221-227.
16. Ascensão, L. (2007). Estruturas secretoras em plantas: uma abordagem morfoanatômica. In: *Potencialidades das plantas aromáticas e medicinais*. Centro de Biotecnologia Vegetal. Lisboa, Portugal. Disponível em: <http://cbv.fc.ul.pt/PAM/pdfsLivro/LiaAscensao.pdf>.
17. Barreto, C.F.; Cavasin, G.M.; Silva, H.H.G.; Silva, I.G. Estudos das alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindus saponaria* Lin (Sapindaceae). *Revista de Patologia Tropical*, v.35, p.37-57, 2006.
18. Basting, R. T. Avaliação da associação do extrato bruto diclometânico de frutos de *Pterodon pubescens* Benth. E do óleo essencial de *Cordia verbenaceae* DC na atividade antinoceptiva e anti-inflamatória. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Universidade Estadual de Campinas, 2018.
19. Bayeux, M.C.; Fernandes, A.T.; Foglio, M.A. e Carvalho, J.E. 2002. Evaluation of the antiedematogenic activity of artemetin isolated from *Cordia curassavica* DC. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35(10): 1229-1232.
20. Bertonceli, M. A. A.; Oliveira, A. E. A.; Passos, M. S.; Vieira, I. J. C.; Braz-Filho, R.; Lemos, F. J. A.; Martins, B. X.; Façanha, A. R.; Pireda, S.; Da Cunha, M.; Fernandes, K. V. S. Rotenoids from *Clitoria fairchildiana* R. Howard (Fabaceae) seeds affect the cellular metabolism of larvae of *Aedes aegypti* L. (Culicidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 186, 2022. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105167>.
21. Biavatti, M. W., Marensi, V., Leite, S. N., & Reis, A. (2007). Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17, 640-653.
22. Bieber, L. W.; Messana, I.; Lins, S. C. N.; da Silva Filho, Á. A.; Chiappeta, A. A.; De Mélo, J. F.; Meroterpenoid naphthoquinones from *Cordia corymbosa*. *Phytochemistry* 1990, 29, 1955. [CrossRef] 49.
23. Bieber, L. W.; Krebs, H. C.; Schafer, W.; Further meroterpenoid naphthoquinones from *Cordia corymbosa*. *Phytochemistry* 1994, 4, 1027.
24. Bisio, A., Corallo, A., Gastaldo, P., Romussi, G., Ciarallo, G., Fontana, N., De Tommasi, N. & Profumo, P. 1999. Glandular hairs and secreted material in *Salvia blepharophylla* Brandegees ex Epling grown in Italy. *Annals of Botany* 83:441-452
25. Braga, I. A., & Valle, D. (2007). *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência.
26. Brazilian Atlantic forest: how much is left and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142: 1141–1153.
27. Brasil. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. 2009. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/daf/pnpmf/publicacoes/programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos/view>. Acesso em: 15 junho 2023.
28. Brasil. Ministério da Saúde. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dengue>. Acesso 15 junho 2023.
29. Borges, G. D. S. C., Vieira, F. G. K., Copetti, C., Gonzaga, L. V., Zambiasi, R. C., Mancini Filho, J., & Fett, R. (2011). Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. *Food Research International*, 44(7), 2128-2133.

30. Boyer, S.; Maquart, P.O.; Chhuoy, K.; Suor, K.; Chhum, M.; Heng, K.; Leng, S.; Fontenille, D.; Marcombe, S.; 2022. Monitoring insecticide resistance of adult and larval *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Phnom Penh, Cambodia. *Parasite Vector* 15, 1–7.
31. Carneiro, V. C. D. S., Lucena, L. B. D., Figueiró, R., & Victório, C. P. (2020). Larvicidal activity of plants from Myrtaceae against *Aedes aegypti* L. and *Simulium pertinax* Kollar (Diptera). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 54.
32. Carvalho Júnior, P. M. DE et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 95, p. 297-301, 2004.
33. Carvalho, D.A. & Sá, C.F.C., 2011. Estrutura do estrado herbáceo de uma restinga arbustiva aberta na APA de Massambaba, Rio de Janeiro, Brasil. *Rodriguésia* 62: 367–378, 2011.
34. Castro, E. M. de; Pereira, F. J.; Paiva, R.. *Histologia Vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos*. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.
35. Castro, M. de Moraes; Machado, S. R.. Células e tecidos secretores. In: Appezato-da-Glória, B. & Carmello-Guerreiro, S. (Editoras). Capítulo 7. p. 179-204. *Anatomia Vegetal* (2ª ed.). Viçosa: UFV. 2009.
36. Castro, M.M.; Leitão-Filho, H.F.; Monteiro, W.R. Utilização de estruturas secretoras na identificação dos gêneros de Asteraceae de uma vegetação de cerrado. *Revista Brasileira de Botânica*; 20 (2). p. 163-174. 1997.
37. Chagas, A. C. de S.. et al. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus spp.* em *Boophilus microplus*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 39, n. 5, p. 247-253, 2002.
38. Chalannavar, RK, Baijnath, H., Odhav, B. Componentes químicos do óleo essencial de *Syzygium cordatum* (Myrtaceae). *Afr. J. Biotechnol.* 2011; 10: 2741-2745. Doi: 10.5897/AJB10.1932.
