



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO MULTI-INSTITUCIONAL EM
BIOTECNOLOGIA**

Avaliação do bloqueio de transmissão de *Plasmodium vivax* para *Anopheles aquasalis* por extratos e substâncias de plantas amazônicas.

Dilcindo Barros Trindade

Manaus

2019

DILCINDO BARROS TRINDADE

Avaliação do bloqueio de transmissão de *Plasmodium vivax* para *Anopheles aquasalis* por extratos e substâncias de plantas amazônicas.

Tese de doutorado submetida ao programa de Pós-Graduação Multi-institucional em Biotecnologia como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração em biotecnologia para saúde.

Orientador: Dr. Adrian Martin Pohlit

Co-orientadora: Dra. Claudia María Rios-Velásquez

Manaus

2019

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

-
- T833a Trindade, Dilcindo Barros
Avaliação do bloqueio de transmissão de Plasmodium vivax para
Anopheles aquasalis por extratos e substâncias de plantas amazônicas. /
Dilcindo Barros Trindade. - 2019.
95 f. : il., color. ; 31 cm.
- Orientador(a): Adrian Martin Pohlitz.
Coorientador(a): Claudia María Rios-Velásquez.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus, 2019.
1. Malária. 2. bloqueio de transmissão. 3. plantas amazônicas. 4.
Plasmodium vivax. I. Pohlitz, Adrian Martin. II. Rios-Velásquez, Claudia
María. III. Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia. IV. Título
-

Folha de aprovação

DILCINDO BARROS TRINDADE

Avaliação do bloqueio de transmissão de *Plasmodium vivax* para *Anopheles aquasalis* por extratos e substâncias de plantas amazônicas.

Tese de doutorado submetida ao programa de Pós-Graduação Multi-institucional em Biotecnologia como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração em biotecnologia para saúde.

Aprovada em: 28/08/2019

BANCA EXAMINADORA

Dr. Adrian Martin Pohlit

Presidente

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA

Dra. Rosemary Aparecida Roque

Membro Titular

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA

Dra. Gisely Cardoso de Melo

Membro Titular

Instituto de Medicina Tropical

Dra. Eunice da Silva Medeiros do Vale

Membro Titular

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA

Dr. Tiago Barbosa Pereira

Membro Titular

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus irmãos, irmãs, a minha esposa Sôngila e a minha filha Dilcianny. Estar junto é estar presente nos melhores e piores momentos da vida. Obrigado

Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais
evidente fica nossa ignorância.

JOHN F. KENNEDY.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia-PPG-BIOTEC da Universidade Federal do Amazonas-UFAM.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES pelo apoio ao Programa de Pós-Graduação.

A Fundação de Amparo as Pesquisas do Estado do Amazonas-Fapeam pelo apoio financeiro do projeto e concessão de bolsa de estudo.

A Fundação de Medicina Tropical do Amazonas-FMT Dr. Heitor Vieira Dourado por conceder amostras de sangue de pacientes com malária.

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane-ILMD-Fiocruz Amazônia e ao laboratório em Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia pela acolhida e fornecimento de estrutura e apoio para a realização dos experimentos.

A Universidade do Estado do Amazonas-UEA pela liberação de dois anos para que eu pudesse dar andamento a esse estudo.

Aos amigos de Belém-Pará, irmãos e irmãs, tios, tias, primos, primas pelo apoio de sempre, especialmente aos meus irmãos e irmãs que sempre torceram por mim.

A minha esposa Sôngila Peres de Oliveira e minha filha Dilcianny Peres Trindade meus sinceros agradecimentos pelo apoio, carinho e amor nos momentos difíceis dessa etapa de minha vida.

A minha sogra dona Vanilda por ter me acolhido em sua residência no início do curso. Obrigado

Aos meus pais biológicos e adotivos *in memoriam* eternamente grato a essas pessoas que de tudo fizeram para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu orientador Dr. Adrian Martin Pohlit (INPA) pela orientação.

A minha co-orientadora Dra. Claudia María Ríos-Velásquez da Fundação Oswaldo Cruz-Amazonas-Instituto Leônidas e Maria Deane (Fiocruz-ILMD) que disponibilizou o laboratório e insetário para o desenvolvimento dessa pesquisa, juntamente, com sua equipe de trabalho. Equipe que serei sempre grato.

Ao Dr. Felipe Pessoa pela amizade e por disponibilizar Junto com a Dra. Claudia Velásquez o laboratório para as atividades de pesquisa.

Ao Antônio Balieiro pelas análises estatísticas

A Marly e dona Marta entre outros que coletaram sangue dos pacientes na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas-FMT Dr. Heitor Vieira Dourado. Obrigado

Aos pacientes que cederam sangue mesmo doentes para esse estudo. Sem a participação voluntária dessas pessoas esse trabalho não seria possível. Meu muito obrigado a vocês.

Ao professor Dr. Edmar Vaz de Andrade, coordenador do curso de Pós-graduação em Biotecnologia por atender-me sempre diante das necessidades quando precisei para terminar esse estudo.

A Dra. Stefanie Lopes pela amizade e contribuição no início desse estudo

As secretárias Jacqueline, Nubiane do PPG-Biotec e Lúcia do centro de apoio multidisciplinar da UFAM pela amizade e bom atendimento.

Aos meus amigos-parceiros da Fundação Oswaldo Cruz-Amazonas-Instituto Leônidas e Maria Deane (Fiocruz-ILMD) que sempre me ajudaram no decorrer dos experimentos: Dra. Keillen, Patrícia, Gervilane, Heliana, Eric, Jordam, João, Kelli, Raissa, Mário, Alexandre, Hermom e Ádria. Mais uma vez muito obrigado a todos vocês.

Aos colegas de laboratório Andreza, Antônio, Emanuelle pela amizade.

A Marizete, ao Sr. Ícaro, Sebastião e tantos outros que acabei me tornando amigo na Fiocruz-ILMD. Obrigado pela boa amizade durante minha passagem por essa instituição de pesquisa.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas-UFAM.

Aos colegas do Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia-LAPAAM do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA: Marlene, Diana, Dra. Bruna, Dra. Andrea, Dra. Zelina, Dr. Tiago, Dr. Edzon e Abraão. Meu muito obrigado

Aos meus colegas de trabalho da Universidade do Estado do Amazonas, especialmente aos colegas do colegiado de Biologia do qual faço parte.

Aos meus colegas professores da UFAM-Parintins.

Aos alunos e alunas do curso de Biologia e Química do Centro de Estudos Superiores de Parintins-CESP-UEA que sempre procuraram entender minha situação durante o desenvolvimento desse estudo.

A coordenação de Química e Biologia pelo apoio no momento em que mais precisei, aos professores do curso de Química, especialmente a Profa. Dra. Célia pelo apoio.

A Direção do CESP-UEA especialmente ao Prof. Dr. Marceliano e ex-diretor Prof. Davi Xavier.

Aos meus ex-alunos que os reencontrei nessa estrada da vida: Katak, Elerson, Veranilce entre outros. Obrigado a todos vocês.

A todas as pessoas que por ventura não lembrei de citar o nome, mas que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

A TODOS, MEU SINCERO, OBRIGADO.

RESUMO

Devido a resistência que vem ocorrendo em *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* aos medicamentos em uso e o crescente número de casos da malária há necessidade de buscar novas estratégias de controle da doença e uma delas pode ser o bloqueio de transmissão de malária (Transmission Blocking Strategies -TBS) que nos últimos anos teve aumentado interesse pela mesma. Neste estudo foi utilizado o modelo laboratorial *Anopheles aquasalis* – *Plasmodium vivax* frente a ação de extratos e substâncias extraídas de plantas da região amazônica. Em *P. vivax* há carência de cultivo contínuo *in vitro* por isso nesse estudo foi utilizado o modelo experimental de alimentação de mosquitos através de membrana artificial, com sangue de pacientes maláricos e substâncias vegetais cis-cajucarina B extraída de ‘sacaca’ *Croton cajucara* e 7-epi-gedunina sintetizada a partir de limonóides extraídos de óleo ou torta residual de ‘andiroba’ *Carapa guianensis*. Além das substâncias, extratos aquosos da casca e galho de ‘acariquara-branca’ *Geissospermum argenteum*. Foram preparadas concentrações dos extratos e substâncias, diluídas e oferecidas juntamente com sangue parasitado aos mosquitos por meio de alimentadores de vidro. Para diluição das substâncias, foi necessário padronização de 0 a 5% do diluente Dimetilsulfóxido-DMSO, pois as substâncias usadas nesse estudo não se dissolvem em água. Dentre essas concentrações a que mais se ajustou aos testes foi a de 1%. Menor número de ovos retidos e postos foi observado nas concentrações de 1%DMSOPv- e 1%DMSOPv+, respectivamente. Maior infecção de mosquitos em 1%DMSOPv+. Além disso, foi utilizada como droga de referência a ivermectina que na concentração de 200ng/mL apresentou alta mortalidade de *A. aquasalis*. O número de oocistos de *P. vivax* variou significativamente frente a ação de DMSO/1ppmPV+ de cis-cajucarina quando comparado ao controle de 1%DMSO/0ppmPV+. O número de oocistos frente a 100ppm/PV+ de concentração do extrato aquoso do galho de *G. argenteum* e 1000ppm/PV+ do mesmo extrato, diferiu significativamente uma concentração da outra e 1000ppm/PV+ diferiu quando comparada a 0%ppm do mesmo extrato.

Palavras-chaves: Malária, bloqueio de transmissão, plantas amazônicas, *Plasmodium vivax*

ABSTRACT

Due to the resistance that has been occurring in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* to the drugs in use and the increasing number of malaria cases, there is a need to look for new disease control strategies and one of them may be the blockage of malaria transmission (Transmission Blocking Strategies - TBS) which in recent years has increased interest in it. In this study we used the laboratory model *Anopheles aquasalis* - *Plasmodium vivax* against the action of extracts and substances extracted from plants of the Amazon region. In *P. vivax* there is a lack of continuous in vitro culture, so in this study we used the experimental model of mosquito feeding through artificial membrane, with blood from malarial patients and cis-cajucarina B extracted from 'sacaca' *Croton cajucara* and 7-epi-gedunine synthesized from limoids extracted from oil and 'andiroba' *Carapa guianensis* residual cake. In addition to the substances, aqueous extracts of the bark and twig of 'acariquara-white' *Geissospermum argenteum*. Concentrations of extracts and substances were prepared, diluted and offered along with parasitized blood to mosquitoes by means of glass feeders. For dilution of the substances, it was necessary to standardize 0 to 5% of the dimethylsulfoxide-DMSO diluent because the substances used in this study do not dissolve in water. Among those concentrations that best fit the tests was 1%. Lower numbers of eggs retained and laid were observed at concentrations of 1% DMSOPv- and 1% DMSOPv +, respectively. Highest mosquito infection at 1% DMSOPv +. In addition, ivermectin was used as a reference drug, which at the concentration of 200ng / mL presented high mortality of *A. aquasalis*. The number of *P. vivax* oocysts varied significantly against cis-cajucarina DMSO / 1ppmPV + action when compared to the 1% DMSO / 0ppmPV + control. The number of oocysts at 100ppm / PV + concentration of the aqueous extract of the *G. argenteum* branch and 1000ppm / PV + of the same extract differed significantly from each other and 1000ppm / PV + differed when compared to 0% ppm of the same extract.

Keywords: Malaria, blocking transmission, amazon plants, *Plasmodium vivax*

LISTA DE ABREVIATURAS

CB: Cis-cajucarina B

CL: Concentração letal

DMSO: Dimetilsulfóxido

LEDTA: Laboratório em Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia

EG: 7epigedunina

G6PD: Glicose-6-Fosfato desidrogenase

GA: *Geissospermum argenteum*

INPA: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

IVM: Ivermectina

LAPAAM: Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia

OMS: Organização Mundial de saúde

PQ: Primaquina

Pv: *Plasmodium vivax*

SIVEP: Sistema Informatizado de Vigilância epidemiológica

T.C.A: Terapia combinada à base de artemisinina

TBS: Transmission blocking strategies

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TNTPS: Tetranortriterpenoides

WHO: World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa mostrando os países que apresentaram casos de malária autóctones em 2018	17
Figura 2: Mapa do Brasil, mostrando áreas de risco para malária, por município de infecção.....	18
Figura 3: Ciclo de vida de <i>Anopheles aquasalis</i>	18
Figura 4: Mapa de América Central e do Sul, mostrando a distribuição de <i>A. aquasalis</i>	19
Figura 5: Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i>	21
Figura 6: Sementes de <i>Carapa guianensis</i>	26
Figura 7: Reação de semissíntese e estrutura química de 7-epigedunina	27
Figura 8: <i>Croton cajucara</i>	28
Figura 9: Estrutura química de cis-cajucarina B.....	29
Figura 10: <i>Geissospermum argenteum</i>	30
Figura 11: Esquema geral da metodologia desenvolvida.....	38
Figura 12: Manutenção de larvas (A) e adultos (B) de <i>A. aquasalis</i>	32
Figura 13: Sistema de infecção experimental, composto por alimentadores de vidro conectados por mangueiras a um banho-maria. Em destaque, alimentador de vidro e mosquitos se alimentando.....	34
Figura 14: Intestino dissecado (A) e presença de oocistos no intestino de <i>A. aquasalis</i>	34
Figura 15. Ovipostura individual (A) contagem de oocistos (B) e presença de oocistos no intestino de <i>A. aquasalis</i>	36
Figura 16. Gráfico de probabilidade de sobrevivência de <i>A. aquasalis</i> sob ação de 0, 1, 2, 3, 4 e 5% de DMSO.....	40
Figura 17. Gráfico de probabilidade de sobrevivência de <i>A. aquasalis</i> sob ação de 0, 1, 2, 3, 4 e 5% de DMSO.....	40
Figura 18: Gráfico de probabilidade de sobrevivência de <i>A. aquasalis</i> sob ação de 0, 1, 2, 3, 4 e 5% de DMSO.....	41
Figura 19: Curva dose-resposta de ivermectina	42
Figura 20: Mediana de ovos postos por <i>A. aquasalis</i> frente ação de 7-epi-gedunina	45
Figura 21: Mediana de ovos retidos em ovários de <i>A. aquasalis</i> frente ação de 7-epigedunina.....	45
Figura 22: Mediana do número de oocistos de <i>A. aquasalis</i> frente ação de 7-epigedunina.....	46

Figura 23: Mediana de ovos postos por <i>A. aquasalis</i> frente ação de cis-cajucarina B.....	47
Figura 24: Mediana de ovos retidos por <i>A. aquasalis</i> frente ação de cis-cajucarina B.....	47
Figura 25. Mediana do número de oocistos em <i>A. aquasalis</i> frente ação de cis-cajucarina B	48
Figura 26. Número de ovos postos por <i>A. aquasalis</i> frente a ação das concentrações 0%DMSOPV+, 0,01%DMSOPV+, 0,1%DMSOPV+, 1%DMSOPV+ e 1%DMSOPV-	50
Figura 27 Número de ovos retidos em <i>A. aquasalis</i> frente a ação das concentrações 0%DMSOPV+, 0,01%DMSOPV+, 0,1%DMSOPV+, 1%DMSOPV+ e 1%DMSOPV-	51
Figura 28: Número de oocistos presentes no intestino de mosquitos <i>A. aquasalis</i> frente a ação das concentrações de 0%DMSOPV+, 0,01%DMSOPV+, 0,1%DMSOPV+, 1%DMSOPV+ e 1%DMSOPV	52
Figura 29: Número de ovos postos por <i>A. aquasalis</i> frente a ação das concentrações 1%DMSOPV+, 1%DMSO/1ppmPV+ de 7-epi-gedunina, 1%DMSO/10ppmPV+ de 7-epi-gedunina, 0,03998ppm IVM e 0,04ppm IVM (CL ₁₅ e CL ₂₅ de ivermectina, respectivamente)	53
Figura 30: Número de ovos retidos em ovários de <i>A. aquasalis</i> frente a ação das concentrações 1%DMSO/0ppmPV+ de 7-epi-gedunina, 1%DMSO/1ppmPV+ de 7-epi-gedunina, 1%DMSO/10ppmPV+ de 7-epi-gedunina, 0,03998ppm IVM e 0,04ppm IVM (CL ₁₅ e CL ₂₅ de ivermectina, respectivamente).	54
Figura 31: Número de oocistos no intestino de <i>A. aquasalis</i> frente a ação da substância 7-epi-gedunina nas concentrações de 1%DMSO/1ppmPV+ e 1%DMSO/1ppmPV+ quando comparadas as demais concentrações letais de ivermectina testadas	55
Figura 32: Número de ovos postos por <i>A. aquasalis</i> frente as concentrações de 0%DMSOPV-, 1%DMSOPV-, 0%DMSOPV+ e 1%DMSOPV+.....	56
Figura 33: Número de ovos retidos em <i>A. aquasalis</i> frente as concentrações de 0%DMSOPV-, 1%DMSOPV-, 0%DMSOPV+ e 1%DMSOPV+.....	57
Figura 34: Número de oocistos frente a ação de DMSO nas concentrações 0%DMSOPV-, 1%DMSOPV-, 0%DMSOPV+ e 1%DMSOPV+.....	60
Figura 35: Número de ovos postos frente a ação de DMSO nas concentrações 1%DMSOPV+, 1%DMSO/1ppmPV+ de cis-cajucarina B, 1%DMSO/10ppmPV+ de cis-cajucarina B, 0,03998ppmIVMPV+ e 0,04ppmPV+ (Cl ₁₅ e CL ₂₅ , respectivamente).	61

Figura 36: Número de ovos retidos frente a ação de 1%DMSO/0ppm PV+, 1%DMSO/1ppmPV+ de cis-cajuarina B, e 1%DMSO/10ppmPV+ de cis-cajuarina B, 0,03998 IVM e 0,04ppm IVM (CL ₁₅ e CL ₂₅ , respectivamente).....	62
Figura 37: Número de oocistos no intestino de <i>A. aquasalis</i> frente as concentrações de 1%DMSO/0ppmPV+, 1%DMSO/1ppmPV+ de cis-cajuarina B, 1%DMSO/10ppmPV+ de cis-cajuarina B, 0,03998ppm IVM e 0,04ppm IVM (CL ₁₅ e CL ₂₅ de ivermectina), respectivamente.....	63
Figura 38: Número de ovos postos por <i>An. aquasalis</i> , nas concentrações (PV-, 1%H ₂ OPV, PV+ e 1% e1%H ₂ OPV+) do experimento com extrato aquoso da casca de <i>Geissospermum argenteum</i> , nas concentrações	64
Figura 39: Número de ovos retidos em <i>A. aquasalis</i> , nas concentrações (PV-, 1%H ₂ O PV-, PV+ e 1%H ₂ OPV+) do experimento com extrato aquoso da casca de <i>Geissospermum argenteum</i>	65
Figura 40: Número de oocistos presentes no intestino de <i>A. aquasalis</i> nas concentrações controles (PV-, 1%H ₂ O PV-, PV+ e 1% e1%H ₂ O PV+).	67
Figura 41: Número de ovos postos por <i>A. aquasalis</i> , sob ação do extrato da casca de <i>Geissospermum argenteum</i> , nas concentrações 0ppmExtGPV+, 100ppmExtGPV+ e 1000ppmExtGPV+, 0,03998ppm IVM, 0,04ppm IVM (CL ₁₅ e CL ₂₅ de ivermectina, respectivamente)	68
Figura 42: Número de ovos retidos em <i>A. aquasalis</i> , sob ação do extrato da casca de <i>Geissospermum argenteum</i> , nas concentrações 0ppmPV+, 100ppmExtGPV+, 1000ppmExtPV+, 0,03998ppm de IVM PV+ e 0,04ppm de IVM PV+ (CL ₁₅ e CL ₂₅ de ivermectina, respectivamente).	69
Figura 43: Número de ovos postos por <i>A. aquasalis</i> , nas concentrações controles (PV-, 1%H ₂ OPV- PV+ e 1%H ₂ OPV+).	70
Figura 44: Número de ovos retidos em <i>A. aquasalis</i> , nas concentrações PV-, 1%H ₂ OPV-, PV+ e 1%H ₂ OPV+.....	71
Figura 45 Número de oocistos presentes no intestino de <i>A. aquasalis</i> nas concentrações PV, 1%H ₂ O PV-, PV+ e 1% e1%H ₂ O PV+.	72
Figura 46: Número de ovos postos por <i>A. aquasalis</i> , sob ação do extrato do galho de <i>Geissospermum argenteum</i> , nas concentrações (0ppmPV+, 100ppmPV+, 1000ppmPV+, 0,03998ppmPV+, 0,04ppm de IVM PV).....	73
Figura 47: O número de ovos retidos em <i>A. aquasalis</i> , sob ação do extrato do galho de <i>Geissospermum argenteum</i> , nas concentrações 0%PV+, 100ppmPV+, 1000ppmPV+, 0,03998ppm de IVM PV+ e 0,04ppm de IVM PV+ (ivermectina, respectivamente).	74

Figura 48: Número de oocistos com o uso do extrato da casca de <i>Geissospermum argenteum</i> nas concentrações 0ppmPV+, 100ppmPV+, 1000ppmPV+, 0,03998ppm IVM PV+ e 0,04ppm IVM PV+ (CL ₁₅ e CL ₂₅ , respectivamente)	75
Figura 49: Número de oocistos no intestino de <i>A. aquasalis</i> sob ação de 0ppm Ext2GPV+, 100ppmExt2GPV+, 1000ppmExt2GPV+, 003998ppm IVM e 0,04ppm IVM (CL ₁₅ e CL ₂₅ de ivermectina respectivamente)	76
Figura 50: Sobrevivência de <i>A. aquasalis</i> frente ao sangue infectado e com parasito inativado.....	77
Figura 51: Sobrevivência de <i>A. aquasalis</i> frente ao sangue infectado e com parasito inativado.....	77
Figura 52: Sobrevivência de <i>A. aquasalis</i> frente a 1ppm e 10ppm de 7-epigedunina em sangue infectado.....	78
Figura 53: Sobrevivência de <i>A. aquasalis</i> frente a 1ppm e 10ppm de 7-epigedunina em sangue infectado.....	78
Figura 54: Sobrevivência de <i>A. aquasalis</i> frente a 0,03998ppm e 0,04ppm de ivermectina em sangue infectado.....	79
Figura 55: Sobrevivência de <i>A. aquasalis</i> frente a 0,03998ppm e 0,04ppm de ivermectina em sangue infectado.....	79
Figura 56: Sobrevivência de <i>A. aquasalis</i> frente a ação de 1ppm e 10ppm de cis-cajucarina B em sangue parasitado.....	80
Figura 57: Sobrevivência de <i>A. aquasalis</i> frente a ação de 100ppm e 1000ppm de extrato aquoso de <i>G. argenteum</i> em sangue parasitado.	80
Figura 58: Sobrevivência de <i>A. aquasalis</i> frente a ação de 100ppm e 1000ppm de extrato aquoso de <i>G. argenteum</i> em sangue parasitado.	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Somatória de mortalidade diária de *A. aquasalis*, em quatro dias, nas três replicatas em função da concentração de DMSO no sangue ingerido..... 41

Tabela 2. Avaliação de *A. aquasalis* frente a ação de ivermectina nas concentrações 0ng/mL a 200 ng/mL. Replicata 1. 43

Tabela 3. Avaliação de *A. aquasalis* frente a ação de ivermectina nas concentrações 0 ng/mL a 200 ng/mL. Replicata 2 43

Tabela 4. Avaliação de *A. aquasalis* frente a ação de ivermectina nas concentrações 0 ng/mL a 200 ng/mL. Replicata 3. 44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Malária.....	17
1.2 Os vetores	18
1.3 <i>Plasmodium</i>	20
1.4 Ciclo de transmissão do <i>Plasmodium</i> sp.	20
1.5 Resistência de <i>Plasmodium</i> spp	22
1.6 Bloqueio de transmissão	23
1.7 Antimaláricos naturais de plantas	24
1.7.1 <i>Carapa guianensis</i> (Andiroba)	26
1.7.2 <i>Croton cajucara</i> (Sacaca)	27
1.7.3 <i>Geissospermum argenteum</i> (Acariquara branca).....	29
2. OBJETIVOS.....	31
2.1 Geral	31
2.2 Específicos.....	31
3. Metodologia.....	32
3.1 Coleta dos mosquitos e aspectos éticos	32
3.2 Colonização de mosquitos <i>Anopheles aquasalis</i>	32
3.3 Obtenção dos extratos e substâncias	33
3.4 Infecção experimental dos mosquitos por meio de membrana	34
3.5 Confirmação da infecção por <i>Plasmodium vivax</i> em <i>A. aquasalis</i>	34
3.6 Tolerância de <i>Anopheles aquasalis</i> ao DMSO	35
3.7 Avaliação da Ivermectina como bloqueador de transmissão (Controle).....	35
3.8 Avaliação das substâncias 7 - Epigedunina e Cis – cajucarina - B.....	35
3.9 Avaliação de extratos de casca e galho de <i>Geissospermum argenteum</i>	36
3.10 Efeito das substâncias e extratos na fecundidade de <i>A. aquasalis</i> infectados por <i>P. vivax</i>	36
3.11 Efeito das substâncias e extratos na longevidade de <i>A. aquasalis</i> infectados por <i>P. vivax</i>	36
3.12 Análise estatística	37
4 Resultados e Discussão.	39
4.1 Avaliação de DMSO em <i>A. aquasalis</i>	39

4.2 Avaliação de Ivermectina em <i>A. aquasalis</i>	41
4.3 Avaliação de 7-epigedunina em <i>A. aquasalis</i>	44
4.4 Avaliação de cis-cajucarina B em <i>A. aquasalis</i>	46
4.5 Ação de DMSO, substâncias e extratos em <i>A. aquasalis</i>	48
4.6 Sobrevivência de <i>A. aquasalis</i> com sangue infectado com <i>P. vivax</i> e inativado	76
4.7 Sobrevivência de <i>A. aquasalis</i> frente a 1ppm e 10ppm de 7-epigedunina em sangue infectado com <i>P. vivax</i>	77
4.8 Sobrevivência de <i>A. aquasalis</i> frente a 0,03998ppm e 0,04ppm de Ivermectina em sangue infectado com <i>P. vivax</i>	78
4.9 Sobrevivência de <i>A. aquasalis</i> frente a ação de 1ppm e 10ppm de cis-cajucarina B em sangue infectado com <i>P. vivax</i>	79
4.10 Sobrevivência de <i>A. aquasalis</i> frente a ação de 100ppm e 1000ppm de extrato aquoso da casca de <i>G. argenteum</i> em sangue infectado com <i>P. vivax</i>	79
4.11 Sobrevivência de <i>A. aquasalis</i> frente a ação de 100ppm e 1000ppm de extrato aquoso do galho de <i>G. argenteum</i> em sangue infectado com <i>P. vivax</i>	80
Conclusão	81
Referências	832

1. INTRODUÇÃO

1.1 A malária

A malária é um grande problema de saúde pública em países tropicais e subtropicais (Figura 1). As manifestações clínicas são febre, sudorese, calafrios e cefaleia, e, em casos mais graves, hepato-esplenomegalia, convulsões, inclusive podendo levar a óbito.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2018 estima-se que houve 228 milhões de casos da doença quando comparados aos dados de 2010 e 2017 em que foram registrados 251 e 231 milhões de casos, respectivamente. Ainda assim, O número de mortes registradas foi de 405 mil em 2018 comparados ao número estimado de 416 mil ocorridos em 2017. Crianças menores de 5 anos foram as mais afetadas com 67% dos casos de morte (WHO 2019).

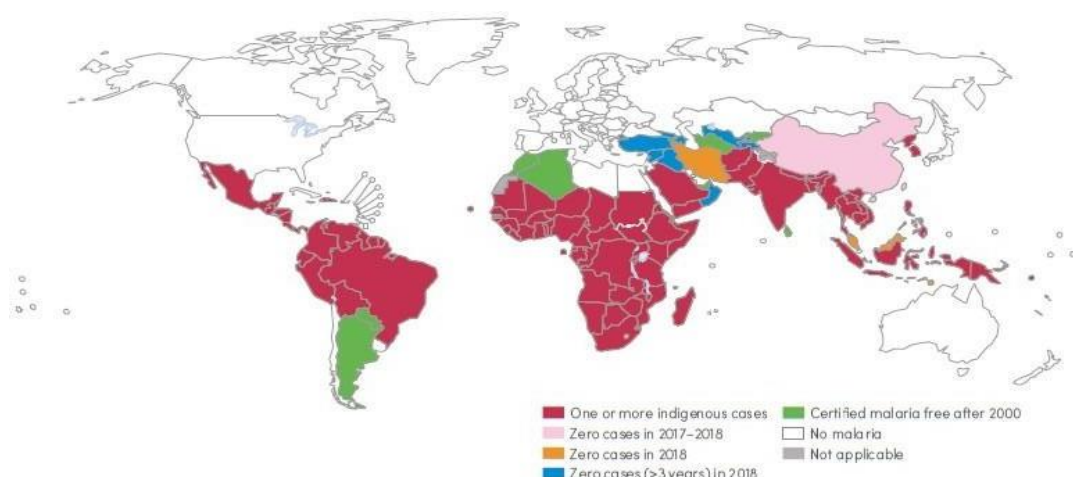


Figura 1. Mapa do mundo mostrando os países que apresentaram casos de malária autóctones em 2018. Os países que não tiveram casos autóctones durante 3 anos consecutivos são considerados livres de malária (Fonte: WHO 2019).

No Brasil, em 2018 foram registrados 195.925 casos clínicos, 99.62% (195.193) dos quais ocorreram na Região Amazônica, onde, os Estados do Amazonas (36%), Pará (25%), Acre (17%) e Roraima (13%) contribuíram com 91% do total de casos registrados para a região (SIVEP-Malária, 2019) (Figura 2). Na Região Extra-Amazônica foi registrado um aumento no número de casos de malária desde 2012, com 732 registros em 2018 e 207 até junho de 2019. Os Estados com maior número de casos registrados tem sido São Paulo

(25,12%), Rio de Janeiro (9,66%), Minas Gerais (9,17%), Paraná (8,66%), Paraíba (7,24%) (SIVEP-Malária, 2019). Estudos recentes tem mostrado que a transmissão de malária na região de Mata Atlântica tem um componente zoonótico, constituído pela espécie *Plasmodium simium* que circula entre humanos e macacos (BRASIL et al., 2017).

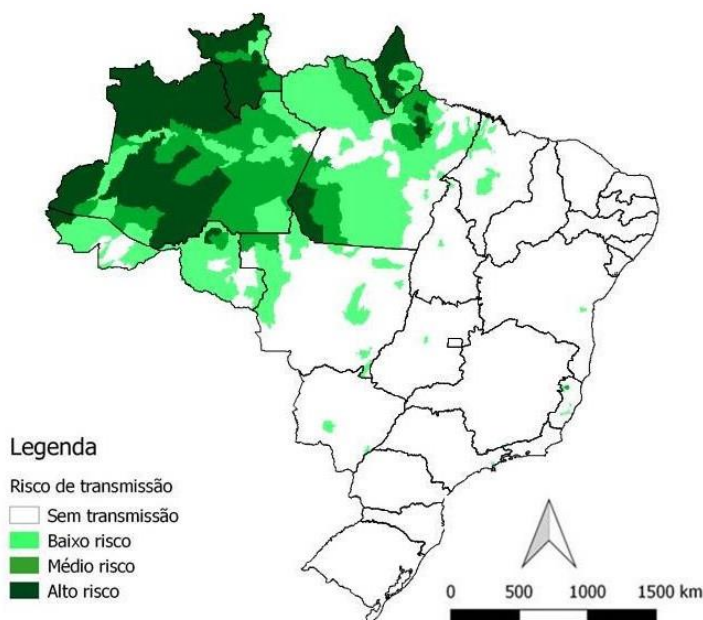


Figura 2: Mapa do Brasil, mostrando áreas de risco para malária, por município de infecção, Brasil, 2018 (Fonte: Sivep-Malária e Sinan/SVS/MS).

1.2 Os vetores

Os mosquitos são insetos pertencentes à ordem Diptera, família Culicidae e gênero *Anopheles* (REY, 2013). São conhecidos popularmente como pernilongos, muriçocas, mosquitos-prego. O ciclo de vida é holometábolo, ou seja, passam pelos estádios de ovo, larva pupa e adulto, sendo a fase adulta terrestre e as outras aquáticas. (Figura 3) (FORATTINI, 2002; BRAGA & FONTES, 2000).

