

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado no formato de artigo e nas normas da revista  
*South African Journal of Botany*

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LARVICIDA DE EXTRATOS VEGETAIS  
DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Aristolochia* E DE SEUS PRODUTOS DE  
BIOCONVERSÃO POR *Battus polydamas***

**LÍGIA GARCIA GERMANO**

**DOURADOS/MS  
2022**

**LÍGIA GARCIA GERMANO**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LARVICIDA DE EXTRATOS VEGETAIS  
DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Aristolochia* E DE SEUS PRODUTOS DE  
BIOCONVERSÃO POR *Battus polydamas***

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, da Universidade Federal da Grande Dourados

Aprovado em: 03/11/2022

**BANCA EXAMINADORA**



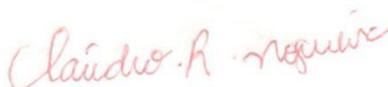
---

**Alexeia Barufatti**  
Presidente



---

**Bruno do Amaral Crispim**  
Membro



---

**Cláudio Rodrigo Nogueira**  
Membro

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pela minha vida e por permitir com que pudesse lutar pelas minhas conquistas.

À minha família, minha mãe, meu pai e minha irmã, pelo incentivo, apoio e acolhimento durante todos esses anos, e toda minha vida, sem vocês nada disso seria possível. Obrigada, amo muito vocês!!

À minha orientadora profa. Dra. Alexeia Barufatti, que é um exemplo de professora e mulher pesquisadora. Obrigada pela ajuda, pelas correções e por compartilhar seu conhecimento comigo, me sinto lisonjeada por poder aprender com você.

Ao prof. Dr. Bruno do Amaral Crispim, pela paciência, por ser sempre acessível e me deixar a vontade para tirar dúvidas. Obrigada por todos os ensinamentos, oportunidades e alegria, você é uma pessoa de luz, merece tudo que conquista.

Ao prof. Dr. Cláudio Rodrigo Nogueira, por sempre estar dispostos a ajudar, especialmente na interpretação dos resultados.

Ao prof. Dr. Bruno do Amaral Crispim e prof. Dr. Cláudio Rodrigo Nogueira por aceitarem participar da banca examinadora desse trabalho. Muito obrigada!!

Agradeço a todos do grupo LECOGEN, aprendi muito com cada um e levo todos em meu coração. Em especial, a Marina e Sabrina, que foram essenciais para os dias mais leves, obrigada pelo companheirismo e amizade.

Agradeço ao Rener Nobre, minha dupla da graduação. Obrigada por todo o companheirismo, pela amizade, pelo acolhimento, por todos os momentos que passamos juntos, você foi uma peça fundamental para minha formação, amo muito você. Aos meus amigos de infância Maria Júlia e Gabriel, que aguentaram todos meus desabafos durante esses anos de graduação, pra sempre a gente, amo vocês.

Agradeço a meus demais amigos que fiz na graduação: Ana Beatriz, Luana, Sarah, Gabriel, Isaac, Pedro e Isabella, que durante todos esses anos me proporcionaram diversos momentos que estarão guardados em minha memória, amo vocês. À minha vizinha e amiga Gabriela, que foi um grande suporte durante todo esse período, muito obrigada!!

Sou grata a todos que direta ou indiretamente fizeram parte de minha formação, muito obrigado!

## **Artigo 1**

O artigo descrito a seguir seguiu as normas da revista *South African Journal of Botany*

Normas da revista: [https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws\\_home/707238?generatepdf=true](https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/707238?generatepdf=true)

# Avaliação do potencial larvicida de extratos vegetais de espécies do gênero *Aristolochia* e de seus produtos de bioconversão por *Battus polydamas*

Lígia Garcia Germano<sup>1</sup>. Alexeia Barufatti<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade, Faculdade de Ciências de Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados Itahum, Km 12, Cidade Universitária, Dourados, MS CEP: 79840-970, Brasil.

Email: ligiaaggermano@hotmail.com

## RESUMO

A propagação do *Aedes aegypti* está cada vez mais se tornando um problema de saúde pública mundial, principalmente em países subtropicais, como o Brasil. O desenvolvimento de novos inseticidas e/ou estratégias naturais para o controle desse vetor torna-se imprescindível para redução dos casos de arbovirose. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade larvicida dos extratos metanólicos de *Aristolochia ringens*, *Aristolochia pohliana* e seus produtos de bioconversão por *Battus polydamas*, e caracterizar suas substâncias majoritárias. Para tanto, foi realizado ensaios de atividade larvicida em *Aedes aegypti* e realizada a análise química dos extratos por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Como resultado dos bioensaios larvicidas, todos os extratos foram considerados ativos, destacando-se todos extratos da espécie *A. pohliana*. Em relação a caracterização química, foi observada a presença do ácido colavênico como substância majoritária para *A. ringens* e duas substâncias majoritárias caracterizadas como (-)-kusunoquinina e dimetilmatairesinol, para *A. pohliana*, o mesmo foi observado para os extratos de bioconversão. Dessa forma podemos concluir que tanto os extratos de folhas quanto os de fezes, possuem potencial larvicida contra o vetor *A. aegypti*, e que são necessários novos estudos para analisar as diversas substâncias que estão inseridas nos extratos.

**Palavras chave:** *Aedes aegypti*; plantas medicinais; saúde pública; dengue; bioativo

## ABSTRACT

The spread of *Aedes aegypti* is increasingly becoming a global public health problem, especially in subtropical countries such as Brazil. The development of new insecticides and/or natural strategies to control this vector is essential to reduce arbovirus cases. In this context, the aim of this study was to evaluate the larvicidal activity of methanolic extracts of *Aristolochia ringens*, *Aristolochia pohliana* and their bioconversion products by *Battus polydamas*, and to characterize their major substances. For that, assays of larvicidal activity were carried out in *Aedes aegypti* and chemical analysis of the extracts by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) was performed. As a result of larvicidal bioassays, all extracts were considered active, highlighting all extracts of the species *A. pohliana*. Regarding the chemical characterization, the presence of collagenic acid was observed as a major substance for *A. ringens* and two major substances characterized as (-)-kusunoquinine and dimethylmatairesinol, for *A. pohliana*, the same was observed for the bioconversion extracts. Thus, we can conclude that both leaf and feces extracts have larvicidal potential against the *A. aegypti* vector, and that further studies are needed to analyze the various substances that are included in the extracts.