39. Cheng, S.S. et al. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresource. Technology*, v. 89, p.99-102, 2003.
40. Christophers SR. 1960. *Aedes aegypti*. The yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure. London: Cambridge University Press. 738 pp.
41. Clements AN. 1963. *The Physiology of Mosquitoes*. London: Pergamon Press.
42. Clements AN. 2012. *The Biology of Mosquitoes*. Cambridge: Cambridge University Press.
43. Consoli, R.A.G.B., N.M. Mendes, J.P. Pereira, B.S. Santos & M.A. Lamounier. 1989. Influence of several plant extracts on the oviposition behaviour of *Aedes fluviatilis* (Lutz) (Diptera: Culicidae) in the laboratory. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 84: 47-51. 13.
44. Consoli, R.; Oliveira, R. L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. 1 edição, Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 228p, 1994.
45. Costa de Oliveira, D.M.; Luchini, A.C.; Seito, L.N.; Gomes, J.C.; Crespo-López, M.E.; Di Stasi, L.C. *Cordia verbenacea* and secretion of mast cells in different animal species. *J Ethnopharmacol* 2011;135(2):463-8.
46. Da Cunha, M.; Gomes, V.M.; Xavier Filho, J.; Attias, M.; Souza, W.; Miguens, F.C. Laticifer system of *Chamaesyce thymifolia*: a closed host environment for trypanosomatids. *Biocell*, v. 24, p. 123–132, 2000.
47. David, R.; Carde, J.P. (1964). Coloration differential le des inclusions lipidique setterpeniques des pseudo phylles du pin maritime au moyen du 25 react if Nadi. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, v. 258, p. 1338– 1340, 1964.

48. Dettrakul, S.; Surerum, S.; Rajviroongit, S.; Kittakoop, P.; Biomimetic transformation and biological activities of Globiferin, a terpenoid benzoquinone from *Cordia globifera*. *Journal of Natural Products* 2009, 72, 861. [PubMed].
49. Dias, C. N.; Moraes, D. F. C. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: Review. *Parasitology Research*, v. 113, n. 2, p. 565–592, 2014.
50. Dickison, W. C. *Integrative Plant Anatomy*. Academic Press. California, Estados Unidos da América. 2000.
51. Diniz, J. C.; Viana, F. A.; Oliveira, O. F.; Maciel, M. A. M.; Torres, M. C. M.; Braz-Filho, R.; Silveira, E. R.; Pessoa, O. D. L.; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments for two new cordiaquinones from roots of *Cordia leucocephala*. *Magnetic Resonance in Chemistry* 2009, 47, 190. [PubMed].
52. Duarte, M. R., & Siebenrock, M. (2016). Microscopic Features of the leaf na stem of *Salvia microphylla* Kunth, Lamiaceae. *Visão Acadêmica*, 17(1).
53. Erdoğan, M. K., Geçibesler, İ. H., & Behçet, L. (2020). Chemical constituents, antioxidant, antiproliferative and apoptotic effects of a new endemic Boraginaceae species: *Paracaryum binguelianum*. *Results in Chemistry*, 2, 100032.
54. Evert, R. F., & Esau, K. (2013). *Anatomia das plantas de Esau: meristemas, células e tecidos do corpo da planta: sua estrutura, função e desenvolvimento*. Editora Blucher.
55. Fahn, A. (1979). *Secretory tissues in Plants*. Academic Press INC. London. p. 588. 21.
56. Fahn, Abraham. Structural and functional properties of trichomes of xeromorphic leaves. *Annals of Botany*, 1986. 57: 631-637.
57. Falkenberg, M.B. *Varronia curassavica* in: L. Coradin, A.E. Siminski, A. Reis, *Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro - região sul*, pp. 715-719, (MMA) Ministério do Meio Ambiente, Brasília (2012).
58. Feijo, E.V.R. da S.; Oliveira, R. A. de; Costa, L. C. do B. Light affects *Varronia curassavica* essential oil yield by increasing trichomes frequency. *Rev. bras. Farmacogn. Curitiba*, v.24, n.5, p.516-523, out.2014.
59. Ferreira, G. do A. *Anatomia do lenho, composição química e atividade antifúngica de extratos de Myrcia insularis Gardner (Myrtaceae) em dois ecossistemas da Mata Atlântica*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2018.
60. Fernandes, E. S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and trans-caryophyllene isolated of essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology* 569 (2007), 228 – 236.
61. Fernandes, E.S., Campos, M.M., Pianowski, L.F., Calixto, J.B., 2007. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-) -trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *Eur J Pharmacol.* 569, 228-236.
62. Figueiredo, A.C. & Pais, M.S. 1994. Ultrastructural aspects of the glandular cells from the secretory trichomes and from the cell suspension cultures of *Achillea millefolium* L. ssp. millefolium. *Annals of Botany* 74:179-190.
63. Fisher, D.B. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie*, v. 16, p. 92–96, 1968.
64. *Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: Acesso em: 11 Dez 2020.
65. Forantini, O. P. *Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia*. 2ª edição, São Paulo: Edusp, 864p, 2002.

66. Fracassetti, D., Limbo, S., Pellegrino, L., & Tirelli, A. (2019). Light-induced reactions of methionine and riboflavin in model wine: Effects of hydrolysable tannins and sulfur dioxide. *Food Chemistry*, 298, 124952.
