

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE
Raquel da Silva Vieira

**POTENCIAL LARVICIDA DO FRUTO DE *Caryocar brasiliense* Cambess. EM
Aedes aegypti, E EFEITOS TÓXICOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Campo Grande

2024

RAQUEL DA SILVA VIEIRA

**POTENCIAL LARVICIDA DO FRUTO DE *Caryocar brasiliense* Cambess. EM
Aedes aegypti, E EFEITOS TÓXICOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de Pesquisa: A biodiversidade do pantanal e cerrado e suas relações e aplicações na saúde.

Orientadora: Prof. Dra. Danielle Bogo.

Campo Grande

2024




Ata de Defesa de Tese
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste
Doutorado

Aos dezessete dias do mês de junho do ano de dois mil e vinte e quatro, às catorze horas, na videoconferência, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Danielle Bogo (UFMS), Evelyn de Andrade Salomão (-), Juliana Rodrigues Donadon (UFMS), Raquel Pires Campos (UFMS) e Rita de Cassia Avellaneda Guimaraes (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: RAQUEL DA SILVA VIEIRA, CPF 99854708187, Área de concentração em Tecnologia e Saúde, do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "POTENCIAL LARVICIDA DO FRUTO DE CARYOCAR BRASILIENSE CAMBESS. EM AEDES AEGYPTI, E EFEITOS TÓXICOS IN VITRO E IN VIVO" e orientação de Danielle Bogo. A presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, a presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR(A)	ASSINATURA	AValiação
Dra. Danielle Bogo (Interno) Presidente da Banca Examinadora	 Documento assinado digitalmente DANIELLE BOGO Data: 17/06/2024 17:55:09-03:00 Verifique em https://validar.jf.gov.br	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovação <input type="checkbox"/> Aprovação c/ revisão <input type="checkbox"/> Reprovação
Dra. Rita de Cassia Avellaneda Guimaraes (Interno)	 Documento assinado digitalmente RITA DE CASSIA AVELLANEDA GUIMARAES Data: 18/06/2024 18:34:52-03:00 Verifique em https://validar.jf.gov.br	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovação <input type="checkbox"/> Aprovação c/ revisão <input type="checkbox"/> Reprovação
Dra. Raquel Pires Campos (Externo)	 Documento assinado digitalmente RAQUEL PIRES CAMPOS Data: 18/06/2024 17:47:48-03:00 Verifique em https://validar.jf.gov.br	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovação <input type="checkbox"/> Aprovação c/ revisão <input type="checkbox"/> Reprovação
Dra. Juliana Rodrigues Donadon (Externo)	 Documento assinado digitalmente JULIANA RODRIGUES DONADON Data: 17/06/2024 23:25:27-03:00 Verifique em https://validar.jf.gov.br	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovação <input type="checkbox"/> Aprovação c/ revisão <input type="checkbox"/> Reprovação
Dra. Evelyn de Andrade Salomão (Externo)	 Documento assinado digitalmente EVELYN DE ANDRADE SALOMAO Data: 18/06/2024 18:55:12-03:00 Verifique em https://validar.jf.gov.br	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovação <input type="checkbox"/> Aprovação c/ revisão <input type="checkbox"/> Reprovação
Dr. Luciana Miyagusku (Externo) (Suplente)		<input type="checkbox"/> Aprovação <input type="checkbox"/> Aprovação c/ revisão <input type="checkbox"/> Reprovação

RESULTADO FINAL: APROVAÇÃO APROVAÇÃO COM REVISÃO REPROVAÇÃO

OBSERVAÇÕES: _____

 Documento assinado digitalmente
RAQUEL DA SILVA VIEIRA
Data: 18/06/2024 17:57:01-03:00
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Assinatura do(a) Aluno(a)

Nada mais havendo a ser tratado, o(a) Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

À **Deus**, Criador da Vida.
À minha família pelo apoio e orações.

AGRADECIMENTOS

A meu bom Deus, pelo Dom da vida, saúde, sabedoria, paciência e guardião da minha saúde mental.

Meus sinceros agradecimentos a minha orientadora e amiga Profa. Dra. Danielle Bogo por acreditar no meu projeto e pelos anos de convívio durante o doutorado, pela orientação, dedicação e disponibilidade. Obrigada pelos conselhos nos momentos bons e nos momentos difíceis que passei nessa jornada. Amizade e parceria que levarei para minha vida profissional.

Ao professor Dr. Paulo Roberto Haidamus de Oliveira Bastos, por abrir as portas para a minha carreira científica, meus sinceros agradecimentos.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) que me recebeu de portas abertas desde a graduação, especialização, mestrado e agora doutorado.

Ao Instituto Federal de Mato Grosso do Sul (IFMS), Campus Coxim, em especial à diretora do campus Profa Dra. Ângela Kwiatkowski pela gentileza na parceria com o espaço físico e equipamentos para os ensaios biológicos com o *Aedes aegypti*, e ao técnico do laboratório Dr. Danilo Tófoli pela disponibilidade com o laboratório.

Ao professor Dr. Antônio Pancrácio de Souza, do Departamento de Morfofisiologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) pelo conhecimento compartilhado.

À Profa Dra. Ana Cristina Jacobowski, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) pela disponibilidade com espaço físico do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FACFAN) e ensinamentos.

Ao professor Dr. Eduardo José de Arruda, da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) por fornecer os ovos de *Aedes aegypti*, pela imensa parceria, ensinamentos compartilhados, atenção, motivação, palavras de conforto nos momentos difíceis, meus sinceros agradecimentos.

À Profa Dra. Rosângela Assis Jacques, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRS pela colaboração na análise química deste estudo.

À Profa Dra. Luciane Caneloro, pela importante colaboração no estudo histológico.

Ao meu colega Roberto Mitsuro Souza Sato, agente de Entomologia da Secretaria Estadual de Saúde, pela parceria desde o início deste projeto, nas palestras realizadas nas escolas públicas de Coxim/MS, levando conhecimento às crianças e adolescentes sobre o *Aedes aegypti*, meus sinceros agradecimentos.

À minha colega Eliane Cristina Brunhera (*in memoriam*), companheira de mestrado que esteve presente em todos os momentos difíceis que passei, sempre parceira e prestativa. Torceu por mim na minha defesa de mestrado e hoje não está presente nesse momento especial, mas tenho certeza de que festejaria comigo. Meu muito obrigado.

RESUMO

Com o aumento da resistência do *Aedes aegypti* aos inseticidas químicos convencionais e as epidemias de arboviroses, surge a necessidade de encontrar alternativas sustentáveis para controlar o vetor, especialmente em países tropicais e subtropicais. O Brasil possui uma biodiversidade vegetal no bioma Cerrado que oferece um vasto potencial de bioativos, destacando a importância de estudos para explorar essas substâncias naturais. Destaca-se o *Caryocar brasiliense* Cambess, um fruto nativo conhecido como pequi, rico em substâncias bioativas em sua composição química, sendo assim, o objetivo deste estudo avaliar o potencial larvicida do fruto de *Caryocar brasiliense* Cambess. em *Aedes aegypti* e efeitos tóxicos *in vitro* e *in vivo*. Os extratos da polpa e da amêndoa do pequi foram obtidos por maceração em solvente etanol, filtrados e rotaevaporados. Na análise química, as amostras foram submetidas à reação de esterificação de ácidos graxos, injetadas em cromatógrafo gasoso acoplado à Espectrometria de Massas (CG/EM) e identificados quatro ésteres graxos no extrato da polpa e cinco no extrato da amêndoa, sendo os majoritários derivados do palmítico e oleico. As amostras foram testadas em larvas de terceiro instar de *Aedes aegypti* da linhagem Rockefeller e obtiveram atividade larvicida em todas as concentrações testadas de 0,3 a 1,0 mg/mL, obtendo o extrato da amêndoa o melhor efeito na mortalidade, com CL₅₀ 0,58 e CL₉₀ 1,15 mg/mL, em relação ao da polpa CL₅₀ 0,64 e CL₉₀ 1,69 mg/mL. A análise morfológica mostrou alteração na coloração das larvas expostas ao tratamento, como perda da continuidade do tubo digestivo, perda parcial da matriz peritrófica e alteração no lóbulo anal. Nos testes *in vitro*, foram testadas duas linhagens de células, sendo uma de fibroblastos murino 3T3 (ATCC CRL-1658) e outra de cordão umbilical humano HUVEC (ATCC CRL-1730), obtendo parâmetro de inibição de 50% do crescimento celular em GI₅₀. Os extratos etanólico da polpa e da amêndoa do pequi não apresentaram citotoxicidade na concentração máxima testada, GI₅₀ >250 µg/ml, comparado a doxorrubicina que apresentou citotoxicidade em 0,25 e 0,023 µg/ml, evidenciando toxicidade 1000 vezes menor na linhagem 3T3 (ATCC CRL-1658) e 10.000 vezes menor HUVEC (ATCC CRL-1730) quando comparados ao mesmo quimioterápico. Os testes *in vivo* foram realizados em camundongos machos da linhagem BALB/c em quatro grupos com três animais cada, que receberam os extratos da polpa e da amêndoa diluídos em azeite de oliva nas doses 2000 mg/Kg (G1), 300 mg/Kg (G2), 50 mg/kg (G3) e 5 mg/kg (G4) e um controle (G5) que recebeu apenas azeite de oliva, todos em dose única (200 µl) via gavagem após 8h de jejum e observados pelo período de 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas, e diariamente por 17 dias. Após a administração das doses, um *screening hipocrático* foi realizado para avaliação dos parâmetros de anestesia, atividade geral, força para agarrar, resposta ao toque, tremores, locomoção, frêmito vocal, irritabilidade, contorção, ptose, lacrimação, respiração, ataxia, alimentação com água e alimentação com comida e constatou-se valores normais nos parâmetros observados, sem sinais de toxicidade, e sem óbito nas diferentes concentrações testadas, obtendo DL₅₀ estimada maior que 2000 mg/kg. Fígado e rins dos animais testados com o extrato da polpa foram coletados para os parâmetros histopatológicos, esteatose (degeneração gordurosa), necrose, infiltrado leucocitário, degeneração hialina, degeneração hidrópica e fibrose, apresentaram padrões histológicos dentro da normalidade. Portanto, os extratos etanólicos da polpa e da amêndoa do *Caryocar brasiliense* se mostraram ativos contra larvas do *Aedes aegypti*, com segurança tóxica *in vitro* e *in vivo*.

Descritores: *Aedes*; ácidos graxos; biodiversidade; compostos fitoquímicos; larvicidas; controle de vetores de doenças

ABSTRACT

The increasing resistance of *Aedes aegypti* to conventional chemical insecticides and arbovirus epidemics leads to a need to find sustainable alternatives to control the vector, especially in tropical and subtropical countries. Brazil has a plant biodiversity in the Cerrado biome that offers a vast potential of bioactives, highlighting the importance of studies to explore these natural substances. The *Caryocar brasiliense* Cambess stands out, a native fruit known as pequi, rich in bioactive substances in its chemical composition, so the objective of this study is to evaluate the larvicidal potential of the fruit of *Caryocar brasiliense* Cambess. in *Aedes aegypti* and toxic effects in vitro and in vivo. The extracts of pequi pulp and almond were obtained by maceration in ethanol solvent, filtered and routeevaporated. In the chemical analysis, the samples were submitted to the fatty acid esterification reaction, injected in a gas chromatograph coupled to Mass Spectrometry (GC/MS) and four fatty esters were identified in the pulp extract and five in the almond extract, the majority being palmitic and oleic derivatives. The samples were tested in third instar larvae of *Aedes aegypti* of the Rockefeller strain and obtained larvicidal activity at all tested concentrations of 0.3 to 1.0 mg/mL, with the almond extract having the best effect on mortality, with LC50 0.58 and LC90 1.15 mg/mL, in relation to the pulp LC50 0.64 and LC90 1.69 mg/mL. The morphological analysis showed changes in the color of the larvae exposed to the treatment, such as loss of continuity of the digestive tract, partial loss of the peritrophic matrix and alteration in the anal lobe. In the in vitro tests, two cell lines were tested, one of murine fibroblasts 3T3 (ATCC CRL-1658) and the other of human umbilical cord HUVEC (ATCC CRL-1730), obtaining a parameter of inhibition of 50% of cell growth in GI50. The ethanolic extracts of the pequi pulp and almond did not present cytotoxicity at the maximum concentration tested, GI50 >250 µg/ml, compared to doxorubicin which presented cytotoxicity at 0.25 and 0.023 µg/ml, showing toxicity 1000 times lower in the 3T3 strain (ATCC CRL-1658) and 10,000 times lower in the HUVEC strain (ATCC CRL-1730) when compared to the same chemotherapy drug. The in vivo tests were carried out in male mice of the BALB/c strain in four groups with three animals each, which received the extracts of the pulp and almond diluted in olive oil at doses 2000 mg/kg (G1), 300 mg/kg (G2), 50 mg/kg (G3) and 5 mg/kg (G4) and a control (G5) that received only olive oil. All in a single dose (200 µL) via gavage after 8 hours of fasting and observed for a period of 30 minutes, 1, 2, 4, 6, 12 and 24 hours, and daily for 17 days. After the administration of the doses, a Hippocratic screening was performed to evaluate the parameters of anesthesia, general activity, grasping force, response to touch, tremors, locomotion, vocal thrill, irritability, contortion, ptosis, lacrimation, respiration, ataxia, feeding with water and feeding with food, and normal values were found in the parameters observed, with no signs of toxicity, and no death in the different concentrations tested. obtaining an estimated LD50 greater than 2000 mg/kg. Liver and kidneys of the animals tested with the pulp extract were collected for histopathological parameters, steatosis (fatty degeneration), necrosis, leukocyte infiltrate, hyaline degeneration, hydropic degeneration and fibrosis, showed histological patterns within the normal range. Therefore, the ethanolic extracts of the pulp and almond of *Caryocar brasiliense* have been shown to be active against *Aedes aegypti* larvae, with toxic safety in vitro and in vivo.

Descriptors: *Aedes*; Fatty Acids; Biodiversity; Phytochemicals; Larvicides; Vector

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGE	Ácidos Graxos Essenciais
AGSs	Ácidos Graxos Saturados
AHJ	Análogos de Hormônio Juvenil
AOCS	American Oil Chemists' Society
BOD	Biochemical Oxygen Demand
Bti	Bacillus thuringiensis israelensis
CA	Carbamatos
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CG	Cromatografia gasosa
CL50	Concentração Letal 50%
CL90	Concentração Letal 90%
CO ₂	Dióxido de carbono
COOH	Ácido carboxílico
DL ₅₀	Dose Letal Mediana
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DXR	Cloridrato de doxorrubicina
EM	Espectrometria de Massas
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAMEs	fatty acid methyl esters
HE	Hematoxilina-Eosina
HUVEC	Human Umbilical Cord Cells
IGR	Insect Growth Regulator
ISQ	Inibidores de Síntese de Quitina
L1	Larva de primeiro instar
L2	Larva de segundo instar
L3	Larva de terceiro instar
L4	Larva de quarto instar
LAFICAVE	Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores
MS	Ministério da Saúde
MUFAs	Ácidos graxos monoinsaturados

OECD	Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OH	Hydroxyl
OP	Organofosforados
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI	Piretróides
PNI	Programa Nacional de Imunização
PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados
RPM	Rotação Por Minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
SRB	Sulforrodamina B
TCA	Tricloroacético
UFGD	Universidade Federal da Grande Dourados
WHO	World Health Organization

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Distribuição geográfica global do <i>Aedes aegypti</i> com maior ocorrência nas áreas na cor laranja.....	3
Figura 2.	Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	4
Figura 3.	Características da vegetação do Cerrado brasileiro.....	6
Figura 4.	Ocorrência natural do <i>Caryocar brasiliense</i> no Brasil.....	7
Figura 5.	Foto do <i>Caryocar brasiliense</i> . (A) árvore do pequizeiro (<i>Caryocar brasiliense</i>); (B) fruto cortado apresentando exocarpo (casca), mesocarpo externo grosso e cinco pirênios. (C) corte longitudinal de um pirênio de pequi mostrando o mesocarpo interno (polpa amarela) que recobre o endocarpo composto por uma camada resistente de espinhos onde abriga a amêndoa. (D) fruto globoso com exocarpo.....	8
Figura 6.	Fluxograma das etapas de extração dos extratos etanólico da polpa e amêndoa de <i>Caryocar brasiliense</i>	15
Figura 7.	Representação esquemática do ensaio larvicida com extratos etanólico da polpa e amêndoa de <i>Caryocar brasiliense</i>	18
Figura 8.	Rendimento dos extratos etanólico extraídos da polpa (A) e amêndoa (B) de <i>Caryocar brasiliense</i>	24
Figura 9.	Cromatograma CG/EM do <i>Caryocar brasiliense</i> . (A) compostos químicos encontrados na polpa. (B) e na amêndoa.....	25
Figura 10.	Curva de dose-resposta para estimativa de mortalidade das larvas do mosquito <i>Ae. aegypti</i> após 24 horas de exposição. A) Log CL ₅₀ 0,64 do extrato etanólico da polpa de <i>Caryocar brasiliense</i> . B) Log CL ₅₀ 0,57 do extrato etanólico da amêndoa de <i>Caryocar brasiliense</i>	30
Figura 11.	Morfologia das larvas de <i>Ae. aegypti</i> após 24h do tratamento com extratos etanólico da polpa e da amêndoa de <i>Caryocar brasiliense</i> . (A) Controle; (B, C) tratamento com a polpa; (D, E) tratamento com a amêndoa. (A-E) aumento de 200x; (F) tratamento com o extrato da amêndoa. (G, H) tratamento com o extrato da polpa. (F-H) aumento de 400x. SR = Sifão respiratório, LA = Lóbulo anal, C =	

Cerdas, PA = Papilas anais, TD = Tubo digestivo, S = Segmentos, 32

A = Antenas.....