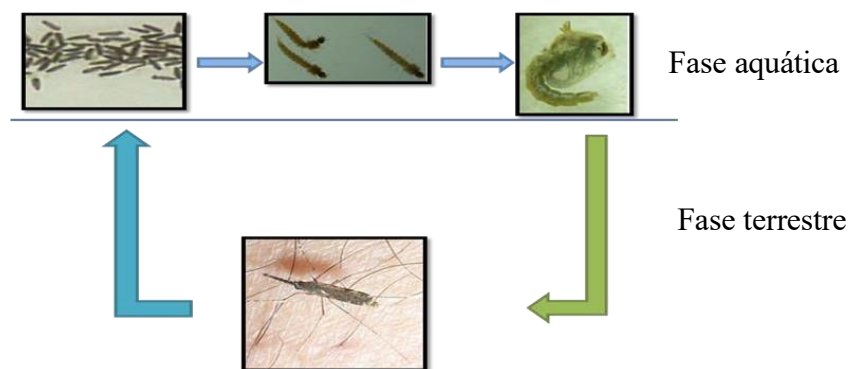


Figura 3: Ciclo de vida de *Anopheles aquasalis*. Adaptado de Rios-Velásquez, (2014)

Das 475 espécies descritas do gênero *Anopheles*, 70 são consideradas vetores de malária (HARBACH, 2019). Segundo Rebêlo et al. (2007) aproximadamente 55 espécies são de ocorrência no Brasil e destas as principais espécies incriminadas como transmissoras fazem parte do subgênero *Nyssorhynchus*: *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root 1926, *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis* Curry 1932 e *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* Lynch-Arribalzaga, 1878 (GALARDO, 2010)

No Brasil, *A. darlingi* é considerada a principal espécie transmissora de *Plasmodium* ao homem, entretanto tem sido pouco utilizada em estudos de interação patógeno - hospedeiro devido à dificuldade de se obter colônias estáveis e por ser uma espécie eurigâmica (RÍOS-VELÁSQUEZ et al., 2013; VILLARREAL-TREVIÑO et al., 2015; MORENO et al., 2018). *Anopheles aquasalis* é uma espécie facilmente colonizada em condições de laboratório, por isso vem sendo utilizada como modelo para estudar suas interações com o *Plasmodium*. Essa espécie está distribuída na faixa litorânea das Américas Central e do Sul (Figura 4), e é considerada principal vetora na Venezuela, Trinidad e Tobago, Guiana Francesa, Guiana e em áreas litorâneas do norte e nordeste do Brasil (DEANE et al., 1948; ZIMMERMAN, 1992; RUBIO-PALIS et al., 1992; CHADEE et al., 1999). Na Região Amazônica, tem sido encontrada naturalmente infectada com *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* (GALVÃO et al., 1942; DEANE et al., 1948; PÓVOA et al., 2003; SILVA et al., 2006a).



Figura 4: Distribuição de *A. aquasalis* na América Central e do Sul.

1.3 *Plasmodium* spp.: Agentes causadores da malária

O agente patogênico causador da enfermidade é um protozoário pertencente à ordem Haemosporida, família Plasmodiidae, gênero *Plasmodium*. Seis espécies de *Plasmodium* são responsáveis por causar a doença em humanos, dentre elas *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae* circulam no Brasil (COX-SINGH et al., 2010; MS 2019).

Plasmodium malariae causa malária branda e é pouco frequente no Brasil, sendo responsável por menos de 1% dos casos registrados. *Plasmodium falciparum* é mais predominante na África e é responsável pelo maior número de mortes por malária, no Brasil causa aproximadamente 11% dos casos registrados (WHO 2018; SIVEP Malária 2019).

Plasmodium vivax é uma espécie amplamente distribuída no mundo, é a mais prevalente no Brasil, causando aproximadamente 87% dos casos registrados. Essa espécie de *Plasmodium* causa uma malária benigna, porém quadros clínicos graves, geralmente associados a outras comorbidades, tem sido registrados nos últimos anos (ALEXANDRE et al. 2010, LACERDA et al. 2012, SIQUEIRA et al. 2012). O controle da malária causada por essa espécie de *Plasmodium* é dificultada pela formação de gametócitos em uma fase precoce da infecção em humanos; formação de hipnozoítos, que são formas hepáticas latentes responsáveis por recaídas da doença; pela ausência de cultura *in vitro*, que dificulta estudos sobre interação patógeno – hospedeiro; pela aparição de pacientes assintomáticos, que mantém a transmissão por não ser diagnosticados nem tratados (CARLOS et al., 2019).

Adicionalmente, os casos de malária humana atribuídos a *P. vivax*-like foram identificados, por técnicas moleculares, como sendo *Plasmodium simium*, espécie que tem como principais hospedeiros naturais macacos em regiões de Mata Atlântica (BRASIL et al., 2017).

1.4 Ciclo de transmissão do *Plasmodium* spp.

A transmissão começa quando esporozoítos são inoculados pelo mosquito (Figura 5), durante o repasto, na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. Esses esporozoítos migram para o fígado, invadem os hepatócitos, se transformam em esquizontes, depois em trofozoítos, e finalmente, em merozoítos, os quais são liberados na corrente sanguínea onde invadem os eritrócitos. Dentro dos eritrócitos, se transformam em esquizontes, trofozoítos, e depois em merozoítos, que são liberados na corrente sanguínea e onde recomeçam a

invasão de outras células vermelhas. Alguns dos merozoítos se transformam em gametócitos, formas infectantes para o mosquito (BAKER, 2010; WHITE et al., 2014; COWMAN et al., 2016).

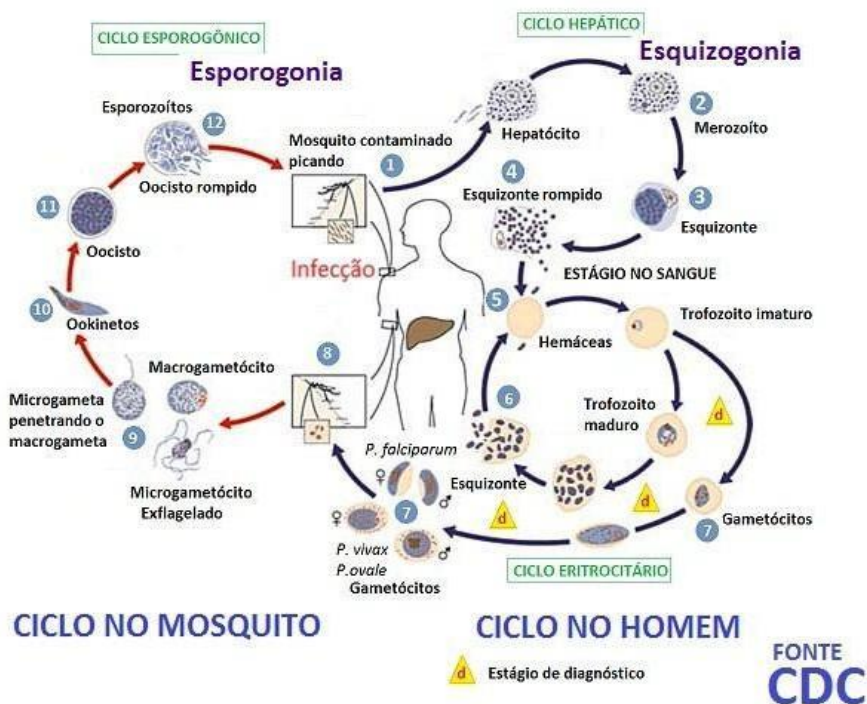


Figura 5: Ciclo de vida do *Plasmodium* no homem e no mosquito. Fonte Center for Disease Control and Prevention

Durante o repasto sanguíneo o mosquito ingere os gametócitos, os quais se transformam em microgametas, masculinos, e macrogametas, femininos. Um microgameta fecunda o macrogameta e forma o zigoto, que se transforma em oocineto, forma móvel que atravessa as células do epitélio intestinal. O oocineto, ao entrar em contato com a lâmina basal do epitélio intestinal, se transforma em oocisto, dentro do qual ocorrem replicações mitóticas, e, por um processo de esporogonia, são formados os esporozoítos. Após 1 ou 2 semanas de desenvolvimento, o oocisto se rompe e os esporozoítos são liberados no hemocele, de onde migram e invadem as glândulas salivares. No próximo repasto sanguíneo os esporozoítos das glândulas salivares são injetados junto com a saliva no hospedeiro vertebrado (BATON & RANFORD-CARTWRIGHT, 2005).

1.5 Resistência de *Plasmodium* spp.

A cloroquina vem sendo o tratamento contra malária aguda por *P. vivax* durante mais de 50 anos, porém já está associada a esse parasito resistência desde 1989 em Papua Nova-Guiné (SCHUURKAMP et al., 1992). Na América do Sul, Phillips et al. (1996) relataram pela primeira vez, na Guiana, a resistência desse parasito e, no Brasil Alecrim et al. (1999) também relataram resistência à cloroquina e à mefloquina, especificamente, na região amazônica. Na Bolívia, Añez et al. (2015) encontram 6,5% de resistência a cloroquina desenvolvida pelo *P. vivax*.

Neste contexto, a resistência do *P. vivax* à Cloroquina associada à ocorrência de quadros clínicos graves requer de mais estudos para entender a interação do parasito com seus hospedeiros. Somado a essa situação, existem outras duas importantes particularidades que torna mais difícil a eliminação desse parasito: a formação de hipnozoítos bem como gametócitos precoces (MUELLER et al., 2009; FEACHEM et al., 2010).

Das espécies de *Plasmodium* a que desenvolve resistência com maior frequência é *P. falciparum*. Esse é um problema que vem sendo estudado intensamente, a resistência ocorreu de forma lenta, hoje é comum nos lugares onde há grande pressão das drogas antimaláricas. Por meio de vários mecanismos a resistência pode se desenvolver, por exemplo, alterações na permeabilidade ou transporte e inativação da droga ou mudanças em alvos moleculares que geram diminuição da afinidade de ligação do inibidor. Essas alterações são originadas por meio de mutações em genes ligados às moléculas-alvo dos medicamentos antimaláricos (WINSTANLEY, 2001).

Segundo Pleter et al. (2010) a resistência de *P. falciparum* a cloroquina tem sido reportada há anos e está relacionada ao polimorfismo em dois genes do parasita, o *pfcr1* (localizado no cromossomo 7 e que codifica uma proteína transportadora de membrana vacuolar) e o *pfmdr1* (localizado no cromossomo 5 e associado a um transportador ligado à resistência a múltiplas drogas), relacionado com a resistência também a outros antimaláricos, como por exemplo, a mefloquina, quinina e halofantrina. Em *P. vivax*, os Loci *MS8* e *MSP1-B10* são associados a resistência a cloroquina na Amazônia brasileira (LIZCANO et al., 2014). Dessa forma, há necessidade de buscar novas alternativas de controle da malária, principalmente considerando a resistência do *P. falciparum* (PLETER et al., 2010) e do *P. vivax* (AÑES et al., 2015) aos medicamentos utilizados.

1.6 Bloqueio de transmissão

Nos últimos anos tem aumentado o interesse no desenvolvimento de estratégias para o bloqueio da transmissão de malária (transmission blocking strategies-TBS), as quais utilizam como alvos potenciais estágios de desenvolvimento do vetor ou do parasito para controlar a doença. Dessa forma, as TBS buscam prevenir a infecção dos mosquitos vetores pelos parasitos. Atualmente, as principais TBS se baseiam na busca por drogas gametocidas, vacinas de bloqueio de transmissão e “construção” de mosquitos refratários à infecção pelo *Plasmodium* (LAVAZEC & BOURGOUIN, 2008; GONÇALVES & HUNZIKER, 2016).

A primeira TBS explorada foi o uso de drogas antimaláricas, tais como a terapia combinada à base de artemisinina (T.C.A.) (artemisinina-piperaquina) com baixas doses de PQ (primaquina). O princípio dessa estratégia é eliminar os gametócitos no hospedeiro humano, ficando os pacientes “não – infectivos” para o mosquito. O problema desse esquema de tratamento é que não pode ser aplicado em mulheres grávidas, nem em crianças menores de 5 anos, e se deve ter os devidos cuidados com pacientes deficientes em glicose-6-Fosfato desidrogenase (G6PD) pelo risco de causar hemólise. No entanto, não se sabe ao certo se a diminuição da parasitemia é consequência direta da eliminação de gametócitos (efeito da PQ) ou a eliminação dos merozoítos que se transformarão em gametócitos (efeito da ACT) (SONG et al., 2010).

Os estudos atualmente estão focados na fase de gametócitos tardios, que também incluem a fase dos parasitos no mosquito. A maior preocupação com esse alvo é a janela entre o tempo da infecção, para essa fase do parasito, e o tempo de duração da ação da droga testada. A eliminação do gametócito tardio poderia deixar vivos os gametócitos imaturos que posteriormente amadurecerão e infectarão os mosquitos (GONÇALVES & HUNZIKER, 2016).

Segundo Bousema & Drakeley, (2011) a gametogênese passa por cinco fases, no sangue periférico e os gametócitos de *P. vivax* duram em torno de 3 dias. Porém, a efetividade da transmissão depende da proporção dos gametócitos maduros e da proporção dos gametas masculinos e femininos (DA et al., 2015).

Um ponto importante para avaliar a atividade gametocida de uma substância é a comprovação da sua capacidade para reduzir ou bloquear a transmissão do *Plasmodium* do humano para o mosquito. Esse tipo de ensaio requer a realização de infecções experimentais

de mosquitos, usando membranas artificiais, com gametócitos de *Plasmodium* (BIRKHOLTZ et al., 2016).

Além do exposto anteriormente, para os próximos anos o desenvolvimento de vacinas visa a alcançar a redução da transmissão por meio do ataque imunológico aos estágios sexuais do parasito ou no ciclo de vida do mosquito. Dessa forma, proteínas de superfície dos gametócitos, gametas, zigoto, oocineto são alvos nessa estratégia de controle (CARTER, 2001; TOMAS et al., 2001; BOUSEMA & DRAKELEY, 2011).

Ainda como tentativa de bloqueio de transmissão, vem sendo desenvolvidos estudos com uso de mosquitos, pois esses desenvolvem mecanismos naturais e conseguem combater o *Plasmodium*, mas uma pequena parte deles conseguem ser refratários à infecção (FERREIRA et al., 2004; CIRIMOTICH et al., 2010). Basicamente, existem três categorias desses estudos: substituição da população, acionamento de mecanismos de genes artificiais e organismos geneticamente modificados (LUÍSA & HENDRICKX, 2013).

Por último, organismos tais como: bactérias e fungos (DURVASULA et al., 1997; WANG et al., 2012) e vírus (REN et al., 2008) vem sendo propostos como aliados no bloqueio da transmissão da malária.

A carência de cultura contínua *in vitro* de *P. vivax* tem inviabilizado vários desses estudos, mas pesquisas podem ser feitas com base em infecções experimentais (PANICHAKUL et al., 2007).

Neste sentido, muitos esforços vem sendo desempenhado na busca de novas estratégias por parte de pesquisadores no que diz respeito ao bloqueio da transmissão da malária por meio de vacinas (GONÇALVES & HUNZIKER, 2016; MIURA et al., 2016), drogas (GONÇALVES & HUNZIKER, 2016; BHAGAVATHULA et al., 2016) e microrganismos (FANG et al., 2011; BOISSIÈRE et al., 2012) como tentativa de interromper o ciclo de vida do parasito no vetor.

Diante disso, é que neste trabalho foi feita avaliação do efeito de extratos e substâncias de plantas amazônicas no bloqueio da transmissão de *P. vivax*, usando o modelo *A. aquasalis* - *P. vivax* e sistemas de infecção experimental através de membrana artificial.

1.7 Antimaláricos naturais de plantas

Dentro desse contexto, espécimes vegetais marcam o histórico de busca de antimaláricos, um dos primeiros compostos utilizados foi a quinina isolada a partir da *Cinchona* (GREENWOOD et al., 2008; BARREIRO & BOLZANI, 2009). No século XX,

foi bastante utilizada até o surgimento de outras drogas como, por exemplo, a artemisinina e seus derivados (LA-SCALEA et al., 2007). A quinina se manteve como principal tratamento antimalárico até a década de 1920, quando então outros antimaláricos mais eficazes passaram a ser usados, como por exemplo a cloroquina (ACHAN et al., 2011).

Segundo Manzali (2011) a eficácia no tratamento da malária com uso de cloroquina durou até surgirem os relatos de recidiva de *P. falciparum* na década de 1960 devido ao uso exacerbado em algumas localidades. Embora seja preocupante a situação quanto ao uso dos antimaláricos em questão, o quinino ainda é usado nos dias de hoje em casos de malária não complicada, porém o tratamento durante sete dias, sendo administrado três vezes ao dia leva a resultados abaixo do esperado e poderá possibilitar o desenvolvimento de resistência a esse medicamento (ACHAN et al., 2011).

A artemisinina foi descoberta na China e extraída de plantas da espécie *Artemisia annua*, bastante usada para o tratamento de febres por curandeiros rurais na China (UDAYKUMAR, 2014). Os derivados de artemisinina (artesunato, artemeter e dihidroartemisinina) conseguem de forma rápida reduzir o número de parasitos (WHO, 2006). Devido a curta meia vida da artemisinina, esta por sua vez passou a ser combinada com outros fármacos (amodiaquina, lumefantrina, mefloquina ou sulfadoxina-piremetamina) de longa meia vida para que a ação tornasse mais eficaz e assim removidos os parasitos restantes, a essa combinação foi dado o nome de terapêutica de combinação com artemisinina (TCA) (WHO, 2008).

Atualmente, a artemisinina ainda é considerada o fármaco de primeira linha terapêutica, principalmente na combinação das formulações de ACTs, mas estudos já demonstraram resistência dos parasitos a mefloquina (PHYO et al., 2012).

Os antimaláricos tem por base produtos naturais de plantas e de acordo com suas características químicas podem ser agrupados da seguinte forma: quinolinometanois naturais (quinina), 4-aminoquinolinas (cloroquina) e (amodiaquina), 8-aminoquinolinas (primaquina), quinolinometanois sintéticos: (mefloquina), fenantrenometanois: (halofantrina), lactonas sesquiterpênicas: (derivados da artemisinina – artemeter, arteeter, artesunato, ácido artelínico, diidroartemisina), naftacenos: (tetraciclinas) doxiciclina, liconsaminas: clindaminica (PIMENTEL et al., 2007).

Neste sentido, pesquisas vem sendo desenvolvidas no Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (LAPAAM) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) a partir da flora amazônica com objetivo de descobrir novas plantas que possam contribuir

com a descoberta de novos princípios ativos contra a transmissão de malária. Sendo avaliadas neste estudo as espécies: *Carapa guianensis*, *Croton cajucara* e *Geissospermum argenteum*.

1.7.1 *Carapa guianensis* (Andiroba)

A *Carapa guianensis*, conhecida popularmente por andiroba (Figura 6) é nativa da região amazônica, pertencente à família das meliáceas a madeira e o óleo são os produtos mais importantes desse vegetal (PINTO et al., 2013). Distribuída pela América do Sul, pode ser encontrada também no Oeste da Índia, Sul da África, são árvores de grande porte de até 30 m de altura e 1,20 m de largura. A copa é de tamanho médio, casca de coloração avermelhada e de sabor amargo (MENDONÇA & FERRAZ, 2007; SCOTTI-SAINTAGNE et al., 2013).



Figura 6: Sementes de *Carapa guianensis* Fonte: <http://diasdacruz.com.br/glossario-fitoterapicos>

Pereira et al. (2014) estudando resíduos de *Carapa guianensis*, (andiroba) (Figura-6), reportou que um dos limonoides da referida árvore denominado 6 α -acetoxigedunina apresentou significativa atividade em testes antimaláricos *in vivo*, inicialmente, usada neste estudo. Do seu trabalho de tese de doutorado Pereira et al. (2018) fez a semissíntese de 7-epigedunina (Figura7) e cedeu para este projeto, pois acredita-se que por ser limonoide deva ter alguma atividade antimalárica. Os limonoides que apresentam estrutura gedunínica apresentam atividade antimalárica, por exemplo a gedunina é a que apresentou maior efeito antimalárico contra cepas de *P. falciparum* (MACHINNON et al., 1997; BICKII et al., 2000).

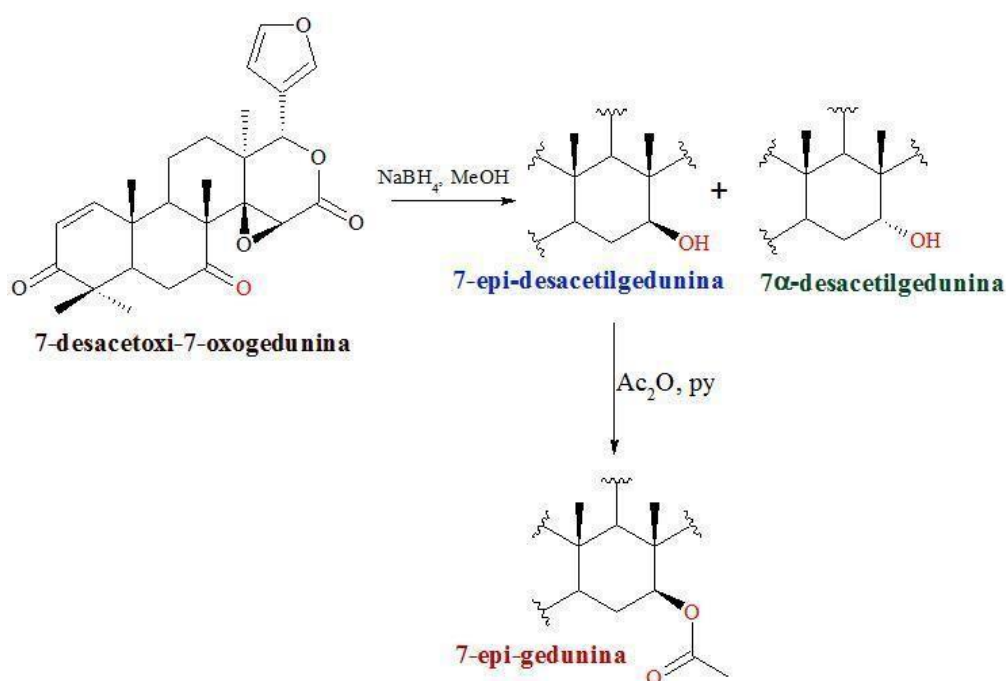


Figura 7. Reação de semissíntese e estrutura química de 7-epi-gedunina. Fonte: (PEREIRA, 2014)

Segundo Amaral & Fierro (2013) a referida planta apresenta propriedades medicinais contra inflamações. Além dessas propriedades, a produção de sabonetes medicinais e os resíduos da extração do óleo são utilizados na fabricação de repelentes de insetos, como por exemplo, *Aedes aegypti* e mosquitos do gênero *Anopheles*.

Basicamente, seus efeitos fitoterápicos são decorrentes das propriedades fitoquímicas presentes, o óleo apresenta princípios ativos como glicerídeos, ácidos graxos e tetranortriterpenoides (TNTPS) (MECCIA et al., 2013; MOYA et al., 2015) e o sabor amargo relacionado a presença de limonoides (HENRIQUES & PENIDO, 2014; WANZELER et al., 2018). O óleo de *C. guianensis* foi eficaz *in vitro* contra *P. falciparum* e *in vivo* contra *Plasmodium berghei* em ratos. Neste contexto, Miranda Junior et al. (2012) observaram que contra *P. falciparum* o óleo foi eficiente.

1.7.2 *Croton cajucara* (Sacaca)

Croton cajucara Benth é uma Euphorbiaceae e o gênero *Croton* encontra-se como segundo representante em maior número dentro dessa família (BERRY et al., 2005). Conhecida popularmente como ‘sacaca’, *Croton cajucara* (Figura 8) é uma espécie muito conhecida na região norte do Brasil e atribuídos a ela efeitos fitoterápicos (CHAVES et al.,

2006; COSTA et al., 2007). Inclusive, a infusão das folhas e da casca do caule tem sido usada contra malária (ODONNE et al., 2013) e sintomas de enfermidades: diabetes, colesterol ruim, diarreia, inflamação da vesícula (DI STASI et al., 1994; BIGHETTI et al., 1999; SILVA et al., 2005b).



Figura 8: *Croton cajucara*. Fonte: <https://www.researchgate.net/publication/283648442>

Campbell et al. (1972) com base em estudos fitoquímicos avaliaram os componentes químicos do óleo das folhas e casca do caule de *C. cajucara* e encontraram principalmente linalol $C_{10}H_{18}O$ em torno de 66% extraído das folhas e da casca do caule o diterpeno $C_{19}H_{22}O_4$, chamado de transdesidrocrotonina.

A partir desse ponto, outros estudos com extratos da casca do caule permitiram isolar outros diterpenos (ITOKAWA et al., 1989; ITOKAWA et al., 1990; ICHIHARA et al., 1992; KUBO & ASAKA, 1991; MACIEL et al., 2000) e após isso, por meio de outros trabalhos novos isolados desse grupo foram obtidos entre eles cis-cajucarina-B, (ITOKAWA et al., 1990; ICHIHARA et al., 1992; MACIEL et al., 1998).

Extratos das folhas e da casca do caule a partir dos métodos de hexano e metanol permitiram isolar mais dois diterpenos, *Trans*-cajucarina e sacarina (MACIEL et al., 1998). Souza (2016) trabalhou com extratos de *C. cajucara* e cedeu para esse estudo a substâncias cis-cajucarina-B (Figura 9), pois segundo o autor essa substância apresentou atividade moderada inibindo mais de 50% *in vitro* contra cepa K1 de *P. falciparum* e a CL₅₀ foi 23.0 µg/mL.

Geralmente a sacaca é considerada na literatura como antimalárica, pois segundo Lima et al. (2015) o extrato clorofórmico da folha, da variedade com morfotipo vermelha apresentou um bom resultado com CL₅₀ = $6,4 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$ *in vitro*. Embora, tenha apresentado baixa atividade *in vivo*.

Por ser considerada planta medicinal, com atividade antimalárica e a substância cis-cajucarina B isolada dessa planta ter apresentado atividade é que se resolveu testá-la no modelo experimental *A. aquasalis* x *P. vivax*.

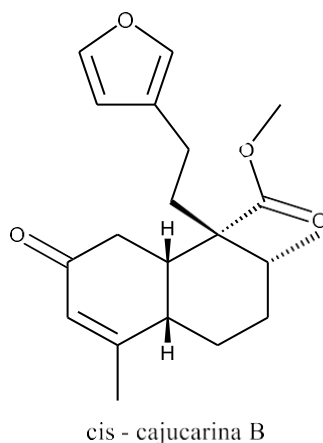


Figura 9. Estrutura química de cis-cajucarina B. Fonte: (SOUZA, 2016)

1.7.3 *Geissospermum argenteum* (Acariquara branca)

Vários autores sugerem que *Geissospermum spp.* sejam espécies de plantas com possíveis princípios ativos de atividade antimalárica na Guiana Francesa, Colômbia, Bolívia e também na Amazônia (BRANDÃO et al., 1992; MILLIKEN, 1997; MUÑOZ et al., 2000; STEELE et al., 2002; BERTANI et al., 2005; VIGNERON et al., 2005).

Geissospermum argenteum Woodson é conhecida no Brasil por quinarana da fruta pequena (CORREIA et al., 2008). Na Amazônia como acariquara branca, (Figura 10) é uma Apocynaceae, são árvores de dossel de grande porte (RIBEIRO et al., 1999). Destaca-se pelo seu valor fitoterápico, a casca pode ser usada como veneno para caça (curare) ou para tratamento de doenças (DeFILIPPS et al., 2004). Sua casca é de sabor amargo que quando macerada em álcool é usada como tratamento da malária pela população local da Guiana Francesa (GRENAND et al., 1987).

Além da espécie citada anteriormente, outras também são conhecidas por terem a mesma função contra malária, por exemplo, *Geissospermum sericeum* e *Geissospermum leave* (BRANDÃO et al., 1992; MILLIKEN, 1997). *Geissospermum leave* já demonstrou ação *in vitro* contra *P. falciparum* resistentes a cloroquina (MUÑOZ et al., 2000).



Figura 10. *Geissospermum argenteum*. Fonte: <https://inaturalist.ca/photos/11819963>

Camargo (2011) avaliou extratos de *G. argenteum* para a cepa K1 de *P. falciparum* e observou (*in vitro*) que a atividade antiplasmódica do extrato aquoso da casca apresentou percentual de inibição na concentração de 50 μ L/mL. Embora, o extrato metanólico da casca tenha sido mais ativo com CL₅₀ 4,6 μ L/mL. Diante disso, a autora cedeu para esse estudo extrato da casca e galho para ser testado em *P. vivax* no inseto vetor *A. aquasalis*.

Levando-se em consideração as evidências de ação antiplasmódica citadas acima de várias espécies de plantas do gênero *Geissospermum* e também da necessidade de se buscar alternativas para controle de malária, que possam ser usadas juntas com as ferramentas atuais para conseguir diminuir ou zerar o número de casos da doença é que nesse estudo foram utilizadas partes de *G. argenteum* no modelo *in vivo* com mosquitos da espécie *A. aquasalis* e *Plasmodium vivax* de pacientes positivos para malária

2. OBJETIVOS

2.1 Geral: Testar o efeito de extratos e substâncias provenientes de plantas amazônicas, sobre o desenvolvimento de *P. vivax* em *A. aquasalis* e sobre o fitness do mosquito.

2.2 Específicos:

- Avaliar o efeito antiplasmodial do extrato da casca e galho de *G. argenteum* e das substâncias cis-cajucarina-B de *C. cajucara*, 7-epigedunina de *C. guianensis* cuja atividade já fora observada na fase sanguínea previamente;
- Analisar a ação do extrato da casca e galho de *G. argenteum* e das substâncias cis-cajucarina-B e 7-epigedunina sobre o fitness do mosquito *Anopheles aquasalis*;
- Estudar a ação do extrato da casca e galho de *G. argenteum* e das substâncias cis-cajucarina-B, 7-epigedunina sobre a quantidade de oocistos formados no modelo laboratorial de infectividade *Anopheles aquasalis* por *Plasmodium vivax*.

3. METODOLOGIA (Figura 11)

3.1 Coleta de sangue e aspectos éticos

Para os experimentos foi utilizado sangue de pacientes infectados com *P. vivax*, diagnosticados pelo método de gota espessa na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado. No estudo foram incluídos pacientes maiores de 18 anos, que apresentavam uma parasitemia de duas cruzes e no mínimo 4 gametócitos.

Após o diagnóstico os pacientes recebiam explicação sobre os objetivos e metodologias do projeto, e os que aceitavam participar como voluntários assinavam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

De cada paciente foram retirados 10 mL de sangue em tubo vacutainer heparinizado.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (CAAE 39706514.2.0000.0005).

3.2 Colonização de mosquitos

Para os experimentos foram utilizadas fêmeas de *A. aquasalis* provenientes do insetário do Laboratório em Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia (LEDTA) (Figura 12), colonizadas em condições de laboratório, seguindo o protocolo modificado de Silva et al. (2006b). Essa cepa de *A. aquasalis* é originária da fazenda Paracambi, no Rio de Janeiro, Brasil, colonizada desde 1993 no laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro.

No LEDTA os mosquitos adultos foram mantidos a 27°C e 70-80% de umidade relativa e alimentados com solução açucarada 10% *ad libitum*.



Figura 12. Manutenção de larvas (A) e adultos (B) de *A. aquasalis*. Fonte: Autor

3.3 Obtenção dos extratos e substâncias

Sugiro organizar melhor as informações, coloque uma frase inicial dizendo que para este trabalho foram utilizadas substâncias e extratos de plantas amazônicas conforme descrito abaixo:

Planta A:

Planta B.....etc

Para a realização deste trabalho foram utilizadas substâncias e extratos obtidos no Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia - LAPAAM, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. As substâncias usadas foram: cis-cajucarina B, obtida conforme descrito na metodologia de Souza (2016) de folhas e cascas da espécie *C. cajucara*, conhecida vulgarmente como sacaca; 7-epi-gedunina, obtida de acordo com a metodologia descrita em Pereira (2014; 2018), a partir de reações de semissíntese de limonoides extraídos de sementes, torta residual ou óleo da planta *C. guianensis*, conhecida como andiroba. Foram utilizados extratos aquosos da casca e galho de *Geissospermum argenteum*, conhecida vulgarmente como Acariquara-branca.

Casca e galhos de *G. argenteum* foram coletados na Reserva Florestal Adolph Ducke (Manaus – AM), em setembro de 2016. O material foi selecionado e processado no Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia e as partes da planta foram colocadas separadamente para secar em estufa com circulação de ar à 40°C até ser obtido peso constante. Posteriormente, esse material foi cortado em partes menores, triturado em moinho elétrico de quatro facas. As serragens obtidas foram armazenadas em sacos de papel e plástico, identificadas, pesadas e mantidas sob refrigeração até a extração.

Para extração aquosa, o método utilizado foi o da infusão (10 g de material vegetal e 500 mL de água destilada). Após 15 minutos as infusões foram filtradas, congeladas e liofilizadas. Os extratos aquosos obtidos foram pesados para cálculo do rendimento e também testados para a atividade antiplasmódica, sendo cedido para esse estudo: 30mg do extrato da casca e 30mg do extrato do galho de *G. argenteum*, divididos em 6 microtubos eppendorf, contendo cada um 10mg de cada extrato. Parte dessa metodologia para extração aquosa encontra-se descrita em Camargo (2011).

Exsiccatas de folhas e galhos de todas as plantas coletadas para esse trabalho foram depositadas no Herbário do INPA.

3.4 Infecção experimental dos mosquitos por meio de membrana

A infecção experimental foi realizada utilizando alimentadores de vidro cobertos por uma membrana de Parafilm® (Bemis Company, Inc., Neenah, Wisconsin, USA) através da qual os mosquitos se alimentaram. Os alimentadores foram conectados por mangueiras a um banho Maria, de onde era bombeada água a 39°C para manter o sangue dos alimentadores aquecido (Figura 13). Nos alimentadores de vidro eram adicionados o sangue de paciente malárico, as substâncias ou extratos e os respectivos diluentes, nas concentrações selecionadas para os testes.

Para as infecções experimentais foram selecionadas fêmeas de *A. aquasalis* de 3 a 5 dias de idade, separadas em grupos de 100 em potes fechados com tecido filó, para permitir que a probóscide dos mosquitos pudesse atravessar a membrana e realizasse o repasto.