**Keywords:** *Aedes aegypti*; medicinal plants; public health; dengue; bioactive

## 1. Introdução

Os mosquitos do gênero *Aedes*, atuam como vetores para várias doenças causando problemas na saúde em humanos e animais (Kovendan e Murugan 2011). As doenças mais comuns são a Dengue, Chikungunya, Zika e Febre Amarela, causadas por vírus que possuem como principal vetor o *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) (Costa et al. 2018). Dentre essas arboviroses, destaca-se a Dengue que ocasiona graves danos à saúde pública, e ocorre principalmente em países tropicais e subtropicais como o Brasil (Krishnappa et al. 2012). Atualmente estima-se que 390 milhões de infecções de dengue ocorram anualmente, dentre elas 96 milhões se manifestam clinicamente (WHO 2022).

A propagação do *A. aegypti* está relacionada aos fatores ambientais, socioeconômicos, políticos, sociais e demais microfatores como, características biológicas do vírus, do vetor e da pessoa infectada (WHO, 2009; SVS-MS, 2018). O controle desse vetor é feito através de inseticidas químicos, como compostos organoclorados e organofosforados (Usman et al. 2018). No entanto, populações de *A. aegypti* apresentam resistência a esse grupo de inseticidas, limitando seu controle, além destes ocasionarem danos à saúde humana pois quando introduzidos nos organismos, permanecem por um longo período no mesmo (Krishnappa et al. 2012).

Nesse sentido, faz necessária a utilização de alternativas ecologicamente corretas, como as propostas pela química verde, que tem como objetivo a implementação de processos para reduzir ou eliminar o uso ou geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao ambiente (Lenardão et al. 2003), tornando fundamental a utilização de inseticidas naturais biodegradáveis (Garcez et al. 2009).

As plantas são constituídas de substâncias bioativas com estruturas químicas diferentes e que podem apresentar atividades contra insetos. Substâncias derivadas de plantas, têm-se destacado como promissoras para o desenvolvimento de inseticidas naturais para o controle de mosquitos e outras pragas (Krishnappa et al. 2012), por possuírem substâncias cujas moléculas possuem ação fago-inibidora, repelente, inseticida, além de serem capazes de alterar a regulação do crescimento (Murugan et al. 2007).

O uso de extratos vegetais na medicina tradicional é lucrativo porque não são necessários procedimentos de alto custo para obtê-los, os custos de produção são baixos e os materiais são acessíveis (Dias et al. 2012; Fregene et al. 2005). Dentre estes extratos ou compostos ativos podemos destacar os que compõem a espécie *Aristolochia* que podem ser aplicados em aspectos

farmacológicos e na medicina tradicional com frequência nos últimos anos (Lerma-Herrera et al. 2022).

O gênero *Aristolochia*, mais abundante da família Aristolochiaceae, possui folhas com ou sem pseudoestípulas, alternas, simples, pecioladas, inteiras ou raramente lobadas (Wanderley et al. 2002). São espécies com ricas fontes de diterpenos e lignanas (Andrade-Neto et al. 2007). Os metabólitos secundários responsáveis pelos efeitos biológicos de suas espécies geralmente são ácidos aristolóquicos e seus derivados, bem como monoterpenos, diterpenos e triterpenos (Lerma-Herrera et al. 2022; Pacheco et al. 2009). Vários ácidos aristolóquicos, lignanas e diterpenos desempenham um papel significativo na defesa das plantas contra insetos (Nascimento et al. 2004).

Outro aspecto é que além das plantas possuírem propriedades larvicidas, podemos considerar que o processo de bioconversão vem se destacando também como método alternativo, principalmente por não ser prejudicial ao meio ambiente. Esse processo que é caracterizado pela bioconversão de micromoléculas secundárias, particularmente pela metabolização destas por lagartas de lepidópteros e por outros insetos, como um caminho eficiente para a diversificação química (micromolecular), o que pode levar à obtenção de substâncias inéditas e/ou bioativas (diversas bioatividades). Trata-se de ferramenta interessante para inúmeras aplicações, incluindo acesso a novos compostos, modificação estrutural e desintoxicação de biomassa (Nogueira et al. 2021).

Desta forma, a bioconversão permite simplificar o processo de obtenção dos produtos, tornando a sua síntese mais rápida e econômica (Moreira et al. 2014). O maior destaque tem sido dado à utilização de microrganismos para esses fins, entretanto foi verificado também o potencial de insetos como a espécie *Battus polydamas*, conhecida popularmente como “borboleta rabo de andorinha” (Nogueira et al. 2021).

Sendo assim, extratos vegetais e/ou seus produtos de bioconversão podem se tornar uma alternativa promissora para o controle de larvas de *A. aegypti*. Nesse sentido, o objetivo do estudo foi avaliar a atividade larvicida dos extratos metanólicos de *Aristolochia ringens*, *Aristolochia pohliana* e de seus produtos de bioconversão por *Battus polydamas*, bem como realizar a caracterização química de suas substâncias majoritárias.

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Material vegetal e insetos: coleta e identificação**

As folhas hospedeiras de espécies do gênero *Aristolochia* foram coletadas durante janeiro e fevereiro de 2018, no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Grande Dourados, Dourados (MS), Brasil. As plantas foram identificadas pelo Dr. Joelcio Freitas como: *A. ringens* Vahl. e *A. pohliana* Duch. Amostras das folhas plantas foram secas em estufa e prensadas para a preparação de seus extratos.

Também foram coletados insetos do gênero *Battus* nas folhas hospedeiras durante janeiro e fevereiro de 2018. A espécie, *Battus polydamas*, foi identificada pelo MSc. Paulo Ricardo Barbosa de Souza, possuindo número de autorização IBAMA, 51842, e números de registros de acesso CGEN/MMA, AC96E87 e A1F6637 (Nogueira et al. 2021).