Figura 12. Fotomicrografias de órgão vital exibindo coloração H&E de fígado em doses testadas do extrato etanólico da polpa do *Caryocar brasiliense* em mg/kg. (A) (300); (B) (2000); (C) (5) e (D) (50). Ducto Biliar (DB); Veia Porta (VP); Veia Centro lobulares (VC)..... 37

Figura 13. Fotomicrografias de órgão vital exibindo coloração H&E de rins em doses testadas do extrato etanólico da polpa do *Caryocar brasiliense* em mg/kg. (A) (300); (B) (2000); (C) (5) e (D) (50). curpúsculo renal (cr); Túbulo contorcido proximal (tp); Túbulo contorcido distal (td)..... 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição de ésteres derivados dos ácidos graxos encontrados nos extratos etanólico da polpa e da amêndoa do <i>Caryocar brasiliense</i>	25
Tabela 2.	Mortalidade larval dos extratos etanólico da polpa e da amêndoa do <i>Caryocar brasiliense</i> em <i>Aedes aegypti</i>	27
Tabela 3.	Mortalidade larval observada dos extratos etanólico da polpa e da amêndoa do <i>Caryocar brasiliense</i> em <i>Aedes aegypti</i> em relação ao esperado no controle negativo.....	28
Tabela 4.	Concentrações letais (CL50 e CL90) para larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> em várias concentrações dos extratos etanólico da polpa e amêndoa de <i>Caryocar brasiliense</i> após 24 horas de exposição.....	29
Tabela 5.	Atividade citotóxica (GI50 µg/ml) dos extratos etanólico da polpa e da amêndoa do <i>Caryocar brasiliense</i> em células 3T3 (ATCC CRL-1658) e HUVEC (ATCC CRL-1730)	36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	<i>Aedes aegypti</i>	3
2.2	CONTROLE E RESISTENCIA QUÍMICA.....	5
2.3	CERRADO E OS FRUTOS NATIVOS.....	5
2.3.1	<i>Caryocar brasiliense</i> Cambess	6
2.4	RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DOS ÁCIDOS GRAXOS	10
2.5	PROPRIEDADES BIOATIVAS.....	11
2.6	TOXICIDADE ORAL AGUDA.....	12
3	OBJETIVOS	13
3.1	Objetivo geral.....	13
3.2	Objetivos específicos.....	13
4	MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1	Coleta dos frutos.....	14
4.2	Elaboração dos extratos etanólico.....	14
4.3	Análise de rendimento.....	15
4.4	Reação de esterificação de ácidos graxos (Método CE-1F-96 da American Oil Chemists' Society (AOCS))	16
4.5	Cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM)	16
4.6	Ensaio biológico com <i>Aedes aegypti</i>	17
4.6.1	Atividade larvicida.....	17
4.7	Efeito citotóxico em células 3T3 (ATCC CRL-1658) e HUVEC (ATCC CRL-1730)	19
4.7.1	Preparo da amostra dos extratos etanólico de <i>Caryocar brasiliense</i>	19
4.7.2	Ensaio com Sulforodamina B (SRB)	20
4.8	Ensaio de toxicidade oral aguda <i>in vivo</i>	21
4.8.1	Animais experimentais.....	21
4.8.2	Design Experimental.....	21
4.8.3	Análises Histológicas.....	22

4.9	Análise Estatística.....	22
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5.1.	Rendimento dos extratos.....	23
5.2.	Composição química	24
5.3.	Atividade larvívica sobre <i>Aedes aegypti</i>	26
5.3.1	Alterações morfológicas em larvas do <i>Ae. aegypti</i> causadas pelos extratos etanólicos da polpa e amêndoa de <i>Caryocar brasiliense</i>	31
5.4.	Atividade citotóxica <i>in vitro</i>	35
5.5.	Avaliação da toxicidade oral aguda da polpa e da amêndoa do <i>Caryocar brasiliense</i>	36
5.5.1.	Análise histológica de fígado e rins com o extrato etanólico da polpa do <i>Caryocar brasiliense</i>	36
6.	CONCLUSÃO.....	40
	REFERÊNCIAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

As arboviroses tem sido motivo de preocupação com a saúde no mundo por serem transmitidas aos humanos por artrópodes, como o *Aedes aegypti*, que se adaptou no ambiente urbano devido a fatores climáticos favoráveis (Silva; Ramos, 2017) e recursos disponíveis para sua reprodução criados pelo homem, como recipientes artificiais, como vasos de plantas, pneus descartados, recipientes domiciliares, entre outros (Silva *et al.*, 2006; Getachew *et al.*, 2015).

Recentemente foi incorporado um imunizante contra a dengue no Programa Nacional de Imunização (PNI). As doses entregues no mês de janeiro de 2024 foram de 750 mil das 5,2 milhões disponíveis pelo fabricante para todo o ano. Dessa forma, a transmissão de outras arboviroses permanecem um desafio (Brasil, 2024).

Muitos larvicidas são compostos sintéticos à base de organofosforados (OP) e carbamatos (CA), piretróides (PI) (WHO, 2024), Reguladores de Crescimento de Insetos do inglês (*Insect Growth Regulator* (IGR) (Braga; Valle, 2007) e inibidores de síntese de quitina (ISQ) que atuam inibindo o desenvolvimento larval impedindo que o inseto chegue a fase adulta (Fournet; Sannier; Monteny, 1997). No entanto, o uso contínuo desses produtos pode levar a seleção de populações resistentes do mosquito, tornando-se ineficazes (Carvalho *et al.*, 2020; Hayd *et al.*, 2020). Quando isso ocorre, tende-se a aumentar a quantidade e a frequência do uso, o que pode causar toxicidade em organismos não-alvo (Araújo; Castanheira; Sousa, 2023).

Nesse sentido, o uso de inseticidas botânicos tornou-se uma alternativa para o controle de vetores, especialmente em países em desenvolvimento onde o acesso aos inseticidas químicos é limitado e as tecnologias biológicas de controle do vetor possuem alto custo. Os inseticidas botânicos são considerados uma alternativa *eco-friendly*, por serem derivados de plantas e com menos toxicidade para organismos não-alvo (Araújo; Castanheira; Sousa, 2023).

Além disso, a biodiversidade do Cerrado brasileiro apresenta uma variedade de espécies de plantas com compostos químicos naturais valiosos de diversas propriedades nutricionais, terapêuticas e bioativas. Entre as espécies, destaca-se o pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Cambess.), uma fruteira nativa perene, considerada árvore símbolo do bioma Cerrado. Seus frutos possuem potencial comercial e gastronômico por serem fontes nutritivas, com sabor e aroma exóticos (Cordeiro *et al.*, 2013).

O pequi é rico em ácidos graxos com estruturas moleculares compostas de longas cadeias hidrocarbonadas lineares, com ou sem insaturações, ligadas a um grupo carboxila (COOH) polar, solúvel em água. Esses ácidos graxos são amplamente encontrados nos óleos

vegetais, principalmente os ácidos palmítico, oleico, linoleico, linolênico e ácidos esteárico (Orsavova *et al.*, 2015), e desempenham papéis essenciais no metabolismo das plantas e nas atividades biológicas, incluindo vetores como o *Ae. aegypti* (Ellwanger; Cardoso; Chies, 2021).

Sua atividade biológica pode estar diretamente relacionada ao tamanho da estrutura molecular de seus compostos e o grau de insaturações, pois a medida em que aumenta o número de hidroxilas (polares), seu caráter lipofílico pode ficar comprometido. A baixa lipofilidade pode dificultar sua passagem através da membrana celular, não atingindo, portanto, o seu efeito (Lomonaco *et al.*, 2009).

Nesse sentido, o pequi pode ser um potencial larvicida seguro e sustentável contra o *Ae. aegypti*. Portanto, este estudo teve por objetivo avaliar o potencial larvicida do fruto de *C. brasiliense* Cambess. em *Ae. aegypti*, e efeitos tóxicos *in vitro* e *in vivo*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Aedes aegypti*

O *Ae. aegypti* pertence a ordem Diptera e família Culicidae e teve sua primeira descrição por Linnaeus em 1792 (Consoli; Oliveira, 1994). Oriunda do Egito, a espécie se habituou em regiões de clima tropical e subtropical, se disseminando para países próximos a linha do equador, onde encontrou ambientes propícios para reprodução em meio ao convívio humano, sendo assim considerado um inseto cosmopolita (Figura 1) (Kraemer *et al.*, 2015).

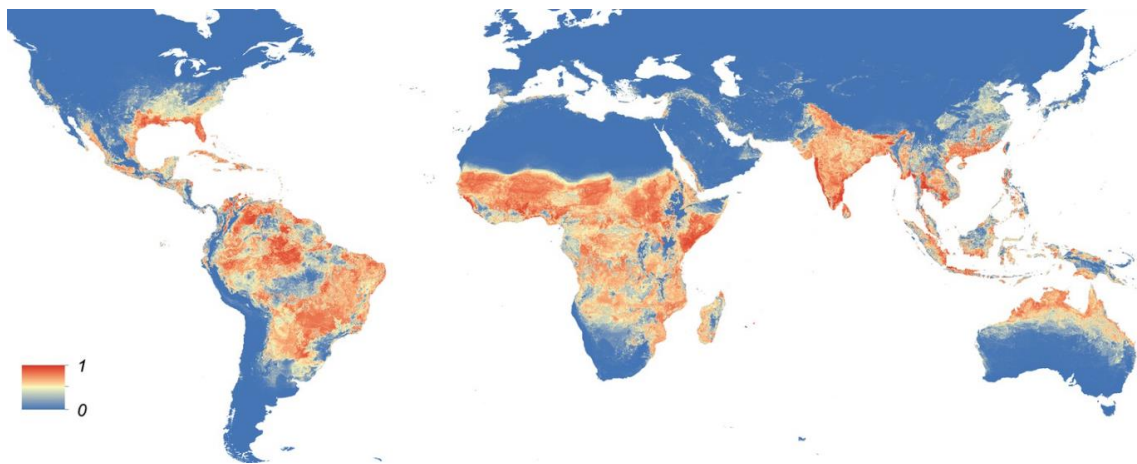


Figura 1: Distribuição geográfica global do *Ae. aegypti* com maior ocorrência nas áreas na cor laranja.

Fonte: Adaptado de Kraemer *et al.*, 2015.

De hábito peculiar, as fêmeas fazem hematofagia para maturação dos ovos que ocorre principalmente durante o dia e posteriormente a oviposição em diversos criadouros artificiais e naturais, sendo assim, o principal fator de permanência dos mosquitos em áreas urbanas (Oliveira; Almeida-Neto, 2017). São as fêmeas que desempenham papel chave na transmissão de patógenos causadores de arboviroses, pois são transmitidos durante o repasto sanguíneo. Outra particularidade da espécie é a habilidade de se alimentar de vários indivíduos, aumentando a capacidade de transmissão dos vírus entre os humanos (Consoli; Oliveira, 1994).

O ciclo biológico do *Ae. aegypti* é do tipo holometábolo, e o desenvolvimento passa pelas fases de ovo, larva, pupa e mosquito adulto (Figura 2).

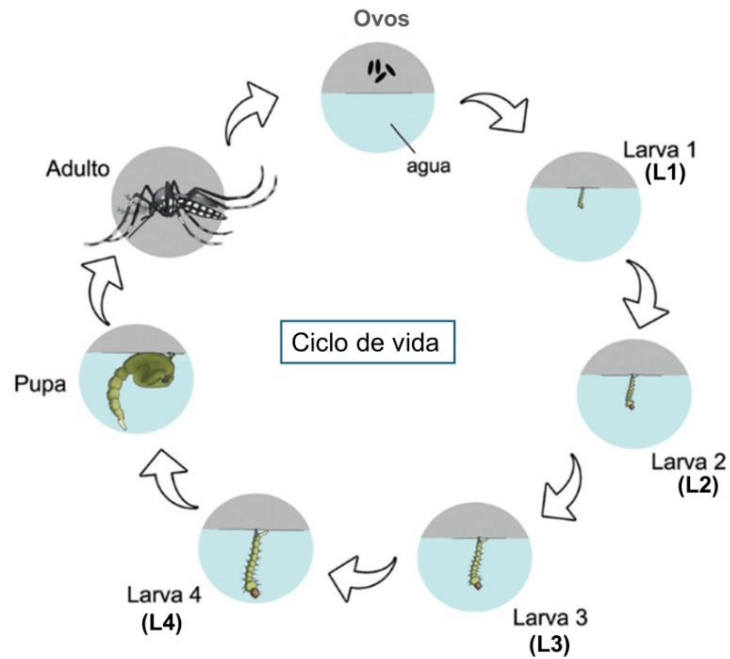


Figura 2. Ciclo de vida do *Ae. aegypti*.

Fonte: Adaptado de Harburguer e Alzogaray (2018).

Na fase embrionária, os ovos possuem formatos ovais, coloração pálida no momento da oviposição, tornando-se escurecida após alguns minutos. Possuem elevada capacidade de resistência a dissecação (diapausa), fenômeno fisiológico de adaptação dos artrópodes que possibilita uma pausa no desenvolvimento do embrião durante estresse ambiental (Forattini, 2002). Os ovos são colocados isoladamente ou em conjunto na face inferior de recipientes, próximos a linha d'água, facilitando a eclosão quando em contato com a água (Valdez; Sibona; Condat, 2018).

Na fase larval, o ciclo ocorre no ambiente aquático e é dividido em quatro estágios de desenvolvimento: L1, L2, L3 e L4. Nessa fase, ocorre a alimentação e crescimento do inseto (Consoli; Oliveira, 1994). A disponibilidade de alimento e temperatura em torno de 30° C vão determinar a duração da fase larval até a emergência do inseto adulto que pode ocorrer em até 15 dias (Couret; Dotson; Benedict, 2014; Custódio *et al.*, 2019; Torres *et al.*, 2022).

A fase de pupa é a metamorfose da larva para o mosquito adulto. Nesta fase, os insetos são inativos, não se alimentam e permanecem na superfície da água para respirar e facilitar o voo na emergência do mosquito adulto (Consoli; Oliveira, 1994).

2.2 CONTROLE E RESISTENCIA QUÍMICA

O controle vetorial é definido como qualquer atividade desempenhada contra o mosquito, que tem como resultado a diminuição da propagação das arboviroses, bem como, a densidade populacional do *Ae. aegypti*, que podem ser direcionadas tanto aos criadouros e eliminação de formas imaturas, quanto aos mosquitos adultos (Braga; Valle, 2007).

As ações de controle vetorial recomendadas pelo Ministério da Saúde (MS) abrangem as medidas de controle mecânico/físico que compreendem as ações direcionadas na eliminação dos criadouros do mosquito (Morosini; Fonseca; Lima, 2018), controle biológico com emprego de microrganismos como bactéria *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) e bactéria *Wolbachia* (Pinto *et al.*, 2021), e o controle químico, a estratégia mais antiga de controle vetorial com emprego de inseticidas químicos sintéticos de combate as formas adultas e juvenis (larvas) (Braga; Valle, 2007).

No entanto, todas as tentativas de controle químico no Brasil se mostraram ineficazes, visto que a alta rotatividade de substâncias químicas sintéticas devido a resistência de populações de mosquitos e o alto custo com novas tecnologias biológicas tem limitado o avanço do controle do mosquito (Gopinathan; Chaudhury; Vivek, 2016; Hayd *et al.*, 2020; Carvalho; Germano; Fiocruz, 2023).

2.3 CERRADO E OS FRUTOS NATIVOS

O bioma Cerrado, também conhecido como savana brasileira é a segunda maior formação vegetal em extensão, abrangendo aproximadamente 2 milhões de Km², cerca de 23% de todo o território brasileiro. Ele abrange principalmente os Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Goiás, Tocantins, Bahia, Maranhão e Distrito Federal. Estima-se que o Cerrado abriga mais de 12 mil espécies de plantas, das quais 44% são endêmicas (Silva *et al.*, 2019). Em virtude disso, o Cerrado foi considerado um “hotspot” da biodiversidade por possuir um dos ecossistemas mais ricos e ameaçado do mundo pela ação humana (Klink; Machado, 2005).

Sua vegetação é bastante diversificada, e varia da forma campestre, veredas, matas de galeria e as formações vegetais densas como os cerradões, formados por árvores de baixo porte, raízes profundas, troncos tortuosos, cascas espessas, ramos retorcidos e folhas cobertas por pelos (Arruda; Araújo; Marostica-Junior, 2022) conforme Figura 3. Essas características são impulsionadas pela disponibilidade de nutrientes no solo, temperatura e água, que são

implicadas por ciclos de secas por longos meses, seguida de chuvas intensas, tornando-as mais resistentes as variações climáticas (Rabeling *et al.*, 2019).

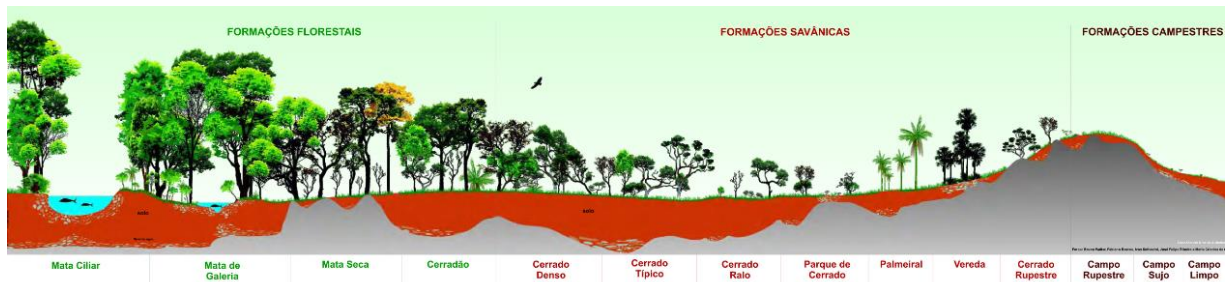


Figura 3. Características da vegetação do Cerrado brasileiro.
Fonte: EMBRAPA (2023).

