



**INGRID MARCIANO ALVARENGA**

**AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE ÓLEO ESSENCIAL DE**  
*Eugenia pyriformis* **SOBRE** *Lutzomyia longipalpis* **E**  
*Leishmania infantum*

**Lavras - MG**  
**2024**

**INGRID MARCIANO ALVARENGA**

**AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Eugenia pyriformis*  
SOBRE *Lutzomyia longipalpis* E *Leishmania infantum***

**EVALUATION OF THE BIOACTIVITY OF ESSENTIAL OIL FROM  
*Eugenia pyriformis* ON *Lutzomyia longipalpis* AND *Leishmania infantum***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Sanidade Animal e Saúde Coletiva, para obtenção do título de Doutora.

**Profa. Dra. Joziana Muniz de Paiva Barçante**  
**Orientadora**  
**Dra. Samara Graciane da Costa Latgé**  
**Co-orientadora**

**Lavras - MG**

**2024**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Alvarenga, Ingrid Marciano.

Avaliação da bioatividade de óleo essencial de *Eugenia  
pyriformis* sobre *Lutzomyia longipalpis* e *Leishmania infantum* /  
Ingrid Marciano Alvarenga. - 2023.

98 p. : il.

Orientador(a): Joziana Muniz de Paiva Barçante.

Coorientador(a): Samara Graciane da Costa Latgé.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Flebotomíneos. 2. isca açucaradas. 3. controle. I. Barçante,  
Joziana Muniz de Paiva. II. Latgé, Samara Graciane da Costa. III.  
Título.

**INGRID MARCIANO ALVARENGA**

**AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Eugenia pyriformis*  
SOBRE *Lutzomyia longipalpis* E *Leishmania infantum***

**EVALUATION OF THE BIOACTIVITY OF ESSENTIAL OIL FROM *Eugenia*  
*pyriformis* ON *Lutzomyia longipalpis* AND *Leishmania infantum***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Sanidade Animal e Saúde Coletiva, para obtenção do título de Doutora.

**APROVADA em 17 de novembro de 2023.**

Dra. Samara Graciane da Costa Latgé - FIOCRUZ

Dra. Joseane Camilla de Castro - UFLA

Dr. Luis Cardoso - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Doro

Dra. Yuly Andrea Caicedo Blanco - Universidad da Colombia

---

**Prof. Dra. Joziana Muniz de Paiva Barçante - UFLA**  
**Orientadora**

**Dra. Samara Graciane da Costa Latgé - FIOCRUZ**  
**Co-orientadora**

**Lavras - MG**  
**2024**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, e por ter me protegido e me amparado até aqui. Mesmo em altos e baixos, Ele sempre esteve ao meu lado.

Agradeço a minha família. Meu marido Rafael, minha mãe Mara, meu irmão João Vitor, meu padrasto Marcos, minhas avós Elza e Kotinha, minhas madrinhas Cidinha e Renata, minhas tias e tios, minhas primas e primos. Eles sempre me apoiaram em conquistar tudo que hoje tenho, gratidão eterna.

Agradeço a minha família acadêmica, minha orientadora Joziana e sua família, Mari, Carol e Thales, que me receberam como parte da família, e se tornaram grandes amigos.

Agradeço a minha família que escolhi, Carol e Pedro, que coincidentemente entraram na minha vida graças a UFLA, mas que hoje são mais do que amigos. A Mariana que também foi um presente da UFLA e que se tornou mais do que uma amiga, e nos presenteou com Heitor. A Iza e Iago estiveram presentes durante toda minha jornada do doutorando e proporcionaram momentos felizes.

Agradeço aos meus amigos de laboratório, Jamile e Pedro, em nome de quem agradeço a todos que me ajudaram durante todo processo de instalação, manutenção da colônia, do biotério experimental, da execução dos experimentos, da escrita do projeto e da tese.

Agradeço a Samara, em nome de quem agradeço ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Insetos da FIOCRUZ-Rio, sob coordenação do Dr. Fernando Genta e da Dra. Daniela Castro, que me recebeu e me acolheu como co-orientadora e que se tornou uma grande amiga. Além do treinamento e disponibilização dos ovos para iniciarmos a colônia na UFLA, eles também disponibilizaram a colônia para realização dos ensaios com *Lutzomyia longipalpis*.