## **2.2 Criação de lagartas e coleta de material fecal**

Lagartas de *B. polydamas* de diferentes estádios foram alimentadas em laboratório com folhas saudáveis de *A. ringens* e *A. pohliana*. Cada grupo de insetos foi alimentado com uma única espécie vegetal. Foram criadas em gaiolas [30 × 30 × 40 cm (w × h × l)] sob condições semi-controladas: luz artificial durante fotoperíodo natural, umidade e temperatura ambiente, antes do início dos experimentos de bioconversão. Para a coleta das fezes, as lagartas ficaram em jejum por 12 h e posteriormente alimentadas com folhas das plantas relacionadas a esse estudo no período de 12 h subsequente. As fezes que foram expelidas durante essas 24 h foram descartadas, com o intuito de purificar o organismo, no caso de as lagartas em campo terem se alimentado de outras amostras que não fossem essas folhas. Os materiais fecais excretados pelos insetos, depois do período de purificação (24 h), foram coletados diariamente, secos ao ar por 15 dias e armazenados a temperatura ambiente em frascos de prolipropileno até a extração das fezes (Nogueira et al. 2021).

## **2.3 Preparo dos extratos das folhas e dos produtos de bioconversão**

As folhas de *A. ringens* e *A. pohliana* foram lavadas, secas ao ar à temperatura ambiente e seus extratos foram extraídos por maceração com metanol (grau HPLC JTBAKER), na proporção (m/v) 1 para 10, sendo 1g de amostra de folha para 10 ml de metanol, à temperatura ambiente e armazenadas em frascos de prolipropileno. O mesmo procedimento de secagem, maceração em metanol foi realizado com as fezes das lagartas de *B. polydamas* alimentadas *ad libitum* com essas folhas. O solvente orgânico foi eliminado em capela com exaustão até a consistência xaroposa.

Após a secagem, os extratos foram armazenados à temperatura ambiente, até o momento da realização do bioensaio larvicida e calculou-se seu rendimento total. Estes cálculos foram realizados de acordo com a fórmula:  $Re = (ME / MA) \times 100$ . Onde: Re = Rendimento total do extrato (%); ME = Massa de extrato (g), MA = Massa da amostra (g).

#### **2.4 Ensaio larvicida com *Aedes aegypti***

Os bioensaios de toxicidade para determinação da atividade larvicida foram realizados seguindo protocolo da WHO (2005), utilizando larvas de 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> *instar* (L3 e L4) de *A. aegypti*, linhagem Rockefeller. Os ovos foram fornecidos pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) unidade de Bio-Manguinhos do Rio de Janeiro.

Inicialmente, os ovos foram mantidos em local controlado com temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $60 \pm 1\%$ , e um fotoperíodo programado de 10:14 h claro/escuro até o momento do teste. Posteriormente, os ovos, aderidos em papel de filtro, foram colocados em um recipiente plástico com água deionizada e fermento biológico (Anjolette e Macoris, 2016), e em seguida alimentados com ração triturada para peixes contendo 28% de proteína bruta (Laguna®, Lote 05EX180067109). Ao atingir 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> *instar*, as larvas foram separadas com pipeta de *pasteur* e alocadas em copo plástico contendo 100 mL de água deionizada.

Foram realizados ensaios prévios para determinação das concentrações a serem utilizados do estudo. Nesse ensaio inicial utilizando com as concentrações de 100 e 1000 mg/mL foram observadas baixa atividade larvicida ( $\leq 10\%$ ) e 100% respectivamente. Baseando nesses resultados, foram realizados os cálculos para as concentrações a serem utilizadas no estudo. Assim sendo, extratos (folhas e de fezes) foram testados nas concentrações de 100, 170, 290, 490 e 850 mg/L.

Para cada concentração, foram usadas 4 réplicas contendo 25 larvas em cada recipiente, totalizando 100 larvas por tratamento. No controle negativo foi utilizado DMSO contendo Tween 80 a 1%. Os ensaios foram realizados em 3 experimentos independentes. As leituras de mortalidade foram realizadas em 24 e 48 h após o início da exposição. As larvas foram consideradas mortas quando permaneceram imóveis e/ou não mostraram nenhuma reação ao toque.

Os resultados do teste de toxicidade com larvas do *A. aegypti* (linhagem Rockefeller) foram realizadas utilizando método estatístico Probit na plataforma R<sup>®</sup> Studio (Core Team, 2019) com intervalo de confiança de 95% para a determinação da concentração letal para 50% (CL<sub>50</sub>) e 90% (CL<sub>90</sub>).

## 2.5 Análise química por ressonância magnética nuclear (RMN)

As substâncias majoritárias dos extratos metanólicos das espécies do gênero *Aristolochia* e seus produtos de bioconversão foram avaliadas por meio de espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN). Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (256 varreduras) e  $^{13}\text{C}$  (60.000 varreduras) foram adquiridos em um espectrômetro Bruker® Ascend™ 300, operando nas frequências de hidrogênio a 300,15 e na frequência de carbono 75,47 MHz. As amostras, 60,0 mg de cada extrato, foram solubilizadas individualmente em 0,75 mL de  $\text{CDCl}_3$  (clorofórmio deuterado) e analisadas a 298 K.

As porções insolúveis em  $\text{CDCl}_3$  das amostras foram solúveis em 0,75 mL de  $\text{DMSO-}d_6$  (99,9% D) e igualmente analisadas a 298 K. Os sinais de solvente residual e solvente deuterado foram usados como referências internas para experimentos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN, respectivamente;  $\delta$  são relatados em relação ao TMS. Todos os dados de RMN foram processados nos softwares TopSpin 3.6.2 (Bruker®) e MNova 14.2.2 (Mestrelab Research), e os resultados foram analisados e comparados com dados da literatura de Pacheco et al. (2009), Messiano et al. (2008) e Heleno et al. (2006).