O potencial biológico das espécies do Cerrado tem sido muito investigado, pois as plantas apresentam uma variedade de compostos bioativos, o que torna o Cerrado o cenário ideal para estudar a complexidade de moléculas existentes (Godinho *et al.*, 2015). As constantes interferências de fatores bióticos (predatismo) e abióticos (naturais) tem influenciado na dinâmica do metabolismo secundário dessas plantas, visto que, no contexto em que se localiza, o bioma sofre forte influência de variações sazonais ocasionadas por invernos secos e verões chuvosos. Esses fatores associados a alta incidência de radiação solar tem resultado na produção de importantes metabólitos secundários de propriedades bioativas (Pinheiro; Giacomini; Reis; Baratto *et al.*, 2016).

Dentre as espécies do Cerrado com potencial biológico, destacam-se as espécies frutíferas (Araújo *et al.*, 2019). Elas representam um tesouro alimentício e nutricional, pois foram adaptadas as condições singulares desse bioma, e se destacam pelo sabor característico, nutrientes e minerais, tais como, o pequi *C. brasiliense* (Silva *et al.*, 2023).

2.3.1 *Caryocar brasiliense* Cambess

A distribuição geográfica do *C. brasiliense* abrange todas as regiões do país, principalmente a região central, como Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, estendendo-se pelos estados do Pará, Tocantins, Bahia, Maranhão, Piauí, Minas Gerais, São Paulo e Paraná (Flora e Funga do Brasil, 2024) Figura 4.



Figura 4. Distribuição geográfica do *Caryocar brasiliense* no Brasil.
Fonte: (Flora e Funga do Brasil, 2024)

A espécie *C. brasiliense*, mais conhecido como pequi tem nome de origem ligado à língua tupi, onde *py* significa casca e *qui*, espinho. Seu fruto é do tipo drupa, com exocarpo de coloração marrom-esverdeado, mesocarpo externo de coloração esbranquiçada e mesocarpo interno (polpa comestível) de cor amarela, carnosa e sabor adocicado recoberto por uma camada resistente de espinhos onde abriga a semente comestível, denominada “amêndoa” (Lima *et al.*, 2007) (Figura 5).

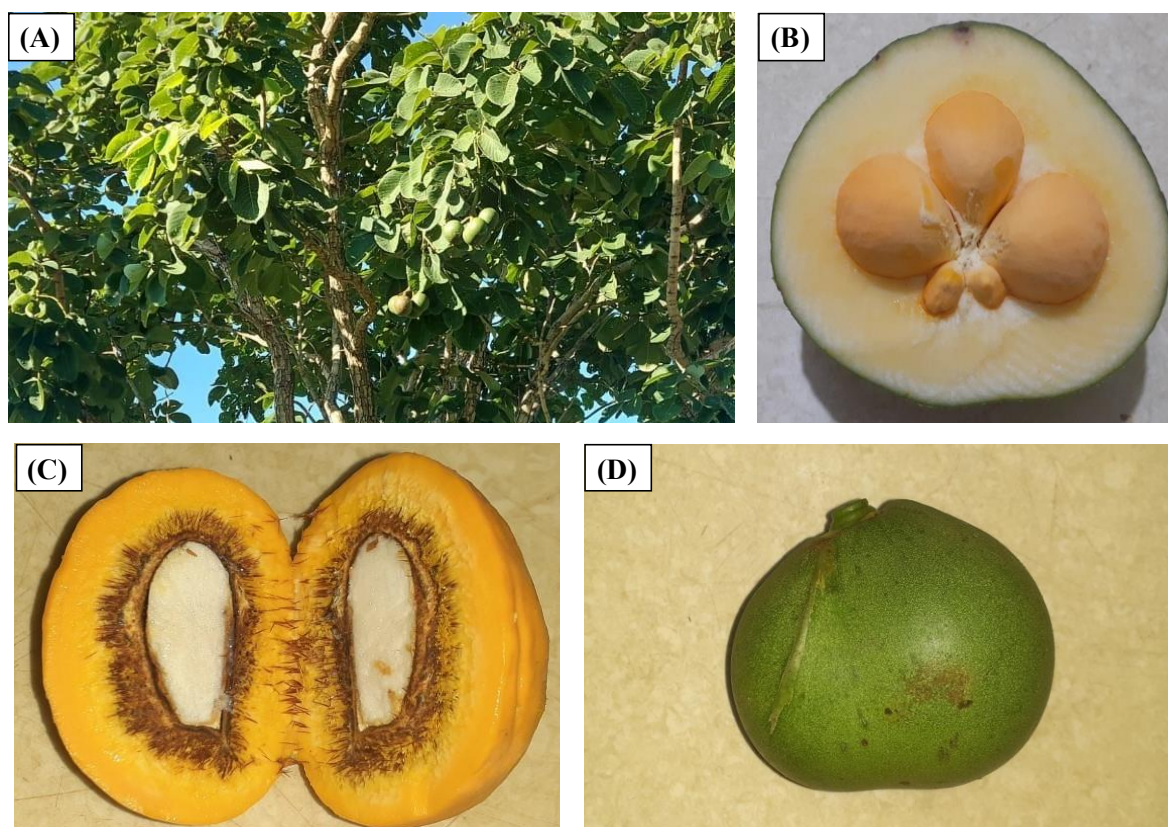


Figura 5. Foto do *Caryocar brasiliense*. (A) árvore do pequi (*Caryocar brasiliense*); (B) fruto cortado apresentando exocarpo (casca), mesocarpo externo grosso e cinco pirênios. (C) corte longitudinal de um pirênio de pequi mostrando o mesocarpo interno (polpa amarela) que recobre o endocarpo composto por uma camada resistente de espinhos onde abriga a amêndoa. (D) fruto globoso com exocarpo.

Fonte: Autoria própria

O alto teor nutricional do pequi está relacionado as concentrações de lipídeos na polpa como, os ácidos graxos (oleicos, palmítico), e fibras alimentares como, pectina e hemicelulose e ácidos graxos poliinsaturados e ácidos graxos essenciais (ω -3 e ω -6) na amêndoa. Além do teor nutricional, o pequi é rico em antioxidantes devido a presença de carotenoides (α e β -caroteno) em torno de 2 a 3 g/100 g de polpa, que conferem o amarelo do fruto e vitamina C (Leão, *et al.*, 2017; Soares; Nogueira; Santana; Oliveira, 2018).

O *C. brasiliense* também é conhecido por possuir uma série de propriedades bioativas importantes. Do fruto, a polpa e as sementes contêm compostos com propriedades antioxidantes, analgésicos e antiinflamatórias (Jorge-Júnior *et al.*, 2020). Além disso, estudos recentes também sugerem que os compostos presentes na planta podem ter aplicações terapêuticas no tratamento de doenças como o câncer (Metibemu *et al.*, 2021), hipertensão (Cheng *et al.*, 2017), doenças metabólicas (Sluijs *et al.*, 2015), doenças neurodegenerativas

(Beitia; Kumar; Hegde; Rao, 2019), tratamentos para condições dermatológicas (Beckenbach *et al.*, 2015) e no processo de envelhecimento (Weber *et al.*, 2020). Nos frutos também são encontrados compostos fenólicos, o que indicam que o fruto possui alta capacidade antioxidante de neutralizar os efeitos dos radicais livres no organismo que estão relacionados a diversas doenças crônico-degenerativas (Rocha; Lopes; Silva, 2011).

Alves *et al.*, (2014) realizaram a caracterização do fruto de *C. brasiliense*, determinando a composição centesimal e minerais da polpa do fruto colhidos em três estados da região Centro-Oeste do Brasil, e indicaram baixo teor de proteínas, variando de variando de (3,73 g.100 g⁻¹ a 4,09 g.100 g⁻¹), elevado teor lipídico entre (24,27 e 26,15 g.100 g⁻¹) e energético, onde três caroços do fruto são capazes de fornecer mais de 300 (kcal.100 g⁻¹), bem como riqueza de cálcio (107,01 mg.100 g⁻¹), zinco (3,51 mg.100 g⁻¹), fósforo (294,24 mg.100 g⁻¹) e magnésio (132,06 mg.100 g⁻¹).

Estudo de Araújo *et al.*, (2018) comparou a composição química e nutricional da amêndoa de pequi com outros frutos do Cerrado, e constataram maior teor de potássio (1690 mg/100 g), atividade antioxidante *in vitro* (14 mg/100 g), concentração de lipídeos (50 g/100 g) e proteínas (33.3 g/100 g), em relação ao murici e maracujá, respectivamente, (1170 mg/100 g) e (270 mg/100 g); (0.1 mg/100 g) e (2 mg/100 g); (15 g/100 g) e (29.6 g/100 g); e (8.8 g/100 g) (15 g/100 g).

Considerando a composição de óleo presente no fruto de espécies de *Caryocar*, na polpa pode variar de 36 a 66%, tendo como principais ácidos graxos o ácido palmítico com 35-40% (Machado *et al.*, 2015), enquanto na amêndoa a composição de óleo pode variar entre 14 e 48%, tendo como principais ácidos graxos o oleico entre 55 e 60% (Guedes *et al.*, 2017). Também são encontrados triacilgliceróis do tipo POP (1,3-dipalmitoil-2-oleil-glicerol), POO (1,2-dioleil-3-palmitoil-glicerol) e POS (palmitoil-oleil-estearoil-glicerol) muito utilizados na indústria de alimentos e cosméticos (Guedes *et al.*, 2017).

O extrativismo do pequi no Brasil é uma atividade tradicional realizada por comunidades locais de pequenos agricultores e moradores da região que comercializam os frutos *in natura* em comércios locais, processados e forma de conserva da polpa. Além disso, o pequi é utilizado na gastronomia regional em pratos típicos culturais, onde da polpa é elaborado sorvetes, farofas e licores, e da amêndoa é produzido pães, doces, paçocas e barras de cereais (Guedes; Antoniassi; Machado, 2017).

O pequiizeiro é uma planta com grande potencial para uso em desenvolvimento sustentável, com produção registrada no país de 47.698 toneladas no ano de 2022, sendo Minas Gerais o estado responsável por mais da metade da produção nacional. Em Mato Grosso do Sul, a produção registrada foi de 22 toneladas, sendo o município de Aquidauana o maior produtor (IBGE, 2024).

2.4 RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DOS ÁCIDOS GRAXOS

A relação estrutura-atividade dos ácidos graxos é essencial para compreender como a estrutura molecular dos compostos influencia na atividade biológica. A variação nos grupos funcionais como o comprimento da cadeia, o grau de insaturação e lipofilidade podem afetar a atividade biológica (Camargo; Martins; Costa, 2019).

Os ácidos graxos são compostos de estruturas moleculares formada por uma longa cadeia hidrocarbonada (hidrofóbica), insaturada ou não, onde uma de suas extremidades está ligada a um grupo carboxila (-COOH) (hidrofílica) (Ahmed; Shah; Ahmed, 2023). Nesse sentido, o que confere a polaridade à molécula é a presença do grupo carboxila na extremidade, fazendo com que os ácidos graxos apresentem características de moléculas anfipáticas, ou seja, com regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, assim como ocorre com as membranas celulares, compostas de fosfolipídeos com uma cabeça hidrofílica e caldas hidrofóbicas (Vani; Riccardi; Palermo; Vivo, 2019; Claus; Jezierska; Inge; Bogaert, 2019).

De maneira geral, os ácidos graxos são ácidos carboxílicos e apresentam em sua fórmula química uma carboxila com ligações de carbono a um oxigênio e a uma hidroxila. Estas hidroxilas são responsáveis pela solubilidade e fluidez das moléculas em água. Estudos mostram que moléculas de cadeias longas apresentam menor fluidez em água e maior interação com membranas celulares. A relação da estrutura/atividade dos compostos pode ajudar a compreender a interação das moléculas com os alvos (Fernández; Oliveros; Garayoa; Fluvìa, 2022). As insaturações podem influenciar na atividade biológica devido a flexibilidade das cadeias carbônicas e interação com membranas celulares podendo levar a disfunções e danos celulares que resultam na toxicidade (Wang *et al.* 2012). Isso demonstra que quanto maior o número de ligações duplas na cadeia carbônica, maior sua flexibilidade e melhor interação celular (Stillwell; Wassall, 2003; Wassall; Stillwell, 2009).

2.5 PROPRIEDADES BIOATIVAS

Os ácidos graxos são amplamente encontrados nos óleos vegetais, principalmente os ácidos palmítico, oleico, linoleico, linolênico e ácidos esteárico (Orsavova *et al.*, 2015), e desempenham papéis essenciais no metabolismo das plantas e nas atividades biológicas (Ellwanger; Cardoso; Chies, 2021).

Os ácidos graxos podem ser classificados em saturados e insaturados. Os ácidos graxos saturados (AGSs) podem ter cadeias longas de carbono sem dupla ligações entre os átomos. Os insaturados possuem cadeias longas (com 20 ou mais carbonos), contendo uma ou mais dupla ligações, que podem ser monoinsaturados (MUFAs) quando apresentar uma única ligação, e poliinsaturados (PUFAs) quando houver duas ou mais ligações (Nelson; Cox, 2005).

Os AGSs comumente estão presentes em fontes de alimentos de origem animal, como carnes e laticínios e vegetal, como óleo de coco e de palma. Segundo Zaouay *et al.*, (2020), o maior teor de ácidos graxos de origem vegetal, como palmítico, palmitoléico, linoleico e esteárico estão presentes em frutas e sementes oleosas, e suas concentrações estão relacionadas a diversos fatores, entre eles o tempo de amadurecimento.

A família dos PUFAs fundamentais é representada pelos ácidos α -linolênico (ALA, 18:3, n-3) e o ácido linoleico (LA, 18:2, n-6), encontrados em peixes, óleos de peixes e fontes vegetais alternativas, como oleaginosas, sementes de linhaça e chia. São considerados ácidos graxos essenciais (AGEs) para a vida humana pois não podem ser sintetizados pelo corpo, mas devem ser obtidos através da dieta, sendo comumente utilizados como suplementos alimentar (Orsavova *et al.*, 2015; Rizzo; Baroni; Lombardo, 2023). Também estão diretamente associados à saúde cardiovascular por reduzir os níveis de colesterol ruim *low density liprotein* (LDL) (Abdelhamid *et al.*, 2018).

Os ácidos graxos são componentes abundantes nos óleos vegetais, principalmente os ácidos palmítico, oleico, linoleico, linolênico e ácidos esteárico (Orsavova *et al.*, 2015). Os ésteres metílicos de ácidos graxos, do inglês *fatty acid methyl esters* (FAMES) são derivados voláteis dos ácidos graxos, obtidos através da reação de esterificação, que podem facilmente ser analisados por técnicas de Cromatografia Gasosa (CG) devido a sua alta sensibilidade na separação dessas misturas complexas (Knittelfelder; Kohlwein, 2017).

2.6 TOXICIDADE ORAL AGUDA

As plantas possuem substâncias resultantes do metabolismo vegetal que podem representar riscos para a saúde humana quando expostos (Mena; Angelino, 2020). Para evitar esses riscos, a realização de estudos toxicológicos é de suma importância para identificar e avaliar os possíveis efeitos tóxicos inerentes as substâncias, garantindo a segurança (Arome; Chinedu, 2013).

A toxicidade em estudos toxicológicos está relacionada à capacidade de uma substância causar danos à saúde. Dentre as maneiras de avaliar a toxicidade, está a toxicidade oral aguda que examina os efeitos após uma única exposição, que é observado dentro de um período de 24 horas após a administração de uma substância, podendo ser avaliado a mortalidade ou imobilidade dos organismos imediata ou tardia em até duas semanas (Andrade *et al.*, 2022).

Nos estudos de toxicidade, diversos parâmetros são avaliados, incluindo a dose letal mediana (DL50), que indica a dose necessária em mg/kg de peso corpóreo para causar a morte em metade dos animais de teste expostos, bem como os efeitos clínicos, histopatológicos e comportamentais observados nos animais expostos à substância (Akhila; Manikkoth; Shyam; Alwar, 2007).

Ao longo dos anos, a Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) validou os primeiros guidelines reconhecidos internacionalmente para a determinação da toxicidade oral aguda de substâncias químicas como protocolos padronizados para garantir a confiabilidade e segurança de estudos toxicológicos em diferentes países, entre eles o Teste de Dose Fixa (*Fixed Dose Method* - OECD 420), adotado em 1992, o método de toxicidade aguda de classe (*Acute Toxic Class Method* - OECD 423), adotado em 1996, e o teste Teste de Dose Crescente (*Up-and-down procedure* - OECD 425), adotado em 1998 (Botham, 2002). Ainda que a letalidade seja o objetivo principal, estes testes reduzem o sofrimento animal, bem como o número de animais utilizados (OECD, 2001).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial larvicida do fruto de *Caryocar brasiliense* Cambess. em *Aedes aegypti*, e efeitos tóxicos *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar o perfil de ésteres graxos presentes nos extratos etanólico da polpa e amêndoa de *Caryocar brasiliense*.
- b) Verificar a atividade larvicida dos extratos etanólico da polpa e amêndoa de *Caryocar brasiliense*;
- c) Determinar as concentrações letais dos extratos etanólico da polpa e amêndoa de *Caryocar brasiliense* as larvas do *Ae. aegypti*;
- d) Avaliar a citotoxicidade dos extratos etanólico da polpa e amêndoa de *Caryocar brasiliense in vitro*.
- e) Avaliar a toxicidade oral aguda dos extratos etanólico da polpa e amêndoa de *Caryocar brasiliense* em camundongos da espécie BALB/C.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta dos frutos

Os frutos maduros de *C. brasiliensis* foram coletados em solo, em perfeitas condições morfológicas da casca nos meses de dezembro de 2021 e janeiro de 2022, na zona rural do município de Coxim (latitude de 18°30'25" Sul e longitude de 54°45'36" Oeste), localizado na região norte do estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Após a colheita, os frutos foram lavados, sanitizados com hipoclorito de sódio, descascados, separados polpa (mesocarpo interno) e amêndoas dos caroços.

4.2 Elaboração dos extratos etanólico

A polpa foi picada com faca, pesada e congelada. Ao todo, 975 gramas do material foi liofilizado em equipamento modelo Alpha 1-2 LDplus®, por 76 horas e posteriormente pesada novamente e armazenada ao abrigo de luz, umidade e calor. Os caroços foram levados à estufa com ar forçado a 50°C por 72 horas. Após esse período, foram quebrados com martelo e retirado as amêndoas utilizando faca e pinça. As amêndoas foram levadas ao triturador Turrax com abertura de 1,70 µm e malha 10 ty, a farinha pesada e armazenada ao abrigo de luz, calor e umidade.