Agradeço ao Pedro Henrique, à técnica Annete e à Dra. Suzan, em nome de quem eu agradeço ao Laboratório de Fitoquímica e Plantas Medicinais do Departamento de Agronomia da UFLA, que disponibilizaram os equipamentos e tempo para auxiliar na extração do OEEp.

Agradeço a Raquel e ao Dr. Ricardo Fujiwara, em nome de quem agradeço ao Laboratório de Imunobiologia e Controle de Parasito do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, que auxiliou na realização de ensaios com *Leishmania infantum*, e apoio nosso biotério experimental com Hamster.

Agradeço a Maíra e a Dra. Ana Claudia Amaral, em nome de quem eu agradeço ao Laboratório de Plantas Medicinais e Derivados do Departamento de Produtos Naturais,

Farmanguinhos/FIOCRUZ, que fizeram o processo de caracterização do OEEp e disponibilizam de tempo para me auxiliar.

Agradeço a Casa Amarela que me recepcionou durante minha estadia na FIOCRUZ, onde conheci pessoas excepcionais.

Agradeço à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo apoio financeiro.

Agradeço a EMBRAPA-CAFÉ pelo apoio financeiro.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e a Universidade Federal de Lavras pelo auxílio em questões administrativas.

Gratidão a todos que estiveram comigo durante todo esse processo. Muito Obrigada!

## RESUMO

Flebotomíneos são vetores de protozoários do gênero *Leishmania* de grande importância em saúde pública. Dentre as diversas espécies de flebotomíneos, *Lutzomyia longipalpis* destaca-se por ser a principal transmissora de *Leishmania infantum*, agente etiológico da Leishmaniose Visceral (LV), doença zoonótica de elevada letalidade quando não tratada precocemente. Os quatro principais pilares do controle residem nas ações de educação em saúde, no diagnóstico precoce e tratamento dos casos humanos, no controle do reservatório canino e no controle do vetor, sendo esses três últimos grandes desafios para as autoridades de saúde. Nesse contexto, o uso de compostos botânicos tem sido amplamente estudado, tanto para aplicação como inseticidas como parasiticidas. Ante o exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a bioatividade do óleo essencial de folhas de *Eugenia pyriformis* (OEEp) sobre insetos vetores. Adicionalmente, foi avaliado *in vitro* do efeito do OEEp sobre formas cultivadas de *Leishmania*. Os OEEp foram obtidos a partir do processo de destilação por arraste de vapor a partir de folhas úmidas de *Eu. pyriformis*, coletadas no município de Perdões, Minas Gerais. A partir de 4.500g de folha, obtivemos um volume final de 4,2 mL (=3,8063g) e um teor de OEEp de 0,0933%. A espectrometria permitiu identificar  $\beta$ -Cariofileno (28,21%), Óxido de cariofileno (12,79%), como compostos majoritários. Os OEEp foram diluídos em DMSO 4% (v/v) e utilizados no preparo de soluções açucaradas nas concentrações de 2,5 mg/mL 5 mg/mL e 7,5 mg/mL testadas em ensaios de sobrevivência e alimentação, preferências e de atração, todos com réplica e controle. Para avaliação do efeito leishmanicida do OEEp foram utilizadas promastigotas e amastigotas de *Leishmania infantum* usando como controle a Miltefosina. Não houve diferença significativa entre as iscas de OEEp e de sacarose (controle) nos ensaios de sobrevivência, atração e preferência. Os resultados dos ensaios de sobrevivência, alimentação, atração e preferência indicam que as concentrações de OEEp testadas não apresentaram diferenças significativas em comparação com o controle de sacarose. No entanto, ao avaliar o potencial leishmanicida do OEEp, observou-se uma inibição significativa da proliferação de promastigotas e amastigotas de *L. infantum*. Embora o OEEp não tenha demonstrado efeito inseticida direto, a aceitação como isca açucarada por *Lu. longipalpis* abre caminho para estratégias integradas que combinam a atratividade da isca com seu potencial leishmanicida.