Os mosquitos completamente ingurgitados foram transferidos para gaiolas e mantidos a 27-28°C, 70-80% de umidade relativa e alimentados com solução de açúcar 10% *ad libitum*.



Figura 13. Sistema de infecção experimental, composto por alimentadores de vidro conectados por mangueiras a um banho-maria. Em destaque, alimentador de vidro e mosquitos se alimentando.

3.5 Confirmação da infecção por *P. vivax* em *A. aquasalis*

Sete (7) dias após a infecção experimental o intestino médio de 25 mosquitos foi dissecado (Figura 14) em solução salina de fosfato, corado com solução de mercúrio cromo comercial 2% (Merbromin), montado entre lâmina e lamínula e observado ao microscópio ótico para verificar a presença de oocistos. O número de oocistos foi registrado para cada intestino dissecado.

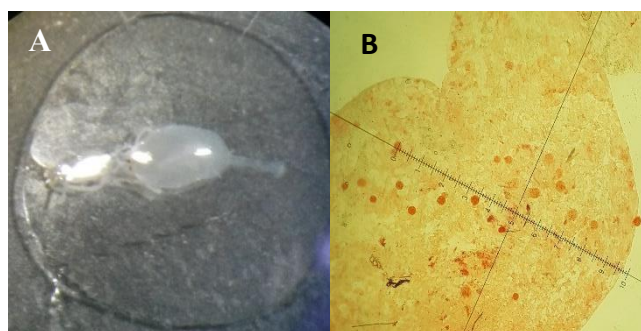


Figura 14. Intestino dissecado (A) e presença de oocistos no intestino de *A. aquasalis* (B). Fonte: autor

3.6 Tolerância de *Anopheles aquasalis* ao DMSO

As substâncias utilizadas nesse trabalho tiveram como solvente o dimetilsulfóxido (DMSO), sem causar efeitos adversos na biologia dos mosquitos. Para isso, foi necessário determinar as concentrações desse composto que diluiriam as substâncias. Foram testadas concentrações de 0, 1, 2, 3, 4 e 5% por via oral, junto com sangue, durante alimentação por membrana. Para cada concentração foi avaliada a longevidade dos mosquitos sendo o experimento realizado em triplicata biológica.

3.7 Avaliação da Ivermectina como bloqueador de transmissão (Controle)

A Ivermectina (IVM) é conhecida pelo seu efeito inseticida (SAMPAIO et al., 2016), portanto nesse trabalho foi utilizada como controle.

Para determinar as concentrações de IVM letais para os mosquitos (CL) e poder selecionar as CL₁₅ e CL₂₅ a serem utilizadas nos experimentos, foram realizadas alimentações experimentais dos mosquitos com as seguintes concentrações de IVM: 0 ng/mL, 100 ng/mL, 50 ng/mL, 25 ng/mL, 12,5 ng/mL, 6,25 ng/mL, 3,13 ng/mL, 1,56 ng/mL.

3.8 Avaliação das substâncias 7-epigedunina e cis – cajucarina - B

Para avaliar o efeito das substâncias 7-epigedunina (EG) no desenvolvimento do *P. vivax* em *An. aquasalis* e no fitness do mosquito, grupos de 100 mosquitos foram alimentados com sangue de paciente malárico (Pv) contendo EG 1ppm, EG 10ppm, DMSO 1%, DMSO 0,1%, DMSO 0,01%, IVM CL₁₅, IVM CL₂₅. Como controles foram utilizados: sangue infectado (Pv 0%), sangue infectado com o parasito inativado (Pv-), e PV-1% + DMSO. Para a inativação do parasito, 1 mL de sangue de paciente malárico foi separado e submetido às seguintes temperaturas: 21°C por 30 minutos, 42°C por 30 minutos, 21°C por 30 minutos. Os mesmos tratamentos foram realizados para avaliar o efeito da cis-cajucarina-B (CB).

3.9 Avaliação de extratos de casca e galho de *Geissospermum argenteum*

Os extratos utilizados nesta pesquisa são aquosos. Para avaliar o efeito da casca e galho de *Geissospermum argenteum* (GA) no desenvolvimento do *P. vivax* em *A. aquasalis* e no fitness do mosquito, foram utilizados os mesmos procedimentos usados para avaliar 7-epi-gedunina e cis-cajucarina B, exceto, pelo emprego de água em lugar de DMSO.

Foi utilizado grupo de 100 mosquitos alimentados com sangue de paciente malárico (Pv) contendo GA 1000ppm, GA 100ppm, H₂O 1%, IVM CL₁₅, IVM CL₂₅. Como controles foram utilizados: sangue infectado (Pv), sangue infectado com o parasito inativado (Pv-), e PV-+ H₂O 1%.

3.10 Efeito das substâncias e extratos na fecundidade de *Anopheles aquasalis* infectados por *Plasmodium vivax*.

Quatro dias após a infecção experimental, 25 mosquitos de cada tratamento, foram colocados em potes de ovipostura individual (Figura 15: A, B e C), com as paredes internas forradas com papel filtro e fundo coberto com água salobra. No sétimo dia após a alimentação experimental foi realizada a contagem dos ovos postos e dos ovos retidos. O intestino médio dos mosquitos dos grupos infectados foi dissecado em PBS (tampão fosfato-salino), corado com mercúrio cromo 2% e observado ao microscópio ótico para contagem de oocistos.

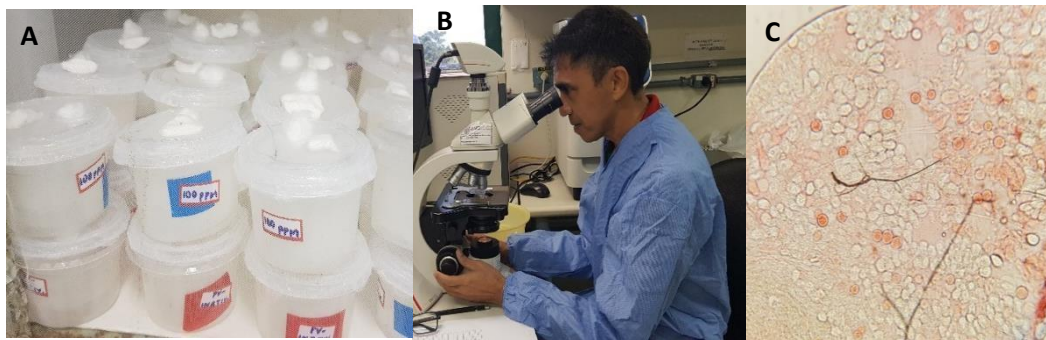


Figura 15. Ovipostura individual (A) contagem de oocistos (B) e presença de oocistos no intestino de *A. aquasalis* (C). Fonte autor

3.11 Efeito das substâncias e extratos na longevidade de *A. aquasalis* infectados por *P. vivax*

Após a infecção experimental, grupos de 50 fêmeas de cada tratamento foram separados e mantidos a 27-28°C e 70-80% de umidade relativa. Diariamente foi feita a

contagem e retirada dos mosquitos mortos, para armazenagem em álcool absoluto. Os dados foram tabulados usando o programa Excel. Estes experimentos foram realizados em triplicata biológica.

3.12 Análise Estatística

Para avaliar a taxa de sobrevivência de *A. aquasalis* sob ação das concentrações de 0, 1, 2, 3, 4 e 5% de Dimetilsulfóxido-DMSO foi utilizado curvas de Kaplan Meier e Teste de Log Rank que testam diferentes grupos e comparam as taxas de sobrevivência entre os grupos, resultando em diferenças que podem ser significativas ou não.

Para avaliar o efeito dos extratos e substâncias sobre a fecundidade dos mosquitos tratados com extratos/substâncias e infectados com *P. vivax* foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para comparações múltiplas. O nível de significância utilizado foi de 95% ($\alpha = 0,005$).

Para avaliar o efeito dos extratos e substâncias sobre a longevidade dos mosquitos tratados com extratos/substâncias e infectados com *P. vivax* foi feita uma curva de sobrevivência, usando o teste de Mantel-Cox. Para essas análises foi utilizado o programa GraphPadPrism 5.

Para avaliar o efeito das substâncias/extratos no número de oocistos foi utilizado o software estatístico R na versão 3.6.0 usando o R studio versão 1.1.4, com pacotes diversos (tidyverse, epiDisplay, hnp, agricolae, sjPlot e ggstatsplot). O nível de significância utilizado foi de 0.05.

Para testar variáveis respostas em relação ao fator “substâncias” (GRUPO) foi utilizado o teste Kruskal-Wallis. Comparações múltiplas do teste de Dwass-Steel-Crichtlow-Fligner com ajuste de Bonferroni.

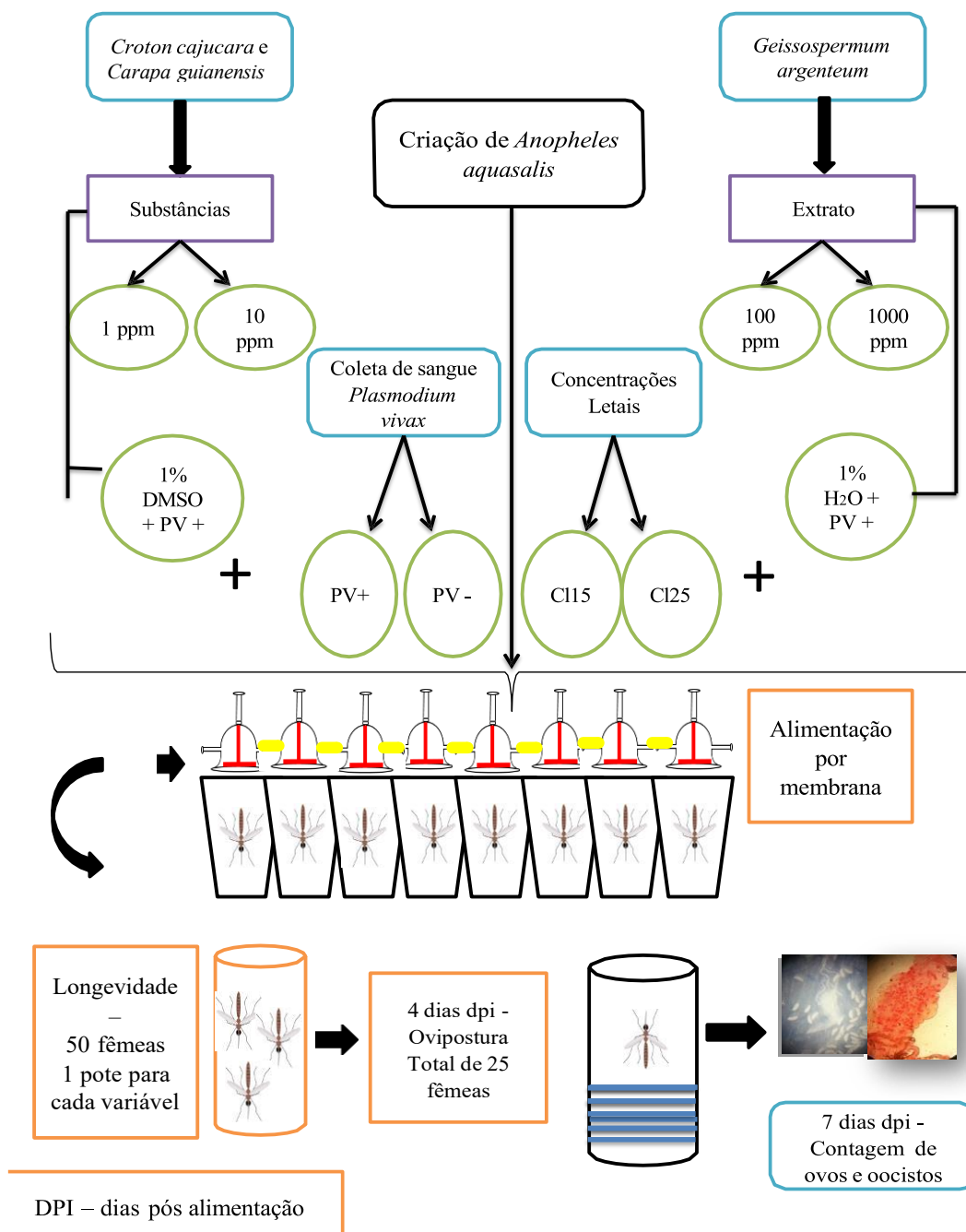


Figura 11. Esquema geral da metodologia desenvolvida

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Muitos extratos vegetais e substâncias não se dissolvem em água, sendo então necessários solventes que possam solubilizá-los. O dimetilsulfóxido-DMSO ($(\text{CH}_3)_2\text{SO}$), é um dos solventes mais comuns na administração de substâncias insolúveis em água, sendo assim frequentemente utilizado como solvente em estudos biológicos (ROSENBAUM et al., 1965; SANTOS, 2003).

Entretanto, não se sabia se o DMSO teria algum efeito adverso na biologia de *A. aquasalis*. Por isso, foi decidido que neste estudo seriam avaliadas as concentrações inseticidas de 0%, 1%, 2%, 3%, 4% e 5% de DMSO para verificar qual concentração a espécie de mosquito em estudo suportaria e a partir dessa concentração, a mesma pudesse ser usada nas diluições de substâncias ou extratos.

Sendo assim, nos gráficos observa-se que nas concentrações de DMSO de 0%, 1% e 2% a mortalidade foi baixa e maior porcentagem de mosquito sobreviveu por mais tempo. Nas concentrações de 3%, 4% e 5% a mortalidade foi alta no início da alimentação e poucos mosquitos sobreviveram.

4.1 Avaliação da tolerância de *A. aquasalis* a diferentes concentrações de DMSO

Diante da necessidade de padronização de concentração de dimetilsulfóxido-DMSO em *A. aquasalis*, a que melhor se ajustou à tolerabilidade, ou seja, não causou efeito inseticida foi 1% desse solvente, observado também por outros autores em outros insetos (OLIVEIRA et al., 2011). Com base nessas observações a concentração de DMSO selecionada foi 1% para a diluição dos extratos e substâncias utilizadas nesse trabalho.

Nos estudos sobre concentrações de DMSO toleradas pelos mosquitos durante o primeiro dia morreu uma quantidade expressiva de mosquitos que ingeriram sangue com > 2% de DMSO nas 3 repetições (Figuras 16-18). Embora na somatória de mortalidade diária das replicatas para cada concentração, o 0% tenha variado (Tabela 1). Além disso, foi possível observar a oscilação da longevidade diária em 15 dias com p-valor < 0,0001.

Em geral, nas três replicatas, de forma qualitativa, o controle (branco, 0% DMSO) e os com 1% de DMSO no sangue ingerido obtiveram mortalidades comparáveis ao longo dos primeiros 15 dias (Figura 16-18). Com base sobre esse efeito, foi utilizado 1% de DMSO nos alimentadores como co-solvente para dissolução das substâncias e extratos. Essa mesma

concentração vem sendo usada como co-solvente em estudos de efeito larvídica de outras espécies de mosquitos (DILL, et al., 2012; ALVES et al., 2017).

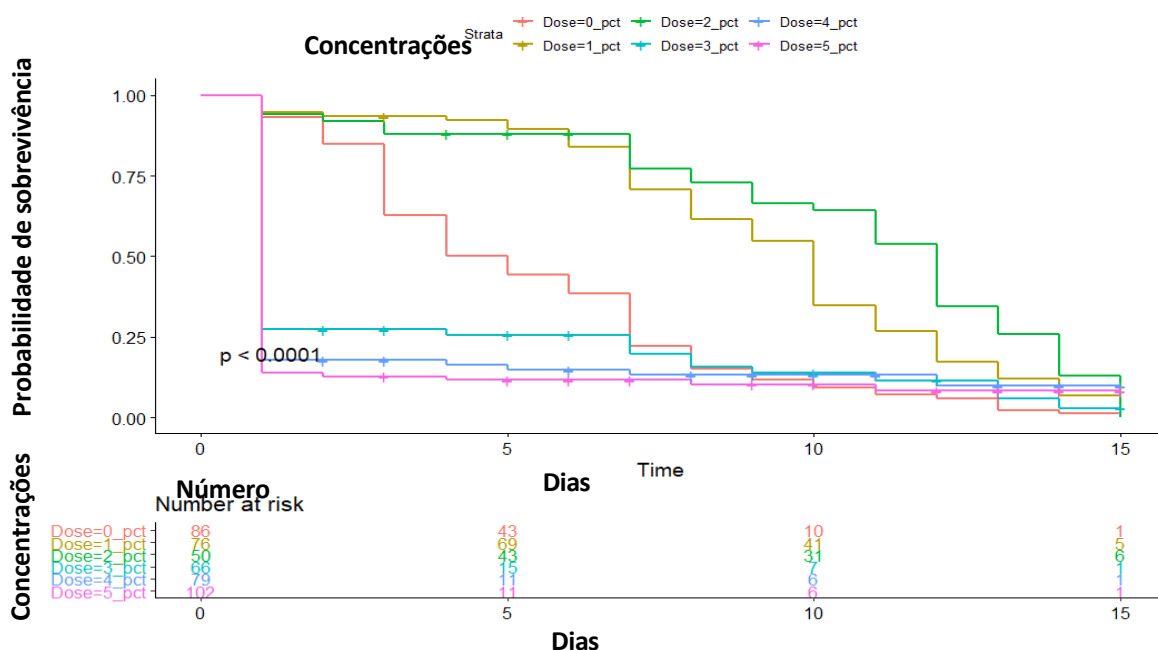


Figura 16. Gráfico da probabilidade de sobrevivência de *A. aquasalis* tratados com DMSO nas concentrações de 0%, 1%, 2%, 3%, 4% e 5% de DMSO. PCT = Por cento.

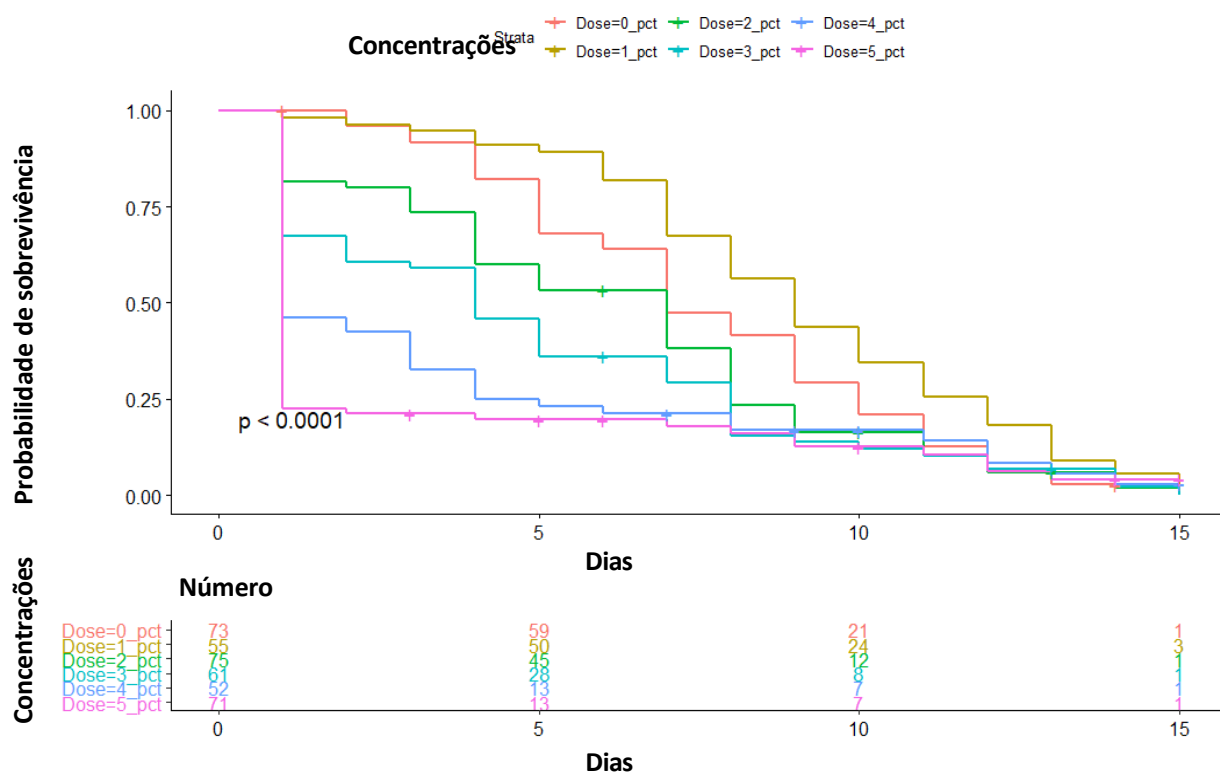


Figura 17. Gráfico da probabilidade de sobrevivência de *A. aquasalis* tratados com DMSO nas concentrações de 0%, 1%, 2%, 3%, 4% e 5%. PCT = Por cento.

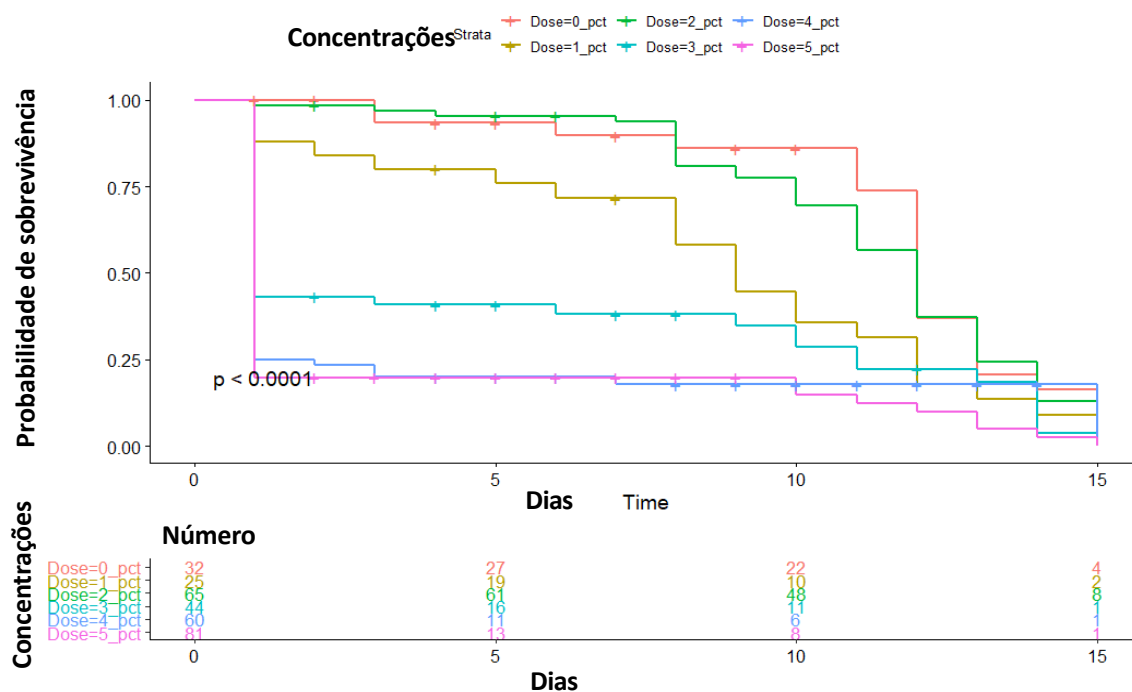


Figura 18. Gráfico da probabilidade de sobrevivência de *A. aquasalis* tratados com DMSO nas concentrações de 0%, 1%, 2%, 3%, 4% e 5%. PCT = Por cento

Tabela 1: Somatória de mortalidade diária de *A. aquasalis*, em quatro dias, nas três replicatas em função da concentração de DMSO no sangue ingerido.

Dias	Dimetil Sulfóxido (DMSO)					
	0%	1%	2%	3%	4%	5%
1	10	2	2	4	3	2
2	24	3	8	2	7	0
3	18	3	11	9	5	2
4	8	5	5	6	2	0

4.2 Avaliação de ivermectina em *A. aquasalis*

A Ivermectina (IVM) segundo Klafke (2011) é uma droga que pertence ao grupo das lactonas macrocíclicas, composto por (avermectinas): ivermectina, abamectina e doramectina. (milbemicinas): moxidectina. Foi isolada pela primeira vez em 1974 a partir

de um microrganismo do solo da costa do Japão, denominado *Streptomyces avermetilis* sendo renomeado mais tarde como: *Streptomyces avermectinus* (OMURA, 2008).

Apresenta ação biológica contra endo e ectoparasitos e vem sendo proposta como controle vetorial na redução da transmissão de *Plasmodium* (WILSON, 1993; FOLEY et al., 2000; FOY et al., 2011; CHACCOUR et al., 2013).

Como nesse estudo seria feita avaliação antiplasmodial com uso de extratos e substâncias de plantas da região amazônica, havia necessidade do uso de um medicamento de referência de conhecida ação antiplasmodial.

Sendo assim, houve necessidade de selecionar quais concentrações de ivermectina seriam letais para os mosquitos e quais poderiam ser usadas nesse estudo sem efeito inseticida para que pudessem servir de controle durante os experimentos.

Para isso, foram realizadas três replicatas utilizando-se ivermectina sendo observada a mortalidade nas três repetições do referido medicamento frente a adultos de *A. aquasalis* (Tabela 2-4), nas concentrações de 100-200 ng/mL foi observada morte expressiva em todas as repetições. Com isso, 200 ng/mL de ivermectina no sangue foi adotado como efeito anti-transmissão contra o vetor. Neste sentido, Segundo Foley et al. (2000); Kobilinski et al. (2012) a ivermectina reduz a transmissão de malária aumentando a mortalidade do vetor.

Dentro desse contexto, Sampaio et al. (2016) e Pinilla et al. (2018) utilizando em seus estudos ivermectina observaram também aumento da mortalidade de *A. aquasalis*.

Neste estudo, foi observado que quanto maior a concentração de ivermectina, maior a mortalidade dos mosquitos.

Com os resultados obtidos nas três replicatas com ivermectina, foi possível calcular a curva das concentrações letais (CL). Sendo então, selecionadas as concentrações letais (CL) CL₁₅ 73,45 ng/mL e CL₂₅ 86,16 ng/mL (Figura 19).

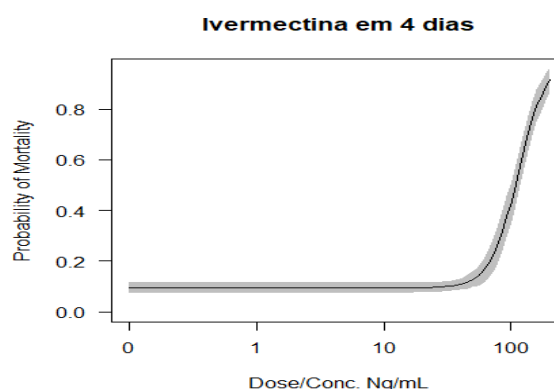


Figura 19. Curva dose-resposta de ivermectina

Em modelo experimental de *Anopheles stephensi* com ratos usado por Bastiaens et al. (2012) o efeito da ivermectina foi de 72 horas após a alimentação, 70-100% dos mosquitos morreram dentro desse tempo quando comparado a mortalidade no controle 10% durante o mesmo tempo. Outro fato interessante é que após esse período a mortalidade diminuiu, mas continuou elevada até o quarto dias após a alimentação. Ressaltando que a dose de ivermectina que os roedores receberam oralmente foi de 200 a 400 µg/Kg de ivermectina.

Outros anofelinos já foram testados com ivermectina e a mortalidade foi sempre elevada após o uso da mesma, *A. quadrimaculatus* (JONES et al., 1992), *A. gambiae* (KOBYLINSKI et al., 2012), *A. farauti* (FOLEY et al., 2000), *A. aquasalis* e *A. darlingi* (SAMPAIO et al., 2016; PINILLA et al., 2018).

Tabela 2. Avaliação de *A. aquasalis* frente a ação de ivermectina nas concentrações 0 ng/mL a 200 ng/mL. Replicata 1

	Dose/Conc.(ng/mL)	Total(N)	4 dias (mortalidade acumulada)
Controle	0	44	4
2	1,56	25	5
3	3,125	32	7
4	6,25	37	5
5	12,5	52	10
6	25	50	17
7	50	47	15
8	100	41	23
9	200	44	40

Tabela 3. Avaliação de *A. aquasalis* frente a ação de ivermectina nas concentrações 0 ng/mL a 200 ng/mL. Replicata 2

	Conc. (ng/mL)	Total (N)	4 dias (mortalidade acumulada)
Controle	0	37	2
2	1,56	38	3
3	3,13	37	4
4	6,25	40	5
5	12,5	61	4
6	25	41	5
7	50	31	1
8	100	37	28
9	200	24	23

Tabela 4. Avaliação de *A. aquasalis* frente a ação de ivermectina nas concentrações 0 ng/mL a 200 ng/mL. Replicata 3

	Conc. (ng/mL)	Total (N)	4 dias (mortalidade acumulada)
Controle	0	54	3
2	1,56	54	0
3	3,13	52	1
4	6,25	54	0
5	12,5	31	1
6	25	32	0
7	50	49	0
8	100	54	6
9	200	64	58

4.3 Avaliação de 7-epigedunina na oviposição e formação de oocistos de *P. vivax* em *A. aquasalis*

É a primeira vez que esta substância 7-epi-gedunina, é testada como possível substância antimalárica. Nos experimentos preliminares, na presença de 7-epi-gedunina não se observou ovos postos de *A. aquasalis* nas concentrações de 1% de DMSO (Figura 20). A mediana de ovos retidos nos permite observar que as concentrações de 1% de DMSO, 1 e 10 ppm de 7-epi-gedunina provocaram retenção de ovos nos ovários de *A. aquasalis*. (Figura 21). Observou-se que na concentração de 1 ppm de 7-epi-gedunina não houve formação de oocistos, enquanto na concentração de 10 ppm observou-se a formação (Figura 22).

Os resultados preliminares dos experimentos de ovos postos, retidos nos ovários e oocistos (de *P. vivax*) em *A. aquasalis* frente à 7-epi-gedunina permitiu observar um provável efeito de supressão de postura de ovos e/ou retenção de ovos nos ovários provocado pela presença de DMSO e/ou infecção por *P. vivax*.

Essa substância é um limonoide e por ter essa característica química acredita-se que deva ter alguma atividade antimalárica. Vale ressaltar que os limonoides que apresentam estrutura gedunínica apresentam atividade antimalárica, por exemplo, a gedunina é a que apresentou maior efeito antimalárico contra cepas de *P. falciparum* (MACHINNON et al., 1997; BICKII et al., 2000).

Talvez por apresentar estrutura gedunínica, essa substância tenha influenciado na retenção de ovos e produção de oocistos de *P. vivax* durante o uso de 1ppm da mesma e na medida em que a concentração é aumentada para 10 ppm essa ação é perdida. Por outro lado,

essa mesma substância na concentração aumentada para 10 ppm suprimiu a oviposição, assim como 1% de DMSO.