Das amostras utilizadas, 425 gramas da polpa e 418 gramas da farinha de amêndoa foram acondicionadas em frascos de coloração âmbar com álcool etílico 99,8% na porção de 2:1, onde permaneceu em maceração em solvente à exaustão por 15 dias a temperatura ambiente, sendo o solvente trocado a cada 5 dias e posteriormente filtrado a vácuo. Após esse período, os extratos foram rotaevaporados para eliminação total do solvente, (Figura 6).

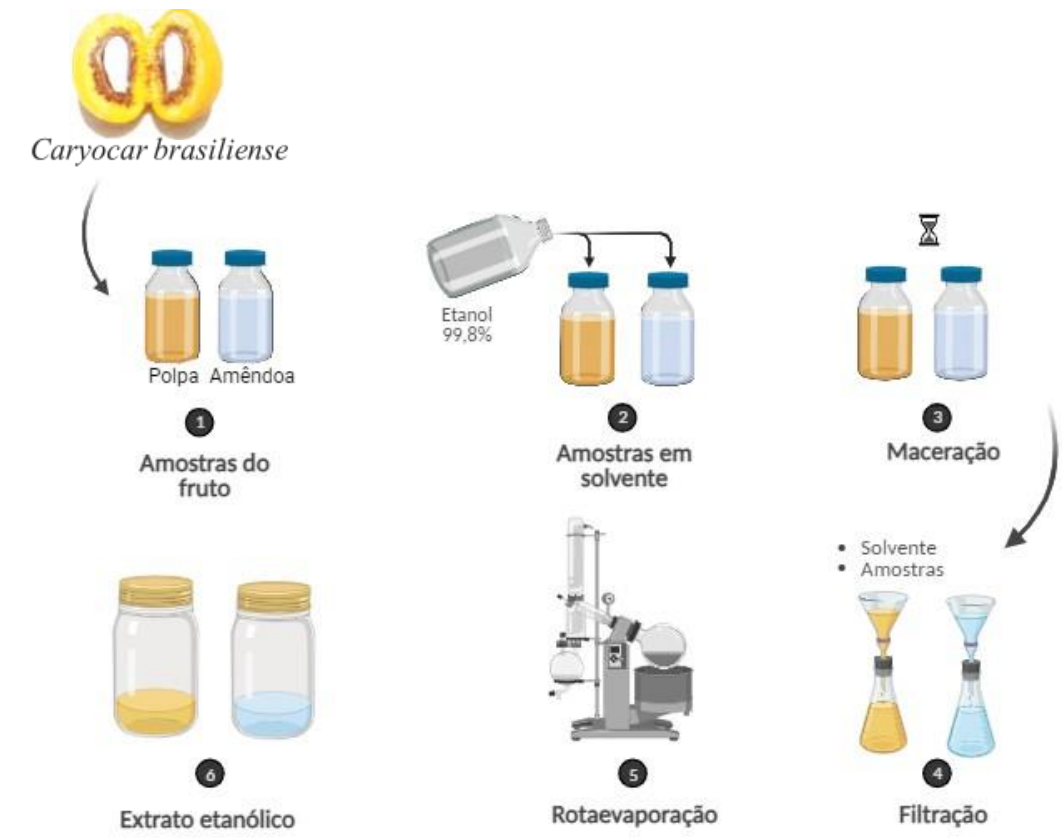


Figura 6. Fluxograma das etapas de extração dos extratos etanólicos da polpa e amêndoa de *Caryocar brasiliense*.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.3. Análise de rendimento

Para determinar o rendimento dos extratos foi utilizada a seguinte equação:

$$\% \text{teor de extrato extraído} = \frac{m \text{ extrato}}{m \text{ amostra}} \times 100$$

Em que:

Onde: m extrato = massa, em gramas do extrato etanólico extraído;

Onde: m amostra = massa total, em gramas da amostra utilizada.

4.4 Reação de esterificação de ácidos graxos (Método CE-1F-96 da American Oil Chemists' Society - AOCS)

A análise química dos compostos foi realizada na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRS), sob responsabilidade da professora Dra. Rosângela Assis Jacques.

As amostras foram adicionadas em tubo de vidro e anotado a massa de cada. Foram adicionados 1,5 mL da solução de NaOH 0,5M em metanol ao tubo de vidro, agitado por 1 minuto em vórtex e deixado em banho-maria em 100 °C por 5 minutos. Após resfriado em água corrente, foi adicionado 2 mL de trifluoreto de boro 13% (BF₃), em capela de exaustão de gases (reagente tóxico) e agitado por 30 segundos em vórtex, deixado em banho-maria em 100 °C por 30 minutos e resfriado novamente em água corrente. Em seguida foi adicionado 2 mL isooctano, agitado por 30 segundos em vórtex, adicionado 5 mL de solução saturada de NaCl e agitado por 30 segundos em vórtex. Posteriormente foi retirado 1 mL (pipeta volumétrica) da fase de isooctano contendo metil éster (fase superior) e colocado em um vial para secar com nitrogênio gasoso comercial e mantido sob congelamento (-18°C) até injeção no cromatógrafo gasoso.

4.5 Cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM)

Para a análise qualitativa dos ácidos graxo presentes nas amostras dos extratos de pequi foi utilizado um cromatógrafo gasoso Shimadzu acoplado ao espectrômetro de massas. A coluna capilar utilizada foi uma DB5 (metil silicone com 5% de grupos fenila) com 60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de fase estacionária. Foi utilizado o gás hélio como gás de arraste com um fluxo de 1 mL/min. A injeção foi no modo split (1:10). O injetor foi mantido a 280°C e a interface a 300°C. O aquecimento do forno seguiu a seguinte sequência: temperatura inicial 210°C (0,0 min), 228°C (0,0 min), 10°C/min., 250°C (10 min). O sistema operou no modo SCAN permitindo a comparação dos espectros obtidos com os da biblioteca de espectros do equipamento (wiley e NIST).

4.6 Ensaio biológico com *Aedes aegypti*

Os ovos de *Ae. aegypti* da linhagem Rockefeller foram obtidos do Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores do Instituto Oswaldo Cruz (LAFICAVE - IOC/Fiocruz), RJ, Brasil, sob colaboração do professor Dr. Eduardo José de Arruda, da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Biologia do Instituto Federal de Mato Grosso do Sul, Campus de Coxim, MS.

4.6.1 Atividade larvicida

O ensaio larvicida foi realizado conforme metodologia adaptada das diretrizes da Organização Mundial da Saúde (OMS) – *Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides* (WHO, 2005), para determinação das concentrações letais 50% (CL₅₀) e 90% (CL₉₀). Ovos de *Ae. aegypti* da linhagem Rockefeller foram doados do Laboratório de Biologia, Controle e Vigilância de Insetos Vetores LBCVIV, do Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ através do protocolo (TTM IOC Fiocruz 21-40), por intermédio do professor Dr. Eduardo José de Arruda, e realizado ensaios biológicos no Laboratório de Biologia do Instituto Federal de Mato Grosso do Sul, Câmpus de Coxim.

Foi realizado teste piloto para verificação da atividade larvicida e as concentrações a serem utilizadas. A princípio, foi testado duas concentrações, 0,5 e 1,0mg/mL para verificar o intervalo de concentrações com atividade larvicida.

Para a eclosão dos ovos, foi fervido 500 mL de água por 5 min., transferida ainda em ebulição para um frasco graduado de tampa azul, vedado com Parafilm M®, e resfriado à temperatura ambiente. Posteriormente o frasco foi aberto rapidamente, os ovos dispostos em tiras de papel de filtro foram depositados e vedado novamente até o final da eclosão, aproximadamente 50 min. As larvas eclodidas foram transferidas para uma bandeja plástica de 20x30x6cm com coluna de água destilada de cerca de até 2 cm, adicionado ração para peixe ornamental Alcon Basic® na porção de (1mg/larva/dia), coberta com touca descartável e levada à incubadora (28±1°C, 70 ± 10% de umidade e ciclo 12h/ 12h).

Larvas de terceiro instar foram utilizadas para bioensaios quatro dias após a eclosão. Após testes preliminares para verificar a existência de mortalidade (mínimo de 1%) e determinar as concentrações a serem testadas. As amostras foram adicionadas em microtubo tipo eppendorf capacidade 2 mL, pesadas em balança analítica (Analítica®), adicionada em 1 gota de DMSO, 25 mg de ração triturada, agitadas, transferidas para copos de plástico transparente com capacidade para 150 mL e mantidas à temperatura ambiente. Um volume de 40 mL de água destilada foi adicionado em cada copo. Um número de 25 larvas escolhidas aleatoriamente foi colocado nos copos, adicionado ração e mantidas em câmara de *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) por 24 h. Foram testadas as concentrações de 0,3 a 1,0 mg/mL. Foram montadas três réplicas para cada concentração e um controle negativo feito com apenas água destilada e ração (Figura 7). A mortalidade foi observada 24h após o experimento e considerada mortas as larvas que não responderam a estímulos ou quando não mantiveram a oscilação de descida e subida até a superfície da solução. Amostras foram coletadas para análise morfológica em Microscópio Binocular 1000x com Câmera USB.

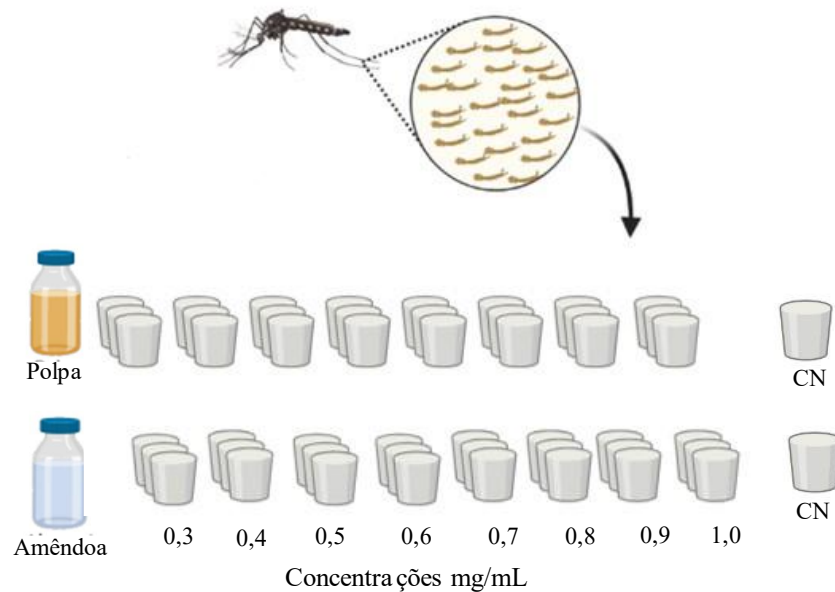


Figura 7. Representação esquemática do ensaio larvicida com extratos etanólico da polpa e amêndoa de *Caryocar brasiliense*.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.7 Efeito citotóxico em células 3T3 (ATCC CRL-1658) e HUVEC (ATCC CRL-1730).

Para a avaliação da citotoxicidade dos extratos etanólico da polpa e da amêndoa de *C. brasiliense*, foram utilizadas as linhagens de fibroblastos murino 3T3 (ATCC CRL-1658) e células de cordão umbilical humano HUVEC (ATCC CRL-1730). Para o ensaio de citotoxicidade, utilizou-se o corante sulforrodamina B (SRB), e como parâmetro de citotoxicidade e GI₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento celular). As células armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) foram descongeladas em banho-maria e transferidas para um tubo cônico de 15 mL, contendo 9 mL de meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ou RPMI (Roswell Park Memorial Institute), ambos contendo os antibióticos Penicilina e Estreptomicina (1%) e Soro Fetal Bovino (SFB) (10%). Os tubos foram centrifugados por 4 minutos a 1000 RPM. Após esse tempo, aspirou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspensionado em 5mL de meio. A suspensão celular foi transferida para frascos de cultura de 25 cm² e incubados a 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ até formação da monocamada com aproximadamente 80% de confluência.

A quantidade necessária de células para o experimento foi obtida através de repiques. Ao aspirar o meio de cultura, restou-se somente as células aderidas no fundo do frasco, que foram desprendidas com a adição de se 0,5 mL de tripsina-EDTA (0,25% + EDTA 1 mM) em tampão PBS, pH 7,4. Em seguida, o frasco ficou em repouso na incubadora entre 1 e 4 minutos até o desprendimento de todas as células. As células em suspensão foram transferidas para outro tubo cônico de 15mL contendo meio completo (meio, antibióticos e SFB a 10%), com 1,5 mL de tripsina para neutralizá-las e centrifugou-se por 4 minutos a 1000 RPM. Aspirou-se o sobrenadante, restando somente o pellet, que foi ressuspensionado em meio completo, sendo a suspensão usada no processo de contagem celular.

4.7.1 Preparo das amostras dos extratos etanólico de *Caryocar brasiliense*

Os extratos foram diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 0,1 g/mL. A adição dos extratos às células foi realizada por diluição seriada em meio de cultura, sendo utilizadas as concentrações de 0,25, 2,5, 25 e 250 µg/mL em triplicata. A concentração máxima de DMSO utilizada foi de 0,25%, por não alterar a viabilidade celular.

4.7.2 Ensaio com Sulforrodamina B (SRB)

Foi utilizado o método colorimétrico com SRB descrito por Skehan *et al.*, (1990). Para obter um número adequado de células, elas foram desprendidas dos frascos de manutenção (garrafas) por ação da tripsina-EDTA (o mesmo procedimento realizado para o repique), transferidas para um tubo cônico com meio completo com 1,5 mL de tripsina e centrifugadas por 4 minutos a 1000 RPM. Adicionou-se ao pellet 2 mL de meio de cultura e retirado desta suspensão a alíquota para diluir em corante (azul de tripan 1:4) que identifica as células não viáveis que foram excluídas da contagem. Utilizou-se contador manual (Câmara de Neubauer) para obtenção da suspensão de células suficientes para inoculação de 7.500 células em cada cavidade da placa teste de 96 poços.

Após a contagem celular, preparou-se duas placas, a placa T0 (Tempo Zero) e a placa teste. Na placa T0 foi adicionado a suspensão celular de cada linhagem e o meio de cultura, em triplicata. À T0 foi inoculada e após 24 horas realizado o procedimento de coloração, por adição de SRB, que consiste em um corante com afinidade por proteínas celular (Skehan *et al.*, 1990). A placa T0 é utilizada como parâmetro do início do experimento, e após a leitura desta, pode-se mensurar a densidade de células viáveis quando adicionado as amostras na placa teste. À placa teste adicionou-se a suspensão celular, e após a incubação inicial de 24 horas adicionou-se as amostras testes nas concentrações de 0,25, 2,5, 25 e 250 µg/mL, em triplicata, e incubada por 48 horas. Na placa teste continha o branco de cada concentração da amostra-teste, o controle negativo (células mais 100 µl de meio) e o controle positivo composto por doxorrubicina (DXR) (0,025, 0,25, 2,5 e 25 µg/mL).

Após 48 horas de incubação, realizou-se a coloração com SRB da seguinte forma: aspirou-se o sobrenadante das 33 cavidades das placas, permanecendo apenas as células. A elas foram adicionada 100 µl de ácido tricloroacético (TCA) 20% para fixar as células viáveis que foram mantidas em repouso por 30 minutos a 4° C ao abrigo da luz. Descartou-se o sobrenadante e as placas foram lavadas em água corrente e depois de secas, adicionou-se 50 µl de SRB (Sigma, USA) 0,1% diluído em ácido acético 1%. As placas foram mantidas em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, e posteriormente lavadas 5 vezes com ácido acético 1% para retirada do excesso de corante livre. Adicionou-se à placa seca 100 µl de tampão Trizma Base (10 mM, pH 10,5) (Sigma, USA) para a solubilização do corante aderido às proteínas das células fixadas.

4.8 Ensaio de toxicidade oral aguda *in vivo*

4.8.1 Animais experimentais

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul sob protocolo n° 1306/2023. Foram utilizados 13 camundongos machos da linhagem BALB/C, pesando em média 26 g, com 6 semanas de nascidos, provenientes do Biotério Central vinculado a Diretoria de Cooperação Científica e Tecnológica da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS - Brasil).

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (dimensão 40 x 35 x 17 cm), na quantidade de três animais/gaiola, à temperatura de aproximadamente 24° C, com ciclo claro /escuro de 12 horas, recebendo ração padrão (NUVITAL® CR1) e água à vontade. Os animais ficaram durante 03 dias em período de aclimação antes do início do experimento.

4.8.2 *Design* Experimental

A dose estabelecida para estimar a DL₅₀ (dose letal mediana) está de acordo com Acute Toxic Class Method, (OECD, 2001) para teste de dose aguda tóxica (Guideline 423). Os testes com o extrato da polpa do pequi foram iniciados em camundongos da linhagem Balb/C na concentração de 300 mg/kg, por serem desconhecidas informações acerca de doses letais para o extrato mais ativo, como preconiza o citado guia e posteriormente 2000 mg/kg, 50 mg/kg e 5 mg/kg. Os ensaios foram realizados em quatro grupos com três animais cada. Um grupo controle (G5) que recebeu azeite de oliva e quatro grupos testes que receberam doses de 2000 mg/Kg (G1), 300 mg/Kg (G2), 50 mg/kg (G3) e 5 mg/kg (G4) dos extratos diluídos em azeite de oliva. Em todos os grupos, os animais receberam dose única (200 µl) via gavagem após 8h de jejum. Após a administração das diferentes doses foi realizado um screening hipocrático dos animais por meio de observações individuais dos animais nos períodos de 30 min, 1, 2, 4, 6, 12 e 24 h, e diariamente por 17 dias. Os parâmetros avaliados foram: Anestesia, atividade geral, força para agarrar, resposta ao toque, tremores, locomoção, frêmito vocal, irritabilidade, contorção, ptose, lacrimação, respiração, ataxia, alimentação com água e alimentação com comida.