## 3. Resultados e discussão

### 3.1 Rendimento dos extratos

Os resultados referentes ao rendimento dos extratos de folhas e de bioconversão foram apresentados na Tabela 1. Os rendimentos de extração variaram de 13,8% a 28,2%, de acordo com a espécie e o tipo de amostra, folha ou de seu produto de bioconversão. Sendo que o extrato metanólico da folha de *Aristolochia ringens* apresentou melhor rendimento (28,2%) quando comparado com os demais (Tabela 1).

**Tabela 1.** Rendimentos dos extratos metanólicos de folhas de *Aristolochia* spp. e de fezes de lagartas alimentadas com essas plantas.

Extrato	Espécie	MA (g)	ME (g)	Rendimento (%) (ME/MA x 100)
Metanólico (Folhas)	1- <i>Aristolochia ringens</i>	3,0	0,85	28,2
	2- <i>Aristolochia pohliana</i>	3,0	0,70	23,3
Metanólico (Fezes*)	1- Bioconversão de <i>Aristolochia ringens</i>	3,0	0,75	25,0
	2- Bioconversão de <i>Aristolochia pohliana</i>	3,0	0,42	13,8

\*Fezes de *Battus polydamas* alimentadas com folhas das espécies de *Aristolochia*.

\*MA: Massa da Amostra; ME: Massa do Extrato

A quantidade de materiais que podem ser extraídos de uma planta depende da natureza e quantidade de solvente utilizado durante o procedimento de extração e é possível identificar existência dessa variação dependendo da amostra (Hsu et al. 2006). O alto rendimento dos extratos metanólicos pode ser devido à capacidade do metanol de extrair metabólitos secundários em materiais vegetais (Parekh et al. 2005). Sabe-se que o metanol é um solvente que possui potencial de extração determinado pela sua capacidade de enfraquecer as membranas para extrair o maior número de metabólitos secundários. Sharaibi e Afolayan (2017) relataram que extrato metanólico de folhas de *Agapanthus praecox* foi extraído mais fitoquímicos quando comparado aos extratos foliares utilizando água e acetona. Além disso, Dhawan e Gupta (2017) observaram os maiores rendimentos de extrato em solvente de metanol para folhas de *Datura metel*, quando comparado com os solventes de acetona, água destilada, clorofórmio, acetato de etilo e hexano.

Outro aspecto a ser considerado é que as diferenças entre as espécies poderiam também ser fator determinante para tal variação. Os resultados deste estudo indicaram que tanto as folhas quanto os produtos de bioconversão de *A. ringens* obtiveram um rendimento superior ao de *A. pohliana* (Tabela 1). Frazen et al. (2018) identificaram rendimento diferencial para extratos de flores de *Calendula officinalis*, *Helianthus annuus* e *Rosa x grandiflora*, onde para o mesmo tempo, método de extração e solvente, os extratos mostraram variação no valor do rendimento, apresentando o melhor resultado para *Rosa x grandiflora* (75,3%).

Os resultados deste estudo mostraram que a interação das matrizes vegetais com o solvente utilizado influenciou diretamente no rendimento total do extrato. No entanto, não há na literatura estudos que expliquem a queda do valor de rendimento dos extratos foliares para os extratos de bioconversão da mesma espécie. Uma possibilidade para que tal evento possa ter ocorrido seria a absorção dos carboidratos oferecidos pela planta durante o processo digestivo da lagarta, acarretando o desaparecimento dos metabólitos primários nos extratos fecais da lagarta.

### 3.2 Ensaio larvicida com *Aedes aegypti*

Os resultados do bioensaio larvicida dos extratos metanólicos das folhas de *Aristolochia pohliana*, *Aristolochia ringens* e seus produtos de bioconversão indicaram que os valores de  $CL_{50}$  variam de acordo com a espécie, o tipo de extrato e o tempo de exposição (Tabela 2).

**Tabela 2.** Concentrações letais 50% ( $CL_{50}$ ) ( $mg L^{-1}$ ) dos extratos metanólicos de folhas e produtos de bioconversão por *Battus polydamas* em larvas de *A. aegypti* linhagem Rockefeller.

Extratos	Tempo de exposição (h)	$CL_{50}$ (IC <sub>0,05</sub> )	$\chi^2$	GL	p valor
<i>A. ringens</i> (folha)	24	584,14 (501 – 709,96)	2,14	4	0,29
	48	413,88 (358,39 – 486,13)	2,37	4	0,33
<i>A. ringens</i> (fezes*)	24	615,78 (554,07 – 810,74)	5,76	4	0,78
	48	471,98 (409,21 – 556,97)	4,04	4	0,60
<i>A. pohliana</i> (folha)	24	427,49 (376,39 – 491,17)	4,60	4	0,67
	48	382,63 (337,72 – 436,64)	4,98	4	0,71
<i>A. pohliana</i> (fezes*)	24	444,57 (397,32 – 500,83)	8,18	4	0,91
	48	375,75 (336,83 – 420,34)	7,63	4	0,89

IC, Intervalo de confiança;  $\chi^2$  Qui-quadrado; GL, Grau de liberdade.

\*Fezes de *Battus polydamas* alimentadas com folhas das espécies de *Aristolochia*

Os extratos foliares de *A. ringens* e *A. pohliana* ocasionaram atividade larvicida em *Aedes aegypti* em 24 e 48 h de exposição, com os valores de  $CL_{50}$  de 584,14 e 413,88  $mg L^{-1}$ , para a primeira espécie e 427,49 e 382,63  $mg L^{-1}$ , para a segunda. Também foram avaliadas o  $CL_{90}$  dos compostos (Tabela Suplementar).

As concentrações para atingir os valores de  $CL_{50}$  em extratos foliares de *A. ringens* ( $CL_{50}$  584,14 e 413,88 mg L<sup>-1</sup>) foram superiores a *A. pohliana* ( $CL_{50}$  427,49 e 382,63 mg L<sup>-1</sup>) em 24 e 48 h de exposição, respectivamente. Alois et al. (2022) relataram atividade larvicida do extrato das folhas de *Aristolochia elegans* contra o vetor *Anopheles gambiae*, com valores inferiores ao deste estudo, onde a  $CL_{50}$  do extrato etanólico foi determinada por extrapolação e encontrada em 165 µg/mL e 135 µg/mL após 48 e 72 h, respectivamente, indicando que a  $CL_{50}$  diminua com o aumento do tempo de exposição.