Palavras-chaves: Flebotomíneos, Iscas açucaradas, Controle

## ABSTRACT

Phlebotomine sandflies are vectors of *Leishmania* protozoa, posing a significant public health concern. Among the various sandfly species, *Lutzomyia longipalpis* stands out as the primary transmitter of *L. infantum*, the etiological agent of Visceral Leishmaniasis (VL), a zoonotic disease with high lethality if not treated early. The four main pillars of control involve health education, early diagnosis and treatment of human cases, control of the canine reservoir, and control of the vector, with the latter three posing significant challenges for health authorities. In this context, the use of botanical compounds has been widely studied, both for application as insecticides and parasiticides. Given the above, the objective of this study was to evaluate the bioactivity of the essential oil from *Eugenia pyriformis* leaves (OEEp) on vector insects. Additionally, the effect of OEEp on cultivated forms of *Leishmania* was assessed. OEEp was obtained through steam distillation from moist leaves of *Eu. pyriformis* collected in Perdões, Minas Gerais. Spectrometry identified  $\beta$ -Caryophyllene (28.21%), Caryophyllene oxide (12.79%), (+)-Spathulenol (6.58%),  $\alpha$ -Copaene (5.73%), and  $\beta$ -Gurjunene (5.11%) as major compounds. OEEp was diluted in 4% (v/v) DMSO and used to prepare sugar solutions at concentrations of 2.5 mg/mL, 5 mg/mL, and 7.5 mg/mL, tested in survival, feeding, preference, and attraction assays, all with replicates and controls. To evaluate the leishmanicidal effect of OEEp, promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* were used, with Miltefosine as a control. There was no significant difference between OEEp baits and sucrose (control) in survival, attraction, and preference assays. The results indicate that the tested concentrations of OEEp showed no significant differences compared to sucrose control in survival, feeding, attraction, and preference assays. However, when assessing the leishmanicidal potential of OEEp, a significant inhibition of the proliferation of *L. infantum* promastigotes and amastigotes was observed. Although OEEp did not demonstrate a direct insecticidal effect, its acceptance as a sugar bait by *Lu. longipalpis* paves the way for integrated strategies that combine bait attractiveness with its leishmanicidal potential.

Keywords: Sandflies, Sugary baits, Control



## LISTA DE ABREVIACES

cm	Centmetro
<i>Eu. pyriformis</i>	<i>Eugenia pyriformis</i>
MP	Matriz peritrfica
m	Metros
mm	Milmetro
L1	Larva nstar 1
L2	Larva nstar 2
L3	Larva nstar 3
L4	Larva nstar 4
<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i>
<i>L. (L.) infantum</i>	<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>
<i>L. (V.) lainsoni</i>	<i>Leishmania (Viannia) lainsoni</i>
<i>Lu. longipalpis</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>
LVA	Leishmaniose visceral americana
LV	Leishmaniose tegumentar
LT	Leishmaniose visceral
OE	leo essencial
OEEp	leo essencial de <i>Eugenia pyriformis</i>
PSG	Promastigote Secretary Gel

## **LISTA DE SIGLAS**

DNT	Doenças negligenciadas tropicais
ONU	Organização das Nações Unidas
ISO	International Standard Organization
POP	Procedimento Operacional Padrão

## SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE .....	13
1 INTRODUÇÃO .....	13
2.1 Flebotomíneos .....	14
2.1.2 Biologia de flebotomíneos.....	15
2.1.2.1 Ovos.....	15
2.1.2.2 Larvas .....	16
2.1.2.3 Pupa .....	16
2.1.2.4 Adultos .....	16
2.2 Leishmanioses .....	17
2.2.1 Parasito e ciclo de desenvolvimento.....	18
2.4 Óleos Essenciais .....	20
2.4.1 Características Botânicas de <i>Eugenia pyriformis</i> .....	21
2.4.2 Óleo Essencial de folhas de <i>Eugenia pyriformis</i> .....	22
3 OBJETIVOS .....	24
3.1 Objetivo Geral .....	24
3.2 Objetivos específicos.....	24
SEGUNDA PARTE .....	28
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO (POP).....	28
1 OBJETIVOS .....	30
2 APLICABILIDADE .....	30
3 DEFINIÇÕES .....	30
4 SIGLAS .....	31
5 REFERÊNCIAS .....	31
6 DESCRIÇÃO.....	32
6.1 Preparo soluções, ração e potes de gesso .....	32