4.8.3 Análises Histológicas

Imediatamente após a eutanásia, foram coletados de cada animal rins e fígado para uma prévia análise macroscópica dos órgãos e posteriormente pesados e fixados em formol tamponado a 10% durante 12 horas. Em seguida, as amostras foram desidratadas em álcool e xilol, incluídas em parafina e cortadas em micrótomo com espessura de 5 μm . Os cortes foram corados por hematoxilina-eosina (HE). A análise foi baseada nas alterações morfológicas quanto aos seguintes parâmetros: esteatose (fígado), degeneração hidrópica, degeneração hialina e necrose (rins). Para cada parâmetro foram atribuídos escores em cada área analisada de acordo com a intensidade da lesão encontrada. A avaliação histopatológica foi realizada no Laboratório de Histologia da UFMS sob a responsabilidade da Profa Dra. Luciane Candeloro.

4.9 Análise Estatística

A estimativa das concentrações letais (CL_{50}) e (CL_{90}) para a mortalidade das larvas do *Ae. aegypti* e os intervalos de confiança foram determinadas pela análise Probit com o auxílio do software IBM SPSS Statistics 27, com nível de significância de $p < 0,05$ ao nível de significância de 5%. Os resultados são expressos pela média \pm erro padrão (EP). A análise dos dados experimentais do larvicida foi realizado utilizando teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, utilizando o programa estatístico SigmaPlot, versão 12.0, ao nível de significância de 5%. O crescimento celular (GI_{50}) foi determinado utilizando o software Origin 6.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento dos extratos

Do total de 425 g de polpa de pequi liofilizada e 418 g de farinha de amêndoa obteve-se 203,79 g de extrato polpa e 173,48 g da amêndoa, tendo um rendimento de 48,7% e 41,5%, respectivamente, (Figura 8). Nessa perspectiva, a cada 1000 g de amostras de polpa liofilizada e farinha de amêndoa de pequi são suficientes para obter 479,51 g de extratos da polpa e 414 g da amêndoa, um rendimento de 47,9% e 41,4%, respectivamente.

A liofilização, também denominada criodesidratação ou criosecação é um processo de desidratação utilizado para preservação de amostras vegetais e outros alimentos. Esse método envolve a remoção da umidade da amostra por sublimação, que é a transformação direta do gelo em vapor, sem passar pelo estado líquido, de forma que mantém sua estrutura, sabor, aroma, e propriedades químicas e biológicas, sendo portanto a razão para esse tipo de preservação da polpa de pequi neste estudo (Bhatta, *et al.*, 2020).

Para uma boa extração de ativos bioquímicos, a utilização de solventes apropriados é fundamental, pois polaridade dos solventes pode influenciar consideravelmente na extração dos ácidos graxos. Neste estudo, foi utilizado o etanol por ser considerado um solvente orgânico moderadamente polar por possuir em uma das extremidades de sua molécula um grupo hidroxila (OH). No entanto, a sua capacidade de solubilizar muitos compostos apolares se deve ao restante de sua molécula apolar por possuir bastante afinidade com compostos lipofílicos (Trentini *et al.*, 2015; Loyao *et al.*, 2018; Tsigirika *et al.*, 2023), o que ocorreu com o extrato gorduroso do *C. brasiliense* utilizado neste estudo. A vantagem de uso do etanol como solvente está na sustentabilidade e por ser considerado ambientalmente seguro (Capello; Fischer; Hungerbühler, 2007).



Figura 8. Rendimento dos extratos etanólico extraídos da polpa (A) e amêndoa (B) de *Caryocar brasiliense*.

Fonte: Autoria própria.

5.2 Composição química

Os ésteres graxos encontrados no extrato etanólico da polpa e da amêndoa do fruto maduro do *C. brasiliense* foram identificados por meio da reação de esterificação pelo método Ce-1F-96 da *American Oil Chemists' Society* (AOCS) e posteriormente analisados por cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM). A reação de esterificação é uma abordagem química muito utilizada para a síntese de ésteres encontrados em compostos orgânicos, derivados de ácidos graxos a partir da reação química entre os ácidos graxos e os álcoois (Neji; Trabelsi; Frikha, 2009).

Os ácidos graxos geralmente não são voláteis o suficiente para serem analisados por cromatografia gasosa. A esterificação desses ácidos graxos é uma reação que os converte em ésteres bastante voláteis, o que aumenta a sensibilidade e detecção mesmo em baixas concentrações na amostra (Drozd, 1975; Gutnikov, 1995).

Os ésteres graxos identificados nos extratos são basicamente três moléculas de ácidos graxos ligados a um glicerol, resultante da reação de esterificação onde a hidroxila (OH) da glicerina reage com o grupo carboxila (COOH) do ácido graxo, resultando na formação de uma ligação éster e na liberação de uma molécula de água, também conhecidos como triacililgeróis ou triglicerídeos (Chemistry Library, 2024).

Neste estudo foram identificados 04 ésteres graxos no extrato etanólico da polpa e 05 no extrato da amêndoa, sendo os majoritários os derivados dos ácidos palmítico e oleico Tabelas 1.

Tabela 1. Composição de ésteres graxos encontrados nos extratos etanólico da polpa e da amêndoa do *Caryocar brasiliense*.

NC	Polpa	FM	TR	Peso molecular (g/mol)
1	Ácido palmitoléico	$C_{16}H_{30}O_2$	13,65	254,4
2	Ácido hexadecanóico	$C_{17}H_{34}O_2$	14,22	254,4
3	Oleato de metilo	$C_{19}H_{36}O_2$	19,39	296,5
4	Ácido esteárico	$C_{18}H_{36}O_2$	20,94	284,4
NC	Amêndoa	FM	TR	Peso molecular (g/mol)
1	Miristato de metila	$C_{15}H_{30}O_2$	9,65	242,40
2	Palmitoleato de metila	$C_{17}H_{32}O_2$	13,65	268,4
3	Palmitato de metila	$C_{17}H_{34}O_2$	14,20	270,5
4	Oleato de metilo	$C_{19}H_{36}O_2$	14,20	296,5
5	Ácido esteárico	$C_{18}H_{36}O_2$	20,39	284,4

NC = Número do composto; FM = Fórmula molecular; TR =Tempo de retenção.

O perfil cromatográfico por análise (CG-EM) dos extratos etanólicos da polpa e da amêndoa do *C. brasiliense* estão apresentados na Figura 9.

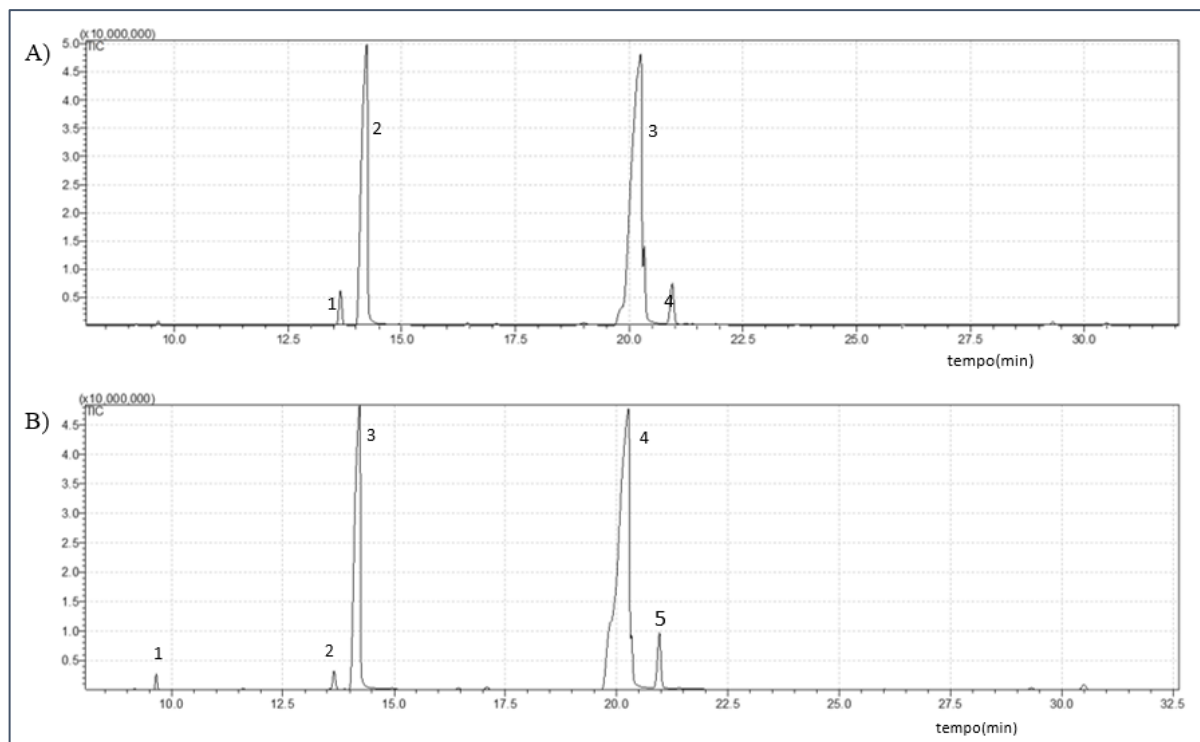


Figura 9. Espectro de massa do *Caryocar brasiliense*. (A) compostos químicos encontrados na polpa. (B) e na amêndoa.

5.3 Atividade larvicida sobre *Aedes aegypti*

A atividade larvicida dos extratos etanólicos da polpa e da amêndoa do *C. brasiliense* foi testada em oito concentrações diferentes. A atividade larvicida foi observada na faixa de 0,3 a 1 mg/mL.

Os resultados apresentados na Tabela 2, mostram o efeito dos extratos, das concentrações e a interação entre esses dois fatores na mortalidade das larvas do *Ae. aegypti*. Nas linhas são observados o efeito dos extratos na mortalidade larval, e nas colunas as concentrações dos extratos na mortalidade.

Verifica-se que ambos os extratos apresentaram mortalidade em todas as concentrações testadas de 0,3 a 1 mg/mL. Na comparação de mortalidade entre os extratos apresentado nas linhas, ambos apresentaram diferença significativa nas concentrações (0,5, 0,8, 0,9 e 1 mg/mL). Nessas concentrações, um dos extratos se mostrou mais ativo que o outro, como por exemplo o extrato da polpa na concentração de 0,5 mg/mL em relação ao da amêndoa, e o extrato da amêndoa nas concentrações 0,8, 0,9 e 1,0 mg/mL em relação ao da polpa. Essa diferença de maior mortalidade do extrato da polpa na concentração de 0,5 mg/mL em relação ao extrato da amêndoa pode estar relacionada a um padrão linear de mortalidade proporcional com o aumento das concentrações. Diferentemente ocorreu com o extrato da amêndoa que apresentou um padrão uniforme de mortalidade nas menores concentrações, passando para um crescimento exponencial de mortalidade larval com melhores efeitos nas maiores concentrações testadas, Tabela 2.

Na comparação entre as concentrações testadas de cada extrato apresentada nas colunas, houve efeito significativo de mortalidade no extrato da polpa na concentração máxima de (1 mg/mL) em relação as menores concentrações (0,5, 0,4 e 0,3 mg/mL), mostrando maior mortalidade na concentração máxima testada. No entanto, o extrato da amêndoa mostrou efeito significativo em quase todas as concentrações, Tabela 2.

Tabela 2. Mortalidade larval dos extratos etanólico da polpa e da amêndoa do *Caryocar brasiliense* em *Aedes aegypti* após 24h de exposição.

Concentrações mg/mL	Extrato		Valor de p
	Polpa	Amêndoa	
0,3	2,33±0,33Ac	2,00±0,58Ae	0,766
0,4	5,33±0,33Ac	7,00±1,00Ad	0,144
0,5	12,67±0,33Ab	7,33±2,03Bd	<0,001
0,6	13,33±0,67Aab	13,00±0,58Ac	0,766
0,7	13,67±0,33Aab	15,67±0,67Ac	0,082
0,8	15,00±0,58Bab	19,33±0,88Ab	<0,001
0,9	16,00±0,58Bab	22,33±0,67Aab	<0,001
1,0	16,67±0,88Ba	23,67±0,33Aa	<0,001
Valor de p	<0,001	<0,001	

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão da média. Valores de p no pós-teste de Tukey. Letras maiúsculas diferentes na linha indicam diferença entre extratos ($p<0,05$). Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa entre concentrações ($p<0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

Os extratos etanólico da polpa e da amêndoa do *C. brasiliense* se mostraram ativos contra larvas do *Ae. aegypti* em todas as concentrações. Quando comparado ao grupo controle negativo onde todas as larvas sobreviveram, o extrato da polpa apresentou efeito significativo na mortalidade em praticamente todas as concentrações, Tabela 3.

Tabela 3. Mortalidade larval observada dos extratos etanólico da polpa e da amêndoa do *Caryocar brasiliense* em *Aedes aegypti* em relação ao esperado no controle negativo após 24h de exposição.

Concentrações mg/mL	Extratos			
	Polpa (mortalidade)	CN Valor de p	Amêndoa (mortalidade)	CN Valor de p
0,3	2,33±0,33	0,020	2,00±0,58	0,074
0,4	5,33±0,33	0,004*	7,00±1,00	0,060
0,5	12,67±0,33	<0,001**	7,33±2,03	0,069
0,6	13,33±0,67	0,002*	13,00±0,58	0,002*
0,7	13,67±0,33	<0,001**	15,67±0,67	0,002*
0,8	15,00±0,58	0,001**	19,33±0,88	0,002*
0,9	16,00±0,58	0,001**	22,33±0,67	<0,001**
1,0	16,67±0,88	0,003*	23,67±0,33	<0,001**

Mortalidade apresentada em média±erro padrão da média. Valores de p em negrito indicam diferença significativa entre o observado e o esperado no controle negativo. Asteriscos em negrito diferem significativamente: p < 0,005 (*); p < 0,001 (**). Nota: Controle Negativo (CN) grupo tratado com H₂O e ração.

Fonte: Elaborado pela autora.

A determinação da Concentração Letal de 50% (CL₅₀) é um parâmetro estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) que permite avaliar a toxicidade dos compostos para causar a morte de 50% das larvas testadas. A CL₅₀ é um parâmetro quantitativo que avalia a eficácia dos compostos e a segurança para outros organismos (WHO, 2005). O formato da curva dose-resposta mostra a relação entre a dose testada e a resposta biológica, muito utilizada para a compreensão da toxicidade de um composto nos diferentes níveis de exposição (Minho; Gaspar; Domingues, 2016).

Foram encontrados CL₅₀ 0,64 e 0,58 mg/mL, e CL₉₀ 1,69 e 1,15 mg/mL para os extratos etanólico da polpa e da amêndoa de *C. brasiliense* respectivamente, pelo método de análise Probit, mostrando maior eficácia em menor concentração para o extrato da amêndoa, Tabela 4.

Tabela 4. Concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀) para larvas do mosquito *Aedes aegypti* em várias concentrações dos extratos etanólico da polpa e amêndoa de *Caryocar brasiliense* após 24 horas de exposição.

Extrato	Concentração letal (CL) para <i>Ae. aegypti</i>			
	CL ₅₀		CL ₉₀	
	Concentração mg/mL	IC 95%	Concentração mg/mL	IC 95%
Polpa	0,64	(0,59 - 0,70)	1,69	(1,39 - 2,27)
Amêndoa	0,57	(0,54 - 0,59)	0,98	(0,91 - 1,08)

CL₅₀ – concentração letal estimada para matar 50% das larvas. IC - Intervalo de Confiança ao nível de significância de 0,05. CL₉₀ – concentração letal estimada para matar 90% das larvas.

Fonte: Elaborado pela autora.

Na Figura 10 é apresentado a estimativa do efeito dose-resposta para a mortalidade do *Ae. aegypti*. A mortalidade foi proporcional a dose testada em (A e B), semelhantemente ao encontrado por Azevedo *et al.*, (2021) em óleos vegetais comercializados de *Caryocar coriaceum* e *Mauritia flexuosa*, em que a dose máxima testada em larvas de terceiro instar, promoveu a maior mortalidade após 24h de exposição.

Na figura (A) foi necessário concentrações superiores a 1mg/mL para 100% de mortalidade, enquanto em (B), 0,99 mg/mL já causou 100% de mortalidade.