67. Freitas, H. P. S.; Maia, A. I. V.; Silveira, E. R.; Marinho Filho, J. D. B.; Moraes, M. O.; Pessoa, C.; Lotufo, L. V. C.; Pessoa, O. D. L.; Cytotoxic cordiaquinones from the roots of *Cordia polycephala*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2012, 23, 1558.
68. Frezza, T. F. Ação de *Cordia verbenaceae* sobre *Schistosoma mansoni*. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Universidade Estadual de Campinas, 2011.
69. Fumagali, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, n. 4, p.627-641, out/dez, 2008.
70. Fundação Oswaldo Cruz. Rede dengue. Disponível em: <https://rededengue.fiocruz.br/>. Acesso em 10 julho 2023.
71. Fundação SOS Mata Atlântica & Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. 2023. Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica. Acessado em 10/07/2023.
72. Furr, M. & Mahlberg, P.G. 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products* 44:153-159.
73. Gadelha, D. P.; Toda, A. T. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, v.37, p.29-36, 1985.
74. Galindo-Leal, C., Câmara, I.G., 2003. The Atlantic forest of South America: Biodiversity Status. Threats and Outlook. Island Press, Washington.
75. Garcez, W. S.; Garcez, F. R.; Silva, L. M. G. E.; Sarmiento, U. C.V Substâncias de origem vegetal com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. *Revista Virtual de Química, Niterói*, v. 5, n. 3, p. 363-393, 2013.79 Simas, N. K.; Lima, E. C.; Conceição, S. R.; Kuster, R. M.; Martins, O. F.; Alfredo, L.; Celso, L. S. *Quím. Nova* 2004, 27, 46.
76. Ghosh, A., Chowdhury, N., Chandra, G. Extratos de plantas como potenciais larvicidas para mosquitos. *Indian J. Med. Res.* 2012; 135: <http://www.vdci.net/blog/2017-year-in-review-mosquito-borne-disease>. 5. Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC). Dengue e o mosquito *Aedes aegypti* ficha técnica. Disponível a partir de: 581-598. PMID: 22771587.
77. Gilbert B, Favoreto R (2012) *Cordia verbenacea* DC Boraginaceae. *Revista Fitos* 7:17-25. (Português).
78. Gomes AC, de Souza JMP, Bergamaschi DP, dos Santos JL, Andrade VR, Leite OF, Rangel O, de Souza SS, Guimarães NS, de Lima VL. 2005. Anthropophilic activity of *Aedes aegypti* and of *Aedes albopictus* in area under control and surveillance. *Rev Saude Publica.* 39(2):206-210.
79. Goodarzi, S.; Tavakoli, S.; Abai, M.R.; Amini, Z.; Vatandoost, H.; Yassa, N.; Hadjiakhoondi, A.; Tofghi, Z. (2019) Strong insecticidal potential of methanol extract of *Ferulago trifida* fruits against *Anopheles stephensi* as malaria vector. *Environ Sci Pollut Res Int* 26(8):7711–7717.
80. Gostin, I. N. (2023). Glandular and Non-Glandular Trichomes from *Phlomis herba-venti* subsp. *pungens* Leaves: Light, Confocal, and Scanning Electron Microscopy and Histochemistry of the Secretory Products. *Plants*, 12(13), 2423.
81. Halstead, N.T.; Civitello, D.J.; Rohr, J.R., 2015. Comparative toxicities of organophosphate and pyrethroid insecticides to aquatic macroarthropods. *Chemosphere* 135, 265–271.
82. Hari, I.; Mathew, N. (2018) Larvicidal activity of selected plant extracts and their combination against the mosquito vectors *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. *Environ Sci Pollut Res Int* 25:9176–9185.

83. Ioset, J.R., Marston, A., Gupta, M.P., Hostettmann, K., 1998. Antifungal and larvicidal mesoterpenoid naphthaquinones and a naphthorixene from the roots of *Cordia linnaei*. *Phytochemistry* 47, 729–734.
84. Ioset, J.R., Marston, A., Gupta, M.P., Hostettmann, K., 2000. Antifungal and larvicidal cordiaquinones from the roots of *Cordia curassavica*. *Phytochemistry* 53, 613–617.
85. Johansen, Donald Alexander. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Will, 1940.
86. Jabbar, A. A., Abdullah, F. O., Hassan, A. O., Galali, Y., Hassan, R. R., Rashid, E. Q., ... & Aziz, K. F. (2022). Ethnobotanical, Phytochemistry, and Pharmacological Activity of *Onosma* (Boraginaceae): An Updated Review. *Molecules*, 27(24), 8687.
87. Joly, A. B. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 6. ed. São Paulo: [s.n.].
- 89 Junior, I. M. Aspecto do cultivo comercial de erva baleeira. *Revista Agroecologia Hoje*, v. 3, p. 14–15, 2000.
88. Judd, W. S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A.; Stevens, P. F.; *Plant systematics: a phylogenetic approach*, 1a. ed., Sinauer Associates: Massachusetts, 1999.
89. Judd, W. S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A.; Stevens, P. E.; Donoghue, M. J.; *Plant Systematics: a Phyllogenetic approach*, 2a. ed., Sinauer Associates: Massachusetts, 2002.