Os produtos de bioconversão de *A. ringens* exibiram  $CL_{50}$  (615,78 e 471,98 mg L<sup>-1</sup>) valores diferenciais aos observados no extrato foliar da mesma espécie ( $CL_{50}$  de 584,14 e 413,88 mg L<sup>-1</sup>) em 24 e 48 h, respectivamente. Os produtos de bioconversão de *A. pohliana* exibiram  $CL_{50}$  (444,57 mg L<sup>-1</sup>), superior ao extrato da folha ( $CL_{50}$  427,49 mg L<sup>-1</sup>) em 24 h. No tempo de exposição de 48 h, a bioconversão resultou na  $CL_{50}$  (375,75 mg L<sup>-1</sup>) inferior ao extrato da folha (382,63 mg L<sup>-1</sup>).

A diferença de resultados entre extratos foliares e os oriundos da bioconversão pode estar relacionada ao fato dos nutrientes ao serem digeridos pela lagarta passam por reações químicas, mediadas por enzimas, convertendo-o num composto diferente do originalmente administrado (Moreira et al. 2014).

Produtos oriundos de fontes naturais destinados a serem utilizados como larvicida com  $CL_{50} < 50$  mg L<sup>-1</sup> são considerados ativos e com  $CL_{50} < 100$  mg L<sup>-1</sup> são considerados moderadamente ativos, segundo Cheng et al. (2003). Komalamisra et al. (2005) relataram que produtos com  $CL_{50}$  entre 100 e 750 mg L<sup>-1</sup> são considerados eficazes e com  $CL_{50} > 750$  mg L<sup>-1</sup> são considerados inativos. Os extratos apresentaram atividade larvicida em concentrações menores que 750 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 2). Desse modo, podemos considerar que os extratos foliares e os produtos da bioconversão como larvicida ativo contra larvas do *A. aegypti*. A bioconversão da *A. pohliana* proporcionou atividade larvicida, ocasionando morte das larvas com  $CL_{50}$  de 375,75 mg L<sup>-1</sup> em 48 h de exposição, que foi menor concentração quando comparado aos outros derivados, no entanto cabe ressaltar que não houve diferença significativa entre eles (Tabela 2).

Atualmente há poucos estudos avaliando os efeitos larvicidas de plantas do gênero *Aristolochia* contra larvas de *A. aegypti*. Cicca et al. (2000) relataram que os extratos metanólicos e diclometanos de *A. triangularis* tiveram atividade larvicida com  $CL_{50}$  de 285,5 e 188,1 µg/mL, respectivamente, contra o *Aedes aegypti*. Krishnappa, & Elumalai (2012) observaram o extrato metanólico da folha de *A. bracteata* contra larvas de terceiro ínstar *A. aegypti*, onde o valor de  $CL_{50}$  foi de 114,89 ppm.

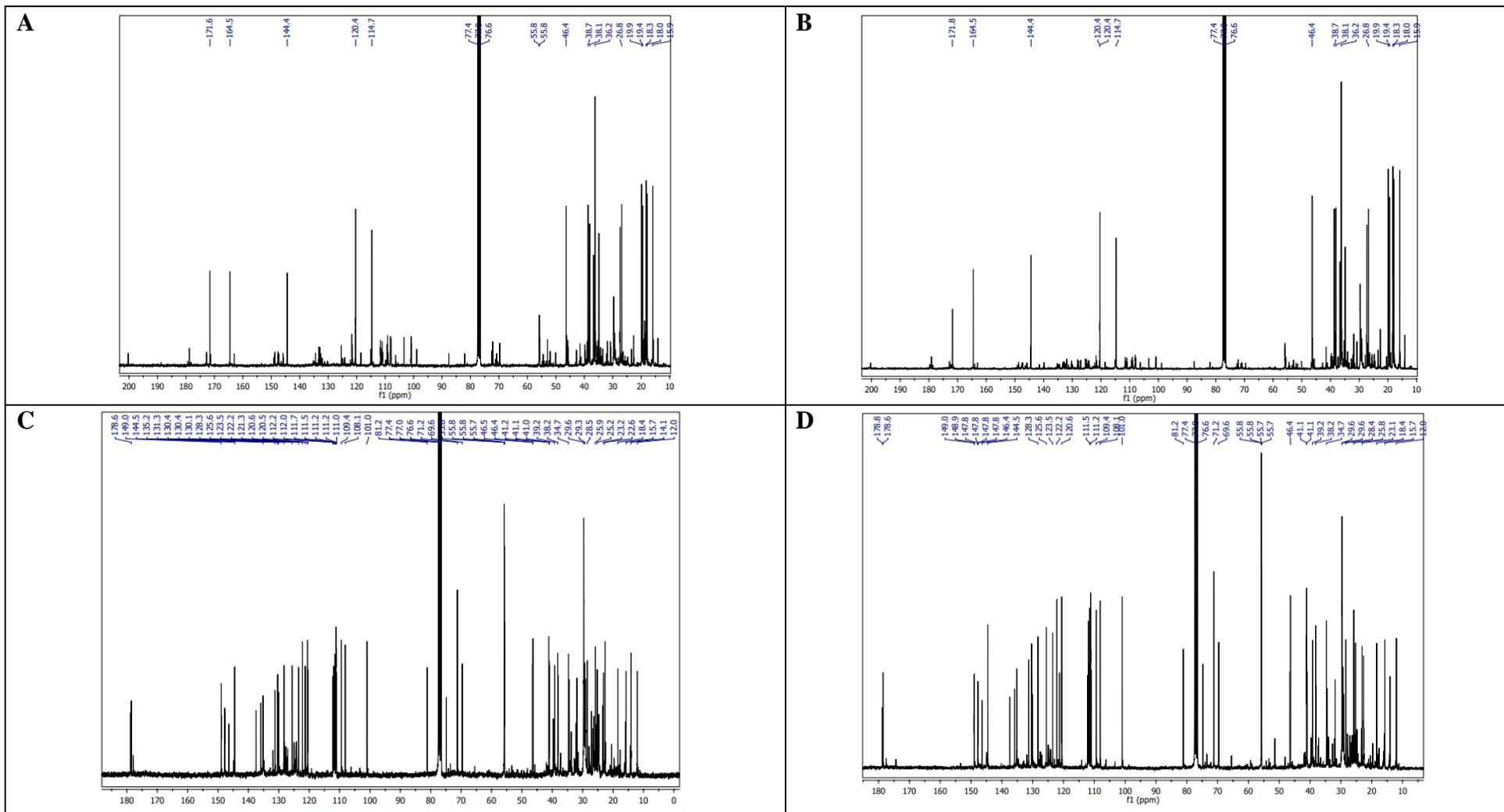
Além disto, não há na literatura estudos que utilizem os produtos de bioconversão de *B. polydamas* para testar sua atividade larvicida, indicando potencialidade do seu uso de forma inovadora. Pesquisas anteriores observaram a redução da toxicidade das folhas de *Aristolochia triangularis* e *Aristolochia gibertii* para as células GM07492, após o processo de bioconversão por *B. polydamas* (Nogueira et al. 2021).