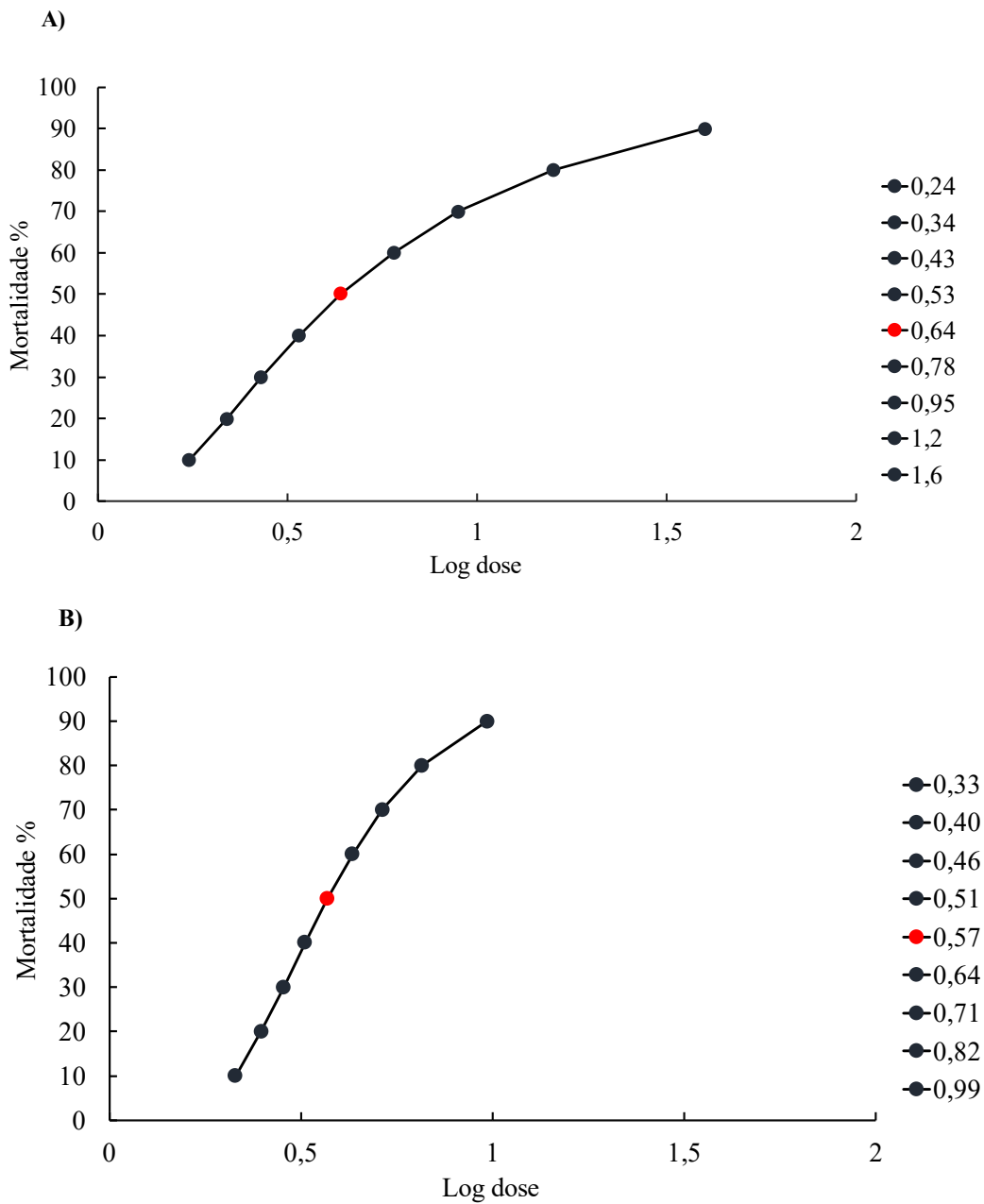


Figura 10. Curva de dose-resposta para estimativa de mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* após 24 horas de exposição. A) Log CL₅₀ 0,64 do extrato etanólico da polpa de *Caryocar brasiliense*. B) Log CL₅₀ 0,57 do extrato etanólico da amêndoa de *Caryocar brasiliense*.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.1 Alterações morfológicas em larvas do *Ae. aegypti* causadas pelos extratos etanólicos da polpa e amêndoa de *Caryocar brasiliense*

As larvas do grupo controle apresentaram-se ativas, com aspecto alongado e vermiforme, coloração acinzentada, cabeça com um par de antenas, tórax e abdome bem definido, segmentos visíveis, pares de cerdas laterais, sifão respiratório íntegro e lóbulo anal (Figura 11:A). As larvas tratadas com os extratos da polpa e da amêndoa, apresentaram alterações nas estruturas morfológicas externas, principalmente na coloração (B, C, D, E), na perda da continuidade do tubo digestivo e perda parcial da matriz peritrófica (F, G, H) e alteração no lóbulo anal (C).

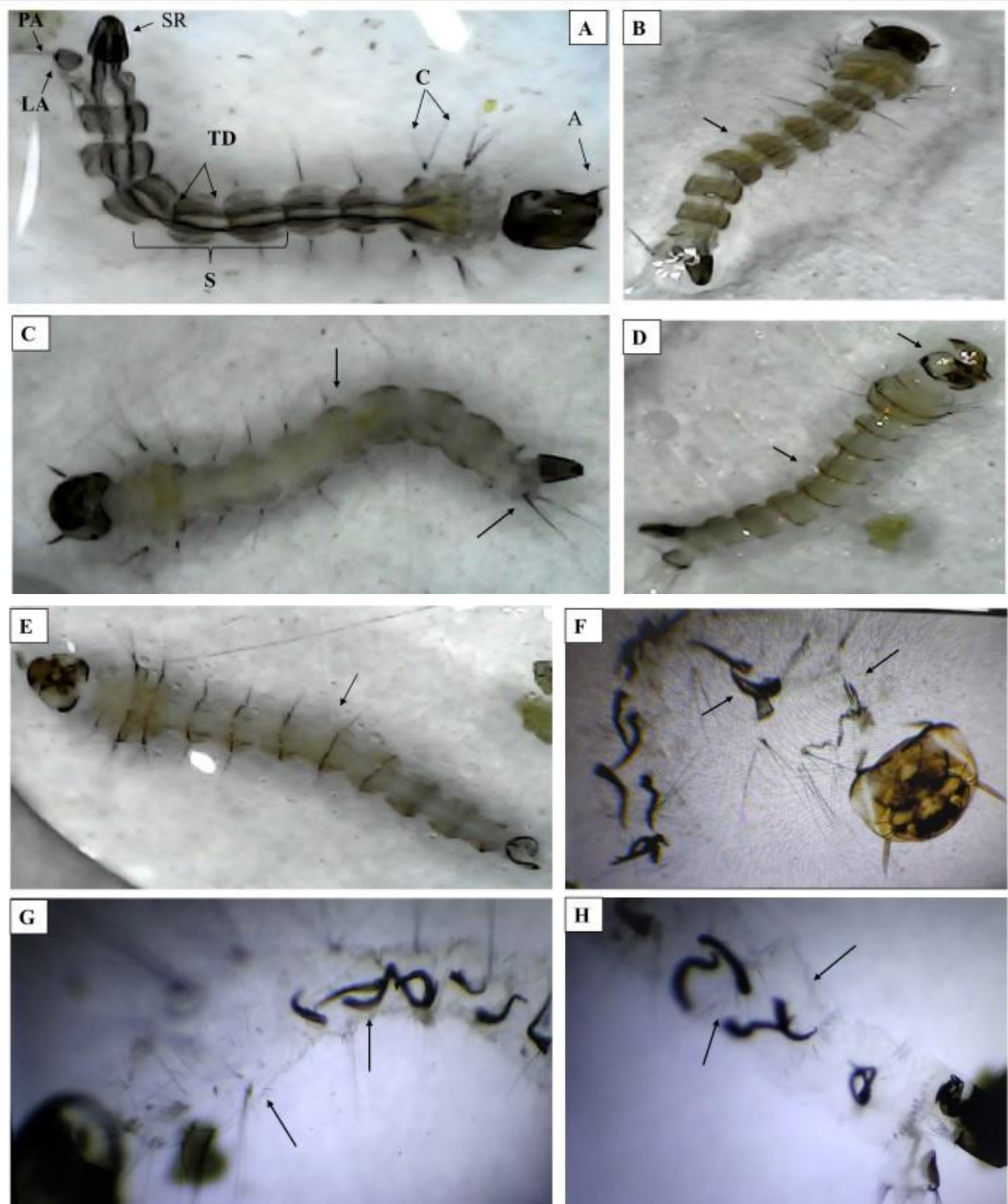


Figura 11. Morfologia das larvas de *Ae. aegypti* após 24h do tratamento com extratos etanólico da polpa e da amêndoa de *Caryocar brasiliense*. (A) Controle; (B, C) tratamento com a polpa; (D, E) tratamento com a amêndoa. (A-E) aumento de 200x; (F) tratamento com o extrato da amêndoa. (G, H) tratamento com o extrato da polpa. (F-H) aumento de 400x. **SR** = Sifão respiratório, **LA** = Lóbulo anal, **C** = Cerdas, **PA** = Papilas anais, **TD** = Tubo digestivo, **S** = Segmentos, **A** = Antenas.

Fonte: Elaborado pela autora.

Os resultados obtidos a partir da análise morfológica mostraram que as larvas alimentadas com os extratos etanólicos da polpa e da amêndoa de *C. brasiliense* impregnados à ração influenciou diretamente na modificação da estrutura das larvas, principalmente na coloração e na continuidade do tubo digestivo.

O canal alimentar das larvas de culicídeos é formado por um tubo que se estende ao longo do corpo da larva, composto por três partes: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior. O intestino anterior está envolvido na ingestão e armazenamento de alimento; o intestino médio secreção de enzimas digestivas e absorção de nutrientes; e o intestino posterior na formação e armazenamento de fezes (Romoser, 1996). O intestino médio é formado por uma camada de células especializadas, do tipo colunares e caliciformes, envolvidas na secreção de enzimas digestivas e absorção de nutrientes, importante mecanismo para a sobrevivência do inseto. Como o intestino médio é o principal órgão responsável pela digestão e absorção de nutrientes, qualquer fator que altere o funcionamento, pode comprometer o desenvolvimento ou levar o inseto a morte (Ray *et al.*, 2009).

Estudo realizado com larvas de terceiro e quarto instar de *Culex quinquefasciatus*, mostrou que os ácidos graxos do extrato hexânico de *Tecoma stans* na concentração de 250 µg/mL, causaram mortalidade de 81,67% e 68,66% de larvas, respectivamente. As amostras estudadas apresentaram potencial larvicida para o controle de culicídeos (Silva *et al.*, 2023). Santos *et al.*, (2017) realizaram estudo de atividade larvicida com óleo volátil extraído das sementes de *Syagrus coronata*, identificou os seguintes ésteres: octanóico (40,55%), decanóico (17,39%) e dodecanóico (40,48%), nos quais causaram a mortalidade em CL₅₀ de 21,07 ppm.

Estudos anteriores mostram o potencial desses compostos na mortalidade de larvas de culicídeos. Ésteres extraídos do fruto de *Solanum lycocarpumna* apresentou atividade larvicida contra *Culex quinquefasciatus* com valores de CL₅₀ entre 0,70 e 27,54mg/L (Silva *et al.*, 2015); bem como relatos de interferência na fisiologia do inseto, como alterações morfológicas, principalmente no trato intestinal (Ribeiro-Neto; Alves; Lima, 2023). Além disso, sua origem natural oferece vantagens por possuir baixa toxicidade para organismos não-alvo.

A atividade biológica dos ácidos graxos pode estar diretamente relacionada a lipofilicidade de suas longas cadeias hidrofóbicas, a distribuição e tamanhos das cadeias carbonadas que podem funcionar como uma espécie de ancoragem em estruturas de membrana celular, a capacidade de permear as células e exercer seu papel bioativo intracelular (Lomonaco *et al.*, 2009; Żyłkiewicz *et al.*, 2020). Ribeiro-Neto; Alves; Lima (2023) realizaram estudo com ésteres metílicos de ácidos graxos (oleato de metila e linoleato de metila) e observaram atividade larvicida em *Ae. aegypti*. De acordo com os autores, os ácidos graxos podem atuar

sinergicamente na mortalidade e, portanto, ser considerados uma fonte de novos bioinseticidas naturais para o controle de larvas de mosquitos. A característica anfipática dos ácidos graxos é um componente importante para a compreensão da interação com as membranas celulares e a sua função biológica, o que poderia explicar seu potencial bioativo em culicídeos vetores (Ahmed; Shah; Ahmed, 2023; Lomonaco *et al.*, 2009).

Diversos possíveis mecanismos de ação podem estar relacionados com a bioatividade em culicídeos. A ação dos ésteres de ácidos graxos pode envolver vários processos bioquímicos e fisiológicos que podem variar dependendo da estrutura específica do éster e o tipo de espécie de mosquito. Um dos mecanismos de ação é a toxicidade sistêmica que ocorre após a ingestão ou contato, onde as substâncias são absorvidas causando a morte do inseto (Ribeiro-Neto; Alves; Lima, 2023). Estudo realizado por Melo *et al.*, (2018) mostrou efeito tóxico do extrato de folhas de *Schinus terebinthifolius* em larvas de *Ae. aegypti* por causar lesão em intestino médio.

Os ácidos graxos podem interferir em processos metabólicos essenciais para o desenvolvimento do inseto, como a síntese de proteínas, a respiração celular ou a produção de energia (Silva *et al.*, 2016). Também é relatado a atuação como disruptores endócrinos, alterando o funcionamento do sistema hormonal das larvas de mosquitos resultando em morte (Sivakumar; Jebanesan; Govindarajan; Rajasekar, 2011).

A relação entre a estrutura molecular dos ácidos graxos e sua atividade larvicida pode ser complexa e variada, pois diversos fatores envolvidos na estrutura dessas substâncias podem influenciar a ação contra as larvas de culicídeos. Alguns aspectos da estrutura molecular dos ácidos graxos estão relacionados com o tamanho da cadeia carbonada, pois o comprimento da cadeia pode afetar sua solubilidade, capacidade de permeabilidade celular e afinidade por alvos biológicos (Vani; Riccardi; Palermo; Vivo, 2019; Claus; Jezierska; Inge; Bogaert, 2019). Em geral, ácidos graxos de cadeias mais longas tendem a ter maior atividade biológica (Lomonaco *et al.*, 2009).

A presença de grupos funcionais específicos, como grupos hidroxila ou carbonila na estrutura dos ácidos graxos pode afetar suas propriedades físico-químicas e interações com alvos biológicos, ou seja, os grupos funcionais podem facilitar a penetração das moléculas de ésteres nas membranas celulares, o que pode aumentar a toxicidade das larvas de mosquitos (Camargo; Martins; Costa, 2019).

Outros compostos podem até complementar a atividade larvicida, mas os ácidos graxos possuem atividade biológica desde a atração (Obaldia *et al.*, 2022), repelência (Cantrell *et al.* 2021) e atividade inseticida contra o *Ae. aegypti* (Arruda *et al.*, 2024; Lomonaco *et al.*, 2009).

Os ácidos graxos podem atuar sinergicamente na mortalidade e, portanto, ser considerados uma fonte de novos bioinseticidas naturais para o controle de larvas de mosquitos (Ribeiro-Neto; Alves; Lima, 2023).

5.4 Atividade citotóxica *in vitro*

A atividade citotóxica dos extratos foi realizada em duas linhagens de células normais, 3T3 (ATCC CRL-1658) e HUVEC (ATCC CRL-1730) O parâmetro utilizado para avaliar a citotoxicidade foi GI₅₀, concentração que inibe 50% do crescimento celular. Os resultados de GI₅₀ estão apresentados na Tabela 5. Na maior concentração testada 250 µg/mL, as células não apresentaram citotoxicidade. Os valores de GI₅₀ foram cerca de 1000 vezes maiores na linhagem de fibroblastos murino quando comparados ao quimioterápico doxorrubicina, e cerca de 10.000 vezes maior na linhagem de cordão umbilical quando comparados ao mesmo quimioterápico.

Desta forma, podemos inferir que na maior concentração testada neste ensaio, não houve inibição do crescimento celular.

Tabela 5. Atividade citotóxica (GI₅₀ µg/mL) do extrato etanólico da polpa do *Caryocar brasiliense* em células 3T3 (ATCC CRL-1658) e HUVEC (ATCC CRL-1730).

Células normais	GI₅₀*extrato etanólico da polpa do <i>Caryocar brasiliense</i>	GI₅₀*extrato etanólico da amêndoa do <i>Caryocar brasiliense</i>	GI₅₀ Doxorrubicina
3T3 (ATCC CRL-1658)	>250 µg/mL	>250 µg/mL	0,25
HUVEC (ATCC CRL-1730)	>250 µg/mL	>250 µg/mL	0,023

*Concentração que inibe 50% do crescimento celular.

5.5 Avaliação da toxicidade oral aguda da polpa e da amêndoa *Caryocar brasiliense*

Durante os dezessete dias de experimentação com os animais não foram verificadas modificações comportamentais anormais ou de maior relevância. Observou-se valores normais no Screening Hipocrático, não ocorrendo óbito de nenhum dos animais nas diferentes concentrações testadas. Esses resultados mostram que o extrato etanólico da polpa e amêndoa do *C. brasiliense* possui DL₅₀ estimada maior que 2000 mg/kg, demonstrando reduzido o potencial de toxicidade oral aguda. Sabe-se que o Screening hipocrático faz parte de uma triagem prévia útil na avaliação e no funcionamento fármaco-toxicológico das substâncias avaliadas, podendo assim ponderar que tais alterações não acarretaram sinais de acuidade relevantes. Não foi observado alteração significativa na média de peso dos animais antes e após os experimentos: polpa (26,36 g antes e 26,33 g depois), amêndoa (26,33g antes e 26,34 g depois). No controle, os pesos estiveram: polpa (30 g antes e 29 g depois) e amêndoa (30 g antes e 32 g depois).

5.5.1 Análise histológica de fígado e rins com o extrato etanólico da polpa do *Caryocar brasiliense*

Os fragmentos coletados do fígado e rins dos animais tratados com o extrato da polpa do *C. brasiliense* não apresentaram qualquer alteração histopatológica e os órgãos mostraram padrões histológicos dentro da normalidade, (Figuras 12 a 15).