90. Karabourniotis, G., Liakopoulos, G., Nikolopoulos, D., & Bresta, P. (2020). Protective and defensive roles of non-glandular trichomes against multiple stresses: structure–function coordination. *Journal of Forestry Research*, 31(1), 1-12.
91. Karnovsky, M. J. 1965. A formaldehydeglyutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol*, 27(2 Pt 2), 137 - 138.
92. Kaur, Kirandeep et al. Antimalarials from nature. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 17, n. 9, p. 3229-3256, 2009.
93. Kipo, S. L., Ofori-Kwakye, K., Kuntworbe, N., Johnson, R., Boakye-Gyasi, M. E., Osei, Y. A., & Owusu, F. A. (2023). Physicochemical and Microbiological Characteristics of Stem Bark Exudate Gum of *Cordia millenii* Tree in Conventional Release Tablets. *The Scientific World Journal*, 2023.
94. Komalamisra, N.; Trongtokit, Y.; Rongsriyam, Y.; Apiwathnasorn, C. (2005) Screening for larvicidal activity in some Thai plants against four mosquito vector species. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 36(6):1412–1422.
95. Kraus, J. E. & Arduin, M. 1997. *Manual básico em morfologia vegetal*. Editora Universidade Rural (EDUR). Seropédica, RJ.
96. Kumar D, Kumar P, Singh H, Agrawal V (2020) Biocontrol of mosquito vectors through herbal-derived silver nanoparticles: prospects and challenges. *Environ Sci Pollut Res Int* 27:25987– 26024.
97. Kumar NP, Bashir A, Abidha S, Sabesan S, Jambulingam P (2014) Predatory potential of *Platynectes* sp. (Coleoptera: Dytiscidae) on *Aedes albopictus*, the vector of dengue/chikungunya in Kerala. *India Trop Biomed* 31:736–741
98. Kuroyanagi, M.; Seki, T.; Hayashi, T.; Nagashima, Y.; Kawahara, N.; Sekita, S.; Satake, M. Anti-androgenic triterpenoids from the Brazilian medicinal plant, *Cordia multispicata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 49, n. 8, p. 954-957, 2001.
99. Kuroyanagi, M.; Kawahara, N.; Sekita, S.; Satake, M.; Hayashi, T.; Takase, Y.; Masuda, K. Dammarane-type triterpenes from the Brazilian medicinal plant *Cordia multispicata*. *Journal of Natural Products*, v. 66, p. 1307-1312, 2003.
100. Kwiecinski, M.R. et al. Study of the antitumor potential of brazilian *Bidens pilosa* L., *Casearea sylvestris*, S., *Cordia verbenacea* DC and *Croton celtidifolus* B. In: simpósio brasileiro de plantas medicinais, 21, 2010, João Pessoa. Anais. João Pessoa: Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais

101. Lameira, O. A.; Pinto, J. E. B. P.; Arrigoni-Blank, M. de F. Enraizamento de miniestacas de erva-baleeira. *Horticultura Brasileira*, v. 15, n. 2, p. 114–116, 1997.
102. Leal-Costa, M. V.; Amélia, R. P. Anatomia foliar de *Varronia curassavica* Jacq. (Cordiaceae). *Revista Fitos*, v. 11, n. 1, 2017.
103. Leonardi, G.R.; Rigon, R.B.; Cavallini, M.E.; Polacow, M.L.O., Araújo, M.R.; Andreollo, N.A. Topical formulation with *Cordia verbenacea* essential oil and glycolic acid. *Lat Am J Pharm* 2010; 29 (6):1004-8.
104. Leite, K.G. Abordagem taxonômica da família Boraginaceae Juss. Disponível em: [sisweb.castelobranco.br/pesquisa/v.15/PDFs/2006](http://sisweb.castelobranco.br/pesquisa/v.15/PDFs/2006). Pdf. Acesso em : 05 mai. 2012.
105. Lima, R. N., Ribeiro, A. S., Santiago, G. M., Costa, C. O. D. S., Soares, M. B., Bezerra, D. P., ... & Alves, P. B. (2019). Antitumor and *Aedes aegypti* Larvicidal Activities of Essential Oils from *Piper klotzschianum*, *P. hispidum*, and *P. arboreum*. *Natural Product Communications*, 14(7), 1934578X19863932.
106. Lemos, A. B. Caracterização morfo-histoquímica dos tecidos do sistema digestório de larvas de *Aedes aegypti*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.
107. Londero, V. S., Costa-Silva, T. A., Tempone, A. G., Namiyama, G. M., Thevenard, F., Antar, G. M., ... & Lago, J. H. G. (2020). Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of costic acid isolated from *Nectandra barbellata* (Lauraceae) is associated with alterations in plasma membrane electric and mitochondrial membrane potentials. *Bioorganic Chemistry*, 95, 103510.
108. Lorenzi, H. & Matos, F. J. de A. 2008. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2. ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa. 440p.
109. Lozovei, A. L. In: Marcondes, C.B. Entomologia Médica e Veterinária. (1ª edição). Rio de Janeiro: Editora Atheneu. 432p, 2001.