A toxidade larvicida dos extratos pode estar relacionada ao fato de espécies desse gênero apresentarem derivados fenantrênicos, além de terpenóides e outros constituintes químicos (Wu et al. 2004). O efeito larvicida pode ser devido à existência de metabólitos secundários com propriedades repelentes de mosquitos. Tais efeitos variam de acordo com a espécie vegetal, o tempo de exposição e a polaridade do solvente utilizado (Ghosh et al. 2012).

Sendo assim, a utilização desses extratos das plantas e seus produtos de bioconversão que visa usar princípios da química verde para desenvolvimento de produtos seguros usando fontes renováveis (Lenardão et al. 2003), pode ser uma alternativa promissora, entretanto há necessidade de mais estudos.

### **3.3 Análise química por ressonância magnética nuclear (RMN)**

Os extratos metanólicos das espécies do gênero *Aristolochia* e seus produtos de bioconversão forneceram constituintes identificados por análises espectroscópicas, por RMN (Figura 1).



**Figura 1:** Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  oriundos de análises de extratos metanólicos de folhas de *Aristolochia* e seus produtos de bioconversão por *Battus polydamas*. A – Folha de *A. ringens*, B – Bioconversão de *A. ringens*, C – Folha de *A. pohliana*, D – Bioconversão de *A. pohliana*

Os resultados de RMN para os extratos de *Aristolochia ringens* mostraram um composto diterpeno clerodânico caracterizado como ácido colavênico, sendo que suas estruturas foram identificadas por comparação de seus dados espectroscópicos ( $^{13}\text{C}$  RMN) com os dados da literatura de Pacheco et al. (2009). Lopes et al. (1987) isolaram diterpenos clerodanos em espécies de *Aristolochia*. Além disso, Gebbinck et al. (2002) relataram os clerodanos como fontes antialimentares naturais de insetos, sendo mistura de atividade antialimentar (sensorial) e efeitos tóxicos. Wu et al. (2004) também relataram o ácido colavênico como substância majoritária em *A. ringens*. Lajide et al. (1995) registraram atividade biológica desses compostos quando avaliaram sua atividade antialimentar contra *Reticulitermes speratus* K. (Isoptera: Rhinotermitidae, cupim subterrâneo).

Os resultados de RMN para os extratos de *Aristolochia pohliana* revelaram duas lignanas dibenzilbutirolactônica, caracterizadas como (-)-kusunoquinina e dimetilmatairesinol. Sendo essa caracterização realizada por meio de comparação de seus dados espectroscópicos ( $^{13}\text{C}$  RMN) com os dados da literatura de Messiano et al. (2008) e Heleno et al (2006). Lignanas de tipos estruturais diversos foram descritas na literatura como sinergistas de inseticidas, embora individualmente inativas (Harmatha et al. 2002).

Lignanas do tipo dibenzilbutirolactona foram descritas como inibidoras de alimentação, impedimentos de alimentação ou inibidoras de crescimento larval (Harmatha et al. 2002; 2003). Messiano et al. (2008) relataram que o extrato hexânico de raízes de *Aristolochia malmeana* (Aristolochiaceae) apresentou atividade inseticida na lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*) e a substância associada a esta atividade foi a lignana dibenzilbutirolactônica ((-)-kusunoquinina), que foi similar a identificada em *A. pohliana*.

As lignanas podem ser caracterizadas pelos seus efeitos inseticidas. No entanto, são poucos os trabalhos que relatem as propriedades biológicas, larvicidas e/ou inseticida substância majoritária dimetilmatairesinol. Chang et al. (2000) relatou a citotoxicidade significativa do composto dimetilmatairesinol contra células tumorais humanas. Em geral, as substâncias correspondentes são as mesmas para ambos extratos da mesma espécie. Além disso, os extratos das folhas e os produtos de bioconversão de ambas as espécies (*A. ringens* e *A. pohliana*) apresentaram atividade larvicida.

## 5. Conclusão

Tanto os extratos metanólicos de plantas quanto de seus produtos de bioconversão apresentaram atividade larvicida. A caracterização química das substâncias majoritárias das

folhas e dos produtos de bioconversão indicaram que a *A. pohliana* possui os compostos (-)-kusunoquinina e dimetilmatairesinol, enquanto a *A. ringens* tem como substância o ácido colavênico como composto majoritário. No entanto, os resultados refletem, a necessidade de mais estudos para analisar as diversas substâncias encontradas nos extratos, pois o estudo sugere que tanto os extratos de folhas quanto seus produtos de bioconversão podem ser usados para o controle larval do mosquito *Aedes aegypti*.