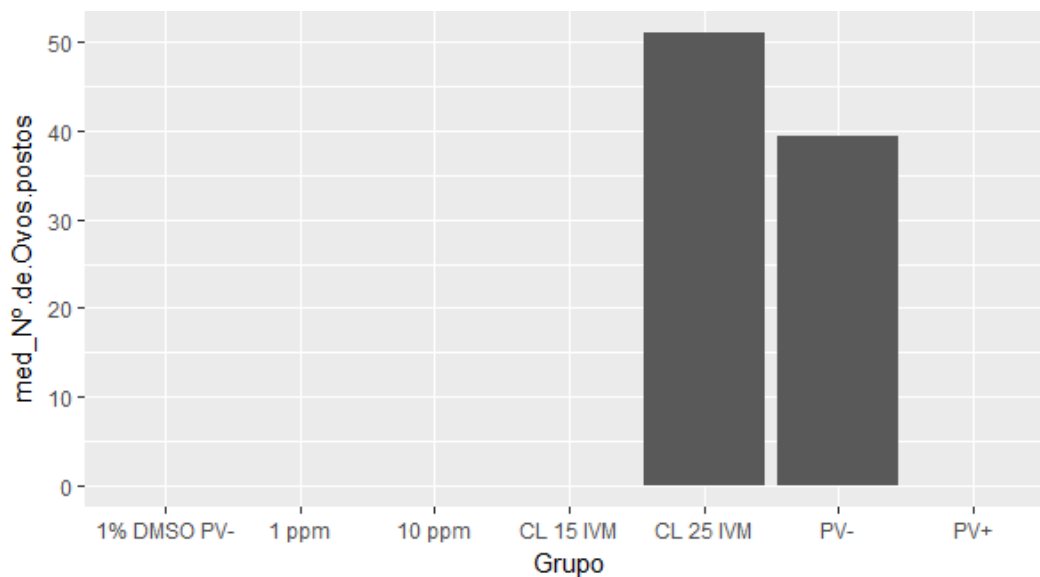


Figura 20: Mediana de ovos postos por *A. aquasalis* frente ação de 7-epi-gedunina

DMSO = dimetilsulfóxido

IVM = ivermectina

PV – sangue com parasito inativado

PV + sangue com parasito

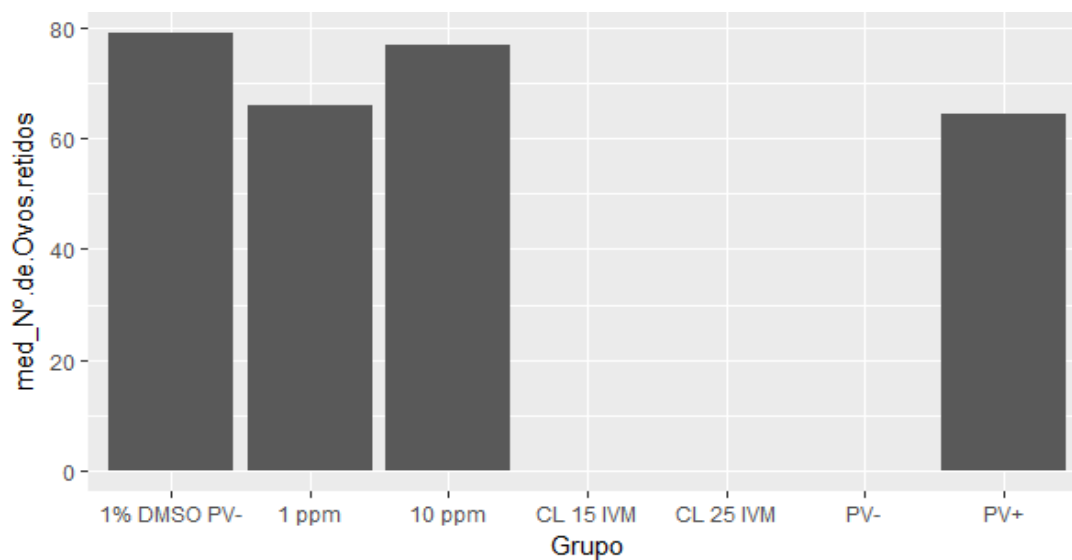


Figura 21: Mediana de ovos retidos em ovários de *A. aquasalis* frente ação de 7-epi-gedunina

DMSO = dimetilsulfóxido

IVM = ivermectina

PV – sangue com parasito inativado

PV + sangue com parasito

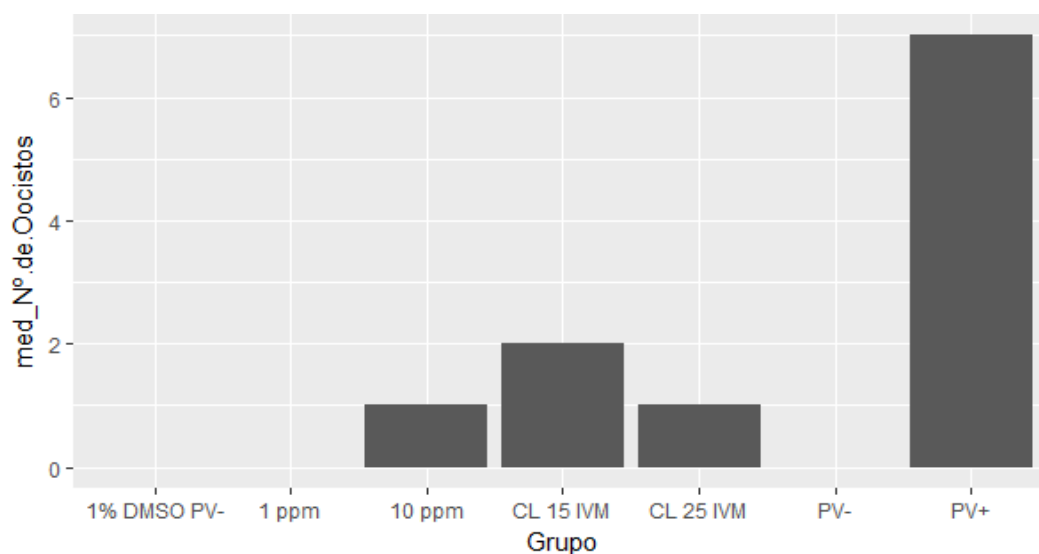


Figura 22: Mediana do número de oocistos de *A. aquasalis* frente ação de 7-epigedunina

DMSO = dimetilsulfóxido

IVM = ivermectina

PV – sangue com parasito inativado

PV + sangue com parasito

4.4 Avaliação de cis-cajucarina B

A mediana de ovos postos na presença de cis-cajucarina B na concentração de 10ppm não se observa ovos postos quando comparados a concentração de 1ppm (Figura 23). A mediana de ovos retidos (Figura 24) não se observa retenção de ovos na concentração de 1% de DMSO e 1ppm. A mediana do número de oocistos (Figura 25) na presença de cis-cajucarina B observa-se que na concentração de 10ppm é mais ativa quando comparada a 1ppm.

Os resultados dos experimentos com ovos postos, retidos nos ovários de *A. aquasalis* frente a cis-cajucarina B permite observar que na presença de 10ppm dessa substância há provável supressão de ovos retidos nos ovários quando comparados a 1ppm da referida substância. Além disso, a presença de *P. vivax* parece suprimir a postura de ovos quando se compara ao sangue com parasito inativado.

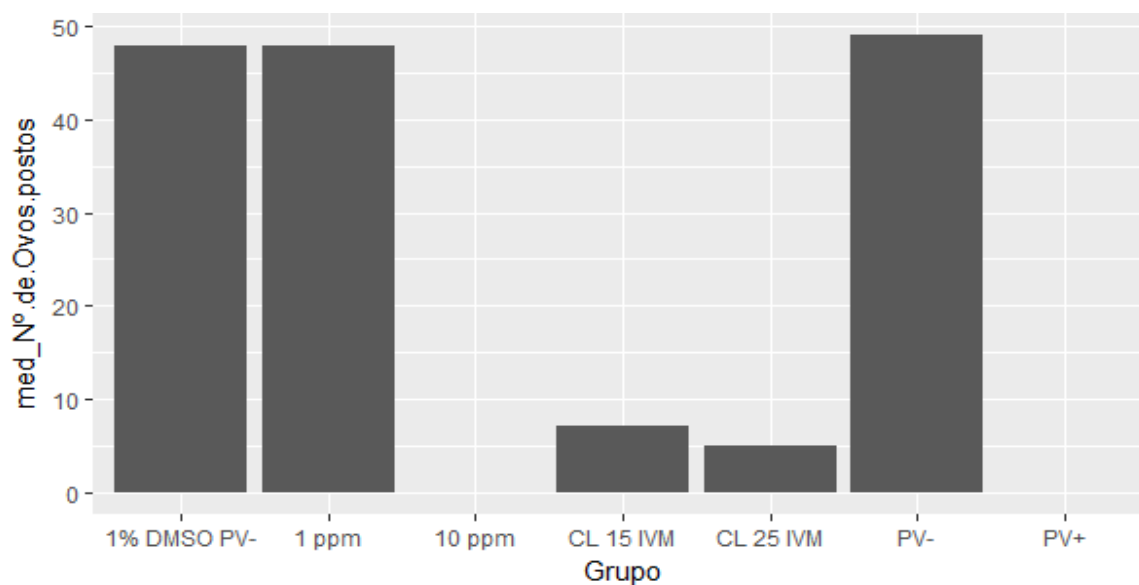


Figura 23: Mediana de ovos postos por *A. aquasalis* frente ação de cis-cajucarina B

DMSO = dimetilsulfóxido

IVM = ivermectina

PV – sangue com parasito inativado

PV + sangue com parasito

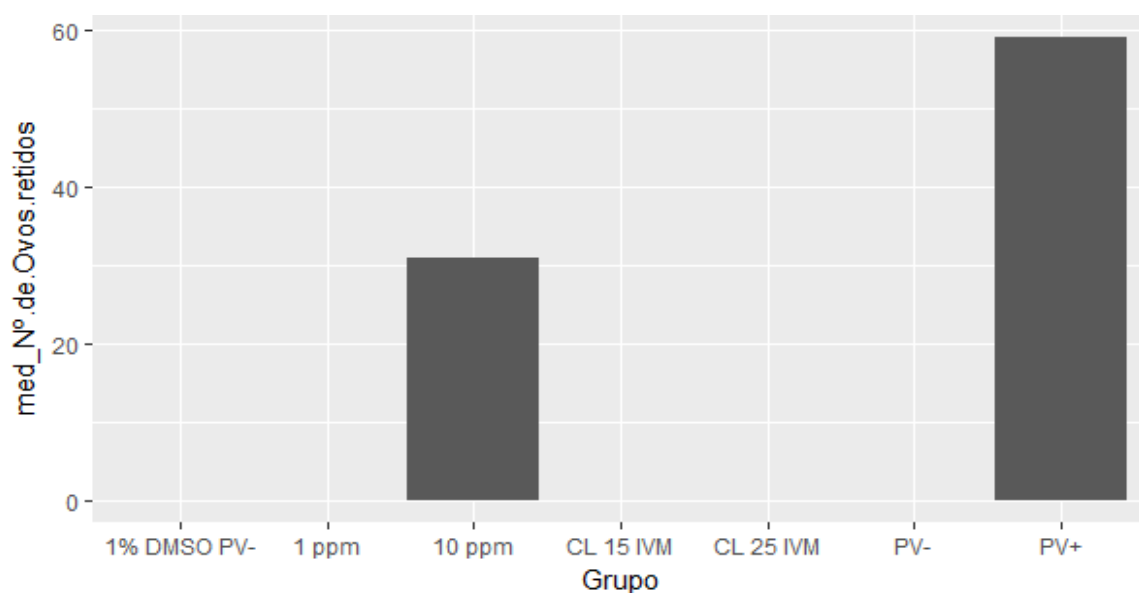


Figura 24: Mediana de ovos retidos por *A. aquasalis* frente ação de cis-cajucarina B

DMSO = dimetilsulfóxido

IVM = ivermectina

PV – sangue com parasito inativado

PV + sangue com parasito

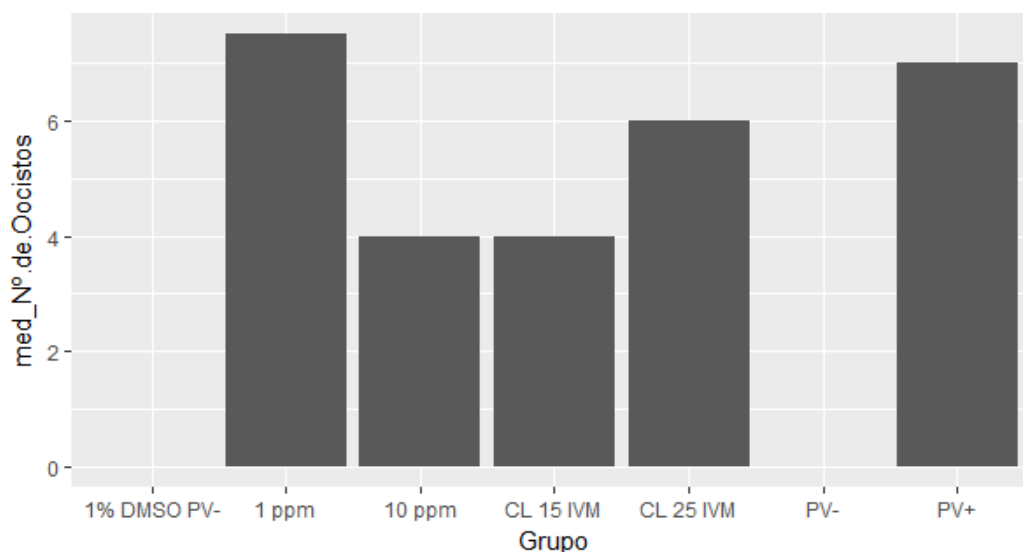


Figura 25: Mediana do número de oocistos em *A. aquasalis* frente ação de cis-cajucarina B

DMSO = dimetilsulfóxido

IVM = ivermectina

PV – sangue com parasito inativado

PV + sangue com parasito

4.5 Ação de DMSO, substâncias e extratos em *A. aquasalis*

Após aos dados preliminares, foi realizado uma triplicata com as concentrações de 0% DMSOPV+, 0,01% DMSOPV+, 0,1% DMSOPV+, 1% DMSOPV+ e 1% DMSOPV- sendo observado que as mesmas não foram significativamente diferentes nas cinco (Figura 26) concentrações testadas na ovipostura individual de *A. aquasalis*. As médias de ovos postos (pontos vermelhos) variaram quando comparadas entre si ficando abaixo de cem. Além disso, observa-se que a menor taxa de zero está na concentração de 1% DMSOPV-. Pelo observado o DMSO não interfere na postura de ovos por *A. aquasalis*. Durante a repetição de experimentos para essa substância, não houve diferença significativa no número de ovos postos frente as concentrações de 0%DMSOPV+, 1%DMSOPV-, 0%DMSOPV+ e 1%DMSOPV+.

O número de ovos retidos em *A. aquasalis* frente a ação de dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações 0% DMSOPV+, 0,01% DMSOPV+, 0,1% DMSOPV+, 1% DMSOPV+ e 1% DMSOPV- não foram significativamente diferentes entre as concentrações 0% DMSOPV+ e 1% DMSOPV+; 0,1% DMSOPV+ e 1% DMSOPV-. Além disso, não se observa diferença significativa entre essas quatro concentrações e a concentração de 0,01%

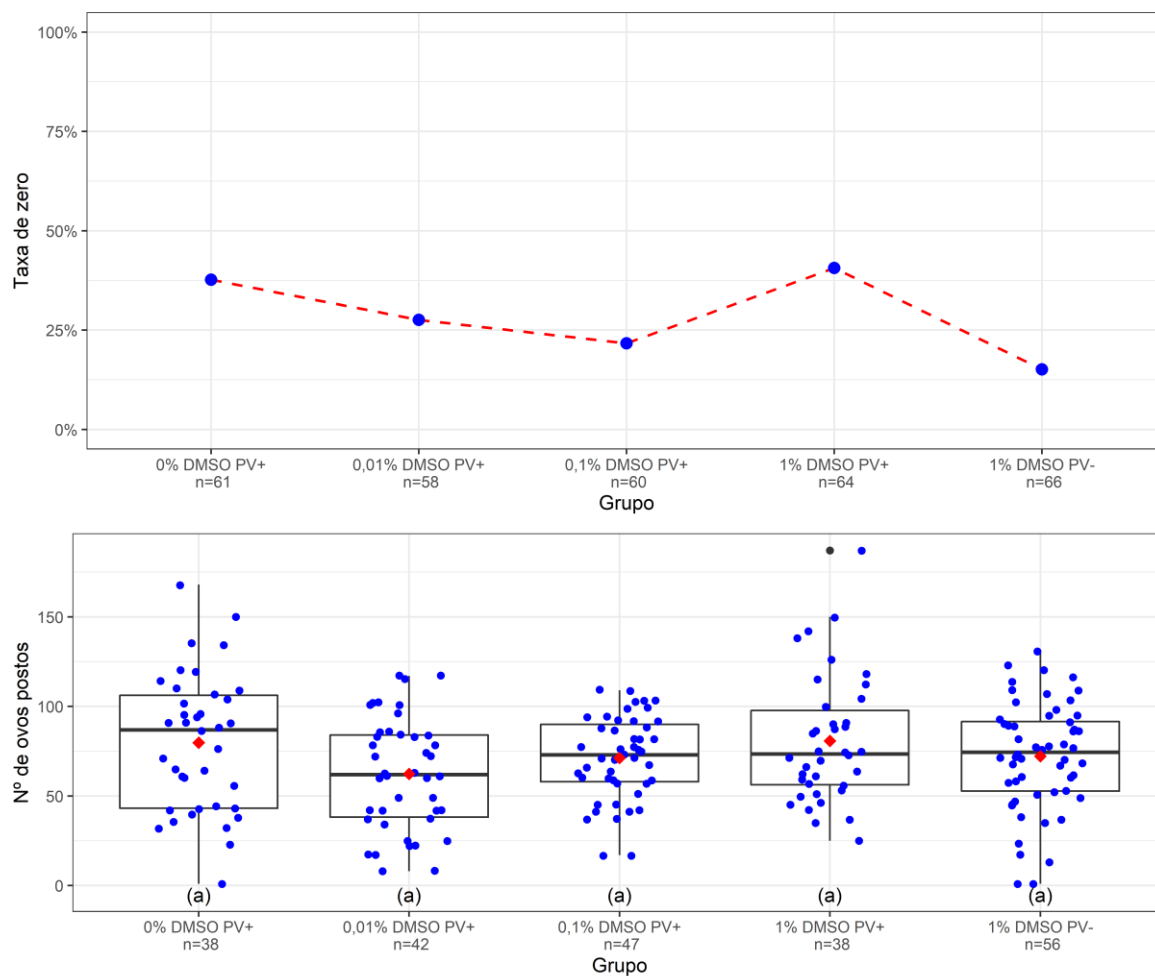
DMSOPV+. Entretanto, existe diferença significativa entre 0% DMSOPV+, 0,1% DMSOPV+ e 1% DMSOPV-. Porém, não há diferença entre as concentrações 0,1%DMSOPV+ e 1% DMSOPV-. Também entre 1% DMSOPV+ e 0,1% DMSOPV+; 1% DMSOPV+ e 1% DMSOPV- (Figura 27).

O número de oocistos presentes o intestino de mosquitos *A. aquasalis* diferem significativamente entre as concentrações de 0,01% DMSOPV+, 0,1% DMSOPV+, 1% DMSOPV+ e 1% DMSOPV-. Porém, as concentrações de 1% DMSOPV+, 0,1% DMSOPV+ não diferem da concentração de 0%DMSOPV+. Além disso, a concentração de 0,01% DMSOPV+ apresenta diferença com 0%DMSOPV+ (Figura 28).

O número de ovos retidos frente a ação das concentrações 0%DMSOPV-, 1%DMSOPV-, 0%DMSOPV+ e 1%DMSOPV+. Observa-se diferença significativa apenas nas concentrações 0%DMSOPV- e 0%DMSOPV+ (Figura 30).

O número de ovos postos na presença das concentrações de 1%DMSO/0ppmPV+, 1%DMSO/1ppmPV+ de 7-epi-gedunina, 1%DMSO/10ppmPV+ de 7-epi-gedunina, 0,03998ppm IVM e 0,04ppm IVM (CL15 e CL 25 de ivermectina, respectivamente) (Figura 29). Não foi observada diferença significativa entre as concentrações testadas em ovos postos por *A. aquasalis*. Inclusive também nas concentrações de 1 e 10ppm de cis-cajucarina-B (Figura 35). O número de ovos retidos nas concentrações de 1%DMSO/0ppmPV+, 1%DMSO/1ppmPV+ de 7-epi-gedunina, 1%DMSO/10ppmPV+ de 7-epi-gedunina, 0,03998ppm IVM e 0,04ppm IVM (CL15 e CL 25 de ivermectina, respectivamente). Não apresentou diferença significativa entre as concentrações. Entretanto, entre 1%DMSO/1ppmPV+ de 7-epi-gedunina, 1%DMSO/10ppmPV+ de 7-epi-gedunina, com 0,03998ppm IVM houve diferença (Figura 30).

O número de oocistos na presença da concentração de 1%DMSO/1ppmPV+ de 7-epi-gedunina e 1%DMSO/10ppmPV+ de 7-epi-gedunina não apresentou diferença significativa quando comparadas as concentrações testadas (Figura 31)



Nota: Teste de Kruskal-Wallis p-valor = 0,099

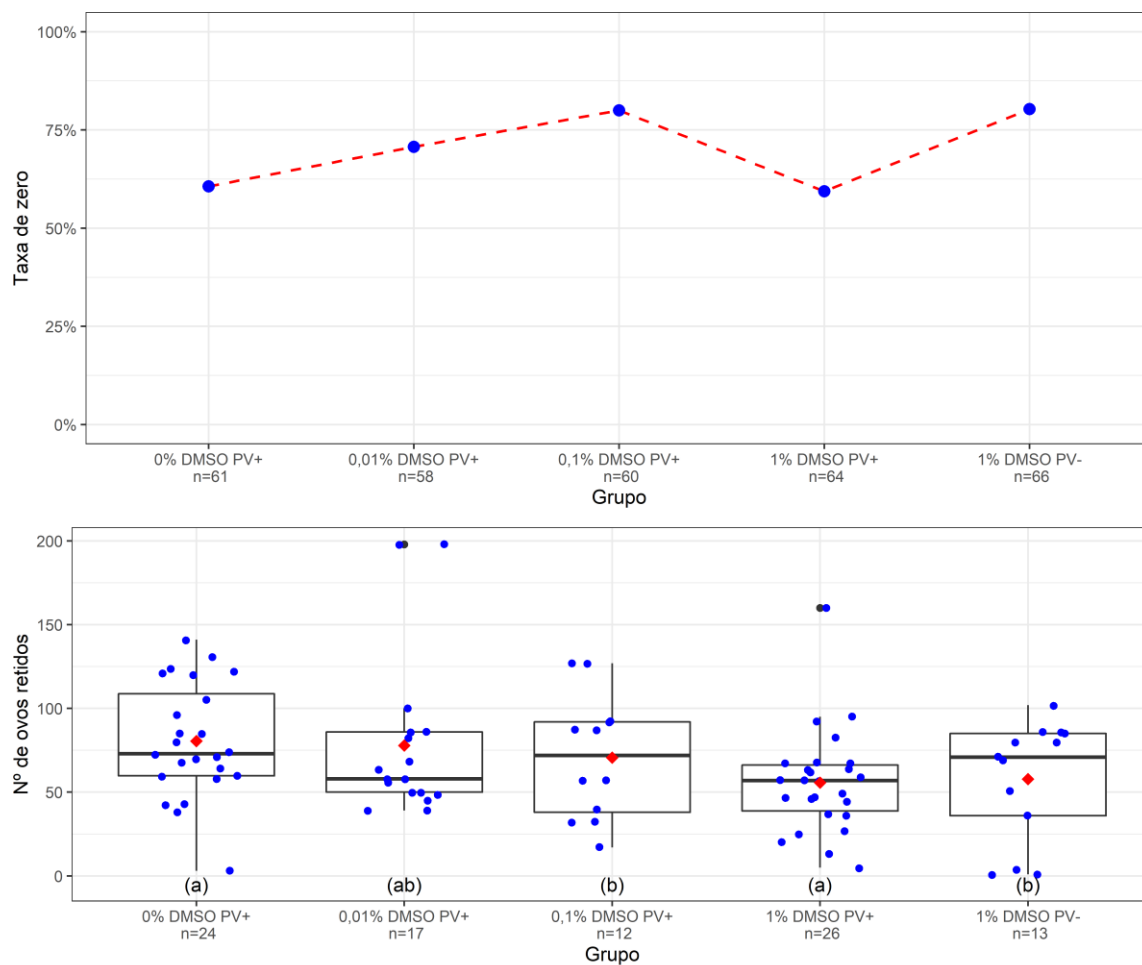
Letras distintas diferem ao nível de significância de 0,05

Figura 26. Número de ovos postos por *A. aquasalis* frente a ação das concentrações 0% DMSOPV+, 0,01%DMSOPV+, 0,1%DMSOPV+, 1%DMSOPV+ e 1%DMSOPV-.

Dimetilsulfóxido= DMSO

PV+= sangue com parasito vivo

PV- = sangue com parasito inativado



Nota: Teste de Kruskal-Wallis p-valor = 0,018

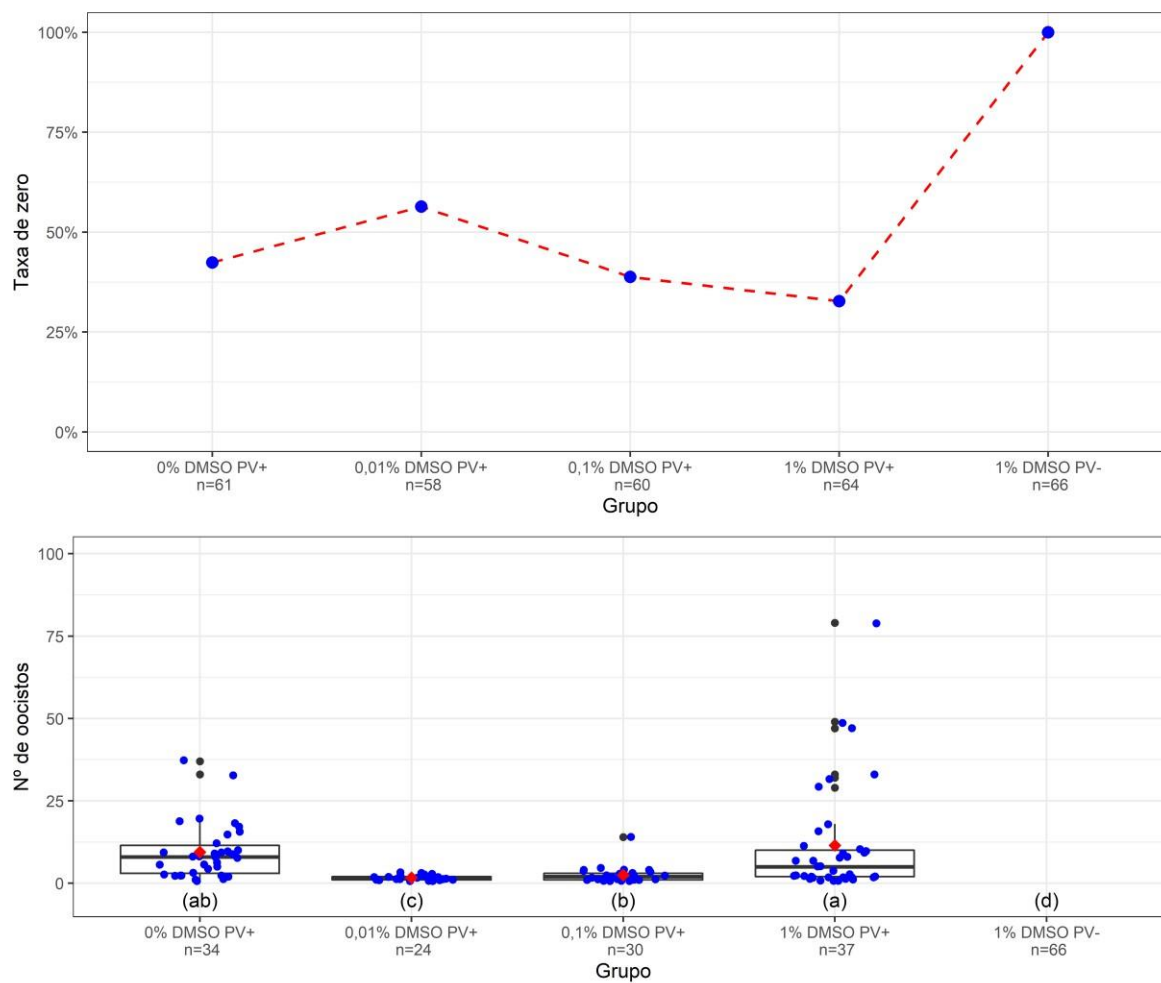
Letras distintas diferem ao nível de significância de 0,05

Figura 27. Número de ovos retidos em *A. aquasalis* frente a ação das concentrações 0%DMSOPV+, 0,01%DMSOPV+, 0,1%DMSOPV+, 1%DMSOPV+ e 1%DMSOPV-.

Dimetilsulfóxido= DMSO

PV+= sangue com parasito vivo

PV- = sangue com parasito inativado



Nota: Teste de Kruskal-Wallis p-valor < 0,001

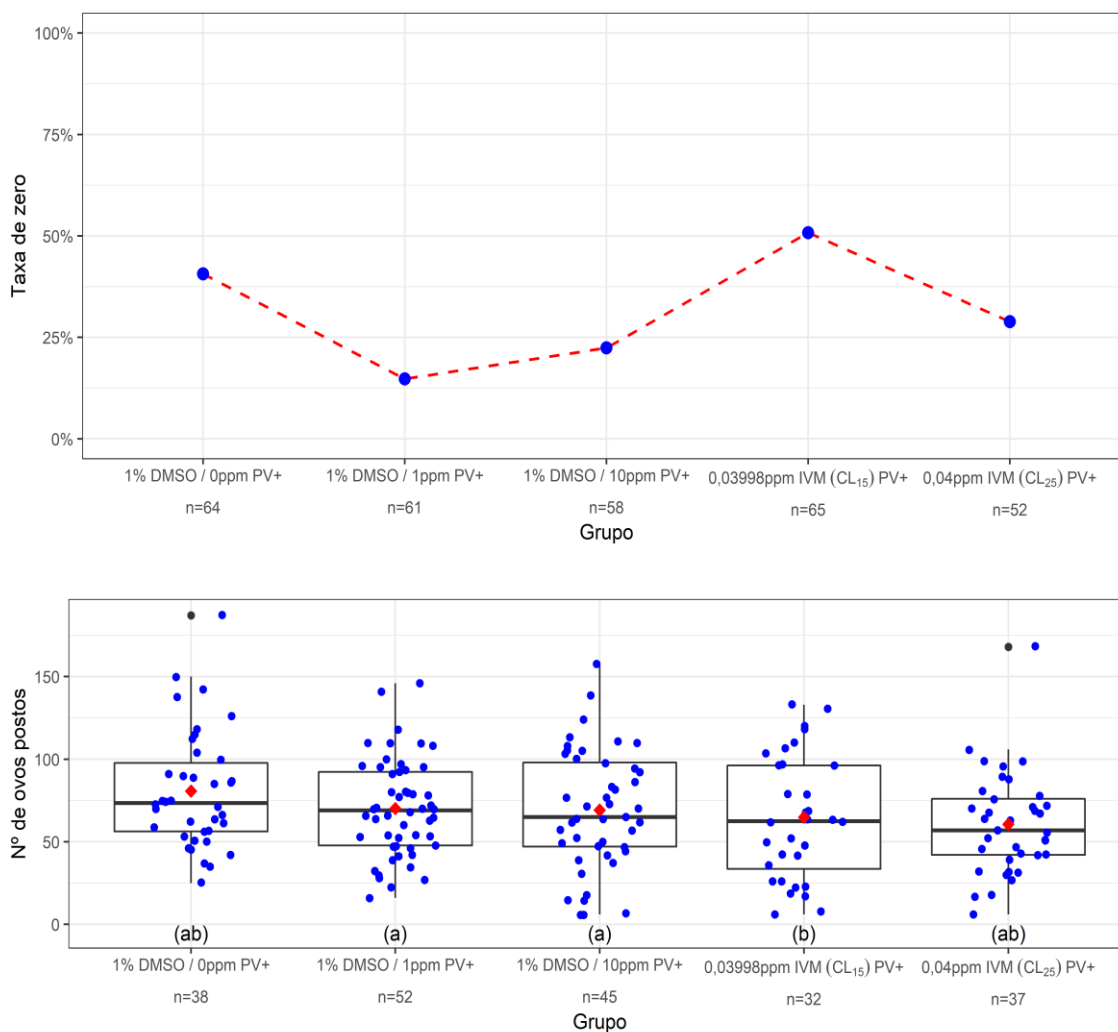
Letras distintas diferem ao nível de significância de 0,05

Figura 28. Número de oocistos presentes no intestino de mosquitos *A. aquasalis* frente a ação das concentrações de 0%DMSOPV+, 0,01%DMSOPV+, 0,1%DMSOPV+, 1%DMSOPV+ e 1%DMSOPV-.

Dimetilsulfóxido= DMSO

PV+= sangue com parasito vivo

PV- = sangue com parasito inativado



Nota: Teste de Kruskal-Wallis p-valor = 0,001

Letras distintas diferem ao nível de significância de 0,05

Figura 29. Número de ovos postos por *A. aquasalis* frente a ação das concentrações 1%DMSOPV+, 1%DMSO/1ppmPV+ de 7-epi-gedunina, 1%DMSO/10ppmPV+ de 7-epi-gedunina, 0,03998ppm IVM e 0,04ppm IVM (CL₁₅ e CL₂₅ de ivermectina, respectivamente)

Dimetilsulfóxido= DMSO

PV+= sangue com parasito vivo

PV- = sangue com parasito inativado

IVM= Ivermectina

CL= Concentração letal

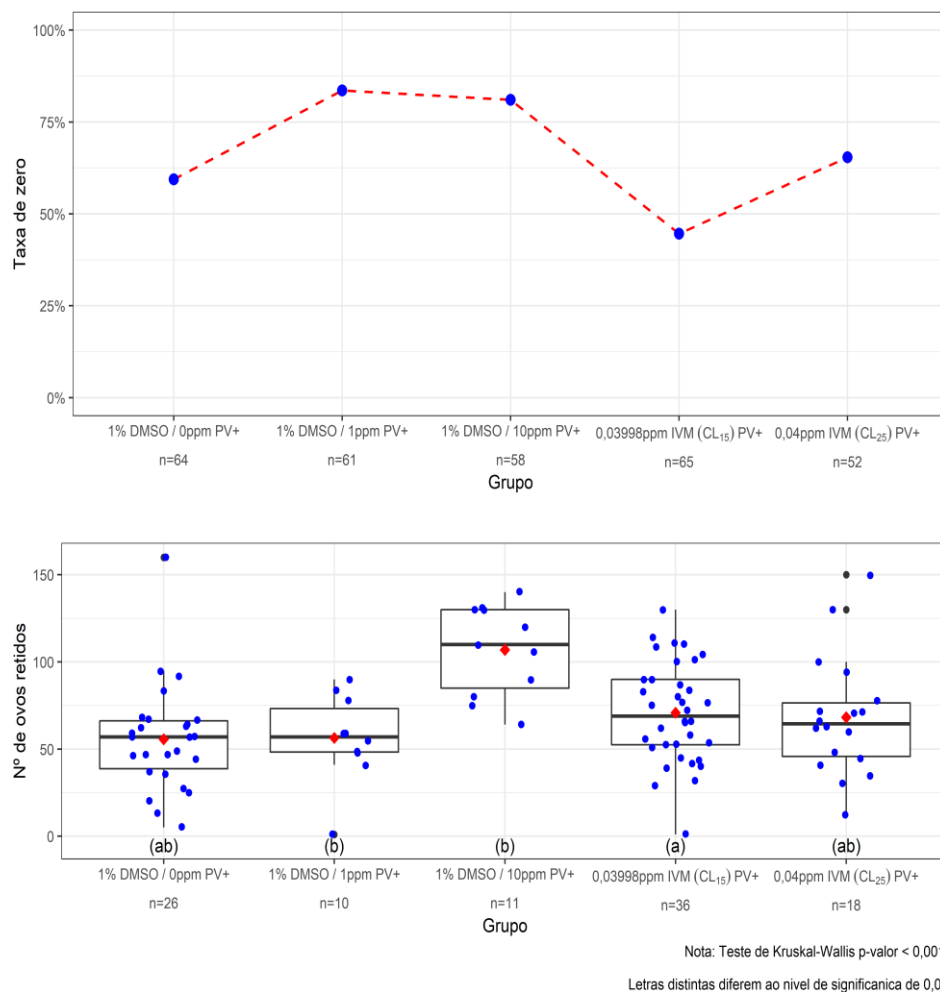


Figura 30. Número de ovos retidos em ovários de *A. aquasalis* frente a ação das concentrações 1%DMSO/0ppmPV+ de 7-epi-gedunina, 1%DMSO/1ppmPV+ de 7-epi-gedunina, 1%DMSO/10ppmPV+ de 7-epi-gedunina, 0,03998ppm IVM e 0,04ppm IVM (CL₁₅ e CL₂₅ de ivermectina, respectivamente).