110. Macoris, M.L.; Andrighetti, M.T.; Otrera, V.C.; Carvalho, L.R.; Caldas Junior, A.L.; Brogdon, W.G. Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007, 102:895-900.
111. Manners, G. D.; Jurd, L.; The hydroquinone terpenoids of *Cordia alliodora*. *Journal of the Chemical Society*, 1977.
112. Marinho-Filho, J. D.; Bezerra, D. P.; Araújo, A. J.; Montenegro, R. C.; Pessoa, C.; Diniz, J. C.; Viana, F. A.; Pessoa, O. D. L.; Silveira, E. R.; Moraes, M. O.; Costa-Lotufo, L. V.; Oxidative stress induction by (+)-cordiaquinone J triggers both mitochondria-dependent apoptosis and necrosis in leukemia cells. *Chemico-Biological Interactions* 2010, 183, 369. [PubMed].
113. Matias, E. F., Santos, K. K., Falcão-Silva, V. S., Siqueira-Júnior, J. P., Costa, J. G., & Coutinho, H. D. (2013). Modulation of the norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* by *Cordia verbenaceae* DC. *The Indian Journal of Medical Research*, 137(1), 178.
114. Meccia, G.; Rojas, L.B.; Velasco, J.; Díaz, T.; Usubillaga, A.; Arzola, J.C.; Ramos, S. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* from the Venezuelan Andes. *Nat Prod Commun* 2009; 4:1119–22.
115. Medeiros, R.; Passos, G. F.; Vitor, C. E.; Koepp, J.; Mazzuco, T. L.; Pianowski, L. F.; Campos, M. M.; Calixto, J.B. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. *British Journal of Pharmacology*, v. 151, p. 618-627, 2007.
116. Michielin, E.M.Z., Salvador, A.A., Riehl, C.A.S.; Smânia- -Jr. A.; Smânia, E.F.A.; Ferreira, S. R. S. Chemical composition and antibacterial activity of

- Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. Bioresource Technol, 100: 6615-6623, 2009.
117. Melo, J. I. M.; Lyra-Lemos, R. P.; Sinopse taxonômica de Boraginaceae sensu lato A. Juss. no Estado de Alagoas, Brasil. Acta Botanica Brasilica 2008, 22, 701.
  118. Metcalfe, C. R. & Chalk, L. 1950. Anatomy of the dicotyledons. 2 vols. Clarendon Press, Oxford.
  119. Metcalf, R. L.; Crit. Rev. Plant. Sci. 1987, 5, 251.
  120. Miguel, E. de C.; Klein, D. E.; Oliveira, A. M.; Da Cunha, M. Ultrastructure of secretory and senescence phase in colleters of *Bathysa gymnocarpa* and *B. stipulata* (Rubiaceae). Revista Brasileira de Botânica; 33 (3). p. 425–436, 2010.
  121. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Diretrizes nacionais para a prevenção e controle de epidemias de dengue. Brasília: Ministério da Saúde; 2021 (Série A. Normas e Manuais Técnicos.).
  122. Ministério do Meio Ambiente (2023). <<https://antigo.mma.gov.br/>> acessado em 06 de julho de 2023.
  123. Moir, M.; Thomson, R. H. Cordiachromes: A new group of terpenoid quinones from *Cordia* spp Journal of the Chemical Society, 1972.
  124. Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B., Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature 403: 853–858. Oliveira-Filho, A.T. 2009. Classificação das fitofisionomias da América do Sul cisandina tropical e subtropical: proposta de um novo sistema: prático e flexível: ou uma injeção a mais de caos? Rodriguésia 60: 237-258.
  125. Montanari Junior, I. et al. Variabilidade genética em uma população de *Cordia verbenacea* DC. para características agrônômicas e fitoquímicas. Orientador: Norberto da Silva. 2011. Tese (Doutorado em Agronomia/ Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.
  126. Nakamura, N.; Kojima, S.; Lim, Y. A.; Meselhy, R.; Hattori, M.; Gupta, M. P.; Correa, M. Dammarane-type triterpenes from *Cordia spinescens*. Phytochemistry, v. 4, n. 6, p. 1139-1141, 1997.
  127. Nauen, R., 2008. Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. Pest Manag. Sci. 63, 1100–1106.
  128. Nawal, A. M.; Shagufta, P.; Itrat, F.; Muhammad, N.; Ajaz, H. Antioxidant, anti-glycation and anti-inflammatory activities of phenolic constituents from *Cordia sinensis*. Molecules, v. 16, p. 10214-10226, 2011.
  129. Neto, M. L., Da Silva, R. O., de Oliveira, F. F., Costa, L. C. B., Conceição, A. O., & de Oliveira, R. A. (2018). Avaliação anti-*Candida* of essential oils from three medicinal plants species (Asteraceae). South African Journal of Botany, 115, 132-137.
  130. Neves, M.; Morais, R.; Gafner, S.; Stoeckl, E. H.; Hostettmann, K. Phytochemistry 1999, 50, 967.
  131. Nityasree, B. R.; Chalannavar, R. K.; Ghosh, S. K.; Divakar, M. S.; Sowmyashree, K. Effect of Solanum lycopersicum leaf extracts against larvicidal activity of *Aedes aegypti* L. Biomedicine: 2020; 40(4): 467- 473, 2020.