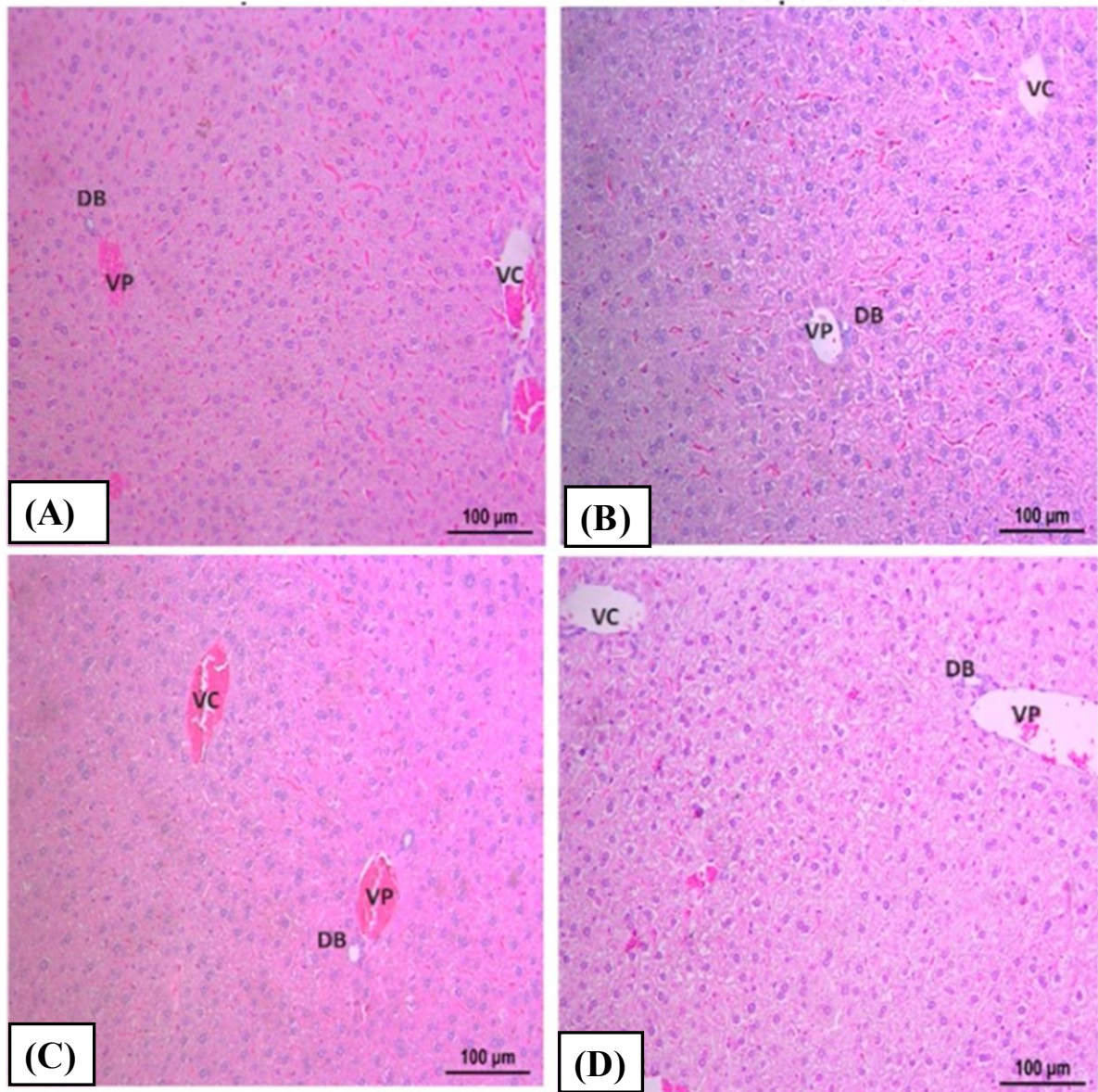


Figura 12. Fotomicrografias de órgão vital exibindo coloração H&E de fígado em doses testadas do extrato etanólico da polpa do *Caryocar brasiliense* em mg/kg. (A) (300); (B) (2000); (C) (5) e (D) (50). Ducto Biliar (DB); Veia Porta (VP); Veia Centro lobulares (VC).

Fonte: Autora.

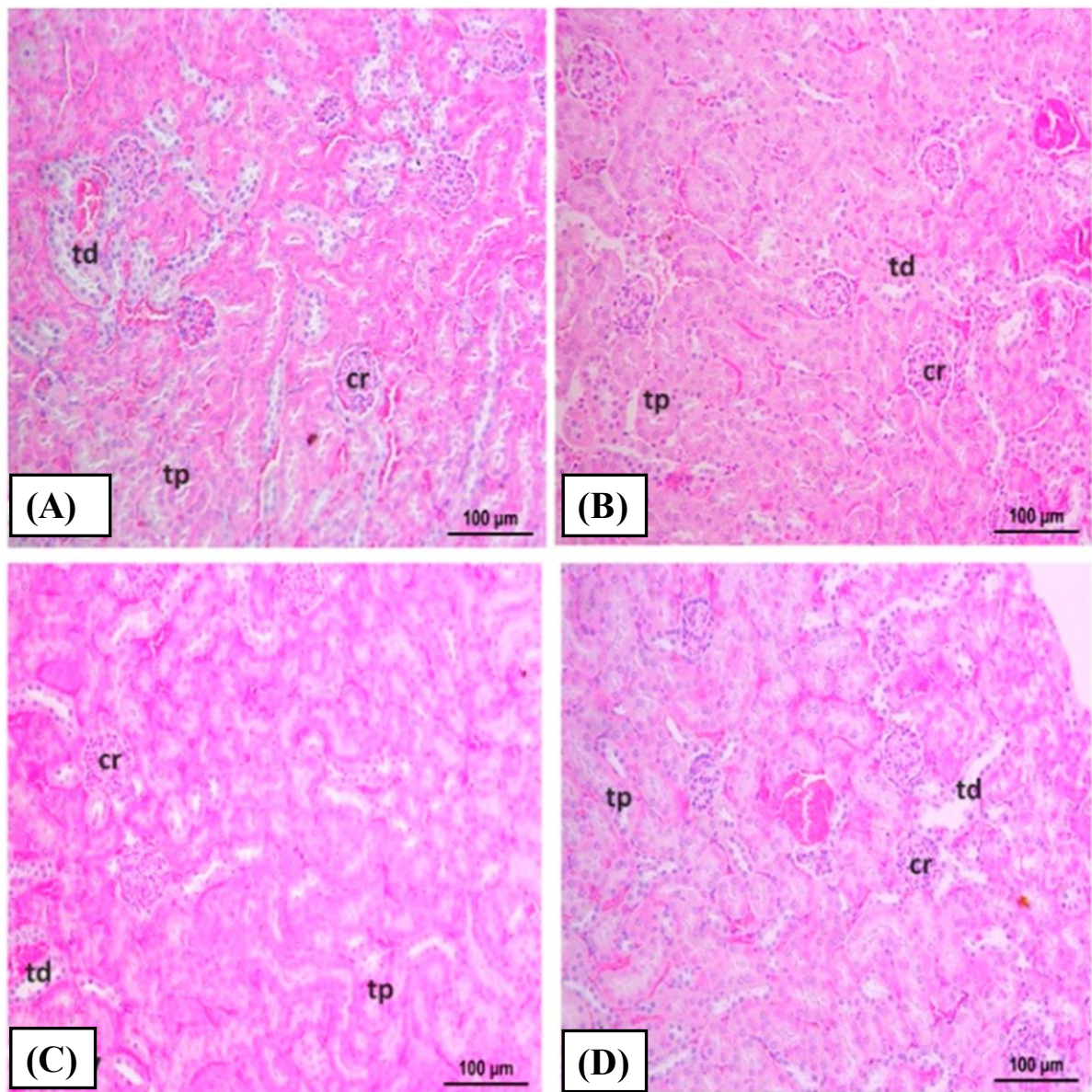


Figura 13. Fotomicrografias de órgão vital exibindo coloração H&E de rins em doses testadas do extrato etanólico da polpa do *Caryocar brasiliense* em mg/kg. (A) (300); (B) (2000); (C) (5) e (D) (50). corpúsculo renal (cr); Túbulo contorcido proximal (tp); Túbulo contorcido distal (td).

Fonte: Autora.

Por não haver nenhuma alteração histológica significativa, o extrato utilizado não oferece risco à saúde, coincidindo com os valores da citotoxicidade em linhagens normais com valores superiores que 250 µg/mL indicando não apresentar citotoxicidade nas maiores doses testadas.

A investigação das funções renal e hepática em estudos de toxicidade oral aguda desempenha um papel crucial na avaliação dos potenciais efeitos adversos de substâncias químicas sobre o organismo. O fígado e os rins são órgãos vitais responsáveis pela metabolização e eliminação de toxinas do corpo, tornando-se alvos frequentes de danos induzidos por agentes tóxicos. Como os extratos vegetais possuem diversas substâncias fitoquímicas, é possível que algumas desenvolvam reações no fígado e rins (Olorunnisola; Bradley; Afolayan, 2012), o que não foi observado neste estudo.

6. CONCLUSÃO

Diante da crescente preocupação global com a propagação das arboviroses transmitidas pelo *Ae. aegypti* e da resistência cada vez mais pronunciada aos inseticidas convencionais, este estudo preenche uma lacuna significativa ao investigar o potencial larvicida dos ácidos graxos presentes na polpa e na amêndoa do fruto do *C. brasiliense* como uma alternativa ecológica viável.

Os resultados dos ensaios larvicida contra larvas de terceiro instar do *Ae. aegypti* demonstraram o potencial bioativo dos ácidos graxos presentes no fruto do pequi, causando mortalidade larval em todas as concentrações testadas. Alterações morfológicas, como descoloração da quitina, perda da continuidade do tubo digestivo e perda parcial da matriz peritrófica são os principais indicativos de toxicidade dos extratos contra as larvas do mosquito.

Os resultados *in vitro* não demonstraram evidências de toxicidade em linhagens de células normais de fibroblastos murino 3T3 (ATCC CRL-1658) e de cordão umbilical humano HUVEC (ATCC CRL-1730), pois os extratos apresentaram GI₅₀ superior 250 µg/mL, em comparação ao quimioterápico doxorrubicina, em que apresentou inibição celular nas concentrações de 0,025 e 0,023 µg/mL em células 3T3 e HUVEC.

Os ensaios *in vivo* não mostraram alterações significativas no peso corporal dos animais nos parâmetros observados no *screening hipocrático* ou qualquer alteração histopatológica em órgãos vitais como fígado e rim, mostrando que os extratos utilizados da polpa e da amêndoa do *C. brasiliense* não oferecem riscos à saúde, o que corrobora com os resultados *in vitro*, sugerindo sua segurança para organismos não-alvo.

Esses achados contribuem para a busca por alternativas sustentáveis e eficazes no controle do *Ae. aegypti*, além de destacar a relevância dos ácidos graxos como potenciais agentes bioativos. Portanto, este estudo não apenas fornece insights importantes para futuras investigações sobre a relação estrutura-atividade de moléculas naturais, mas também sugere uma abordagem promissora para o controle das doenças transmitidas por este vetor, apontando para a possibilidade de desenvolvimento de novas estratégias de controle baseadas em fontes naturais.

REFERÊNCIAS

ABDELHAMID, A. S.; MARTIN, N.; BRIDGES, C. BRAINARD, J. S. et al. Polyunsaturated fatty acids for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. **Cochrane Database Syst Rev.** v. 11, n. 11, p. CD012345. 2018. doi: 10.1002/14651858.CD012345.pub3.

AHMED S, SHAH P, AHMED O. **StatPearls [Internet]**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK525952/>.

AKHILA, J.; MANIKKOTH, S.; SHYAM, D.; ALWAR, M. (2007). Acute toxicity studies and determination of median lethal dose. *Current Science*. 93. 917-920.

ALVES, A. M.; FERNANDES, D. C.; SOUSA, A. G. O.; NAVES, R. V. et al. Características físicas e nutricionais de pequis oriundos dos estados de Tocantins, Goiás e Minas Gerais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 3, p. 198-203. 2014 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.6013>.

ANDRADE, E. L.; BENTO, A. F.; CAVALLI, J.; OLIVEIRA, S. K, et al. Non-clinical studies in the process of new drug development - Part II: Good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics, safety and dose translation to clinical studies. **Braz J Med Biol Res.** v. 49, n. 12, p:e5646. 2016, <https://doi.org/10.1590/1414-431X20165646>.

ARAÚJO, A. C. M. A.; MENEZES, E. G. T.; TERRA, A. W. C.; DIAS, B. O.; et al. Bioactive compounds and chemical composition of Brazilian Cerrado fruits' wastes: pequi almonds, murici, and sweet passionfruit seeds. **Food Sci. Technol**, Campinas, 38(Suppl. 1), p. 203-214, 2018.

ARAÚJO, M. F.; CASTANHEIRA, E. M. S.; SOUSA, S. F. The Buzz on Insecticides: A Review of Uses, Molecular Structures, Targets, Adverse Effects, and Alternatives. **Molecules.** v. 28, n. 8, p. 3641. 2023. doi:10.3390/molecules28083641.

ARAÚJO, R. S. R. M.; BARROS, N.V. A.; PORTO, R. G. C. L.; BRANDÃO, C. C. A. S. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity three fruit species from the Brazilian Cerrado. **Rev Bras Frutic.** v. 41, n. 3, p.e-011. 2019. Available from: <https://doi.org/10.1590/0100-29452019011>.

AROME, D.; CHINEDU, E. The importance of toxicity testing. **J. Pharm. BioSci.** v. 4, n. 2013, p.146-148.

ARRUDA, H. S.; ARAÚJO, M. V. L.; MAROSTICA JUNIOR; M. R. Underexploited Brazilian Cerrado fruits as sources of phenolic compounds for diseases management: A review. *Food chemistry.* **Molecular sciences**, v. 5, 2022. 100148. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2022.100148>.

ARRUDA, J. E.; BIASOTTO, G.; BEPPU, M. M.; MONTEIRO, F. J., *et al.* Nano-encapsulated Cu(II) complex as a promising insecticidal for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Heliyon**, v. 10, n. 1, p. e23198. 2023.

AZEVEDO, F. R.; BEZERRA, L. L. A.; SILVA, T. I.; SILVA, R. A.; FEITOSA, J. V. Larvicidal activity of vegetable oils against *Aedes aegypti* larvae. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín.*, v.74, n.2 p: 9563-9570, 2021. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v74n2.91486>.

BECKENBACH, L. BARON, J. M.; MERK, H. F.; LÖFFLER, H. et al. Retinoid treatment of skin diseases. *Eur J Dermatol*, v. 25, n. 5, p. 384-91, 2015. doi: 10.1684/ejd.2015.2544.

BEITIA, J. L.; KUMAR, J. D.; HEGDE, M. L.; RAO, K. S. Carotenoids as Novel Therapeutic Molecules Against Neurodegenerative Disorders: Chemistry and Molecular Docking Analysis. *Int J Mol Sci*. v. 20, n. 22: 5553. 2019. doi: 10.3390/ijms20225553.

BHATTA, S.; JANEZIC, T. S.; RATTI, C. Freeze-Drying of Plant-Based Foods. *Foods* (Basel, Switzerland), v. 9, n. 1, p. 87, 2020. <https://doi.org/10.3390/foods9010087>.

BOTHAM, P. A. Acute systemic toxicity. *ILAR J*. 2002, v. 43 p. 27-30. doi: 10.1093/ilar.43.suppl_1.s27.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília*, v. 16, n. 4, p :279-293, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Ministério da Saúde incorpora vacina contra a dengue no SUS. (2024).** Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2023/dezembro/ministerio-da-saude-incorpora-vacina-contr-a-dengue-no-sus#:~:text=O%20imunizante%20Qdenga%20tem%20registro,idade%2C%20independentem%20de%20exposi%C3%A7%C3%A3o%20pr%C3%A9via>. Acesso em 04 de janeiro de 2024.

CAMARGO, A.; MARTINS, R.; COSTA, F. Larvicidal Activity of Secondary Plant Metabolites in *Aedes aegypti* Control: An Overview of the Previous 6 Years. *Natural Product Communications*. v. 14, n. 7. p. 1-11. 2019. doi:10.1177/1934578X19862893.

CANTRELL, C. L. ZAKI, M. A.; REICHLEY, A.; SINK, M., *et al.* Biting deterrency of undecanoic acid and dodecanoic acid ester analogs against *Aedes aegypti*. *Pest management science*, 77(8), 3737–3743. 2021. <https://doi.org/10.1002/ps.5994>.

CAPELLO C., FISCHER U., HUNGERBÜHLER K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvent. *Green Chem*. v. 9, p. 927–934. 2007. doi: 10.1039/b617536h.

CARVALHO, B. L.; GERMANO, R. N. L.; BRAGA, K. M. L. Susceptibility of *Aedes aegypti* populations to pyriproxyfen in the Federal District of Brazil. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*, v. 53, p:e20190489: 2020. DOI: 10.1590/0037-8682-0489-2019.

CHEMISTRY LIBRARY. Fatty Acids and Their Esters. Disponível em: [https://chem.libretexts.org/Courses/Saint_Francis_University/Chem_114%3A_Human_Chemistry_II_\(Muino\)/23%3A_Lipids/23.02%3A_Fatty_Acids_and_Their_Esters](https://chem.libretexts.org/Courses/Saint_Francis_University/Chem_114%3A_Human_Chemistry_II_(Muino)/23%3A_Lipids/23.02%3A_Fatty_Acids_and_Their_Esters). Acesso em 05 de março de 2024.

CHENG, H. M.; KOUTSIDIS, G.; LODGE, J. K.; ASHOR, A. S. M. *et al.* Tomato and lycopene supplementation and cardiovascular risk factors: A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis*. v. 257, p. p.100-108, 2017. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.01.009.

CLAUS, S.; JEZIERSKA, S.; INGE, N. A.; BOGAERT, V. Protein-facilitated transport of hydrophobic molecules across the yeast plasma membrane. **FEBS Letters**. v. 593, n. 2019. p. 1508–1527. 2019. doi:10.1002/1873-3468.13469.

CONSOLI, R. A. G. B., OLIVEIRA, R. L. Principais mosquitos de importância sanitária. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1994. 228.

CORDEIRO, M.W.S.; CAVALLIERI, A.L.F.; FERRI, P.H.; NAVES, M. M. V. Características físicas, composição químico-nutricional e dos óleos essenciais da polpa de *Caryocar brasiliense* nativo do estado de Mato Grosso. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 35, n. 4, p. 1127-1139. 2013.

COURET, L.; DOTSON, E.; BENEDICT, M. K. Temperature, Larval Diet, and Density Effects on Development Rate and Survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *PLoS One*. 2014; 9(2): e87468. doi: 10.1371/journal.pone.0087468.

CUSTÓDIO, J. M. O.; NOGUEIRA, L. M. S.; SOUZA, D. A.; FERNANDES, M. F., et al. Abiotic factors and population dynamic of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in an endemic area of dengue in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 61, p. e18. 2019. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201961018>.

DROZD, J. Chemical derivatization in gas chromatography, **Journal of Chromatography A**. v. 113, p. 303-356, 1975, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)95303-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)95303-2).