6.1.1	Solução Sacarose 70 % (p/v).....	32
6.1.2	Ração Larvas .....	34
6.1.3	Potes de Gesso .....	35
6.1.4	Potes para oviposição .....	36
6.1.5	Potes de larvas e adultos .....	38
6.2	Procedimento .....	38
6.2.1	Alimentação de larvas .....	39
6.2.2	Potes de larvas em estágio mais avançado .....	43
6.2.3	Armazenamento dos potes.....	44
6.2.4	Manejo de adultos.....	45
6.2.5	Repasto sanguíneo .....	47
6.2.6	Oviposição .....	50
6.2.7	Higienização das gaiolas .....	54
6.2.8	<i>Brushing out</i> .....	55
6.2.9	Armazenamento.....	56
7	TREINAMENTO DO POP .....	57
7.1	Multiplicadores.....	57
8	ANEXOS .....	58
9	FOLHA DE APROVAÇÃO.....	61
	TERCEIRA PARTE .....	62
	ARTIGO .....	62
	RESUMO .....	63
	ABSTRACT .....	64
1	INTRODUÇÃO.....	66
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	68
2.1	Obtenção do Óleo Essencial de <i>Eugenia pyriformis</i> (OEEp).....	68

2.1.1	Dados da Coleta.....	68
2.1.2	Extração de OEEp .....	69
2.1.3	Caracterização do OEEp.....	70
2.2	Atividade do OEEp.....	71
2.2.1	Atividade do OEEp.....	71
2.2.1.1	Insetos.....	71
2.3	Ensaio para avaliação do potencial leishmanicida do OEEp.....	75
2.3.1	Manutenção <i>Leishmania infantum</i> e células DH 82.....	75
2.3.2	Testes <i>in vitro</i> com <i>Leishmania infantum</i> e OEEp.....	75
2.4	Testes estatísticos .....	76
3	RESULTADOS .....	77
3.1	Extração e Caracterização do OEEp.....	77
3.2	Ensaio de preferência e ingestão .....	79
3.3	Ensaio de atratividade .....	82
3.4	Efeito OEEp na sobrevivência de <i>Lu. longipalpis</i> .....	84
3.5	Atividade leishmanicida do OEEp .....	87
4	DISCUSSÃO .....	89
5	CONCLUSÃO.....	93
	REFERÊNCIAS .....	94
	QUARTA PARTE.....	96
	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	96

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

Os flebotomíneos são insetos da ordem Diptera, da família Psychodidae, que agrupam diversas espécies de importância para a saúde pública, sendo *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie vetora de *Leishmania infantum*, protozoário causador da Leishmaniose Visceral Americana (LVA).

O programa de controle da LVA no Brasil direciona as ações para as práticas de educação em saúde, diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, controle do reservatório canino, e controle químico do inseto vetor. Essas três últimas constituem grandes desafios para a saúde pública. O arsenal terapêutico disponível para tratamento de humanos e cães é limitado e com relatos de cepas resistentes às bases farmacológicas disponíveis. No que tange ao controle do inseto vetor, este tem sido centrado no uso de inseticidas, o que resulta em um impacto ambiental não desejável, uma vez que os compostos utilizados atuam de maneira não seletiva e causam danos a organismos não alvos. Além disso, a seleção de resistência já é uma realidade no controle de flebotomíneos com impacto em outros dípteros de importância médica.

Por essas razões, o interesse em novas substâncias e compostos de origem natural tem se intensificado nos últimos anos, e os óleos essenciais têm recebido muita atenção devido ao seu aumento no uso como compostos bioativos eficazes na medicina popular. Alguns têm sido empregados contra parasitos do gênero *Leishmania* com um impacto positivo no tratamento dessa doença negligenciada e outros no controle de insetos de importância médico veterinária.