  132. Pearse, A.G.E. Histochemistry theoretical and applied: preparative and optical technology. 4th edition. Churchill Livingstone, Edinburgh, UK: p. 456, 1980.
  133. Oliveira, A.A.M.; Abdalla, D.S.P.; Sertie, J.A.A. Hematological evaluation of the ethanol extract of *Cordia verbenacea* leaves. Fitoterapia 1998; 69(5):387-9.

134. Oliveira, A. C. D.; Ropke, C. D. Os dez anos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e os principais entraves da cadeia produtiva de extratos vegetais e medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Revista Fitos*, v.10, n.2, p.95-219, 2016. Available from: Accessed: Apr. 04, 2020. doi: 10.5935/2446- 4775.20160015.
135. Oliveira, Nildo Tavares; Almeida, Sheylla Susan Moreida da Silva de. Análise fitoquímica, citotóxica e antimicrobiana do extrato bruto etanólico das folhas da espécie *Ambelania acida* Aublet (Apocynaceae). *Biota Amazônica*; 6 (1). p. 20-25, 2016.
136. Organização Mundial da Saúde. Diretrizes para testes laboratoriais e de campo de larvicidas contra mosquitos Genebra: Organização Mundial da Saúde. 2005.
137. Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). Cooperação entre Países para o Desenvolvimento da Saúde. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/dengue>. Acesso em: 10 julho 2023.
138. Parisotto, E. B. et al. The antitumor activity of extracts from *Cordia verbenacea* D.C. obtained by supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 61, p. 101–107, jan. 2012.
139. Parks, J.; Gyeltshen, T.; Prachyawarakorn, V.; Mahidol, C.; Ruchirawat, S.; Kittakoop, P.; Glutarimide alkaloids and a terpenoid benzoquinone from *Cordia globifera*. *Journal of Natural Products* 2010, 73, 992. [PubMed].
140. Passos, G. F., Fernandes, E. S., Cunha, F. M., Ferreira, J., Pianowski, L. F., Campos, M. M., 90 Calixto, J. B., 2006. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. *J Ethnopharmacol.* 110, 323–333.
141. Pavela, R., Maggi, F., Iannarelli, R., Benelli, G. Extratos de plantas para o desenvolvimento de larvicidas para mosquitos: do laboratório ao campo, com insights sobre os modos de ação. *Acta Trop.* 2019; 193: 236-271. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.01.019.
142. Pereira, P. S., Oliveira, C. V. B., Maia, A. J., Tintino, S. R., Oliveira-Tintino, C. D. D. M., Vega-Gomez, M. C., ... & Coutinho, H. D. (2021). Cytotoxicity of Essential Oil *Cordia verbenaceae* against *Leishmania brasiliensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Molecules*, 26(15), 4485.
143. Pereira, B.B. et al. (2016) Toxicological assessment of spinosad: Implications for integrated control of *Aedes aegypti* using larvicides and larvivoracious fsh. *J Toxicol Environ Health Part A* 79:477–481.
144. Perigo, C. V., Haber, L. L., Facanali, R., Vieira, M. A., Torres, R. B., Bernacci, L. C., ... & Marques, M. O. M. (2022). Essential Oils of Aromatic Plant Species from the Atlantic Rainforest Exhibit Extensive Chemical Diversity and Antimicrobial Activity. *Antibiotics*, 11(12), 1844.
145. Perini, J.A., Angeli-Gamba, T., Perini, J.A., Ferreira, L.C., Nasciutti, L.E., Machado, D.E., 2015. Topical application of Acheflan on rat skin injury accelerates wound healing: a histopathological, immunohistochemical and biochemical study. *BMC Complem Altern M.* 15, 203-210.
146. Pimentel, S.P.; Barreira, G.E.; Casarin, R.C.V.; Cirano, F.R.; Casati, M.Z.; Foglio, M.A.; Figueira, G.M. Protective effect of topical *Cordia verbenacea* in a rat periodontitis model: immuneinflammatory, antibacterial and morphometric assays. *BMC Complem Altern M* 2012;12, article number 224.
147. Pinheiro, R. P. A. Análise dos atributos anatômicos da lâmina foliar, estudo fitoquímico e atividade antifúngica dos extratos foliares de *Tabernaemontana laeta* Mart. (Apocynaceae). Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2019.

148. Pinheiro, S. K.P.; Teófilo, F.B.S.; Lima, A.K.M.; Cordoba, B.V.; Migeul, T.B.A.R.; Miguel, E.C. (2019) Ontogegnesis and secretion mecanismo of *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae) colleters. S African J Bot 21:26–33
149. Pireda, S., Oliveira, D.S., Borges, N.L., Ferreira, G.A., Barroso, L.M., Simioni, P., Vitória, A.P., Da Cunha, M., 2019. Acclimatization capacity of leaf traits of species co-occurring in restinga and seasonal semideciduous forest ecosystems. Environmental and Experimental Botany. 164: 190–202.
150. Raman, BV, Samuel, LA, Saradhi, MP, Rao, BN, Krishna, NV, Sydhakar, M., Radhakrishnan, TM (2012). Atividade antibacteriana, antioxidante e análise CG-MS de *Eupatorium odoratum*. Asiático J Pharm Clin Res. 2012; 5?99-106.