ELLWANGER, J. H.; CARDOSO, J. D. C.; CHIES, J. A. B. Variability in human attractiveness to mosquitoes. **Current research in parasitology & vector-borne diseases**, 1, 100058. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2021.100058>.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Bioma Cerrado. (2023). Disponível em: <https://www.embrapa.br/cerrados/colecao-entomologica/bioma-cerrado>. Acesso em 12 de janeiro de 2024.

FERNÁNDEZ, O. N.; OLIVEROS, D.; GARAYOA, R. C.; FLUVIÀ, M. B. Introducing Lipophilicity to (Polyhydroxyalkyl)thiazolidine Carboxylic Acids Via Acylation. **ACS Omega**, v. 7, n. 13, p. 11075-11081. 2022. DOI: 10.1021/acsomega.1c07078.

FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Nova parceria Fiocruz e WMP ajudará no controle de arboviroses. (2023). Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/en/news/new-fiocruz-and-wmp-partnership-will-help-control-arboviruses>. Acesso em 12 de janeiro de 2024.

FLORA E FUNGA DO BRASIL. *Caryocar brasiliense* Cambess. Disponível em: https://reflora.jbrj.gov.br/consulta/?grupo=6&familia=null&genero=&especie=&autor=&nomeVernaculo=pequi&nomeCompleto=&formaVida=null&substrato=null&ocorreBrasil=QUALQUER&ocorrencia=OCORRE&endemismo=TODOS&origem=TODOS®iao=QUALQUER&ilhaOceanica=32767&estado=QUALQUER&domFitogeograficos=QUALQUER&vegetacao=TODOS&mostrarAte=SUBESP_VAR&opcoesBusca=TODOS_OS_NOMES&loginUs

uario=Visitante&senhaUsuario=&contexto=consulta-publica&pagina=1#CondicaoTaxonCP. Acesso em 29 de março de 2024.

FOURNET F, SANNIER C, MONTENY N. Effects of two insect growth regulators on the susceptibility of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to *Molinema dessetae* (Nematoda: Filarioidea). **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 13, n. 1, p. 40–42.

GETACHEW, D.; TEKIE, H.; MICHAEL, G. T.; BALKEW, M. et al. Breeding Sites of *Aedes aegypti*: Potential Dengue Vectors in Dire Dawa, East Ethiopia. **Interdiscip Perspect Infect Dis**. v. 2015:706276. doi:10.1155/2015/706276.

GODINHO, C. S.; SILVA, C. M.; MENDES, C. S. O.; FERREIRA, P. R. B. *et al.* Estudo fitoquímico de espécies arbóreas do cerrado. **Rev Multitexto**. v. 3, n. 1, p. 64-70. 2015.

GOPINATHAN, C.; CHAUDHURY, A.; VIVEK. Novel techniques for cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* Subsp. *Israelensis*. **International Journal of Mosquito Research**. v. 3, n. 4, p. 17-29. 2016. ISSN: 2348-5906.

GUEDES, A. M. M.; ANTONIASSI, R.; GALDEANO, M. C.; GRIMALDI, R.; et al. Length-scale Specific Crystalline Structural Changes Induced by Molecular Randomization of Pequi Oil. **J Oleo Sci**. v. 66, n. 5, p. 469-478. 2017. doi: 10.5650/jos.ess16192

GUEDES, A. M. M.; ANTONIASSI, R.; MACHADO, A. F. F. Pequi: a Brazilian fruit with potential uses for the fat industry. **OCL-Oilseeds and fats, Crops and Lipids**. <https://doi.org/10.1051/ocl/2017040>.

GUTNIKOV, G. Fatty acid profiles of lipid samples. **J Chromatogr B Biomed Appl**. v. 671, n.1-2, p. 71-89. 1995. doi: 10.1016/0378-4347(95)00116-z. PMID: 8520704.

HARBURGUER, L. V.; ALZOGARAY, R. A. **Insectos de importancia sanitaria en la Argentina: guía ilustrada para personal militar**. 1a ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Autores de Argentina, 2018.

HAYD, R. L. N.; CARRARA, L.; MELO, J. ALMEIDA, N. C. V. *et al.* Lima Evaluation of resistance to pyrethroid and organophosphate adulticides and kdr genotyping in *Aedes aegypti* populations from Roraima, the northernmost Brazilian State. **Parasites Vectors**, v. 13, p. 264, 2020. DOI: 10.1186 / s13071-020-04127-w.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2024. Produção de Pequi. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/pequi/br>. Acesso em: 20 de junho de 2024.

JORGE-JUNIOR, A.; LEITÃO, M. M.; BERNAL, L. P. T.; SANTOS, E. et al. Analgesic and Anti-inflammatory Effects of *Caryocar brasiliense*. **Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem**. v. 19, n. 3, p. 313-322. 2020. doi: 10.2174/1871523018666190408144320.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**. v. 1, n. 1, 2005.

KNITTELFELDER, O.; & KOHLWEIN, S. Derivatization and Gas Chromatography of Fatty Acids from Yeast. **Cold Spring Harbor Protocols**. 2017. pdb.prot085464. 10.1101/pdb.prot085464.

KRAEMER, M. U.; SINKA, M. E.; DUDA, K. A.; MYLNE, A. Q. N. et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **eLife**, 4, e08347. 2015. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>.

LEÃO, D. P.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; BASTOS, R. et al. Physicochemical characterization, antioxidant capacity, total phenolic and proanthocyanidin content of flours prepared from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit by-products. **Food Chemistry**. v. 225, p. 146-153. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.027>.

LIMA, A.; SILVA, A. M. O.; TRINDADE, R. A.; TORRES, R. P. et al. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 695-698. 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452007000300052>.

LOMONACO, D.; SANTIAGO, G. M. P.; FERREIRA, Y. S.; ARRIAGA, M. C. et al. Study of technical CNSL and its main components as new green larvicides. **Green Chem.**, 2009, 11, 31–33.

LOYAO, A.S. JR; VILLASICA, S.L.G.; DELA PEÑA, P.L.L.; GO, A. W. Extraction of lipids from spent coffee grounds with non-polar renewable solvents as alternative. **Ind. Crop. Prod.** v. 119, p.152–161. 2018. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.04.017.

MACHADO, A. F. F, TRES, A, RUTH, S. M. V.; ANTONIASSI, R. et al. Discrimination of pulp oil and kernel oil from pequi (*Caryocar brasiliense*) by fatty acid methyl esters fingerprinting, using GC-FID and multivariate analysis. **J Agric Food Chem**. v. 63, n. 45, p. 10064-9. 2015. doi: 10.1021/acs.jafc.5b03699.

MELO, A. R.; GARCIA, I. J. P.; SERRÃO, J. E.; Hérica Lima Santos, H. L. et al. Toxicity of different fatty acids and methyl esters on *Culex quinquefasciatus* larvae, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 154, p: 1-5, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.009>.

MENA, P.; ANGELINO, D. Plant Food, Nutrition, and Human Health. **Nutrients**, 12, 2157. 2020, <https://doi.org/10.3390/nu12072157>.

METIBEMU, D. S.; AKINLOYE, O. A.; OMOTUYI, I. O.; OKOYE, J. O. *et al.* Carotenoid-Enriched Fractions From *Spondias mombin* Demonstrate HER2 ATP Kinase Domain Inhibition: Computational and In Vivo Animal Model of Breast Carcinoma Studies. **Front Oncol**. v. 11: 687190. 2021. doi: 10.3389/fonc.2021.687190.

MINHO, A. P.; GASPAS, E. B.; DOMINGUES, R. **Guia prático para determinação de curva dose-resposta e concentração letal em bioensaios com extratos vegetais**. Embrapa Peçuária Sul. Comunicado técnico, 93. 2016.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R. et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, n. 11, p. 757–766. 1991. <https://doi.org/10.1093/jnci/83.11.757>.

MOROSINI, M. V. G. C.; FONSECA, A. F.; LIMA, L. D. Política Nacional de Atenção Básica 2017: retrocessos e riscos para o Sistema Único de Saúde. **Saúde Debate**. Rio de Janeiro, v. 42, n. 116, p. 11-24, jan-mar, 2018. <https://doi.org/10.1590/0103-1104201811601>.

NEJI, S. B.; TRABELSI, M.; FRIKHA, M. H. Esterification of Fatty Acids with Short-Chain Alcohols over Commercial Acid Clays in a Semi-Continuous Reactor. **Energies** 2009, v. 2, n. 4, p. 1107-1117, 2009. <https://doi.org/10.3390/en20401107>.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lipid Biosynthesis. In: Principles of Biochemistry**. New York: W.H. Freeman and Company, 2005. p. 787-815.

OBALDIA, M.E., *et al.* Differential mosquito attraction to humans is associated with skin-derived carboxylic acid levels. **Cell**, v. 185, n. 22, p. 4099–4116.e13. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.09.034>.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT - 2001. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development.

OLIVEIRA, V. C.; ALMEIDA-NETO, L. C. A. Ocorrência de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em bromélias cultivadas no Jardim Botânico Municipal de Bauru, São Paulo, Brasil. **Cad. Saúde Pública**. v. 33, n. 1:e00071016, 2017. doi: 10.1590/0102-311X00071016.

OLORUNNISOLA, O.S., BRADLEY, G., AFOLAYAN, A. J., Acute and sub-chronic toxicity studies of methanolic extract of *Tulbaghia violacea* rhizomes in Wistar rats. *African Journal of Biotechnology*. v. 11, n. 83, p:14934–14940. 2012. DOI: 10.5897/AJB12.1565.

ORSAVOVA, J.; MISURCOVA, L.; AMBROZOVA, J. V.; VICHA, R. *et al.* Fatty Acids Composition of Vegetable Oils and Its Contribution to Dietary Energy Intake and Dependence of Cardiovascular Mortality on Dietary Intake of Fatty Acids. **Int J Mol Sci**. v. 16, n. 6, p. 12871-12890. 2015. doi:10.3390/ijms160612871.

PINHEIRO, H. S.; GIACOMIN, L. L.; REIS, I. M. S.; BARATTO, L. C. Avaliação do desenvolvimento e da produção de flavonoides de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (Crassulaceae) em diferentes condições de luz e nutrição. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 4, p. 375-547, Out-Dez 2016. DOI 10.5935/2446-4775.20160029.

PINTO, S. B.; RIBACK, T. I. S.; SYLVESTRE, G.; COSTA, G. *et al.* Effectiveness of *Wolbachia*-infected mosquito deployments in reducing the incidence of dengue and other *Aedes*-borne diseases in Niterói, Brazil: A quasi-experimental study. **PLoS Negl Trop Dis** v. 15, n. 7, p: e0009556. 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009556>.

RABELING, S. C.; LIM, J. L.; ROSANA TIDON, R.; NEFF, J. L. *et al.* Seasonal variation of a plant-pollinator network in the Brazilian Cerrado: Implications for community structure and robustness. **PLoS One**. v. 14, n. 12: e0224997. 2019. doi: 10.1371/journal.pone.0224997.

RAY, K.; MERCEDES, M.; CHAN, D.; CHOI, C. Y. *et al.* Growth and differentiation of the larval mosquito midgut. **J Insect Sci**. 2009;9:1-13. doi:10.1673/031.009.5501.

RIBEIRO-NETO, J. A.; ALVES, S. N.; LIMA, L. A. R. S. Fatty acid methyl esters (FAMES) obtained from edible vegetable oils: Larvicidal activity and melanization process in *Aedes aegypti* larvae, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 50, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102689>.

RIZZO, G., BARONI, L., & LOMBARDO, M. Promising Sources of Plant-Derived Polyunsaturated Fatty Acids: A Narrative Review. **International journal of environmental research and public health**, v. 20, n. 3, p. 1683. 2023. <https://doi.org/10.3390/ijerph20031683>.

ROCHA, W. S.; LOPES, R. M.; SILVA, D. B. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP**, v. 33, n. 4, p. 1215-1221, 2011.

ROMOSER, W. S. 1996. **The vector alimentary system**. In BJ Beaty, WC Marquardt (eds), **The Biology of Disease Vectors**, Colorado University Press, Niwot, CO, p. 298-317.

SANTOS, M.M., JÉSSICA S. NASCIMENTO, MIRELA A.G. e al. Fatty acid-rich volatile oil from *Syagrus coronata* seeds has larvicidal and oviposition-deterrent activities against *Aedes aegypti*, **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v 100, 2017, <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.05.008>.

SILVA, N. R. R.; SANTOS, A. M., OLIVEIRA, C. M. A.; TEREZAN, A. P. et al. Energy and lipid contents, and polyphenols composition of pequi pulp according to the fruit native area. **Ciência Rural**, v. 53, n. 6, p. e20220063. 2023. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20220063>.

SILVA, S. L. R.; CRISPIM-FILHO, A. J.; COSTA, A. C.; BATISTA, P. F et al. *Pouteria torta* is a remarkable native plant for biomonitoring the glyphosate effects on Cerrado vegetation. **Ecological Indicators**. v. 102, p. 497-506. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.03.003>.

SILVA, V. C. B.; RIBEIRO-NETO, J. A.; ALVES, S. N.; LIMA L, A. R. S. Larvicidal activity of oils, fatty acids, and methyl esters from ripe and unripe fruit of *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) against the vector *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Rev Soc Bras Med Trop**. 2015 Sep-Oct;48(5):610-3. doi: 10.1590/0037-8682-0049-2015. PMID: 26516974.

SILVA, V. C.; SCHERER, P. O.; FALCÃO, S. S.; ALENCAR, J. et al. Diversidade de criadouros e tipos de imóveis freqüentados por *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti*. **Revista De Saúde Pública**, v. 40, n. 6, p. 1106–1111. 2006. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102006000700021>.

SILVA, V. I. A.; RAMOS, J. F. Arboviroses e políticas públicas no Brasil. **Revista Ciências em Saúde**, v. 7, n. 3, 2017.

SIVAKUMAR, R.; JEBANESAN, A.; GOVINDARAJAN, M.; RAJASEKAR, P. Larvicidal and repellent activity of tetradecanoic acid against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say.) (Diptera:Culicidae). **Asian Pac J Trop Med**. v. 4, n. 9, p. 706-10. 2011, doi: 10.1016/S1995-7645(11)60178-8. PMID: 21967693.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107–1112. 1990. <https://doi.org/10.1093/jnci/82.13.1107>.

SLUIJS, I.; CADIER, E.; BEULENS, J.W.J.; D L VAN DER, A. et al. Dietary intake of carotenoids and risk of type 2 diabetes. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases** v. 25, Issue 4, p. 376-381. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2014.12.008>.

SOARES, C. T.; NOGUEIRA, G. F.; SANTANA, A. A.; OLIVEIRA, R. A. Vitamin C content of freeze dried pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) Pulp. **International Drying Symposium Valência, Spain**, p. 11-14, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.4995/ids2018.2018.7803>.

STILLWELL, W.; R. WASSALL, S. R. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 126, p. 1-27, 2003, [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(03\)00101-4](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(03)00101-4).

TORRES, P. F. F.; BALDINOTTI, H. S.; COSTA, D. A.; MIRANDA, C. M. et al. Influence of pH, light, food concentration and temperature in *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae) larval development. **EntomoBrasilis**. v. 15, p. e999. 2022. <https://doi.org/10.12741/ebrasilis.v15.e999>.

TRENTINI, C. P.; OLIVEIRA, D. M.; ZANETTE, C. M.; SILVA, C. Low-pressure solvent extraction of oil from macauba (*Acrocomia aculeata*) pulp: characterization of oil and defatted meal. **Ciência Rural**, v. 46, n. 4, p.725-731, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20150740>.

TSIRIGKA, A.; NTOULA, M.; KONTOGIANNOPOULOS, K.N.; KARABELAS, A. J. et al. Optimization of Solvent Extraction of Lipids from *Yarrowia lipolytica* towards Industrial Applications. **Fermentation**, v. 9, n. 35. 2023. <https://doi.org/10.3390/fermentation9010035>.

VALDEZ, L.D.; SIBONA, G.J.; CONDAT, C.A. Impact of rainfall on *Aedes aegypti* populations. **Ecological Modelling**, v. 385, p. 96-105, 2018. doi: 10.22038/ijbms.2019.33825.8051.

VANNI, S.; RICCARDI, L.; PALERMO, G.; VIVO, M. Structure and Dynamics of the Acyl Chains in the Membrane Trafficking and Enzymatic Processing of Lipids. **Accounts of Chemical Research**, v. 52, n. 11, p. 3087-3096. 2019. DOI: 10.1021/acs.accounts.9b00134.

WANG Z, KIM JR, WANG M, SHU S, AHN YJ. Larvicidal activity of *Cnidium monnieri* fruit coumarins and structurally related compounds Against insecticide-susceptible and insecticide-resistant *Culex pipiens pallens* and *Aedes aegypti*. *Pest Manag Sci*. 2012;68:1041–7.

WASSALL, S. R.; STILLWELL, W. Polyunsaturated fatty acid–cholesterol interactions: Domain formation in membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1788, p. 24-32, 2009, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.011>.

WEBER D.; KOCHLIK B.; DEMUTH I.; THIESSEN, E. S. et al. Plasma carotenóides, tocoferóis e retinol-Associação com a idade no Berlin Aging Study II. **Redox Biol**. 2020; v. 32, p :101461. doi: 10.1016/j.redox.2020.101461.

WHO - World Health Organization. Global insecticide use for vector-borne disease control -- 4th Edition. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241598781>. Acesso em: 20 de junho de 2024.

WHO - World Health Organization. **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides**. Genebra, Suíça, 2005.

ZAOUAY, F.; BRAHEM, M.; FATEN BOUSSAA, F.; HADDADA, F. M. et al. Effects of Fruit Cracking and Maturity Stage on Quality Attributes and Fatty Acid Composition of Pomegranate Seed Oils. **International Journal of Fruit Science**. v. 20, p. S1959-S1968. 2020. <https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1839625>.

ŻYŁKIEWICZ B. G.; ŚWISŁOCKA, R.; KALINOWSKA, M.; GOLONKO, A. et al. Biologically Active Compounds of Plants: Structure-Related Antioxidant, Microbiological and Cytotoxic Activity of Selected Carboxylic Acids. **Materials (Basel)**. v. 13, n. 19, p:4454. 2020. doi:10.3390/ma13194454.