DMSO= Dimetilsulfóxido

PV+= sangue com parasito vivo

PV- = sangue com parasito inativado

IVM= Ivermectina

CL= Concentração letal

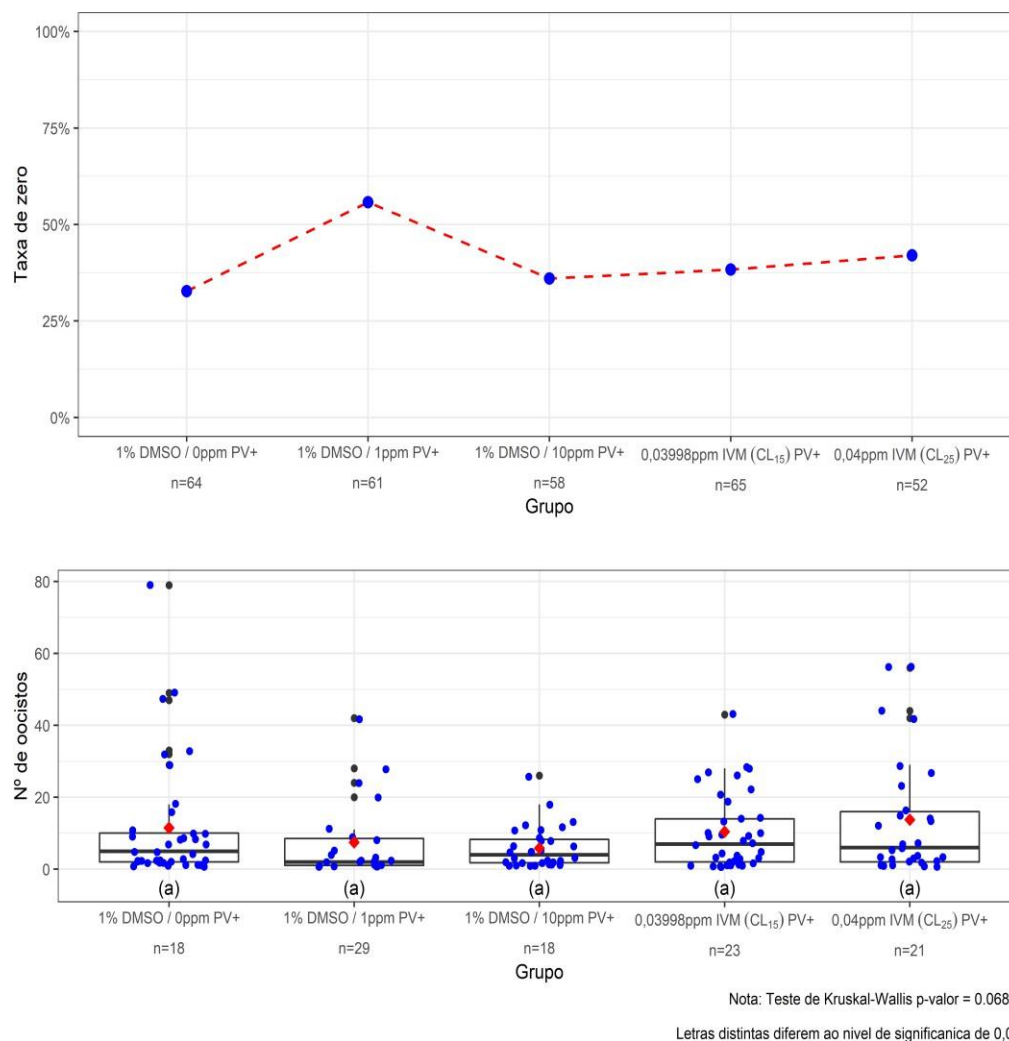


Figura 31. Número de oocistos no intestino de *A. aquasalis* frente a ação da substância 7-epi-gedunina nas concentrações de 1%DMSO/1ppmPV+ e 1%DMSO/1ppmPV+ quando comparadas as demais concentrações letais de ivermectina testadas.

DMSO= Dimetilsulfóxido

PV+= sangue com parasito vivo

PV- = sangue com parasito inativado

IVM= Ivermectina

CL= Concentração letal

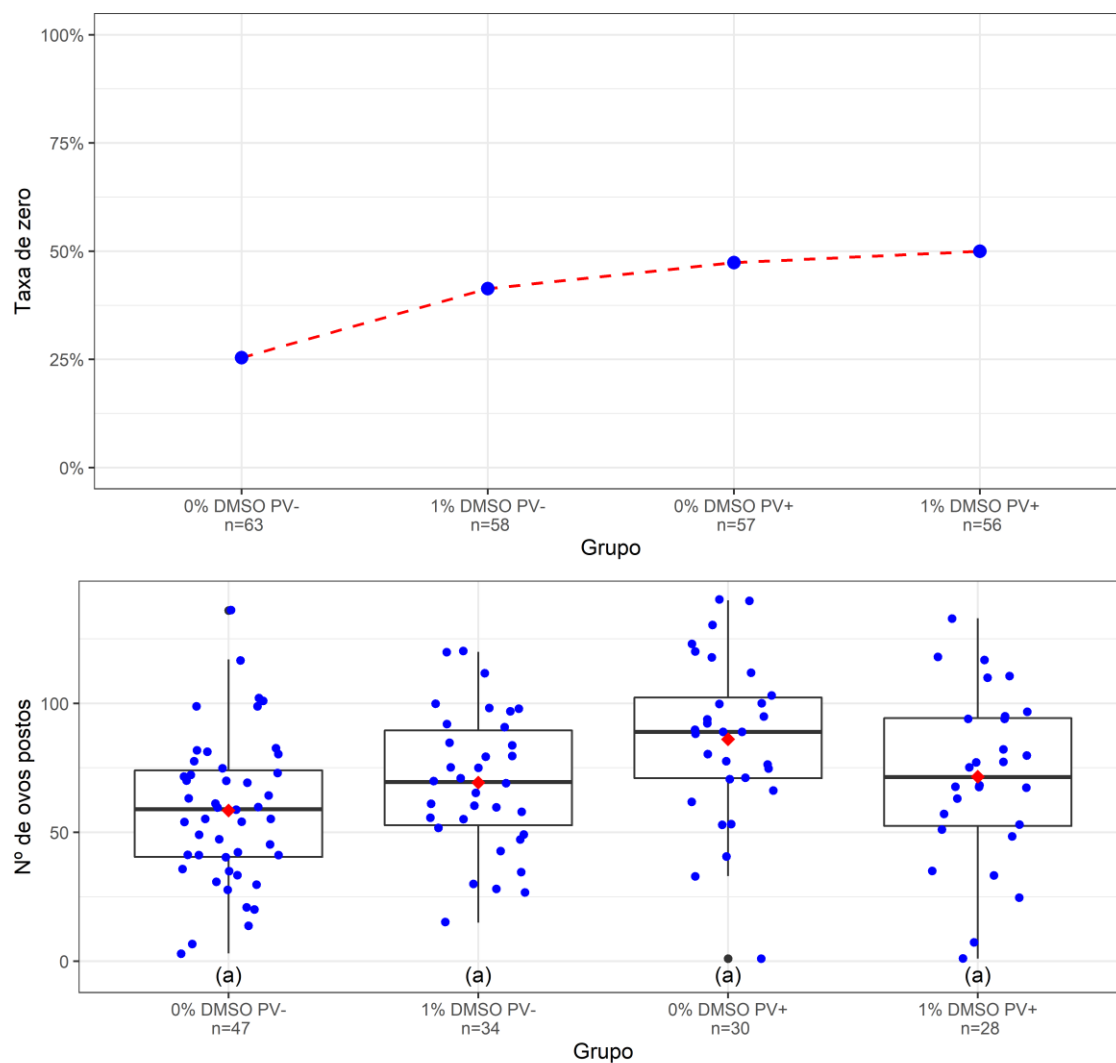
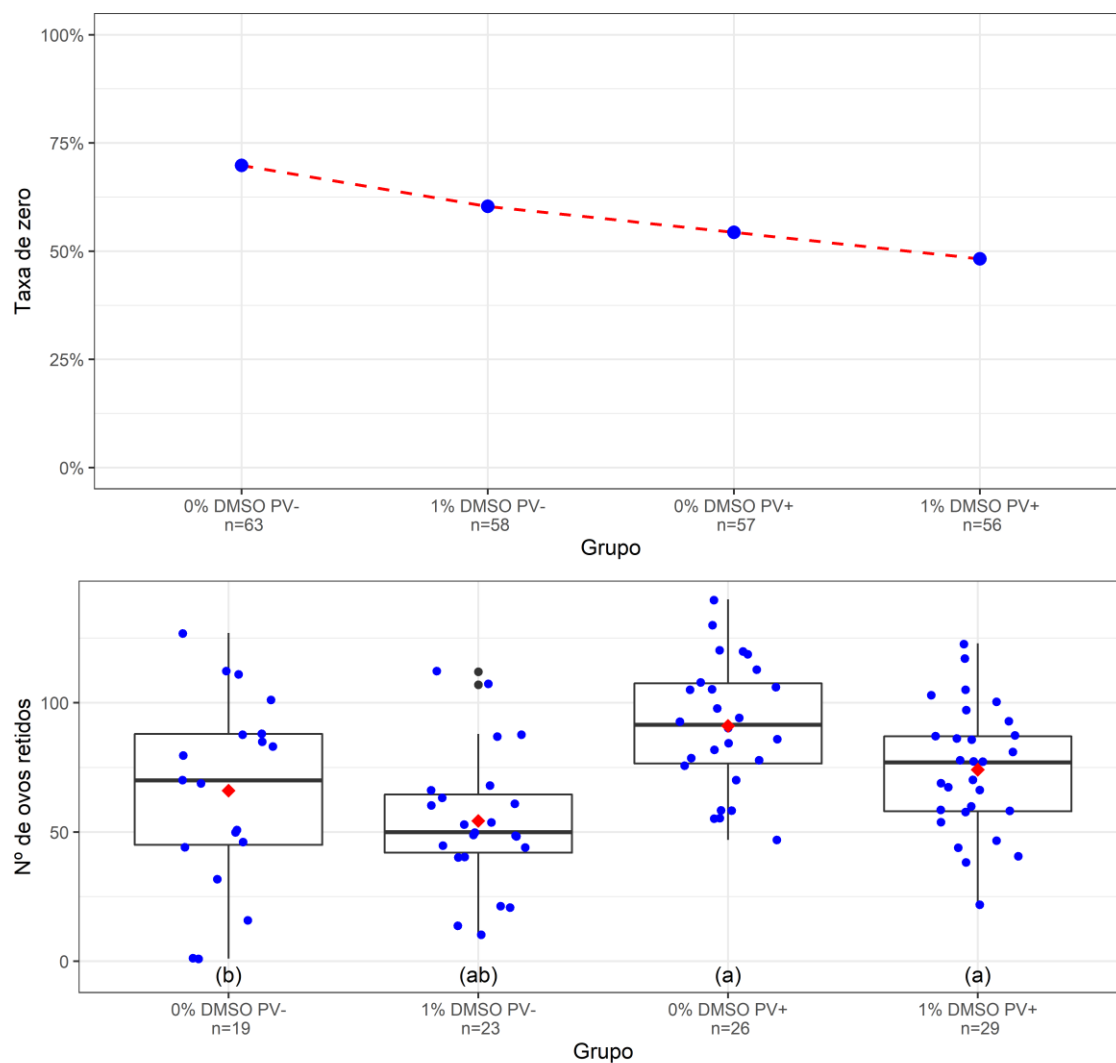


Figura 32. Número de ovos postos por *A. aquasalis* frente as concentrações de 0%DMSOPV-, 1%DMSOPV-, 0%DMSOPV+ e 1%DMSOPV+.

DMSO= Dimetilsulfóxido

PV+= Sangue com parasito vivo

PV- = Sangue com parasito inativado



Nota: Teste de Kruskal-Wallis p-valor = 0,021

Letras distintas diferem ao nível de significância de 0,05

Figura 33. Número de ovos retidos em *A. aquasalis* frente as concentrações de 0%DMSOPV-, 1%DMSOPV-, 0%DMSOPV+ e 1%DMSOPV+.

DMSO= Dimetilsulfóxido

PV+= Sangue com parasito vivo

PV- = Sangue com parasito inativado

Tabela 1 Mediana de ovos postos, retidos e número de oocistos de *A. aquasalis* frente ação de cis-cajuarina B

Grupo	n	Nº.de.Ovos.postos	Mediana	
			Nº.de.Ovos.retidos	Nº.de.Oocistos
1% DMSO PV-	67	48	0	0.0
10 ppm	68	0	31	4.0
1 ppm	65	48	0	7.5
CL 25 IVM	65	7	0	4.0
CL15 IVM	51	5	0	6.0
PV-	61	49	0	0.0
PV+	62	0	59	7.0
Pvalor	-	-	-	< 0,001

Nota: P valor do Teste de Kruskal-Wallis

Durante a repetição de experimentos para essa substância, não houve diferença significativa no número de ovos postos frente as concentrações de 0%DMSOPV+, 1%DMSOPV-, 0%DMSOPV+ e 1%DMSOPV+ (Figura 32).

O número de ovos retidos frente a ação das concentrações 0%DMSOPV-, 1%DMSOPV-, 0%DMSOPV+ e 1%DMSOPV+. Observa-se diferença significativa apenas nas concentrações 0%DMSOPV- e 0%DMSOPV+ (Figura 33).

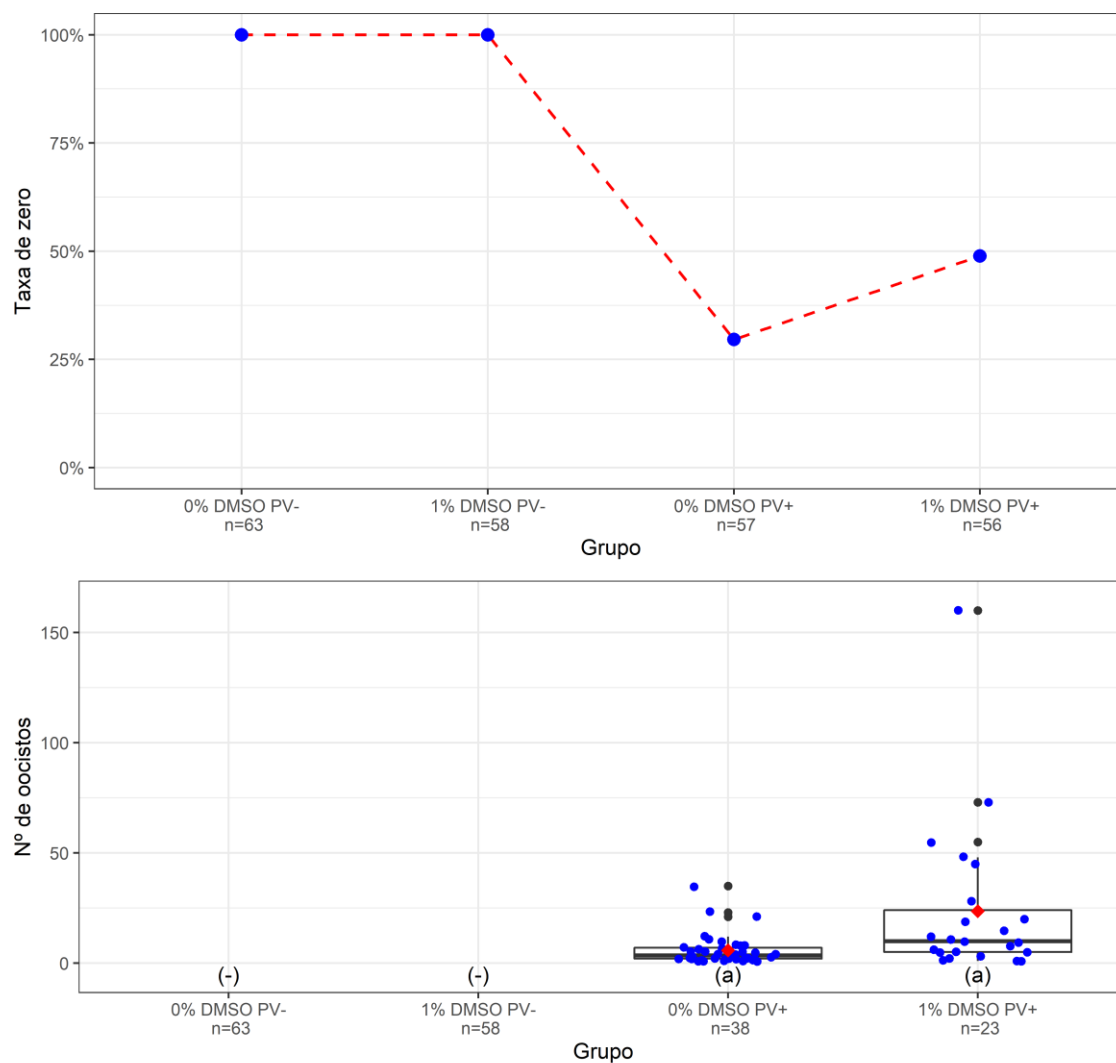
O número de oocistos frente a ação de DMSO não apresentou diferença significativa. Embora, aparentemente a média de oocistos em 1%DMSOPV+ esteja acima de 0%DMSOPV+ (Figura 34).

No número de ovos retidos frente a ação de 1%DMSO/1ppm PV+ e 1%DMSO/10ppmPV+ de cis-cajuarina B, não houve diferença significativa quando se comparam as concentrações. No entanto, há diferença quando se compara 0,03998ppm IVM e 0,04ppm IVM com 1%DMSO/0ppmPV+ (Figura 36).

O número de oocistos varia significativamente quando se comparam as concentrações 1%DMSO/0ppm PV+ e 1%DMSO/1ppmPV+ de cis-cajuarina B. Além disso, diferenciam-se 1%DMSO/1ppmPV+ de 1%DMSO/10ppmPV+, 0,04ppm IVM (CL15) (Figura 37). Essa mesma substância foi testada em *P. falciparum* cepa K1 e foi considerada de atividade moderada *in vitro* por Souza (2016) com CL₅₀ 23,0 µg/mL.

Neste estudo, o número de ovos postos por *A. aquasalis*, ao se testar extrato aquoso de *G. argenteum* nas concentrações (PV-, 1%H₂OPV-, PV+ e 1%H₂OPV+) os valores não diferiram significativamente entre as quatro concentrações testadas. Embora, aparentemente as médias de ovos postos tenham variadas nessas concentrações (Figura 38).

O número de ovos retidos (Figura 39) nessas mesmas concentrações do extrato da casca diferiu significativamente entre as concentrações PV- e 1%H₂OPV-. Porém, essas concentrações não diferem de PV+ e 1%H₂O PV+. Além disso, as médias de ovos variaram e encontram-se abaixo de 100 e próximas uma da outra, principalmente entre PV, 1%H₂O PV- e PV+.



Nota: Teste de Kruskal-Wallis p-valor 1

Letras distintas diferem ao nível de significancia de 0,05

Figura 34. Número de oocistos frente a ação de DMSO nas concentrações 0%DMSOPV-, 1%DMSOPV-, 0%DMSOPV+ e 1%DMSOPV+.

DMSO= Dimetilsulfóxido

PV+= Sangue com parasito vivo

PV- = Sangue com parasito inativado

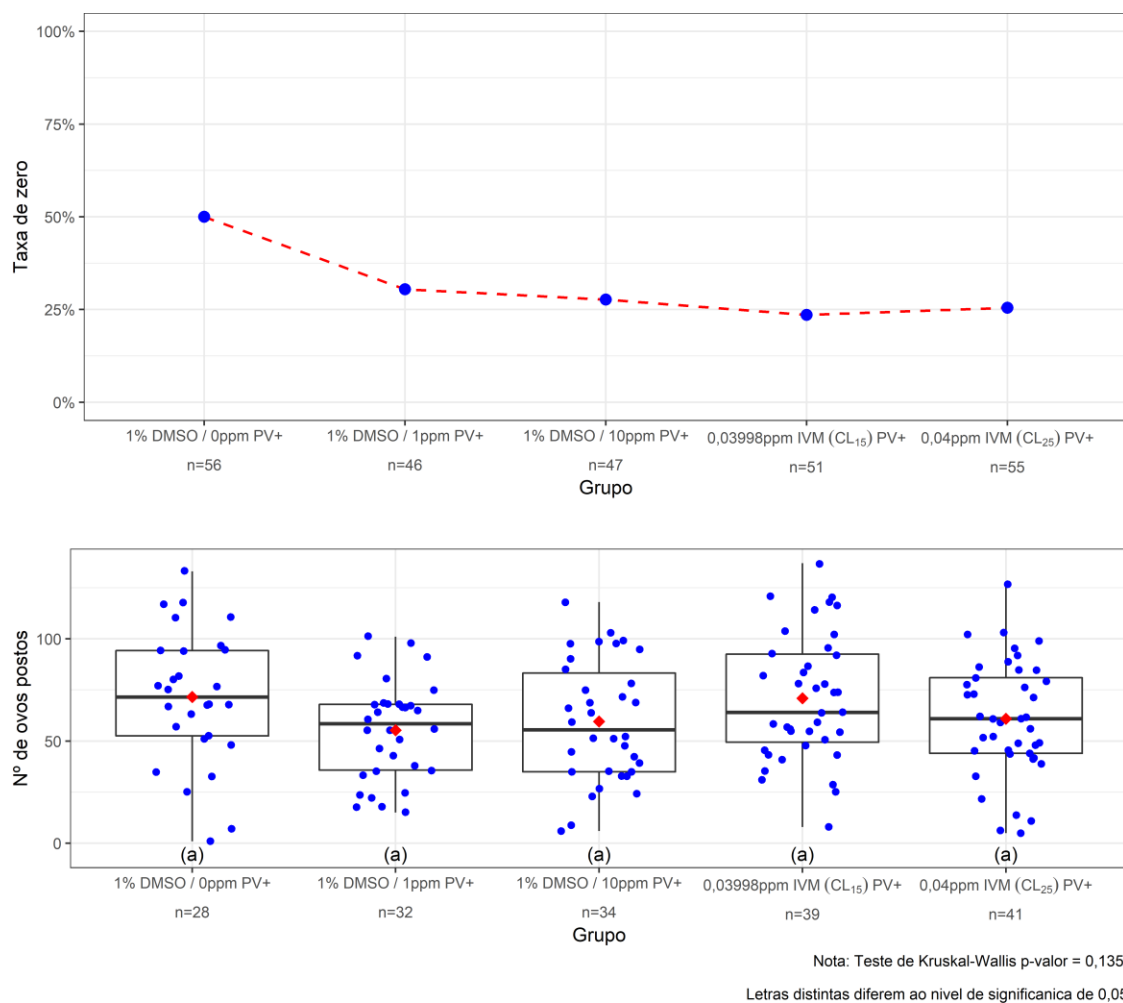


Figura 35. Número de ovos postos frente a ação de DMSO nas concentrações 1%DMSOPV+, 1%DMSO/1ppmPV+ de cis-cajucarina B, 1%DMSO/10ppmPV+ de cis-cajucarina B, 0,03998ppmIVMPV+ e 0,04ppmPV+ (CL₁₅ e CL₂₅, respectivamente).

Dimetilsulfóxido= DMSO

PV+= sangue com parasito vivo

PV- = sangue com parasito inativado

IVM= Ivermectina

CL= Concentração letal

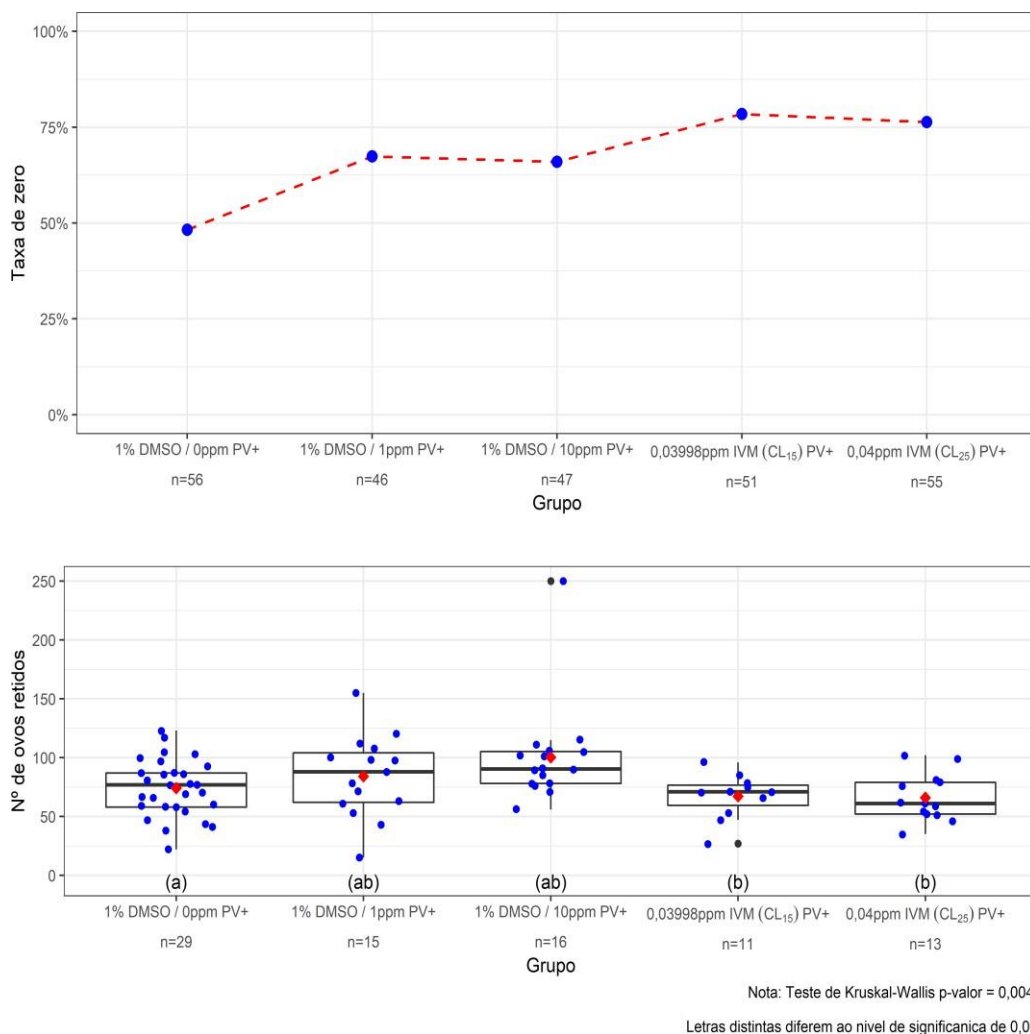


Figura 36. Número de ovos retidos frente a ação de 1%DMSO/0ppm PV+, 1%DMSO/1ppmPV+ de cis-cajucarina B, e 1%DMSO/10ppmPV+ de cis-cajucarina B, 0,03998 IVM e 0,04ppm IVM (CL₁₅ e CL₂₅, respectivamente).

Dimetilsulfóxido= DMSO

PV+= sangue com parasito vivo

PV- = sangue com parasito inativado

IVM= Ivermectina

CL= Concentração letal

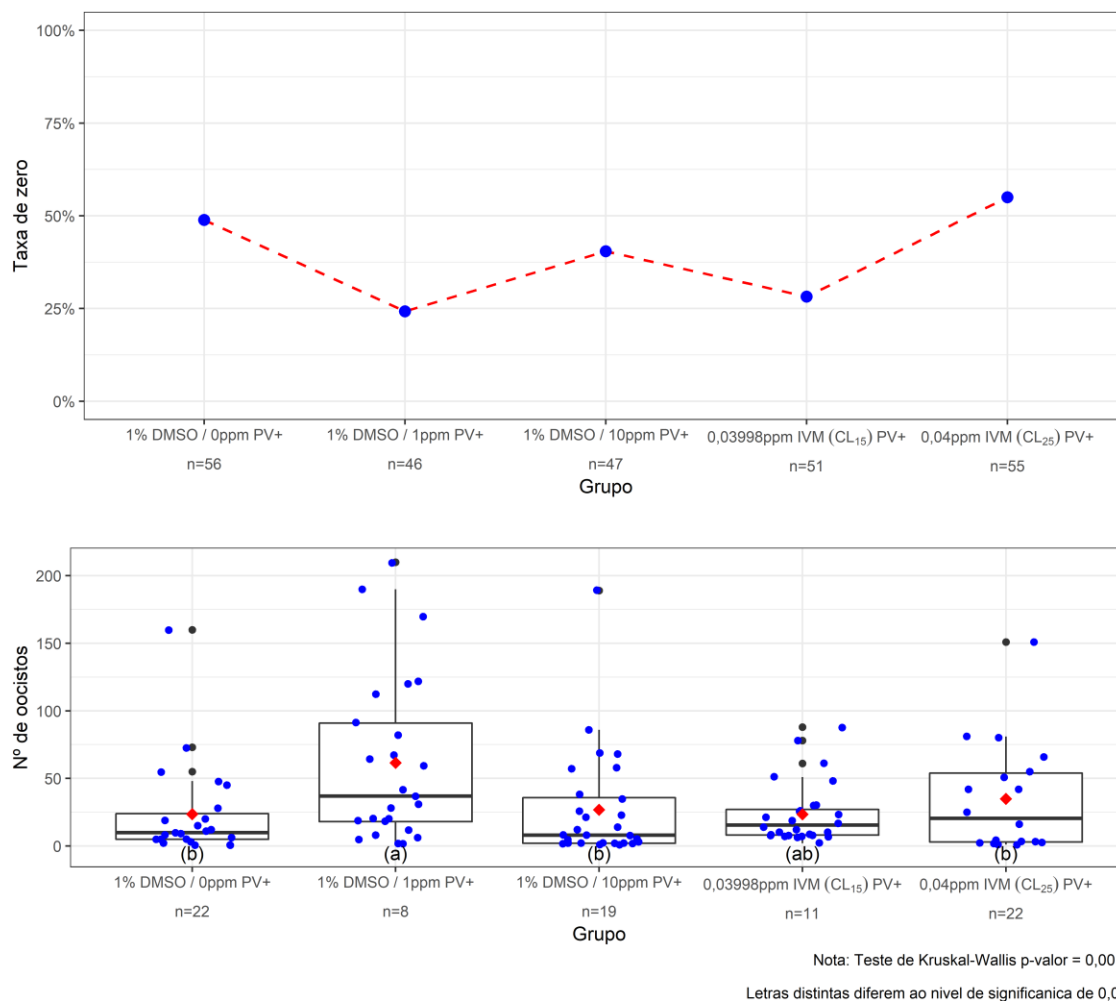


Figura 37. Número de oocistos no intestino de *A. aquasalis* frente as concentrações de 1%DMSO/0ppmPV+, 1%DMSO/1ppmPV+ de cis-cajucarina B, 1%DMSO/10ppmPV+ de cis-cajucarina B, 0,03998ppm IVM e 0,04ppm IVM (CL₁₅ e CL₂₅ de ivermectina), respectivamente.