151. Raven, Peter H., Evert, Ray F; Eichhorn, Susan E. Biologia Vegetal. 7. ed. Coordenadora de tradução Jane Elizabeth Kraus. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2007. 830 p
152. Rezende, F. M. de. et al. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. In: VI Botânica no Inverno 2016. Org. Miguel Peña H. [et al.]. – São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, p. 93-104, 2016.
153. Rezende, C.E., Santiago, L.S., 2018. Isotopic composition of leaf carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ) and nitrogen ( $\delta^{15}\text{N}$ ) of deciduous and evergreen under storey trees in two tropical Brazilian Atlantic forests. J. Trop. Ecol. 34: 145–156.
154. Ribeiro, M.C., Metzger, J.P., Martensen, A.C., Ponzoni, F., Hirota, M.M., 2009.
155. Roldão, E. De F. et al. Evaluation of the antiulcerogenic and analgesic activities of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae). Journal of Ethnopharmacology, v. 119, n. 1, p. 94–98, set. 2008.
156. Roel, A. R.; et al. The effect of sub-lethal doses of *Azadirachta indica* (Meliaceae) oil on the midgut of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Revista Brasileira de Entomologia. v.54, n.3, p.505-510, 2010.
157. Rodrigues, F. F., Oliveira, L. G., Rodrigues, F. F., Saraiva, M. E., Almeida, S. C., Cabral, M. E., ... & Costa, J. G. M. (2012). Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves. Pharmacognosy research, 4(3), 161.
158. Rodrigues, L. A., Almeida, A. D. C., Gontijo, D. C., Salustiano, I. V., Almeida, A. A., Brandão, G. C., ... & Leite, J. P. V. (2021). Antibacterial screening of plants from the Brazilian Atlantic Forest led to the identification of active compounds in *Miconia latecrenata* (DC.) Naudin. Natural Product Research, 35(24), 5904-5908.
159. Rosa, D. D., Basseto, M. A., Feliciano, F., Neves, M. B., & Baldin, E. L. (2008). Ocorrência de *Dictyla monotropidia* Stål (Hemiptera: Tingidae) em *Cordia verbenacea* Al. DC no Brasil. Neotropical entomology, 37, 236-238.
160. Rose, R. I. Pesticides and public health integrated methods of mosquito management. Emerging Infectious Disease Journal. v.7, p.17–23, 2001.
161. Sá, G. C. S.; Bezerra, P. V. V.; Silva, M. F. A.; Silva, L. B.; Barra, P. B.; Ximeneses, M. F. F. M.; Uchôa, A. F. Arbovirus vectors insects: are botanical insecticides na alternative for its management? Journal of Pest Science, 2022. <https://doi.org/10.1007/s10340-022-01507-2>.
162. Santos, B. M., Bezerra-Souza, A., Aragaki, S., Rodrigues, E., Umehara, E., Ghilardi Lago, J. H., ... & Passero, L. F. D. (2019). Estudo etnofarmacológico de plantas da floresta atlântica com atividade leishmanicida. Medicina Complementar e Alternativa Baseada em Evidências, 2019.
163. Santos, M.C.A.; Freitas, S.P.; Aroucha, E.M.M.; Santos, A.L.A. Anatomia e histoquímica de folhas e raízes de vinca *Catharanthus roseus* (L.) G. Don). Revista de Biologia e Ciências da Terra; 9: 24-30. 2009.

164. Santos, R. P.; Lemos, T. L. G.; Pessoa, O. D. L.; Braz-Filho, R.; Rodrigues Filho, E.; Viana, F. A.; Silveira, E. R. Chemical constituents of *Cordia piauhiensis* – Boraginaceae. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 16, n. 3B, p. 662-665, 2005.
165. Santos, R.P., Nunes, E.P., Nascimento, R.F., Santiago, G.M.P., Menezes, G.H.A., Silveira, E.R., Pessoa, O.D.L. (2006). Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the Northeast of Brazil. *J Braz Chem Soc* 17:1027–1030.
166. Schlemper, S.E.M., et al. Atividade antifúngica dos óleos essenciais e extratos etanólicos de *Aloysia selovii*, *Cordia verbenacea* e *Ocimum gratissimum*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 26. Recife. Recife: Imprensa Universitária da UFPE, 2000. p. 108.
167. Sciarrone, D. et al. Quali-quantitative characterization of the volatile constituents in *Cordia verbenacea* D.C. essential oil exploiting advanced chromatographic approaches and nuclear magnetic resonance analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 1524, p. 246–253, nov. 2017.
168. Seigler, D. S., Mikolajczak, K. L., Smith, C. R., Jr. and Wolf, I. A. (1970) *Chem. Phys. Lipids* 4, 147.
169. Serrato-Valenti, G., Bisiol, A., Cornara, L. & Ciarallo, G. 1997. Structural and histochemical investigation of the glandular trichomes of *Salvia aurea* L. leaves, and chemical analysis of the essential oil. *Annals of Botany* 79:329-336.
170. Sertié, J. A. A.; Basile, A. C.; Panizza, S.; Oshiro, T. T.; Azzolini, C. P. & Penna, S. 1991. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* III: Oral and topical anti-inflammatory activity and gastrotoxicity of a crude leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology* 31: 239–247.