## 6. Referências

- Alois, K. M., Sangiwa, G. C., Marciale, C. M., & Sahini, M. G., 2022. Phytochemical constituents and larvicidal efficacy of leaf extracts of *Aristolochia elegans* (Aristolochiaceae). *South African Journal of Botany*, 146, 383-394. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.11.015>
- Andrade-Neto, V. F., da Silva, T., Lopes, L. M. X., do Rosário, V. E., de Pilla Varotti, F., & Krettli, A. U., 2007. Antiplasmodial activity of aryltetralone lignans from *Holostylis reniformis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(7), 2346-2350. <https://doi.org/10.1128/AAC.01344-06>
- Anjolette, A. F. F., & Macoris, M. D. L. D. G., 2016. Técnicas para manutenção de *Aedes aegypti* em laboratório. *Bepa-Boletim Epidemiológico Paulista*, 19-29. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/ses-sp/2016/ses-34229/ses-34229-6334.pdf>. Acesso em: 27 jun. 2022
- Chang, S. T., Wang, D. S. Y., Wu, C. L., Shiah, S. G., Kuo, Y. H., & Chang, C. J., 2000. Cytotoxicity of extractives from *Taiwania cryptomerioides* heartwood. *Phytochemistry*, 55(3), 227-232. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00275-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00275-2)
- Cheng, S. S., Chang, H. T., Chang, S. T., Tsai, K. H., & Chen, W. J., 2003. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresource Technology*, 89(1), 99-102. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00008-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00008-7)
- Ciccia, G., Coussio, J., & Mongelli, E., 2000. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 72(1-2), 185-189. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00241-5](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00241-5)
- Costa, C. F. D., Silva, A. V. D., Nascimento, V. A. D., Souza, V. C. D., Monteiro, D. C. D. S., Terrazas, W. C. M., Passos, R. A., Nascimento, S., Lima, J. B. P., Naveca, F. G., 2018. Evidence of vertical transmission of Zika virus in field-collected eggs of *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(7), e0006594. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006594>
- Dias, D. A., Urban, S., & Roessner, U., 2012. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, 2(2), 303-336. <https://doi.org/10.3390/metabo2020303>

Dhawan, D., & Gupta, J., 2017. Research article comparison of different solvents for phytochemical extraction potential from *Datura metel* plant leaves. Int J Biol Chem, 11(1), 17-22. <https://doi.org/10.3923/ijbc.2017.17.22>

Franzen, F. D.L., Fries, L. L. M., de Oliveira, M. S. R., Lidório, H. F., Menegaes, J. F., & Lopes, S. J., 2018. Teor e rendimento de extratos de flores obtidos por diferentes métodos e períodos de extração. Acta Iguazu, 7(1), 9-21. <https://doi.org/10.48075/actaiguaz.v7i1.16765>

Fregene, A., & Newman, L. A., 2005. Breast cancer in sub - Saharan Africa: how does it relate to breast cancer in African - American women?. Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society, 103(8), 1540-1550. <https://doi.org/10.1002/cncr.20978>

Garcez, W. S., Garcez, F. R., da Silva, L. M., & Hamerski, L., 2009. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of some plants native to the West-Central region of Brazil. Bioresource Technology, 100(24), 6647-6650. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.092>

Gebbinck, E. A. K., Jansen, B. J., & de Groot, A., 2002. Insect antifeedant activity of clerodane diterpenes and related model compounds. Phytochemistry, 61(7), 737-770. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00174-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00174-7)

Ghosh, A., Chowdhury, N., & Chandra, G., 2012. Plant extracts as potential mosquito larvicides. The Indian journal of medical research, 135(5), 581. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3401688/>

Harmatha, J., & Dinan, L., 2003. Biological activities of lignans and stilbenoids associated with plant-insect chemical interactions. Phytochemistry Reviews, 2(3), 321-330. <https://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000045494.98645.a3>

Harmatha, J., & Nawrot, J., 2002. Insect feeding deterrent activity of lignans and related phenylpropanoids with a methylenedioxyphenyl (piperonyl) structure moiety. In: Proceedings of the 11th International Symposium on Insect-Plant Relationships. Springer, Dordrecht, 2002. p. 51-60. <https://doi.org/10.1023/A:1021286002077>

Heleno, V. C. G., da Silva, R., Pedersoli, S., de Albuquerque, S., Bastos, J. K., e Silva, M. L. A., Doe, P. M., Silva, G. V. J., & Lopes, J. L. C., 2006. Detailed <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR structural assignment of three biologically active lignan lactones. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 63(1), 234-239. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2005.04.047>

Hsu, B., Coupar, IM, & Ng, K., 2006. Atividade antioxidante do extrato de água quente do fruto da palmeira Doum, *Hyphaene thebaica*. Food chemistry, 98 (2), 317-328. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.077>

Komalamisra, N., Trongtokit, Y., Rongsriyam, Y., & Apiwathnasorn, C., 2005. Screening for larvicidal activity in some Thai plants against four mosquito vector species. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 36(6), 1412. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16610643/>

Kovendan, K., & Murugan, K., 2011. Effect of medicinal plants on the mosquito vectors from the different agro-climatic regions of Tamil Nadu, India. *Adv Environ Biol*, 5(2), 335-344. [https://www.researchgate.net/publication/216385615\\_Effect\\_of\\_Medicinal\\_Plants\\_on\\_the\\_Mosquito\\_Vectors\\_from\\_the\\_Different\\_Agroclimatic\\_Regions\\_of\\_Tamil\\_Nadu\\_India\\_2\\_335-344\\_2011](https://www.researchgate.net/publication/216385615_Effect_of_Medicinal_Plants_on_the_Mosquito_Vectors_from_the_Different_Agroclimatic_Regions_of_Tamil_Nadu_India_2_335-344_2011)

Krishnappa, K., & Elumalai, K., 2012. Toxicity of *Aristolochia bracteata* methanol leaf extract against selected medically important vector mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2, S553-S557. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(12\)60219-9](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(12)60219-9)

Lajide, L., Escoubas, P., & Mizutani, J., 1995. Termite antifeedant activity in *Detarium microcarpum*. *Phytochemistry*, 40(4), 1101-1104. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00153-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00153-X)

Lenardão, E. J., Freitag, R. A., Dabdoub, M. J., Batista, A. C. F., & Silveira, C. D. C., 2003. Green chemistry: the 12 principles of green chemistry and its insertion in the teaching and research activities. *Química Nova*, 26, 123-129. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000100020>