Dimetilsulfóxido= DMSO

PV+= sangue com parasito vivo

PV- = sangue com parasito inativado

IVM= Ivermectina

CL= Concentração letal

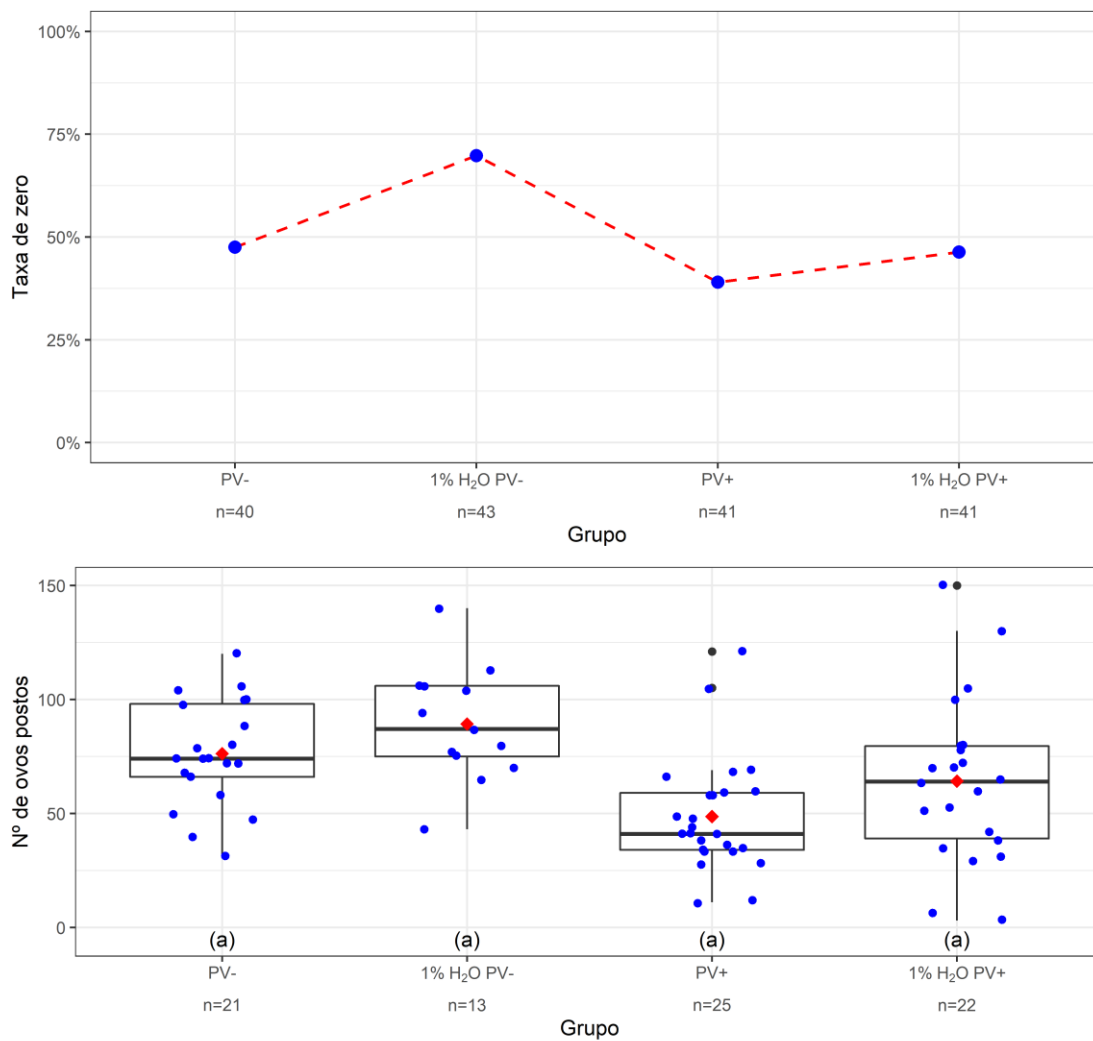


Figura 38. Número de ovos postos por *An. aquasalis*, nas concentrações (PV-, 1%H₂OPV, PV+ e 1% e1%H₂OPV+) do experimento com extrato aquoso da casca de *Geissospermum argenteum*.

PV- = Sangue com parasito inativado

PV+ = Sangue com parasito vivo

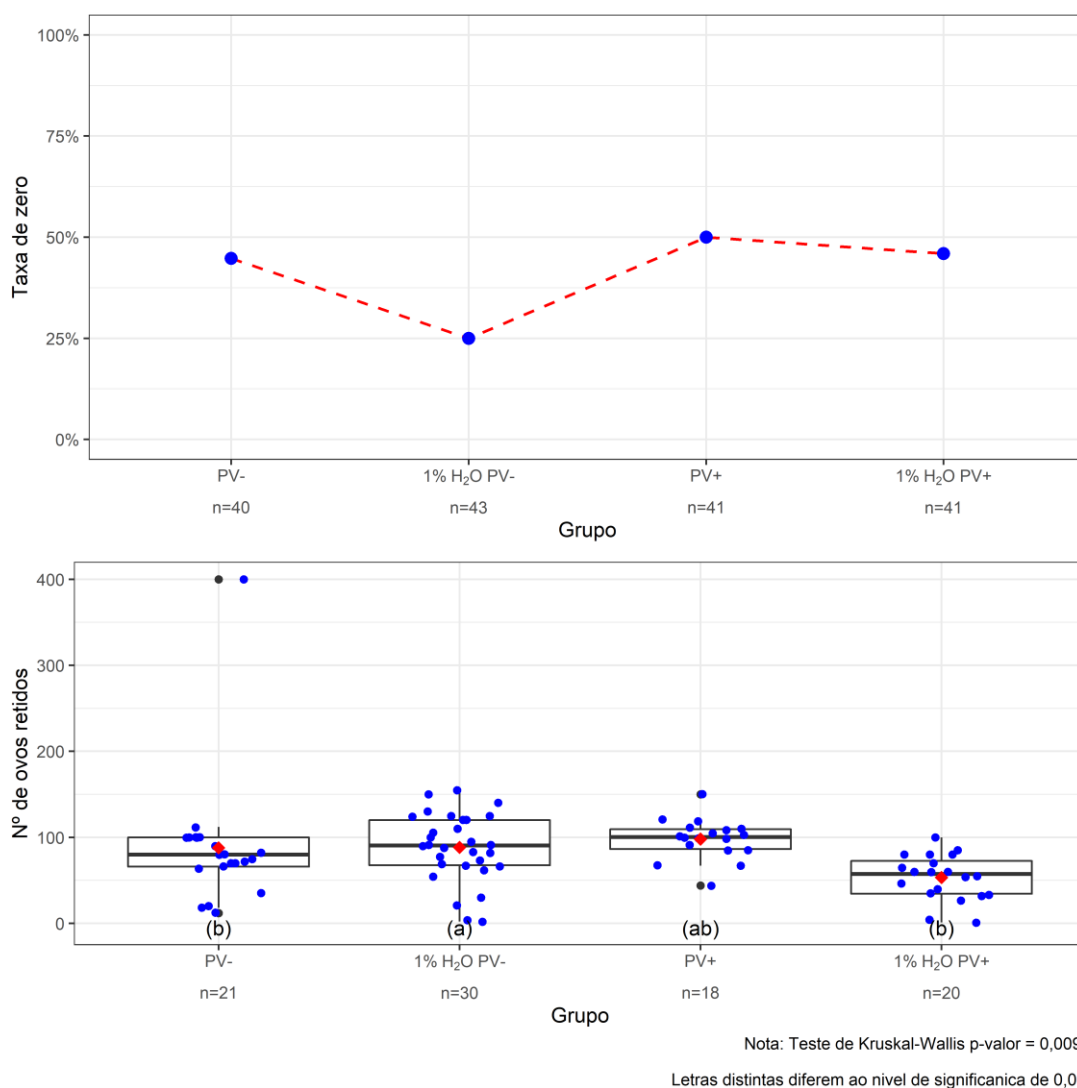


Figura 39. Número de ovos retidos em *A. aquasalis*, nas concentrações (PV-, 1%H₂O PV-, PV+ e 1%H₂O PV+) do experimento com extrato aquoso da casca de *Geissospermum argenteum*.
PV- = Sangue com parasito inativado
PV+ = Sangue com parasito vivo

O número de oocistos presentes no intestino de *A. aquasalis* nas concentrações controles (PV-, 1%H₂O PV-, PV+ e 1% e 1%H₂O PV+) (Figura 40) com extrato aquoso da casca de *Geissospermum argenteum*, difere significativamente entre as concentrações PV+ e 1%H₂O PV+ quando comparadas as concentrações em que o parasito encontra-se inativado (PV- e 1%H₂O PV-). Além disso, as médias das concentrações que diferem significativamente encontram-se abaixo de 10.

O número de ovos postos (Figura 41) por *A. aquasalis*, sob ação do extrato da casca de *Geissospermum argenteum*, nas concentrações (100ppmPV+ e 1000ppmPV+) difere significativamente entre essas duas concentrações. Porém, quando a concentração 100ppmPV+ do extrato é comparada com 0ppm PV+, 0,03998ppm de IVM PV+ e 0,04ppm de IVM PV+ (CL₁₅ e CL₂₅ de ivermectina, respectivamente) que é a droga de referência, não se observa diferença significativa entre as mesmas. Entretanto, a concentração de 1000ppmPV+ do referido extrato, não apresenta diferença significativa quando comparada com 0ppm PV+ e 0,04ppm de IVM PV+ (CL₂₅ de ivermectina), mas difere significativamente da concentração de 0,03998ppm de IVM PV+ (CL₁₅ de ivermectina). Embora, as médias possam ter variadas entre as concentrações 0ppm PV+ e 100ppmPV+. Nas concentrações de 1000ppmPV+, 0,03998ppm de IVM PV+ e 0,04ppm de IVM PV+ (CL₁₅ e CL₂₅ de ivermectina, respectivamente) as médias foram semelhantes, indicando provável ação da concentração de 1000ppmPV+ do extrato semelhante a ação das concentrações letais (CLs) de ivermectina usadas nesse estudo sobre a ovipostura individual de *An. aquasalis*.

O número de ovos retidos (Figura 42) em *A. aquasalis*, sob ação do extrato da casca de *Geissospermum argenteum*, nas concentrações (100ppmPV+ e 1000ppmPV+) não difere significativamente entre essas duas concentrações. Além disso, a concentração de 100ppm PV+ do extrato também não difere das concentrações 0ppmPV+, 0,03998ppm de IVM PV+ e 0,04ppm de IVM PV+ (CL₁₅ e CL₂₅ de ivermectina, respectivamente). Mas, a concentração de 1000ppmPV+ difere significativamente de 0,04ppm de IVM PV+ (CL₂₅ de ivermectina). Embora, não se observe diferença significativa entre 1000ppmPV+ 0ppmPV+ e 0,03998ppm de IVM PV+ (CL₁₅ de ivermectina).

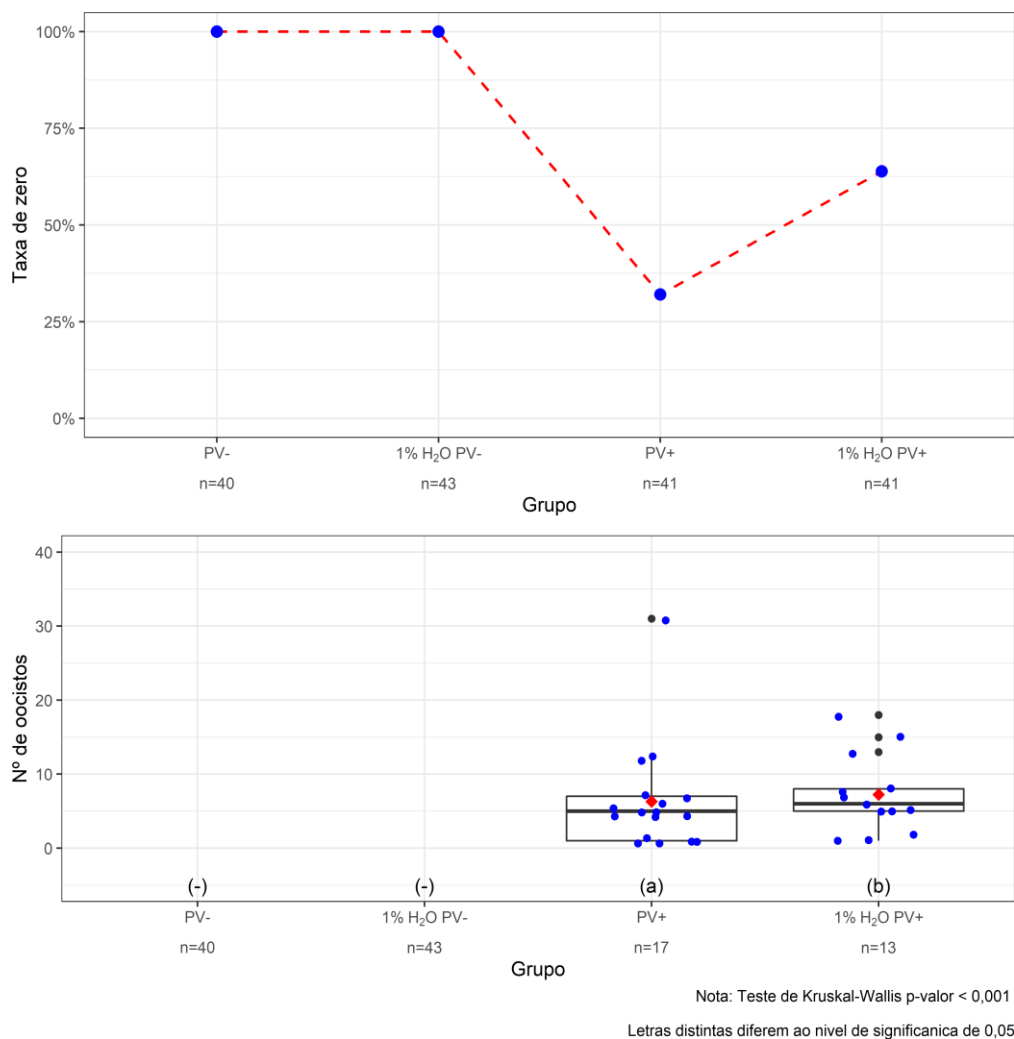


Figura 40. Número de oocistos presentes no intestino de *A. aquasalis* nas concentrações controles (PV-, 1% H₂O PV-, PV+ e 1% H₂O PV+)
 PV- = Sangue com parasito inativado
 PV+ = Sangue com parasito vivo

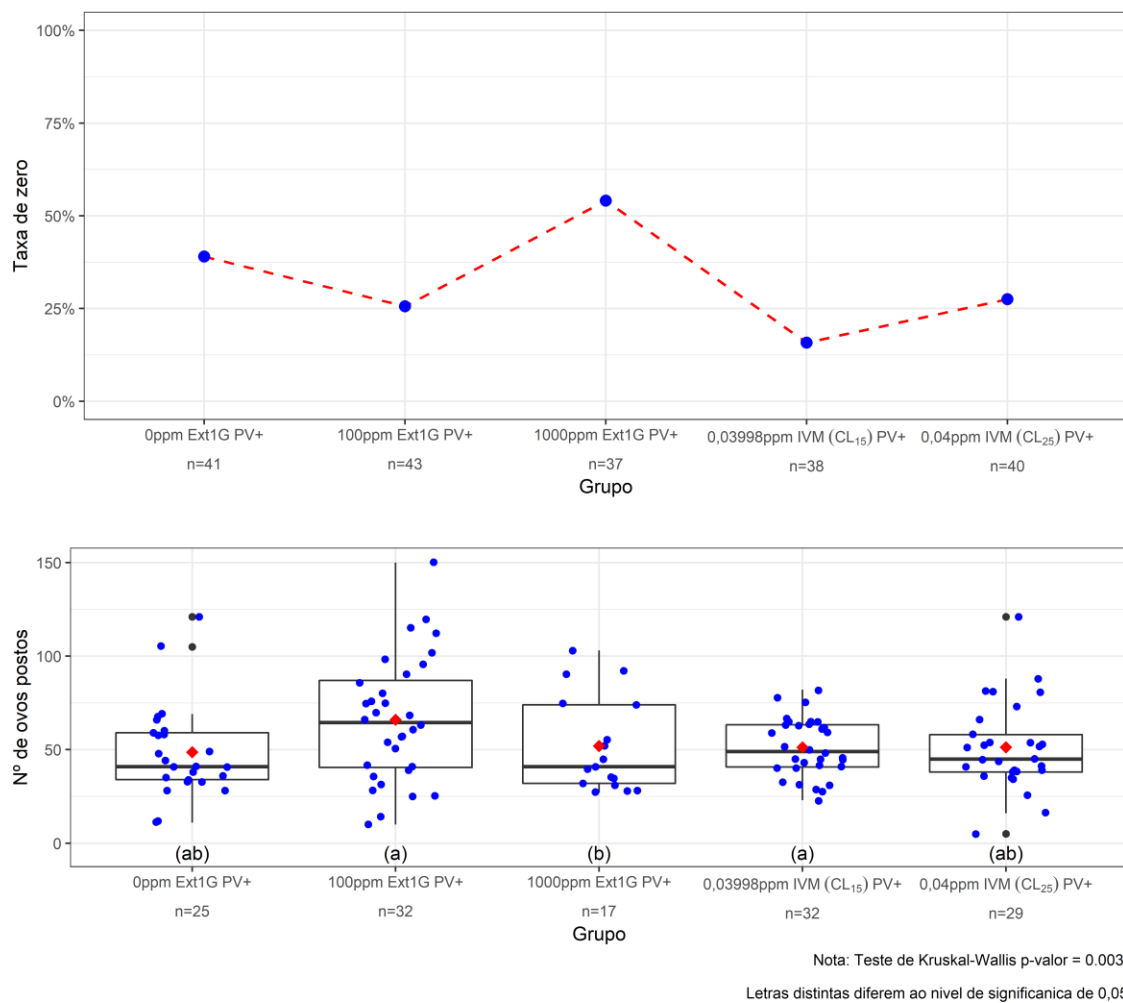


Figura 41. Número de ovos postos por *A. aquasalis*, sob ação do extrato da casca de *Geissospermum argenteum*, nas concentrações 0ppmExtGPV+, 100ppmExtGPV+ e 1000ppmExtGPV+, 0,03998ppm IVM, 0,04ppm IVM (CL₁₅ e CL₂₅ de ivermectina, respectivamente).

PV+ = Sangue com parasito vivo

Ext1G= Extrato da casca de *G. argenteum*

IVM= Ivermectina

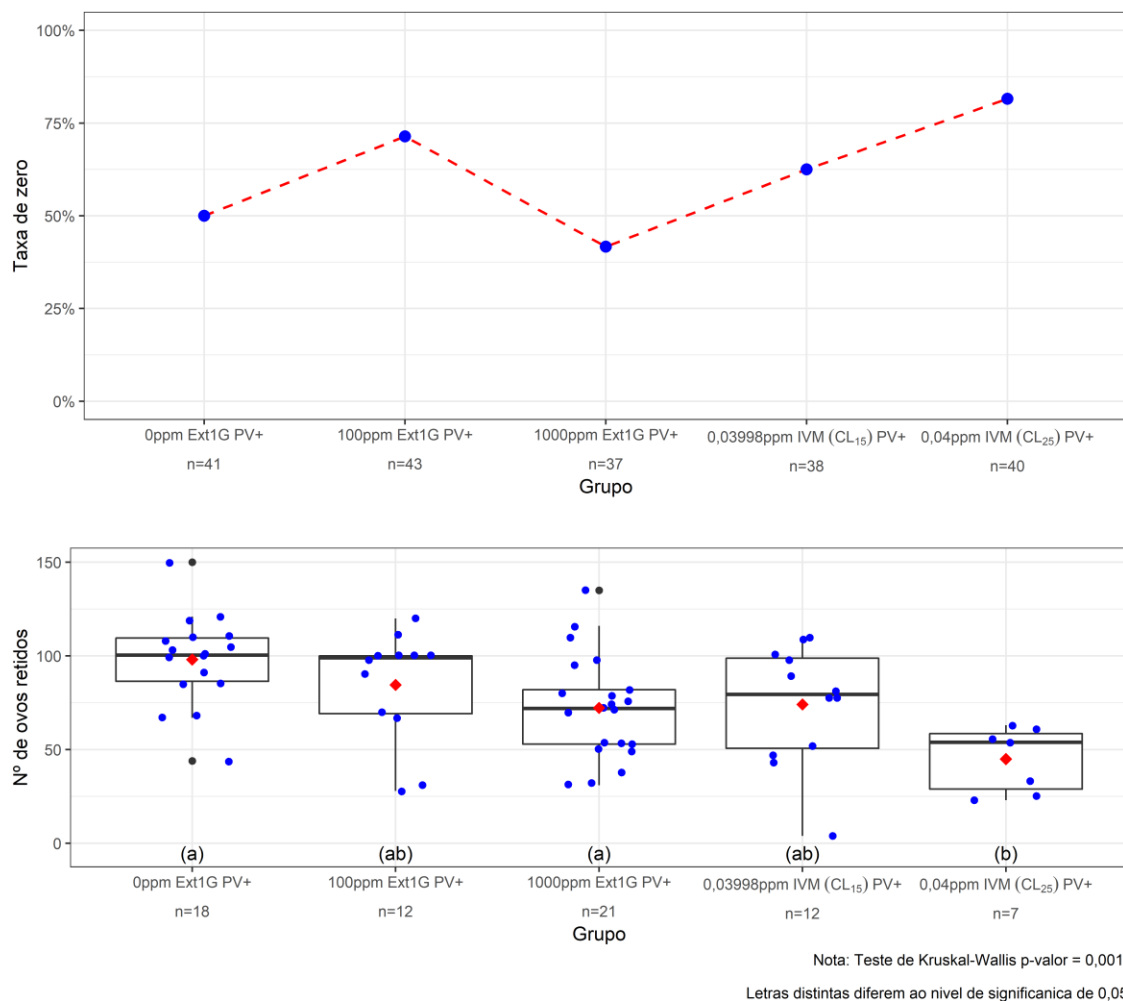


Figura 42. Número de ovos retidos em *A. aquasalis*, sob ação do extrato da casca de *Geissospermum argenteum*, nas concentrações 0ppmPV+, 100ppmExtGPV+, 1000ppmExtPV+, 0,03998ppm de IVM PV+ e 0,04ppm de IVM PV+ (CL15 e CL25 de ivermectina, respectivamente).
PV+ = Sangue com parasito vivo
Ext1G = Extrato da casca de *G. argenteum*
IVM= Ivermectina

O número de ovos postos (Figura 43) por *A. aquasalis*, nas concentrações controles (PV-, 1%H₂OPV- e 1%H₂OPV+) difere significativamente. Porém, PV- e 1%H₂OPV- não se diferem significativamente com a concentração de PV+. Entretanto, as concentrações PV+ e 1%H₂OPV+ se diferem quando são comparadas.

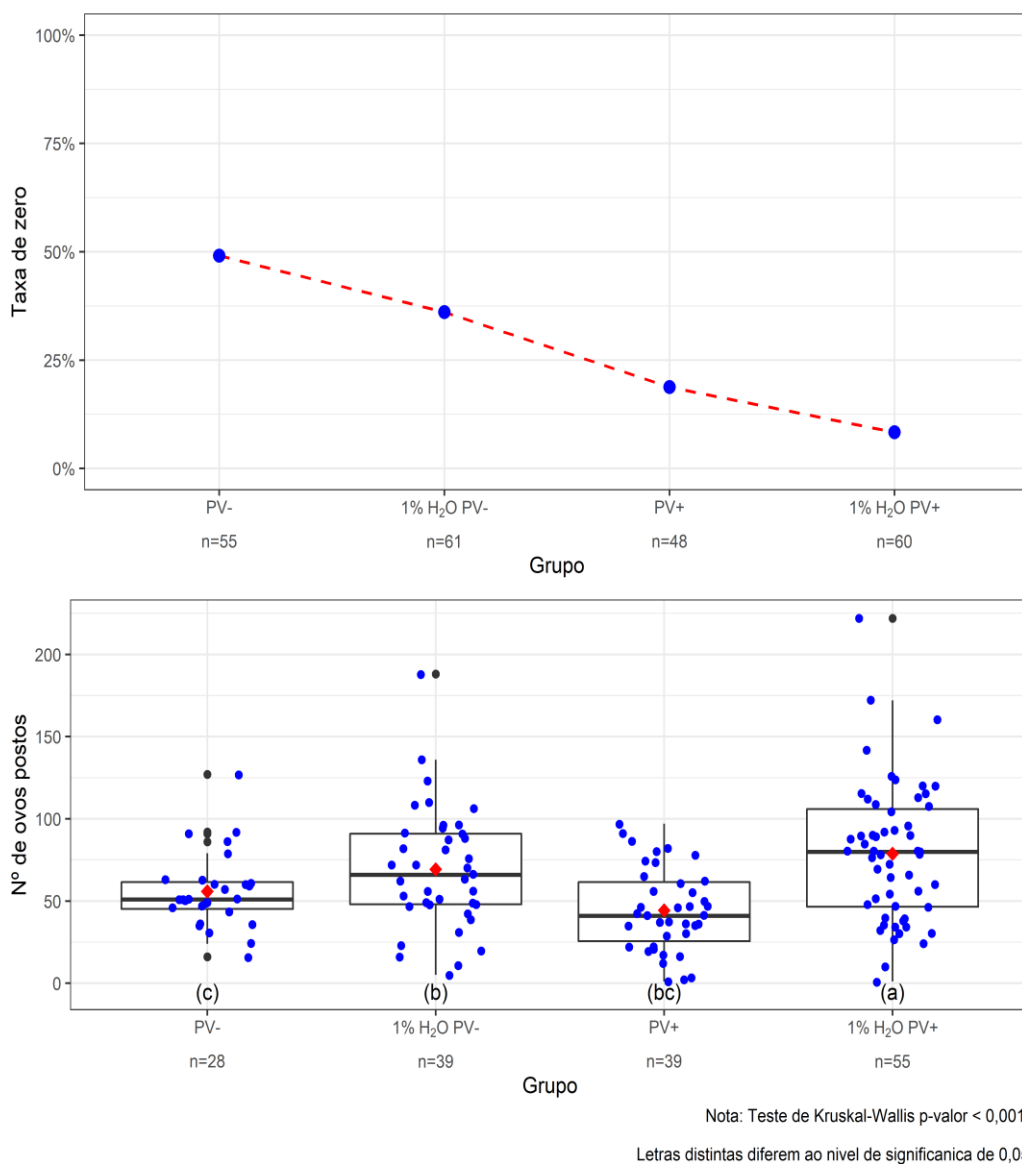


Figura 43. Número de ovos postos por *A. aquasalis*, nas concentrações controles (PV-, 1%H₂OPV- PV+ e 1%H₂OPV+).

PV- = Sangue com parasito inativado

PV+ = Sangue com parasito vivo

O número de ovos retidos (Figura 44) em *A. aquasalis*, nas concentrações controles (PV-, 1%H₂OPV-) não difere significativamente entre essas duas concentrações, mas diferem das concentrações PV+ e 1%H₂OPV+. Além disso, não existe diferença significativa entre as concentrações PV+ e 1%H₂OPV+.

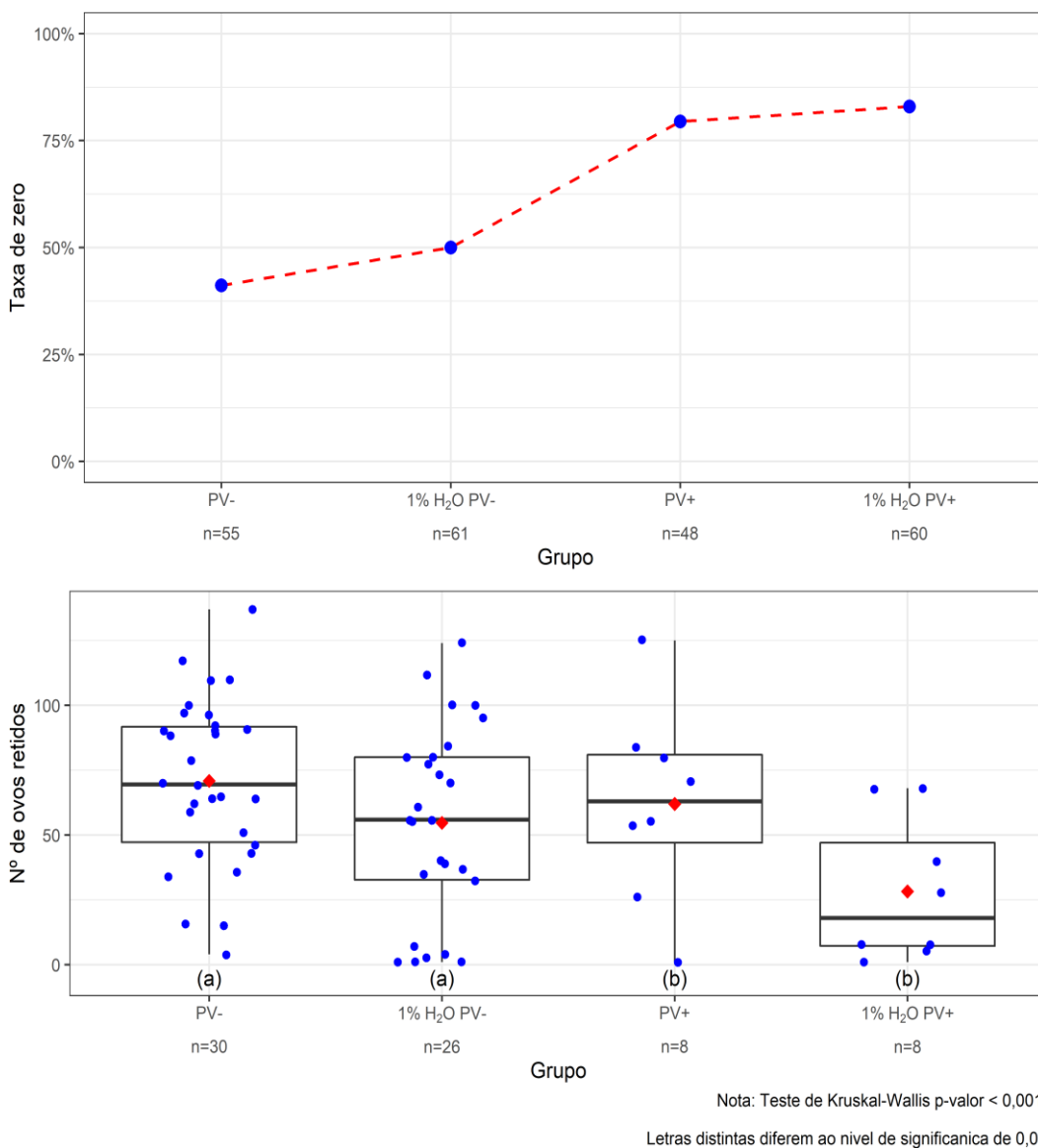
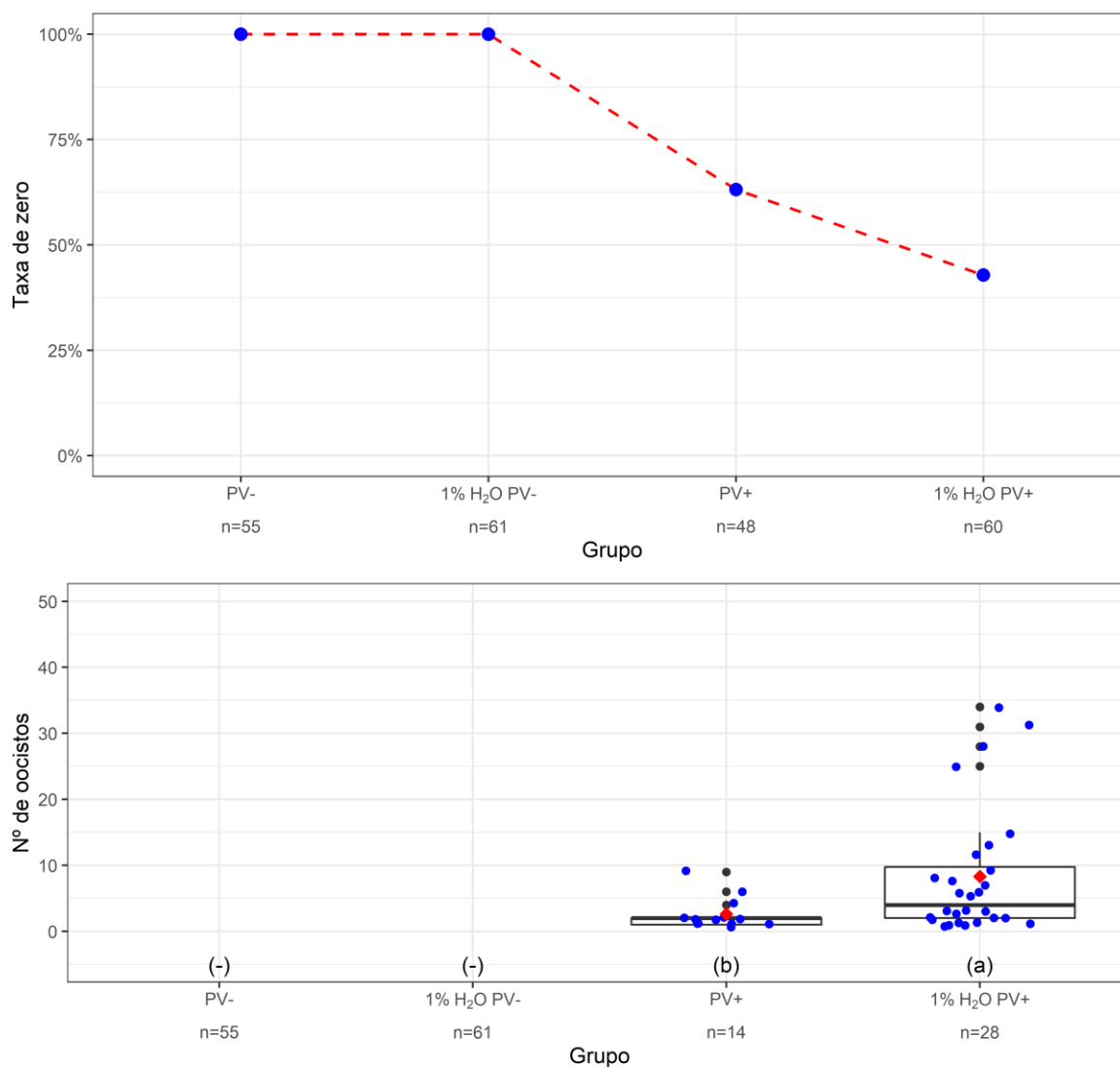


Figura 44. Número de ovos retidos em *A. aquasalis*, nas concentrações PV-, 1%H₂OPV-, PV+ e 1%H₂OPV+. PV+ = Sangue com parasito vivo
PV- = sangue com parasito inativado

O número de oocistos (Figura 45) presentes no intestino de *A. aquasalis* nas concentrações PV-, 1%H₂OPV-, PV+ e 1%H₂OPV+. Varia significativamente entre PV+ e 1%H₂OPV+.