171. Sertié, J. A. A., Woisky, R. G., Wiezel, G., & Rodrigues, M. (2005). Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* V: oral and topical anti-inflammatory activity, analgesic effect and fetus toxicity of a crude leaf extract. *Phytomedicine*, 12(5), 338-344.
172. Silva, A. P. G., Sganzerla, W. G., Jacomino, A. P., da Silva, E. P., Xiao, J., & Simal-Gandara, J. (2022). Chemical composition, bioactive compounds, and perspectives for the industrial formulation of health products from uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess–Myrtaceae): A comprehensive review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 109, 104500.
173. Silva, A. K. O.; Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, 2013.
174. Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R.; Farmacognosia : da planta ao medicamento. 6. ed. Santa Catarina: Editora da UFSC, 2010.
175. Smith, P. K. et al. *Analytical Biochemistry*, v. 150, n. 1, p. 76–85, 1985 70.
176. Solereder, H. *Systematic Anatomy of the Dicotyledons*. Clarendon Press. Oxford, Inglaterra. 1908.
177. Sousa, Ian Jhemes Oliveira, et al. "A diversidade da flora brasileira no desenvolvimento de recursos de saúde." *Uningá Review Journal* 31.1 (2017).
178. Spinozzi E, Maggi F, Bonacucina G, Pavela R, Boukouvala MC, Kavallieratos NG, Canale A, Romano D, Desneux N, Wilke ABB, Beier JC, Benelli G (2021) Óleos essenciais de Apiaceae e seus constituintes como inseticidas contra mosquitos - Uma revisão. *Ind Crops Prod* 171:113892.
179. Suffredini, I. B., Paciencia, M. L. B., Frana, S. A., Varella, A. D., & Younes, R. N. (2007). In vitro breast cancer cell lethality of Brazilian plant extracts. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62(10), 798-800.

180. Taiz, L.; Zeiger, E.; Moller, I.; Murphy, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 888, 2017.
181. Tavares, P. C. Constituintes químicos de *Justicia paracambi* (Acanthaceae). Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2022.
182. The Angiosperm Phylogeny Group (2016) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. The Linnean Society of London, Botanical Journal of the Linnean Society, 2016, 181, 1–20.
183. Torres, S. M. Avaliação estrutural e ultraestrutural de larvas e adultos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) submetidos a tratamento com produto formulado de óleos de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e extrato fermentado bacteriano de *Carica papaya*. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos) – Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2014.
184. Tici F.K.; Hage L.I.; Cambraia, R.S.; Pereira P.S.; Magro, A.J.; Fontes, M.R. et al. Rosmarinic acid, a 156 new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): anriserum action potentiation and molecular interaction. *Toxicon* 2005;46(3):318-27.
185. Velde, V.V., Lavie, D., Zelnik, R., Matida, A.K., Panizza, S., 1982. Cordialin A and B, two new triterpenes from *Cordia verbenacea* D.C. *Journal of the Chemical Society Perkin Trans 1*, 2697–2700.
186. Ventrella, M. C. et al. Morphology and histochemistry of glandular trichomes of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) leaves. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 31, n. 3, p. 457-467, 2008.
187. Verpoorte, R. Secondary Metabolism. In: Verpoorte, R.; Alfermann, A. Wilhelm. *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. Dordrecht (Netherlands): Kluwer Academic Publishers, 2000.
188. Viegas-Júnior, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*, v.26, p.390-400, 2003.
189. Vieira, M. G. C. (2015). Constituintes químicos de *Trichilia hirta* (Meliaceae). Tese (Doutorado em Ciências Naturais) – Campos dos Goytacazes – RJ, Laboratório de Química da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
190. Vincent, V. V.; Lavie, D.; Zelnik, R.; Amabile, K.; Matida.; Panizza, S. Cordialin A and B, two new triterpenes from *Cordia verbenacea* DC. *Journal of Chemical Society*, v. 1, p. 2697-2700, 1982.
191. Wang, Z., Perumalsamy, H., Wang, X., Ahn, Y, J. Toxicidade e possíveis mecanismos de ação do honokiol das sementes de *Magnolia denudata* contra quatro espécies de mosquitos. *Ciência. Rep.* 2019; 23: 1-9, doi: 10.38/s41598-018-36558-y.
192. World Health Organization. 1997. Dengue bulletin: Epidemic dengue/dengue haemorrhagic fever: A global public health problem in the 21st century.
193. World Health Organization (WHO). Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides. 2005. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13.
194. Yadav, R., Tyagi, V., Tikar, SN, Sharma, Ak, Mwndki, M. J. Jain, AK, Sukumaran, D. Toxicidade larval diferencial e atividade de alteração da oviposição de alguns extratos de plantas indígenas contra vetores de dengue e Chikungunya *Aedes albopictus* *J Arthropod Bomer Dis.* 2014; 8:174 – 185. PMID: 26114131.

195. Yan, J.; Yuan, S.; Jiang, L.; Ye, X.; NG, T. B.; WU, Z. Plant antifungal proteins and their applications in agriculture. *Applied Microbiology Biotechnol*, p.4961-4981, v. 99, 2015.
196. Zara, A.; Maria dos Santos, S., Fernandes-Oliveira, E.S.; Carvalho, R.G.; Giovanini, E.C. (2016) Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiol e Serviços Saúde* 25:391–403.