Lerma-Herrera, M. A., Beiza-Granados, L., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J. E., Navarro-Santos, P., Herrera-Bucio, R., ... & García-Gutiérrez, H. A., 2022. Biological Activities of Organic Extracts of the Genus *Aristolochia*: A Review from 2005 to 2021. *Molecules*, 27(12), 3937. <https://doi.org/10.3390/molecules27123937>

Lopes, L. M., Bolzani, V. D. S., & Trevisan, L. M., 1987. Clerodane diterpenes from *Aristolochia* species. *Phytochemistry*, 26(10), 2781-2784. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83590-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83590-6)

Messiano, G. B., Vieira, L., Machado, M. B., Lopes, L. M., De Bortoli, S. A., & Zukerman-Schpector, J., 2008. Evaluation of insecticidal activity of diterpenes and lignans from *Aristolochia malmeana* against *Anticarsia gemmatalis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(8), 2655-2659. <https://doi.org/10.1021/jf703594z>

Moreira, C., 2014. Bioconversão, *Rev. Ciência Elementar* 2(4): 239. <http://doi.org/10.24927/rce2014.239>

Murugan K., Murugan P., Noortheen A., 2007. Larvicidal and repellent potential of *Albizzia amara* Boivin and *Ocimum basilicum* Linn against dengue vector, *Aedes aegypti* (Insecta:Diptera:Culicidae). *Bioresour Technol.* 98(1):198-201. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.12.009>

Nascimento, I. R., Murata, A. T., Bortoli, S. A., & Lopes, L. M., 2004. Insecticidal activity of chemical constituents from *Aristolochia pubescens* against *Anticarsia gemmatalis* larvae. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 60(4), 413-416. <https://doi.org/10.1002/ps.805>

Nogueira, C. R., Silva, J. D. A. D., Vieira, M. D. C., Cardoso, C. A. L., Carvalho, R. A. D., Amaral, C. S. T., & Amaral, A. C., 2021. Cytotoxicity and the bioconversion strategy of

*Aristolochia* spp. Arquivos do Instituto Biológico, 88. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000622019>

Pacheco, A. G., Machado de Oliveira, P., Piló-Veloso, D., & Flávio de Carvalho Alcântara, A., 2009. <sup>13</sup>C-NMR data of diterpenes isolated from *Aristolochia* species. *Molecules*, 14(3), 1245-1262. <https://doi.org/10.3390/molecules14031245>

Parekh, J., Jadeja, D., & Chanda, S., 2005. Efficacy of aqueous and methanol extracts of some medicinal plants for potential antibacterial activity. *Turkish Journal of Biology*, 29(4), 203-210. Disponível em: <https://journals.tubitak.gov.tr/biology/vol29/iss4/3>

Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde (SVS-MS). Boletim Epidemiológico. Volume 49 Mar. 2018. Disponível em: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/setembro/10/2018-045.pdf>. Acesso em 3 set. 2022.

Sharaibi, O. J., & Afolayan, A. J., 2017. Phytochemical analysis and toxicity evaluation of acetone, aqueous and methanolic leaf extracts of *Agapanthus praecox* Willd. *Int J Pharm Sci Res*, 8, 5342-5348. <https://doi.org/10.19080/JCMAH.2018.07.555722>

Usman, H. S., Sallau, A. B., Nok, A. J., & Salihu, A., 2018. Larvicidal Assessment of Fractions of *Aristolochia albida* Rhizome on *Culex quinquefasciatus*. *Tropical Journal of Natural Product Research (TJNPR)*, 2(5), 227-234. <https://doi.org/10.26538/tjnpr/v2i5.5>

Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J., Giulietti, A.M., Melhem, T.S., Bittrich, V., Kameyama, C., 2002. Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo, vol. 2, pp: 39-50. Disponível em: <https://www.infraestruturameioambiente.sp.gov.br/institutodebotanica/wp-content/uploads/sites/235/2016/02/Aristolochiaceae.pdf>. Acesso: 5 set. 2022

World Health Organization (WHO), 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. World Health Organization, 2005. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69101>. Acesso em 14 ago. 2022.

World Health Organization (WHO), 2009. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition. World Health Organization. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44188>. Acesso em 3 set. 2022.

World Health Organization (WHO), 2022. Dengue and severe dengue. World Health Organization. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Acesso em 3 set. 2022

Wu, T. S., Damu, A. G., Su, C. R., & Kuo, P. C., 2004. Terpenoids of *Aristolochia* and their biological activities. *Natural Product Reports*, 21(5), 594-624. <https://doi.org/10.1039/b401950d>



## Anexo 1:

**Tabela S1.** Concentrações letais 90% (CL<sub>90</sub>) (mg L<sup>-1</sup>) dos extratos de folhas e produtos de bioconversão por *Battus polydamas* em larvas de *Ae. aegypti* linhagem Rockefeller.

Extratos	Tempo de exposição (h)	CL90 (IC <sub>0,05</sub> )	$\chi^2$	GL	<i>p</i> valor
<i>A. ringens</i> (folha)	24	1521,62 (1141,90 – 2403,29)	2,14	4	0,29
	48	1018,01(872,01 – 1618,53)	2,37	4	0,33
<i>A. ringens</i> (fezes*)	24	1705,87 (1250,09– 2848,10)	5,76	4	0,78
	48	1221,89(950,16 – 1786,52)	4,04	4	0,60
<i>A. pohliana</i> (folha)	24	975,74 (795,72 – 1312,59)	4,60	4	0,67
	48	861,47 (711,18 – 1131,63)	4,98	4	0,71
<i>A. pohliana</i> (fezes*)	24	866,82 (733,45 – 1102,52)	8,18	4	0,91
	48	715,15 (613,57 – 886,08)	7,63	4	0,89

IC, Intervalo de confiança;  $\chi^2$  Qui-quadrado; GL, Grau de liberdade.

\*Fezes de *Battus polydamas* alimentadas com folhas das espécies de *Aristolochia*

## Anexo 2: Normas da revista