Nota: Teste de Kruskal-Wallis p-valor < 0,001

Letras distintas diferem ao nível de significância de 0,05

Figura 45. Número de oocistos presentes no intestino de *A. aquasalis* nas concentrações PV, 1%H₂O PV-, PV+ e 1% e 1%H₂O PV+.

PV+ = Sangue com parasito vivo

PV- = Sangue com parasito inativado

O número de ovos postos (Figura 46) por *A. aquasalis*, sob ação do extrato do galho de *Geissospermum argenteum*, nas concentrações (0ppmPV+, 100ppmPV+, 1000ppmPV+, 0,03998ppmPV+, 0,04ppm de IVM PV) não diferiu significativamente quando comparado entre as concentrações testadas. Ficando a média de ovos postos abaixo de 200.

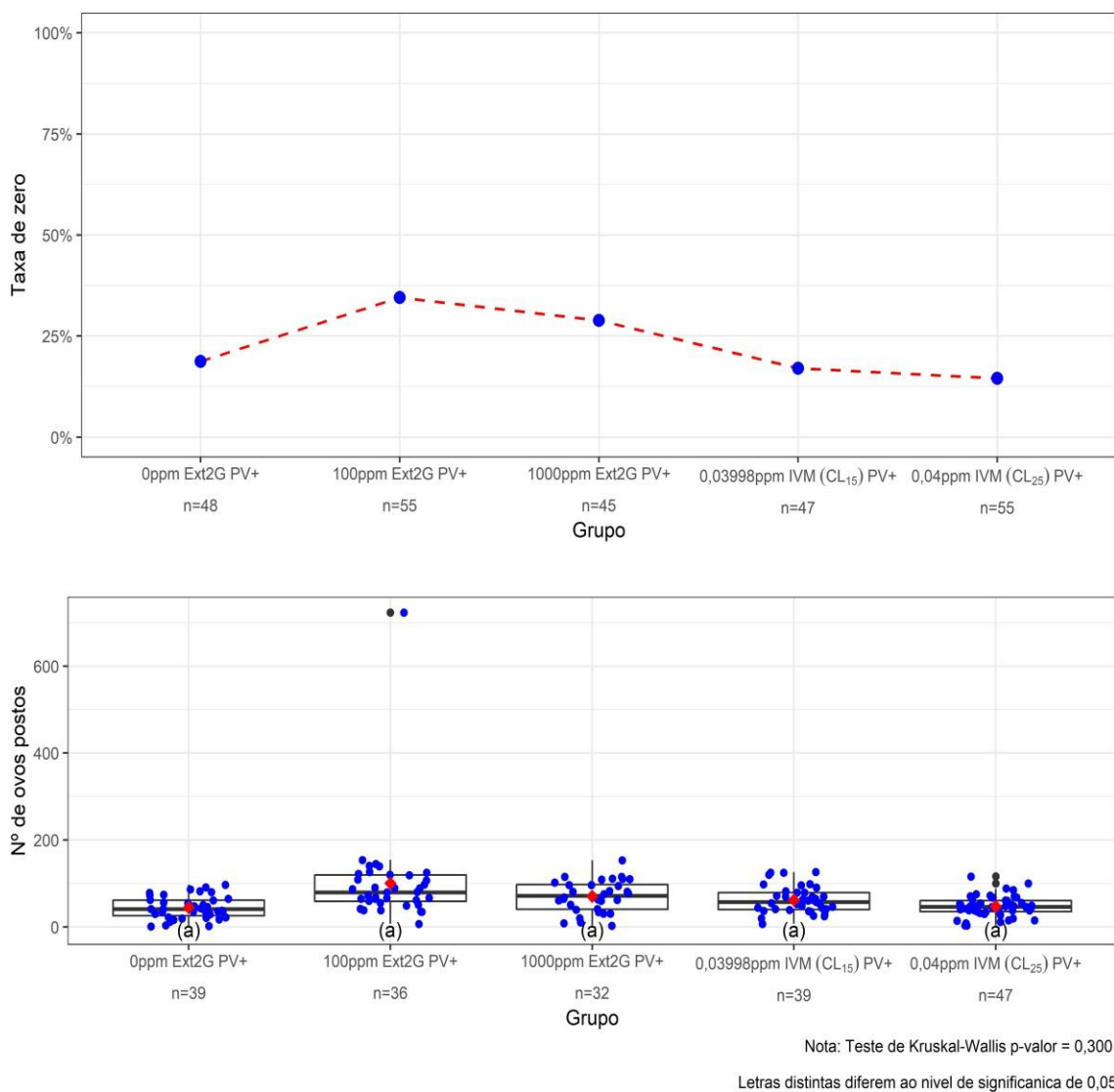


Figura 46. Número de ovos postos por *A. aquasalis*, sob ação do extrato do galho de *Geissospermum argenteum*, nas concentrações (0ppmPV+, 100ppmPV+, 1000ppmPV+, 0,03998ppmPV+, 0,04ppm de IVM PV).

PV+ = Sangue com parasito vivo

IVM = Ivermectina

Ext2G = Extrato do galho de *G. argenteum*

O número de ovos retidos (Figura 47) em *A. aquasalis*, sob ação do extrato do galho de *Geissospermum argenteum*, nas concentrações (0%PV+, 100ppmPV+, 1000ppmPV+, 0,03998ppm de IVM PV+ e 0,04ppm de IVM PV+ (ivermectina, respectivamente) não houve diferença significativa entre as concentrações testadas. Embora, tenha variação nas médias.

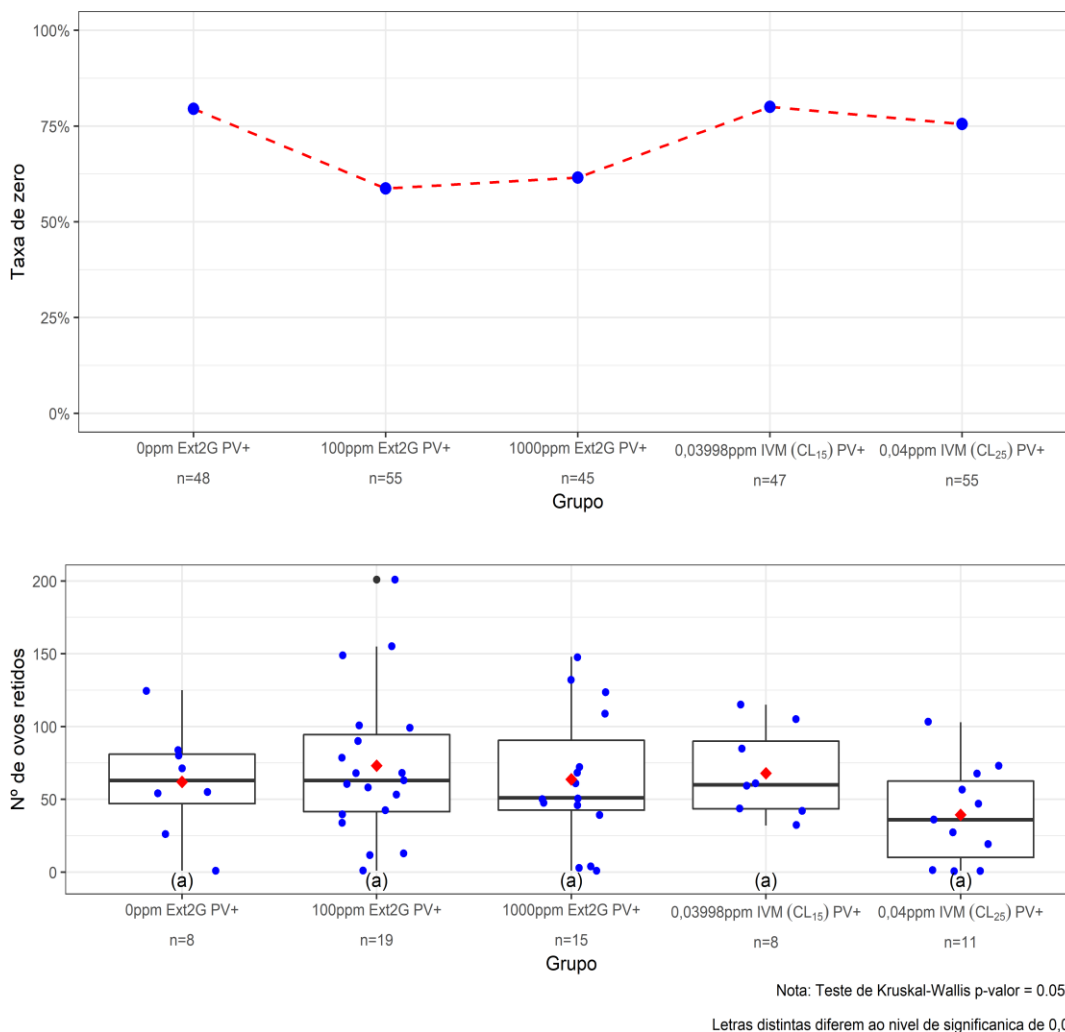


Figura 47. O número de ovos retidos em *A. aquasalis*, sob ação do extrato do galho de *Geissospermum argenteum*, nas concentrações 0%PV+, 100ppmPV+, 1000ppmPV+, 0,03998ppm de IVM PV+ e 0,04ppm de IVM PV+ (ivermectina, respectivamente).

PV+ = Sangue com parasito vivo

IVM = Ivermectina

Ext2G = Extrato do galho de *G. argenteum*

Não houve diferença significativa no número de oocistos com o uso do extrato da casca (Figura 48) de *Geissospermum argenteum* entre as concentrações 0ppmPV+, 100ppmPV+, 1000ppmPV+, 0,03998ppmPV+ e 0,04ppmPV+ (CL₁₅ e CL₂₅, respectivamente).

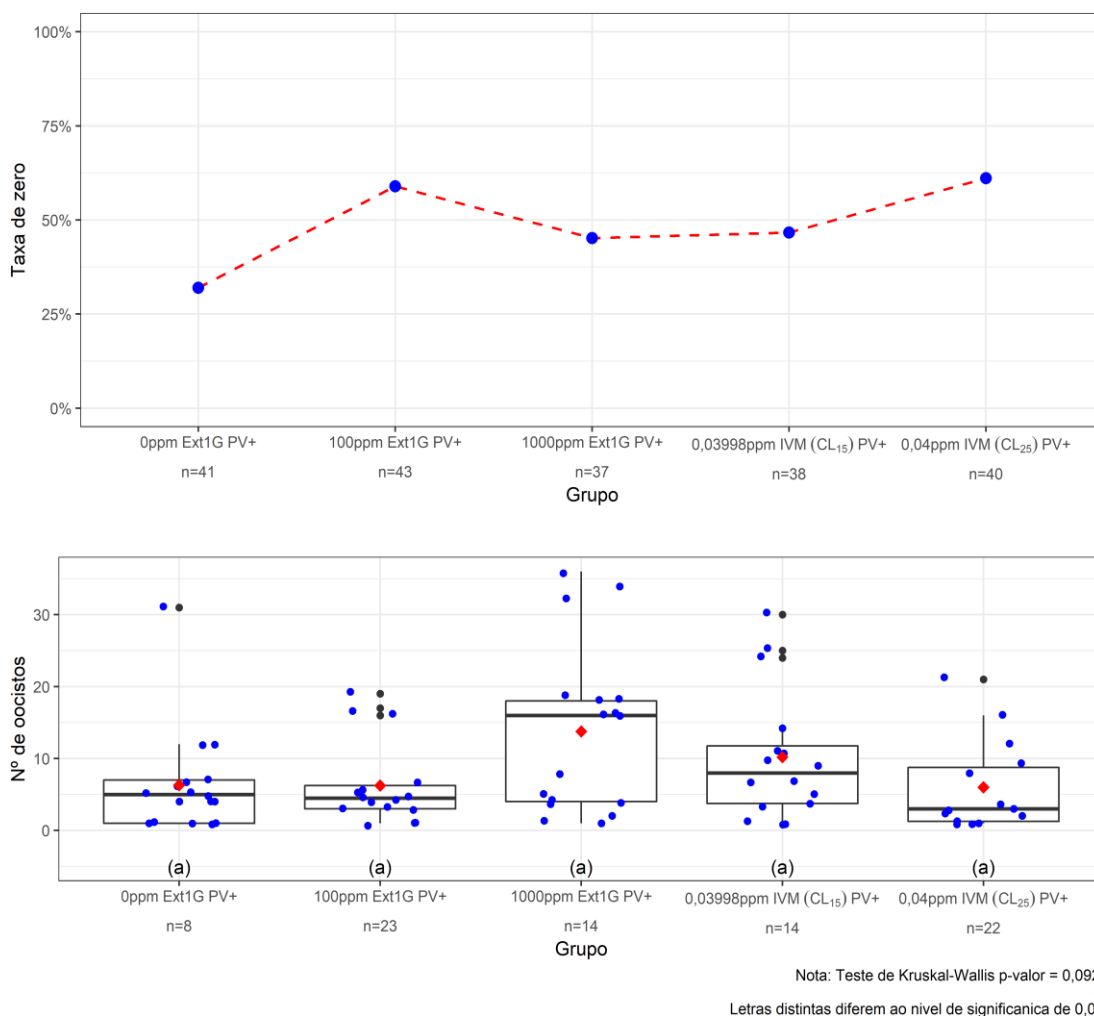


Figura 48. Número de oocistos com o uso do extrato da casca de *Geissospermum argenteum* nas concentrações 0ppmPV+, 100ppmPV+, 1000ppmPV+, 0,03998ppm IVM PV+ e 0,04ppm IVM PV+ (CL₁₅ e CL₂₅, respectivamente).

PV+ = Sangue com parasito vivo

CL = Concentração letal

IVM = Ivermectina

Não houve diferença significativa entre as concentrações 0ppmPV+, 100ppmPV+, 0,03998ppmPV+ e 0,04ppmPV+ (CL₁₅ e CL₂₅, respectivamente) (Figura 49) durante o ensaio com extrato do galho de *Geissospermum argenteum*. Entretanto, observa-se diferença significativa na concentração de 1000ppmPV+ do extrato quando comparada as outras quatro concentrações testadas.

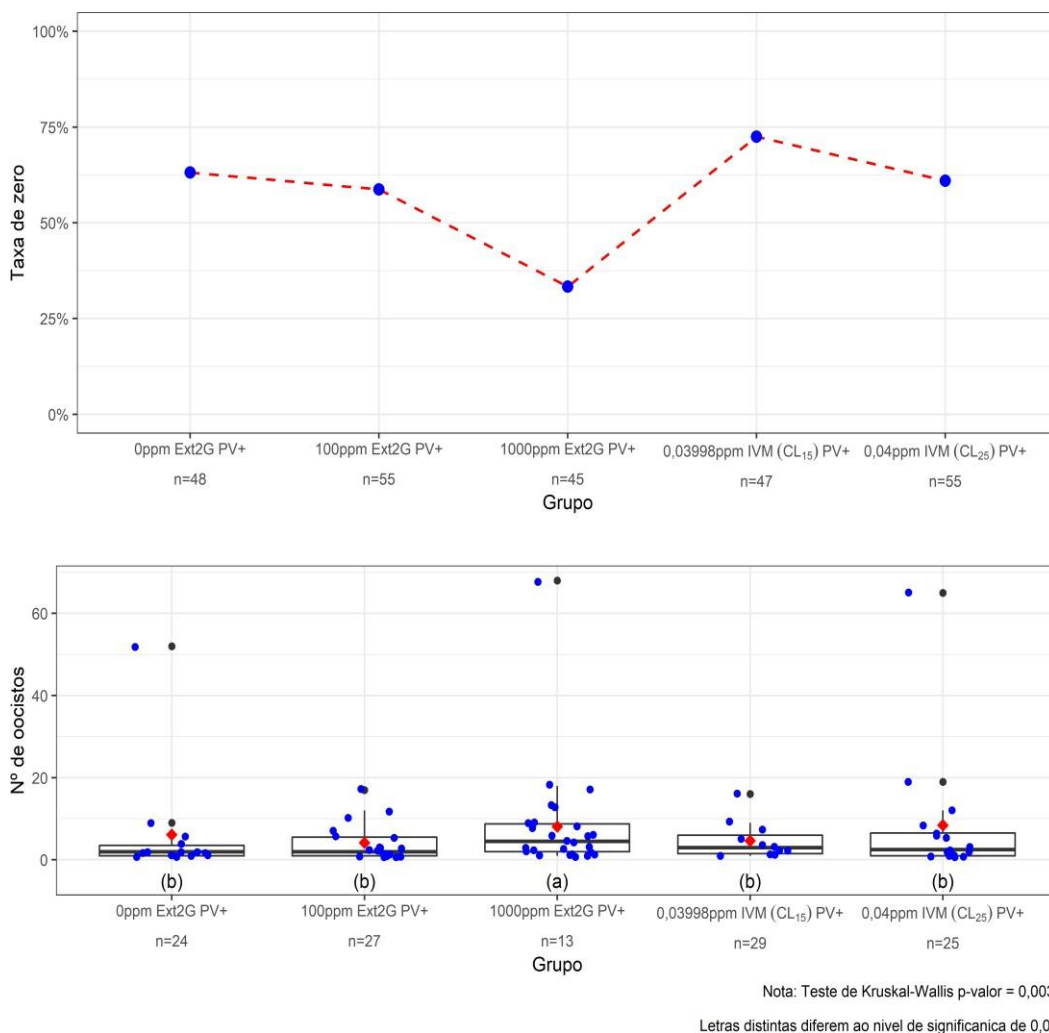


Figura 49. Número de oocistos no intestino de *A. aquasalis* sob ação de 0ppm Ext2GPV+, 100ppmExt2GPV+, 1000ppmExt2GPV+, 003998ppm IVM e 0,04ppm IVM (CL₁₅ e CL₂₅ de ivermectina respectivamente).

PV+ = Sangue com parasito vivo

Ext2G = Extrato do galho de *G. argenteum*

IVM = Ivermectina

CL = Concentração letal

4.6 Sobrevivência de *A. aquasalis* com sangue infectado com *P. vivax* e inativado

Durante as nossas observações da sobrevivência de *A. aquasalis* que ingeriram sangue parasitado e sangue com parasito inativado em oito replicatas, não houve diferença na taxa de sobrevivência, apresentando como valores de P: 0,0995 (Figura 50), 0,1615, 0,3442, 0,3607, 0,3442, 0,3442, 0,6107, 0,0689, 0,1415. Porém, em alguns momentos essa situação foi diferente apresentando diferença significativa com valor de P: 0,0045 (Figura 51), 0,0193, 0,0003, <0,0001.

Sobrevivência de *A. aquasalis* infectado com *P. vivax* (PV+) e *P. vivax* inativado PV-.

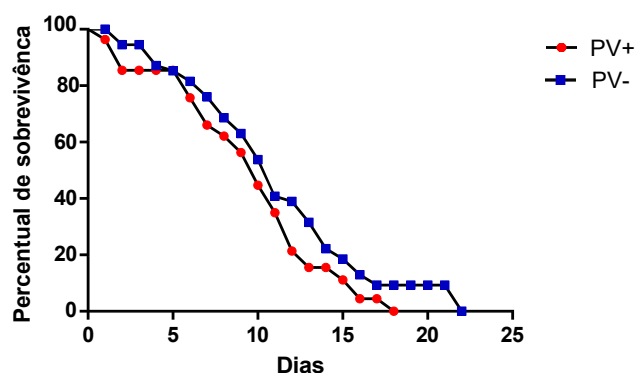


Figura 50. Sobrevivência de *A. aquasalis* frente ao sangue infectado e com parasito inativado

Sobrevivência de *A. aquasalis* infectado com *P. vivax* (PV+) e com *P. vivax* inativado (PV-).

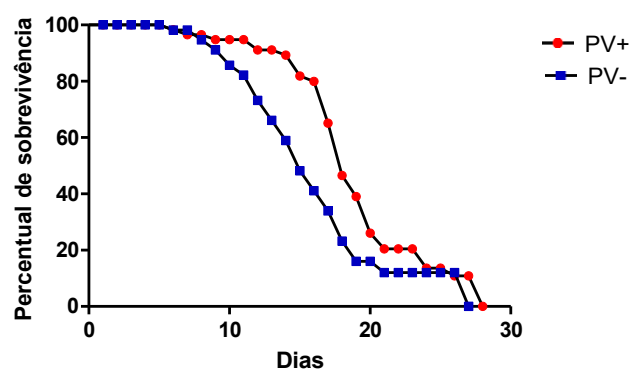


Figura 51. Sobrevivência de *A. aquasalis* frente ao sangue infectado e com parasito inativado

4.7 Sobrevivência de *A. aquasalis* frente a 1ppm e 10ppm de 7-epigedunina em sangue infectado

Durante acompanhar a longevidade de mosquitos *A. aquasalis* frente a ação de 7-epigedunina comparado ao controle com 1% DMSOPV+ e PV+. Apenas uma replicata não foi significativamente diferente com P valor de 0,2700 (Figura 52), mas em duas o valor de P foram significativos: < 0, 0001 (Figura 53) e 0,0007 .

Sobrevivência de *A. aquasalis* sob ação da concentração de 1% de DMSO (PV+), 1ppm de 7-epig. PV+ e 10ppm de 7-epig. PV+.

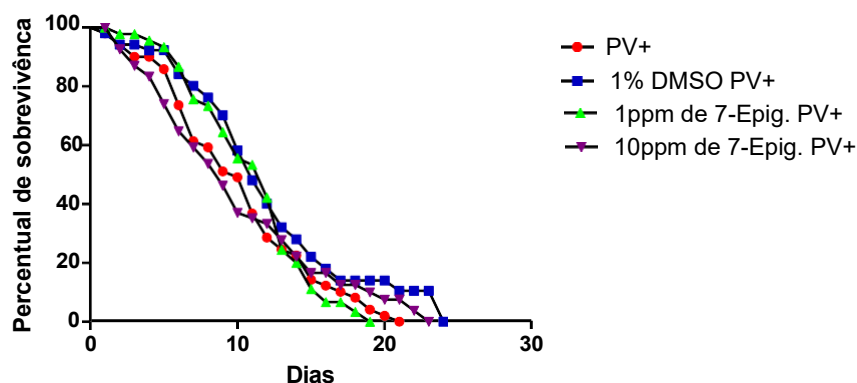


Figura 52. Sobrevivência de *A. aquasalis* frente a 1ppm e 10ppm de 7-epigedunina em sangue infectado

Sobrevivência de *A. aquasalis* infectado com *P. vivax* (PV+), 1% de DMSO, 1 e 10ppm de 7-epigedunina.

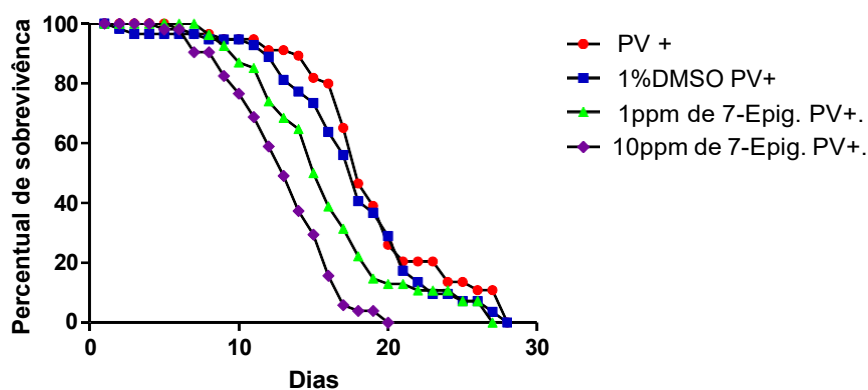


Figura 53. Sobrevivência de *A. aquasalis* frente a 1ppm e 10ppm de 7-epigedunina em sangue infectado

4.8 Sobrevivência de *A. aquasalis* frente a 0,03998ppm e 0,04ppm de ivermectina em sangue infectado

Também não se encontra diferença significativa na longevidade quando *A. aquasalis* está sob ação de ivermectina nas concentrações de 0,03998ppmPV+ e 0,04ppmPV+ (CL₁₅ e CL₂₅ de ivermectina, respectivamente) em sete replicatas com P valor: 0,1228 (Figura 54), 0,3506, 0,3304, 0,0733, 0,5374, 0,2658 e 0,4386. Entretanto, em cinco replicatas houve diferença significativa com P valor: 0,0002 (Figura 55), < 0,0001, 0,0002, e 0,0100, 0,00025 e 0,0007.

Sobrevivência de *A. aquasalis* sob ação da concentração de 1% de DMSO (PV+), CL₁₅ IVM (PV+) e CL₂₅ IVM (PV+).

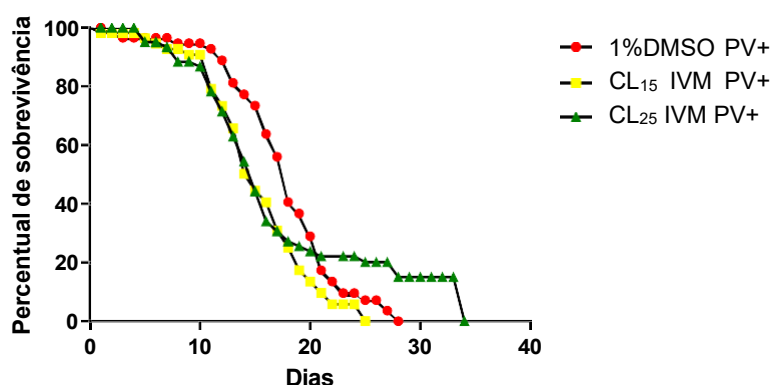


Figura 54. Sobrevivência de *A. aquasalis* frente a 0,03998ppm e 0,04ppm de ivermectina em sangue infectado

Sobrevivência de *A. aquasalis* sob ação da concentração de 1% de DMSO (PV+), CL₁₅ IVM (PV+) e CL₂₅ IVM (PV+).

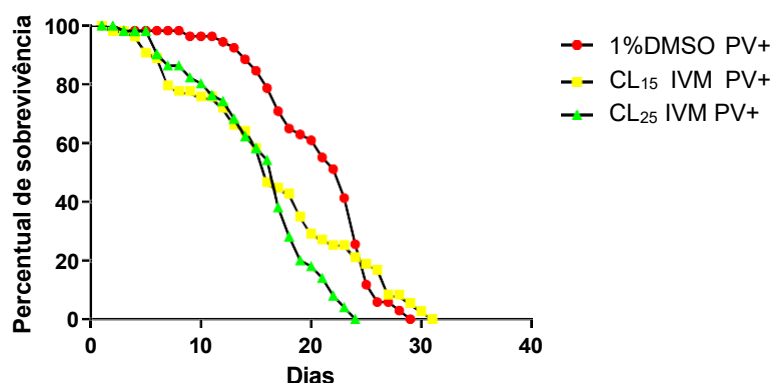


Figura 55. Sobrevivência de *A. aquasalis* frente a 0,03998ppm e 0,04ppm de ivermectina em sangue infectado

4.9 Sobrevivência de *A. aquasalis* frente a ação de 1ppm e 10ppm de cis-cajucarina B em sangue parasitado.

A ação de 1ppm e 10ppm de cis-cajucarina B foi significativa em três replicatas com valor de P: 0,0122 (Figura 56), 0,0085 e 0,0005. Esses dados precisam ser reavaliados, pois não se sabe em que ponto está a diferença, ou melhor, em qual concentração.

Sobrevivência de *A. aquasalis* infectado com *P. vivax* (PV+), 1% DMSO PV+, 1ppm de Cis-caj. B PV+ 10ppm de Cis-caj. B PV+.

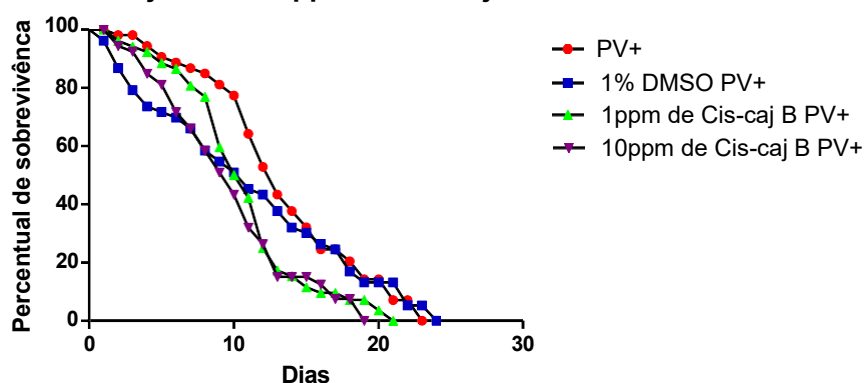


Figura 56. Sobrevivência de *A. aquasalis* frente a ação de 1ppm e 10ppm de cis-cajucarina B em sangue parasitado.

4.10 Sobrevivência de *A. aquasalis* frente a ação de 100ppm e 1000ppm de extrato aquoso da casca de *G. argenteum* em sangue parasitado.

Sob ação do extrato aquoso nas concentrações de 100ppm e 1000ppm da casca de *G. argenteum* em sangue infectado, durante observação da sobrevivência de *A. aquasalis* houve diferença significativa nas três replicatas com valor de P: 0,0499 (Figura 57), 0,0051 e 0,0126. Podendo ser um possível efeito do extrato da casca, mas esses dados precisam ser reavaliados para saber qual concentração testada apresenta diferença.

Sobrevivência de *A. aquasalis* infectado com *P. vivax* (PV+), 1% H₂O PV+, 100ppm e 1000ppm.

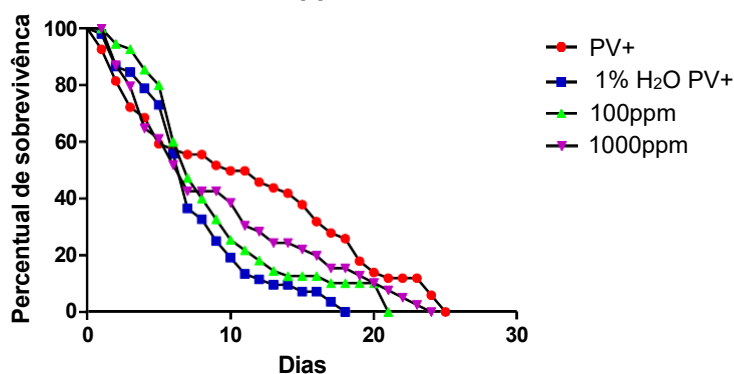


Figura 57. Sobrevivência de *A. aquasalis* frente a ação de 100ppm e 1000ppm de extrato aquoso de *G. argenteum* em sangue parasitado.

4.11 Sobrevivência de *A. aquasalis* frente a ação de 100ppm e 1000ppm de extrato aquoso do galho de *G. argenteum* em sangue parasitado.

Ainda considerando o extrato aquoso de *G. argenteum*, ressaltamos que o extrato do galho dessa planta nas concentrações de 100ppm e 1000ppm não foi significativo na sobrevivência de *A. aquasalis* em três replicatas com valor de P: 0,1260 (Figura 58), 0,5952 e 0,1211.

Sobrevivência de *A. aquasalis* infectado com *P. vivax* (PV+), 1% H₂O PV+, 100ppm e 1000ppm.

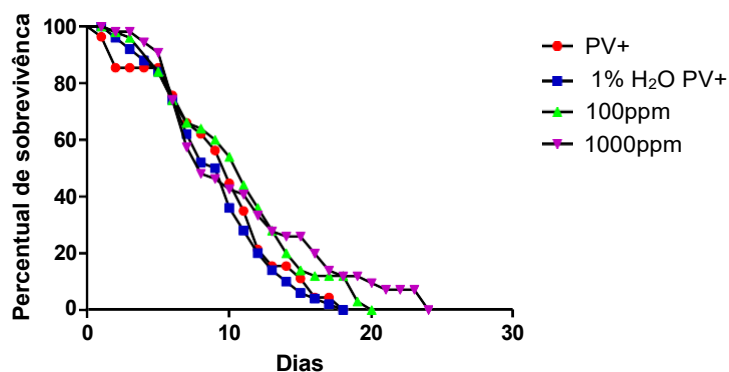


Figura 58. Sobrevivência de *A. aquasalis* frente a ação de 100ppm e 1000ppm de extrato aquoso de *G. argenteum* em sangue parasitado.

Conclusão

Pelos resultados obtidos, a concentração ideal de DMSO testada em *A. aquasalis* é a de 1% quando comparada as demais que foram testadas

A ivermectina em concentração elevada aumenta a mortalidade dos mosquitos, o que corresponde com outros trabalhos.

O número de oocistos de *P. vivax* frente as concentrações de 1%DMSO/1ppmPV+ e 1%DMSO/10ppm de 7-epigedunina não varia significativamente comparado ao controle 1%DMSO/0ppmPV+

O número de oocistos de *P. vivax* varia significativamente frente a ação de DMSO/1ppmPV+ de cis-cajucarina quando comparado a 1%DMSO/0ppmPV+.

O número de oocistos frente a 100ppm/PV+ de concentração do extrato do galho de *G. argenteum* e 1000ppm/PV+ do mesmo extrato, difere significativamente uma concentração da outra e 1000ppm/PV+ difere quando comparada a 0%ppm do extrato.

REFERÊNCIAS

- ACHAN, J.; TALISUNA, A.O.; ERHART, A.; YEKA, A.; TIBENDERANA, J.K.; BALIRAINÉ, F.N.; ROSENTHAL, P.J.; D'ALESSANDRO, U. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malaria Journal*, 10(144): 1475-2875, 2011.
- ALECRIM, M.G.C.; ALECRIM, W.; MACEDO, V. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32(1): 67-68, 1999.
- ALEXANDRE, M.A.; FERREIRA, C.O.; SIQUEIRA, A.M.; MAGALHÃES, B.L.; MOURAO, M.P.; LACERDA, M.V.; ALECRIM, M.G.C. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 16(10): 1611-4, 2010.
- ALVES, S.N.; SOUZA, T.N.; GALDINO, A.S. Suscetibilidade de larvas do mosquito *Culex quinquefasciatus* após exposição a diferentes óleos. *Conexão Ciência*, (12): 1, 86-93, 2017.
- AMARAL, L.F.G.; FIERRO, I.M. Profile of medicinal plants utilization through patent documents: the andiroba example. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(4): 716-719, 2013.
- AÑEZ, A.; MOSCOSO, M.; LAGUNA, Á.; GARNICA, C.; MELGAR, V.; CUBA, M.; GUTIERREZ, S.; ASCASO, C. Resistance of infection by *Plasmodium vivax* to chloroquine in Bolivia. *Malaria Journal*, (14): 261-266, 2015.
- BAKER, D.A. Malaria gametocytogenesis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 172:57-65, 2010.
- BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: Fonte potencial para descoberta de novos fármacos. *Química Nova*, (32): 3, 679-688, 2009.
- BASTIAENS, G.J.H.; VANGERMERT, G-J.; HOOGHOF, J.; LINDSAY, S.W.; DRAKELEY, C.; CHURCHER, T.S.; VERHAVE, J.P.; KOCKEN, C.H.M.; SAUERWEIN, R.W.; BOUSEMA, T. Duration of the mosquitocidal effect of ivermectin. *Malaria World Journal*, 3: 10, 2012.
- BATON, L.A.; RANFORD-CARTWRIGHT, L.C. Spreading the seeds of million murdering death: metamorphoses of malaria in the mosquito. *TRENDS in Parasitology*, (21): 12, 573-580, 2005.
- BERRY, P. E.; HIPPEL, A. L.; WURDACK, K.J.; VAN EELAND, B. RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and TRNL-TRNF DNA sequence data. *American Journal of Botany*, (9): 92, 1520-1534, 2005.
- BERTANI, S.; BOURDY, G.; LANDAU, I.; ROBINSON, J-C. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*. 98, 45-54. 2005.

BICKII, J.; Njifutie, N.; Foyere, J.A.; Basco, L.K.; Ringwald, P. In vitro antimalarial activity of limonoids from *Khaya grandifoliola* CDC (Meliaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 69, 27-33, 2000.

BIGHETTI, E.J.B.; HIRUMA-LIMA, C.A.; GRACIOSO, J.S.; SOUZA-BRITO, A.R.M. Anti-inflammatory and antinociceptive effects in rodents of the essential Oil of *Croton cajucara* Benth. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, (51): 1447-1453, 1999.

BIRKHOLTZ, L-M.; COETZER, T.L.; MANCAMA, D.; LEROY, D.; ALANO, P. Discovering New Transmission Blocking Antimalarial Compounds: Challenges and Opportunities. *Trends in Parasitology*. 32: 669-681. 2016.

BOISSIÈRE, A.; TCHIOFFO, M.T.; BACHAR, D.; ABATE, L.; MARIE, A.; NSANGO, S.E.; SHAKBAZKIA, H.R.; AWONO-AMBENE, P.H.; LEVASHINA, E.A.; CHRISTEN, R.; MORLAIS, I. Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathogens*. 8(5):e1002742, 2012.

BOUSEMA T.; DRAKELEY C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malária control and elimination. *Clinical Microbiology Reviews*. 24: 377–410, 2011.

BHAGAVATHULA, A.S.; ELNOUR, A.A.; SHEHAB, A. Alternatives to currently used antimalarial drugs: in search of a magic bullet. *Infectious Diseases of Poverty*. 5(1):103, 2016.

BRAGA, E.M.; FONTES, C.J.F.; *Plasmodium* – Malária. In: NEVES, D. P. *Parasitologia Humana*. 10 ed. São Paulo: Atheneu, pp. 128–146, 2000.

BRANDÃO, M.G.; GRANDI, T.S.; ROCHA, E.M.; SAWER D.R.; KRETTLI, A.U. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, (36): 175-182, 1992.

BRASIL, P.; ZALIS, M.G.; PINA-COSTA, A.; SIQUEIRA, A.M.; JÚNIOR, C.B.; SILVA, S.; AREAS, A.L.B.; PELAJO-MACHADO, M.; ALVARENGA, D.A.M.; SANTELLI, A.C.F.S.; ALBUQUERQUE, H.G.; CRAVO, P.; ABREU, F.V.; ABREU, F.V.S.; PETERKA, C.L.; ZANINI, G.M.; MUTIS, M.C.S.; PISSINATTI, A.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; BRITO, C.F.A.; FERREIRA-DA-CRUZ, M.F.; CULLETON, R.; DANIEL-RIBEIRO, T. *BioRxiv*. *Plasmodium simium* causing human malaria: a zoonosis with outbreak potential in the Rio de Janeiro Brazilian Atlantic forest. preprint first posted online doi: <http://dx.doi.org/10.1101/122127>. 2017.

CAMARGO, M.R.M. Avaliação da atividade antimalárica e antimicrobiana de *Geissospermum argenteum* Woodson e *Minquartia guianensis* Aubl coletadas em Roraima. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Roraima-UFRR, 2011.

CAMPBELL, A. V.; CORREA, R. G. C.; GOTTLIEB, O. R.; LEO M. S.; MARX, M. C.; MAIA, J. G. S.; MAGALHAES, M. T., 'Linalool-containing amazonian essential oils', *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 44: 317–19, 1972.

CARLOS, B.C.; RONA, L.D.P.; CHRISTOPHIDES, SOUZA-NETO, J.A.; A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil. *Pathogen Global Health*. 113: 1-13. 2019.

CARTER R. Transmission blocking malaria vaccines. *Vaccine*.19:2309–14, 2001.

Center for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria>. Acesso em 23/09/2019.

CHACCOUR, C.J.; KOBYLINSKI, K.C.; BASSAT, Q.; BOUSEMA, T.; DRAKELEY, C.; ALONSO, P.; FOY, B.D. Ivermectin to reduce malaria transmission: a research agenda for a promising new tool for elimination. *Malaria Journal*, (12): 153-162, 2013.

CHADEE, D.D.; KITRON, U. Spatial and temporal patterns of imported malaria cases and local transmission in Trinidad. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*. 61: 513-517. 1999.

CHAVES, F.C.M.; BIZZO. H.R.; ANGELO, P.C.S.; XAVIER, J.J.B.N.; SÁ SOBRINHO, A.F. Rendimento e composição química do óleo essencial de folhas de dois morfótipos de sacaca (*Croton cajucara* Benth.) *Revista Brasileira de plantas medicinais*, (4): 8, 117-119, 2006.

CIRIMOTICH, C.M.; DONG, Y.; GARVER, L.S.; SIM, S.; DIMOPOULOS, G. Mosquito immune defenses against *Plasmodium* infection. *Developmental & Comparative Immunology*. 34:387–95, 2010.

COSTA, M.P.; MAGALHÃES, N.S.S.; GOMES, F.E.S.; MACIEL, A.M. Uma revisão das atividades biológicas da trans desidrocrotonina, um produto natural obtido de *Croton cajucara* *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(2): 275 286, 2007.

COWMAN, A.F.; HEALER, J.; MARAPANA, D.; MARSH, K. Malaria: Biology and Disease *Cell*, 167(3): 610-624, 2016.

COX-SINGH, J.; HIU, J.; LUCAS, S.B.; DIVIS, P.C.; ZULKARNAEN, M.; CHANDRAN, P.; WONG K, T.; ADEM, P.; ZAKI, S.R.; B, SINGH.; KRISHNA, S. Severe malaria - a case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: a case report. *Malaria Journal*, 9:10. 2010.

DA, D.F.; CHURCHER, T.S.; YERBANGA, R.S.; YAMEOGO, B.; SANGARÉ, I.; OUEDRAOGO, J.B.; SINDEN, R.E.; BLAGBOROUGH, A.M.; COHUET, A. Experimental study of the relationship between *Plasmodium* gametocyte density and 103 infection success in mosquitoes; implications for the evaluation of malaria transmission-reducing interventions. *Experimental Parasitology*. 149:74-83, 2015.

DEANE, L.M.; CAUSEY, R.; DEANE, M.P. Notas sobre a distribuição e a biologia dos nefeinos das regiões nordestina e Amazônica do Brasil. *Revista do Serviço Especial Saúde Pública*, 1: 827-965. 1948.

DeFILIPPS, R.A.; MAINA, S.L.; CREPIN. Surinam, French Guiana). *Journal Medicinal Plants of the Guianas, Surinam, French Guiana*. 2004.

DI STASI, L.C.; HIRUMA, C.A.; GUIMARÃES, E.M. SANTOS, C.M. Medicinal Plants popularly used in Brazilian Amazon. *Fitoterapia*, LXV (6): 529-540, 1994.

DILL, E.M.; PEREIRA, M.J.B.; COSTA, M.S. Efeito residual do extrato de *Annona coriacea* sobre *Aedes aegypti*. *Arquivos do Instituto de Biológico, São Paulo*. (79): 4, 595-601, 2012.

DURVASULA, R.V.; GUMBS, A.; PANACKAL, A.; KRUGLOV, O.; AKSOY, S.; MERRIFIELD, R.B; RICHARDS, F.F.; BEARD, C.B. Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:3274–8, 1997.

FANG, W.; VEGA-RODRÍGUEZ, J.; GHOSH, A.K.; JACOBS-LORENA, M.; KANG, A.; ST LEGER, R.J. Development of transgenic fungi that kill human malaria parasites in mosquitoes. *Science*. 331(6020):1074-7, 2011.

FEACHEM, R.G.; PHILLIPS, A.A.; HWANG, J.; COTTER, C.; WIELGOSZ, B.; GREENWOOD, B.M.; SABOT, O.; RODRIGUEZ, M.H.; ABEYASINGHE R.R.; GHEBREYESUS, T.A.; SNOW, R.W. Shrinking the malaria map: progress and prospects. *Lancet*, 376(9752): 1566-78, 2010.

FERREIRA, U.M.; NUNES, M.S.; WUNDERLICH, G. Antigenic diversity and immune evasion by malaria parasites. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 11:987–95, 2004.

FOLEY, D.H.; BRYAN, J.H.; LAWRENCE, G.W. The potential of ivermectin to control the malaria vector *Anopheles farauti*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(6): 625-8. 2000.

FORATTINI, O.P. *Culicidologia Médica*. EDUSP, São Paulo. 864p, 2002.

FOY, B.D.; KOBYLINSKI, K.C.; SILVA, I.M.; RASGON, J.L.; SYLLA, M. Endectocides for malaria control. *Trends in Parasitology*, (27): 10, 2011.

GALARDO, A.K.R. A importância dos *Anopheles darlingi* Root, 1926 e *Anopheles marajoara* Galvão e Damasceno, 1942 na transmissão de malária no Município de Macapá/Ap – Brasil [Doutorado em Agentes Infecciosos e Parasitários]: Universidade Federal do Pará, 2010.

GALVÃO, A.L.A.; DAMASCENO, R.G.; MARQUES, A.P. Algumas observações sobre a biologia dos anofelinos de importância epidemiológica em Belém do Pará. *Arquivos Higiene*, 12: 51–110. 1942.

GONÇALVES, D.; HUNZIKER, P. Transmission-blocking strategies: The roadmap from laboratory bench to the community. *Malaria Journal*, 15: 95, 2016.

GREENWOOD, B.M.; FIDOCK, D.A.; KYLE, D.E.; COLLINS, F.H. DUFFY, P.E.; ALONSO, P.L. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *The Journal of Clinical Investigation*, 1266-1273, 2008.

GRENAND, P.; MORETTI, C.; JACQUEMIN, H. Pharmacopées traditionnelles en Guyane: Créoles, Palikur, Wayãpi. Institut François de Recherche Scientifique Pour Le Développement en Coopération. Paris: Éditions de l'ORSTOM. 1987.

HARBACH, R.E. <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/> acesso em 20/07/2019.

HENRIQUES, M.G.; PENIDO, C. The therapeutic properties of *Carapa guianensis*. *Current Pharmaceutical Design*, (20), 6, 850-856, 2014.

<https://diasdacruz.com.br/glossario-fitoterapicos-andiroba>. Acesso em 19/06/2018

<https://www.researchgate.net/publication/283648442-sacaca>. Acesso em 19/06/2018

<https://inaturalist.ca/photos/11819963-acariquara-branca> Acesso em 19/06/2018

ICHIARA, Y.; TAKEYA, K.; HITOTSUYANAGI, Y.; MORITA, H.; OKUYAMA, S.; SUGANUMA, M.; FUJIKI, H.; MOTILLOME, M.; ITOKA, W. A. H. Cajucarinolide and iso-cajucarinolide: antiinflammatory diterpenes from *Croton cajucara*. *Planta Medica*, 58(6): 549-5. 1992.

ITOKAWA, H.; ICHIHARA, Y.; KOJIMA, H.; WATANABE, K.; TAKEYA, K. 'Nor-clerodane diterpenes from *Croton*', *Phytochemistry*, 28: 1667–1669, 1989.

ITOKAWA, H.; ICHIHARA, Y.; SHIMIZU, M.; TAKEYA, K.; MOTIDOME, M. 'Cajucarins A and B, New Clerodanes from *Croton Cajucara*, and Their Conformations', *Chem. Pharm. Bull.*, 38: 701–705, 1990.

JONES J.W.; MEISCH, M.V.; MEEK, C.L.; BIVIN, W.S. Lethal effects of ivermectin on *Anopheles quadrimaculatus*. *Journal American Mosquito Control Association*, 8(3): 278-80, 1992.

KLAFKE, G.M. Diagnóstico e mecanismo de resistência a ivermectina *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Tese (Doutorado em Ciências) Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2011.

KOBYLINSKI, K.C.; FOY, B.D.; RICHARDSON, J.H. Ivermectin inhibits the sporogony of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. *Malaria journal*, 11:381, 2012.

KUBO, I.; ASAKA, Y. 'Insect growth inhibitory nor-diterpenes, dehydrocrotonin and trans-dehydrocrotonin , from', *Phytochemistry*, 30: 2545–46, 1991.

LACERDA, M.V.; MOURÃO, M.P.; ALEXANDRE, M.A.; SIQUEIRA, A.M.; MAGALHAES, B.M.; MARTINEZ-ESPINOSA, F.E; FILHO, F.S.; BRASIL, P.; VENTURA, A.M.; TADA, M.S.; COUTO, V.S.; SILVA, A.R.; ALECRIM, M.G. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malaria Journal*, 11: 12, 2012.

LA-SCALEA, M.A.; FERREIRA, E.I.; SILVA, H.S.R.C. Redução voltamétrica de artemisinina e sua interação com grupo heme (hemina). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 372-373, 2007.

LAVAZEC, C.; BOURGOUIN, C. Mosquito-based transmission blocking vaccines for interrupting *Plasmodium* development. *Microbes and Infection*.10: 845-849, 2008.

LIMA, R.B.S.; ROCHA-SILVA, L.F.; MELO, M.R.S.; COSTA, J.S.; LIMA, E.S.; VASCONCELOS, M.C.; AMORIM, R.C.N.; CHAVES, F.C.M.; COUTINHO, J.P.; KRETTTLI, A.U.; TADEI, W.P; POHLIT, A.M. *In vitro* and *in vivo* anti-malarial activity of extracts of Amazonian plants used to treat malaria and its symptoms. *Malaria journal*, 14, 508. 2015.

LIZCANO, V.O.; RESENDE, S.S.; CHEHUAN, Y.F.; LACERDA, M.V.G; BRITO, C.F.A.; ZALIS, M.G. Genetic diversity of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* parasites from the western Brazilian Amazon. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(7): 948-951, 2014.

LUÍSA, R.C.; HENDRICKX, K. Winged promises: exploring the discourse on transgenic mosquitoes in Brazil. *Technology and Society*. 35:118–28, 2013.

MANZALI, S.I. A resistência à cloroquina e a busca de antimalariais entre as décadas de 1960 e 1980. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, 18: 2, 407-430, 2011.

MACIEL, M. A. M; PINTO, A. C.; ARRUDA, A. C.; PAMPLONA, S. G. S. R.; VANDERLINDE, F. A.; LAPA, A. J. and others, 'Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology: A Successful Combination in the Study of *Croton cajucara*', *Journal of Ethnopharmacology*, 70: 41–55, 2000.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; BRABO, S.N.; DA SILVA, M.N. Terpenoides from *Croton cajucara*. *Phytochemistry*, 49(3): 823-8, 1998.

MACKINNON, S.; Durst, T.; Arnason, J.T.; Angerhofer, C.; Pezzuto, J.; Sanchez-Vindas, P.E.; Poveda, L.J.; Gbeassor, M. Antimalarial activity of tropical Meliaceae extracts and gedunin derivatives. *Journal Natural Products*, 60: 336-41, 1997.

MECCIA, G.; QUINTERO, P.; ROJAS, L.B.; USUBILLAGA, A.; VELASCO, J. DIAZ T.; DIAZ C.; VELÁSQUEZ J.; TORO, M. Chemical composition of the essential oil from the leaves of *Carapa guianensis* collected from Venezuelan Guyana and the antimicrobial activity of the oil and crude extracts. *Natural Product communications*, 8: 11, 2013.

MENDONCA, A. P.; FERRAZ, I. D. K. Óleo de andiroba: processo tradicional da extração, uso e aspecto sociais no estado do Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, 37: 3, 353-364, 2007.

MILLIKEN, W. Traditional anti-malarial medicine in Roraima, Brazil. *Economic Botanic*, 51: 3, 212-237, 1997.

MIRANDA JUNIOR, R.N.C.; DOLABELA, M.F.; SILVA, M.N.; POVOA, M.M.; MAIA, J.G.S. Antiplasmodial activity of the andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) oil and its limonoid-rich fraction. *Journal of Ethnopharmacology*, 142: 3, 679–683, 2012.

MIURA, K.; STONE, W.J.; KOOLEN, K.M.; DENG, B.; ZHOU, L.; VAN GEMERT, G.J.; LOCKE, E.; MORIN, M.; BOUSEMA, T.; SAUERWEIN, R.; LONG, C.A.; DECHERING, K.J. An inter-laboratory comparison of standard membrane-feeding assays for evaluation of malaria transmission-blocking vaccines. *Malaria journal*. 15:463, 2016.

MORENO, M.; TONG-RIOS, C.; ORJUELA-SANCHEZ, P.; CARRASCO-ESCOBAR, G.; CAMPO, B.; GAMBOA, D.; WINZELER, E.A.; VINETZ, J.M. Continuous Supply of *Plasmodium vivax* sporozoites from colonized *Anopheles darlingi* in the Peruvian Amazon. *ACS- Infectious Diseases*. 13: 541-548. 2018.

MOYA, R.; RODRIGUEZ-ZUNIGA, A.; VEGA-BAUDRIT, J.; ALVAREZ, A. Effects of adding nano-clay (montmorillonite) on performance of polyvinyl acetate (PVAc) and urea-formaldehyde (UF) adhesives in *Carapa guianensis*, a tropical species. *International Journal of Adhesion & Adhesives*, 59: 1, 62–70, 2015.

MS. (Ministério da Saúde). Boletim da Situação epidemiológica da malária. 2018.

MUELLER, I.; GALINSKI, M.R.; BAIRD, J.K.; CARLTON, J.M.; KOCHAR, D.K.; ALONSO, P.L.; DEL PORTILLO, H.A. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *The Lancet Infectious Diseases*, 9(9): 555-66, 2009.

MUÑOZ, V.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G.; CALLAPA, J.; BERGERON, S.; BRAVO, J.A.; BALDERRAMA, L.; ORTIZ, B.; GIMENEZ, A.; DEHARO, E. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, 69: 127–137. 2000.

ODONNE, G.; VLADEAU, C.L.; ALBAN-CASTILLO, J.; STIEN, D.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G. Medical ethnobotany of the Chayauita of the Paranapura basin (Peruvian Amazon). *Journal of Ethnopharmacology*, 146: 127-153, 2013.

OLIVEIRA, T.A.; TELES-RONCHI, B.; OLIVEIRA, R.B.; FONSECA DA, C.R.V.; SILVA, S.L.R.; SANTOS DOS., P.A.; NUNEZ, C.V. Evaluation of the Acute Effects of Organic Solvents on Adults of *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera, Curculionidae). *Journal of the Brazilian Society Ecotoxicology*. 6: 1, 9-13, 2011.

ÔMURA, S. Ivermectin. 25 years and still going. Strong. International Journal Antimicrobials Agents, 31(2): 91-98, 2008.

PANICHAKUL, T.; SATTABONGKOT, J.; CHOTIVANICH, K.; SIRICHAISINTHOP, J.; CUI, L.; UDOMSANGPETCH, R. Production of erythropoietic cells *in vitro* for continuous culture of *Plasmodium vivax*. International journal for parasitology. 37(14):1551-7, 2007.

PEREIRA, T.B. Derivados semissintéticos a partir dos limonoides isolados das sementes da andiroba (*Carapa guianensis* – meliaceae) e sua atividade antimalárica contra *Plasmodium* spp. Tese de doutorado. Universidade Federal do Amazonas-UFAM, 2018.

PEREIRA, T.B.; SILVA, L.F.R.; AMORIM, R.C.N.; MELO, M.R.S.; SOUZA, R.C.Z.; EBERLIN, M.N.; LIMA, E.S.; VASCONCELLOS, M.C.; AND POHLIT, A.M. *In vitro* and *in vivo* anti-malarial activity of limonoids isolated from the residual seed biomass from *Carapa guianensis* (andiroba) oil production. Malaria Journal, 13: 317, 2014.

PHILLIPS, E.J.; KEYSTONE, J.S.; KAIN, K.C. Failure of combined chloroquine and high-dose primaquine therapy for *Plasmodium vivax* malaria acquired in Guyana, South America. Clinical Infectious Diseases, 23: 1171-1173, 1996.

PHYO, A.P.; DONDORP, A.M.; MOO, C.; ASHLEY, E.A.; NOSTEN, F.; STEPNIEWSKA, K.; LWUIN K.M.; WHITE, N. J.; DAY, N. P. J.; SINGHASIVANON, P.; MCGREADY, R.; AL-SAAI, S.; NAIR, S.; NKHOMA, S.; ANDERSON, T.J.C.; NOSTEM, F. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. The Lancet, 1960-1966, 2012.

PIMENTEL, L.F.; JÁCOME, A.T.J.; MOSQUEIRA, V.C.F.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Application of pharmaceutical nanotechnology to the treatment of malaria. Revista Brasileira de Ciências e Farmacêuticos, São Paulo, 43: 4, 2007.

PINILLA, Y.T.; LOPES, S.C.P.; SAMPAIO, V.S.; ANDRADE, F.S. MELO, G.C.; ORFANÓ, A.S.; SECUNDINO, N.F.C.; GUERRA, M.G.V. B.; LACERDA, M.V.G.; KOBYLINSKI, K.C.; ESCOBEDO-VARGAS, K.S.; LÓPEZ-SIFUENTES, V.M.; STOOPS, C.A.; BALDEVIANO, G.C.; TARNING, J.; VASQUEZ, G.M.; PIMENTA, P.F.P.; MONTEIRO, W.M. Promising approach to reducing Malaria transmission by ivermectin: Sporontocidal effect against *Plasmodium vivax* in the South American vectors *Anopheles aquasalis* and *Anopheles darlingi*. Neglected Tropical Diseases, 12(2): e0006221, 2018.

PINTO, A.A.; TELES, B.R.; ANJOS, N.; COUCEIRO, S.E.M. Predação de sementes de andiroba [*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapaprocera* DC. (Meliaceae)] por insetos na Amazônia. Revista Árvore, 37: 6, 1115-123, 2013.

PLETER, P.; LEKOSTAJ, J.K.; ROEPE, P.D. Purified *Plasmodium falciparum* multi-drug resistance protein (PfMDR 1) binds a high affinity chloroquine analogue. Molecular and Biochemical Parasitology, 173:158-161, 2010.

PÓVOA, M.; CONN, J.E.; SCHLICHTING, C.D; AMARAL, J.C.O.F.; SEGURA, M.N.O.; SILVA, A.N.M.; SANTOS, C.C.B.; LACERDA, R.N.L.; SOUZA, R.T.L.; GALIZA, D.; SANTA ROSA, E.; WIRTZ, R.A. Malaria vectors, epidemiology, and the re-emergence of *Anopheles darlingi* in Belem, Pará, Brazil. *Journal Medical Entomology*. 40: 379-386. 2003.

Ren X, Hoiczyk E, Rasgon JL. Viral paratransgenesis in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathogens*. 4:e1000135, 2008.

REBÊLO, J.M.M.; MORAES, J.L.P.; ALVES, G.A.; LEONARDO, F.S.; ROCHA, R.V.; MENDES, W.A.; COSTA, E.; CÂMARA, L.E.M.B.; SILVA, M.J.A.; PEREIRA, Y.N.O. MENDONÇA, J.A.C. Distribuição das espécies do gênero *Anopheles* (Diptera, Culicidae) no Estado do Maranhão, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 13(12): 2007.

REY L. *Parasitologia*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p 222-57; 728-39. 2013.

RIBEIRO, J.E.LS.; VICENTINI, A.; HOPKINS, M.J.G.; SOTHERS, C. Flora da Reserva Ducke. Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus DIFID. INPS. 798p. 1999.

RIOS-VELÁSQUEZ, C.M.; MARTINS-CAMPOS, K.M.; SIMÕES, R.C.; IZZO, T.; SANTOS, E.V.; PESSOA, F.A.C.; LIMA, J.B.P.; MONTEIRO, W.M.; SECUNDINO, N.F.C.; LACERDA, M.V.G.; TADEI, W.P.; PIMENTA, P.F.P. Experimental *Plasmodium vivax* infection of key *Anopheles* species from the Brazilian Amazon. *Malaria Journal*, 12: 460, 2013.

ROSENBAUM, E.E.; HERSCHLER, R.J.; JACOB, S.W. Dimethyl sulfoxide in musculoskeletal disorders. *Journal of the American Medical Association*, 192: 02, 309-313, 1965.

RUBIO-PALIS, Y.; WIRTZ, R.A.; CURTIS, C.F. Malaria entomological inoculation rates in Western Venezuela. *Acta Tropica*. 52: 167-174. 1992.

SAMPAIO, V.S.; BELTRÁN, T.P.; KOBYLINSK, K.C.; MELO, G.C.; LIMA, J.B.P.; SILVA, S.G.M.; RODRIGUEZ, I.C.; SILVEIRA, H.; GUERRA, M.G.V.B.; BASSAT, Q.; PIMENTA, P.F.P.; LACERDA, M.V.G.; MONTEIRO, W.M. Filling gaps on ivermectin knowledge: Effects on the survival and reproduction of *Anopheles aquasalis*, a Latin American malaria vector. *Malaria Journal*, 2016.

SANTOS, N.C.; J. FIGUEIRA-COELHO, J.; MARTINS-SILVA, J.; SALDANHA, C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochemical Pharmacology* 65: 1035–1041. 2003.

- SCHUURKAMP, G.J.; SPICER, P.E.; KEREU, R.K.; BULUNGOL, P.K.; RIECKMANN, K.H. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* in Papua New Guinea. Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene, 86: 121–122, 1992.
- SCOTTI-SAINTAGNE, C.; DICK, C.W.; CARON, H.; VENDRAMIN, G.G.; GUICHOUX, E.; BUONAMICI, A.; DURET, C.; SIRE, P.; VALENCIA, R.; LEMES, M.R.; GRIBEL, R.; SCOTTI, I. Phylogeography of a species complex of lowland Neotropical rain forest trees (*Carapa*, Meliaceae). Journal of Biogeography, 40: 4, 676-692, 2013.
- SILVA, A.N.M.; SANTOS, C.C.B.; LACERDA, R.N.L.; SANTA ROSA, E.; SOUZA, R.T.L.; GALIZA, D.; SUCUPIRA, I.; CONN, J.E.; PÓVOA, M.M. Laboratory colonization of *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) in Belem, Para, Brazil. Journal Medical Entomology. 43(1): 107-109. 2006b.
- SILVA, R.M.; OLIVEIRA, F.A.; CUNHA, K.M.A.; MAIA, J.L.; MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C. Cardiovascular effects of trans-dehidrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* in rats. Vascular Pharmacology, 43: 11-18 2005b.
- SIQUEIRA, A.M.; MAGALHÃES, B.M.L.; MELO, G.C.; FERRER, M.; CASTILLO, P.; MARTIN-JAULAR, L.; FERNANDEZ-BECERRA, C.; ORDI, J.; MARTINEZ, A.; LACERDA, M.G.V.; PORTILLO, H.A. Spleen rupture in a case of untreated *Plasmodium vivax* infection. PLOS Neglected Tropical Diseases, 6 (12): e1934, 2012.
- SIVEP-Malária. Sistema de informação de vigilância epidemiológica. 2019. Acesso em 20/07/2019.
- SONG, J.; SOCHEAT, D.; TAN, B.; DARA, P.; DENG, C.; SOKUNTHEA, S.; SEILA, S.; OU, F.; JIAN, H.; LI, G. Rapid and effective malaria control in Cambodia through mass administration of artemisinin-piperaquine. Malaria Journal. 23: 57. 2010.
- SOUZA, A.A. Princípios antimaláricos de *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae). Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Amazonas-UFAM, 2016.
- STEELE, J.C.P., VEITCH, N.C., KITE, G.C., SIMMONDS, M.S.J. Indole and beta-carboline alkaloids from *Geissospermum sericeum*. Journal of natural products. 65, 85-88. 2002.
- TOMAS, A.M.; MARGOS, G.; DIMOPOULOS G.; VAN LIN, L.H.; de KONING-WARD, T.F.; SINHA, R.; LUPETTI, P.; BEETSMA, A.L.; RODRIGUEZ, M.C.; KARRAS, M.; HAGER, A.; MENDONZA, J.; BUTCHER, G.A.; KAFATOS, F.; JANSE, C.J.; WATERS, A.P.; SINDEN, R.E. P25 and P28 proteins of the malaria ookinete surface have multiple and partially redundant functions. EMBO Journal. 20:3975–83, 2001.
- UDAYKUMAR, P. Discovery of artemisinin: The Chinese wonder drug. Muller Journal of Medical Science and Research, 191-192, 2014.

VIGNERON, M.; DEPARIS, X.; DEHARO, E.; BOURDY, G. Antimalarial remedies in French Guiana: a knowledge attitudes and practices study. *Journal of Ethnopharmacology*. 98, 351-360. 2005.

VILLARREAL-TREVIÑO, C.; VÁSQUEZ, G.M.; LÓPEZ-SIFUENTES, V.M.; ESCOBEDO-VARGAS, K.; HUAYANAY-REPETTO, A.; LINTON, Y-M.; FLORES-MENDOZA, C.; LESCANO, A.G.; STELL, F.M. Establishment of a free-mating, long-standing and highly productive laboratory colony of *Anopheles darlingi* from the Peruvian Amazon. *Malaria Journal*. 14: 227. 2015.

ZIMMERMAN, R.H. Ecology of the malaria vectors in the Americas and future direction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 87(3): 371-383. 1992.

WANZELER, A. M. V.; JUNIOR, S.M.A.; GOMES, J.T.; GOUVEIA, E.H.H.; HENRIQUES H.Y.B. CHAVES, R.H.; SOARES, B.M.; SALGADO, H.LC.; SANTOS, A.S.; TUJI, F.M. Therapeutic effect of andiroba oil (*Carapa guianensis* Aubl.) against oral mucositis: an experimental study in golden Syrian hamsters. *Clinical Oral Investigation*, 22: 5, 2069-2079, 2018.

WANG, S.; GHOSH, AK.; BONGIO, N.; STEBBINGS, KA.; LAMPE, D.J.; JACOBS-LORENA, M. Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:12734–9, 2012.

WHITE, N.J. PUKRITTAYAKAMEE, S.; HIEN, T.T.; FAIZ, A.; MOKUOLU, O.A.; DONDORP, A.M. Malaria. *The Lancet*, 383: 9918, 723–735, 2014.

WINSTANLEY, P. Modern chemotherapeutic options for malaria. *Lancet Infectious Diseases*, 1: 242-250, 2001.

WHO (World Health Organization). Global malaria control and elimination: a report of a meeting on containment of artemisinin tolerance. *World malaria report 2008*.

WHO (World Health Organization). *Guidelines for the treatment of malaria*. 2006.

WHO (World Health Organization). *World malaria report*. 2019.

WILSON, M.L. Avermectins in Arthropod vector management- Prospects and Pitfalls. *Parasitology Today*, 9: 3, 1993.