Nesse contexto, o uso de iscas açucaradas contendo extratos botânicos ou óleos essenciais (OE) tem aparecido como uma ferramenta de controle que pode interferir no ciclo de vida dos insetos vetores ou dos próprios patógenos por eles transmitidos. Ante o exposto, identificar compostos que tenham potencial inseticida e/ou leishmanicida e que possam ser

incorporados em iscas açucaradas, constitui uma importante linha de investigação para o controle das leishmanioses.

Nesse sentido, selecionamos para o presente estudo, a espécie *Eugenia pyriformis*, cujo fruto é popularmente conhecido como uvaia, por ser uma espécie representante da Mata Atlântica e nativa da flora brasileira, uma vez que seu OE já demonstrou possuir características bioativas microbianas, inclusive para espécie de *Leishmania* spp.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Flebotomíneos**

Os flebotomíneos, popularmente conhecidos como mosquito-palha, são insetos pequenos, com exoesqueleto quitinoso e corpo dividido em três segmentos: cabeça, tórax e abdômen. Como pertencentes à família Psychodidae observa-se corpo, pernas e asas cobertos por cerdas, e asas longas e eretas. Com base na morfologia da cabeça e genitália, os flebotomíneos podem ser diferenciados em pelo menos sete gêneros que agrupam mais de 950 espécies. Dessas, 100 já foram descritas como vetores de parasitos, bactérias e de vírus (RANGEL & SHAW, 2018).

Nas Américas os flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* são os principais vetores do agente etiológico da Leishmaniose Visceral Americana (LV). No Brasil, a espécie é encontrada nas cinco regiões (SHOWLER & BOGGILD, 2017). No final da década de 80, a espécie *Lu. longipalpis*, que antes habitava ambientes rurais, passou a colonizar regiões urbanas. Alguns fatores como, a ampla variedade de alimentação para fêmeas realizarem o repasto sanguíneo com diversos mamíferos e o desmatamento para construção de cidades, favoreceu essa troca de ambiente, sendo hoje considerada uma das espécies de flebotomíneos mais bem adaptadas à zona urbana (SALOMÓN *et al.*, 2015; ANVERSA *et al.*, 2017)

### **2.1.2 Biologia de flebotomíneos**

Diferente dos mosquitos, os flebotomíneos possuem seu ciclo biológico relativamente longo e integralmente no ambiente terrestre. Eles são insetos holometábolos, ou seja, possuem em seu ciclo biológico as fases de ovo, larva, pupa e adultos, tendo assim metamorfose completa. O ciclo biológico desses insetos dura em cerca de 30 a 45 dias, da fase de ovo até a fase adulta. Em condições favoráveis os adultos podem viver de 20 a 30 dias, dependendo da espécie (SOARES & TURCO, 2003).

#### **2.1.2.1 Ovos**

Após o repasto sanguíneo das fêmeas, os óvulos maturam, e ela poderá fazer a postura dos ovos. As fêmeas podem fazer a postura de cerca de 30 a 70 ovos, por repasto sanguíneo, diminuindo a quantidade de ovos nas seguintes posturas. Porém, a quantidade de ovos por postura depende do tamanho da fêmea, espécie e da nutrição advinda da alimentação sanguínea e durante a fase larval (VOLF & VOLFOVA, 2011). Apesar de não haver informações concretas sobre habitats de flebotomíneos imaturos, muito são encontrados em solo úmido, protegido e rico em matéria orgânica em decomposição que leva a elaborar que as fêmeas na natureza optam por realizar a deposição de ovos em locais com essas características visando o desenvolvimento das larvas (YOUNG & DUNCAN, 1994). Eles são pequenos, de formato helicoidal, com cerca de 0.3-0.5 mm de comprimento e 0.1-0.15 mm de largura e possuem cor clara quando é feita a postura, e depois de entrar em contato com o ambiente eles se tornam de marrom a preto. Normalmente os ovos eclodem de 6-11 dias desde o repasto sanguíneo, mas podem sobreviver até 30 dias no ambiente até condições favoráveis para eclosão (LAWYER *et al.*, 2017)



### **2.1.2.2 Larvas**

As larvas dos flebotomíneos variam de tamanho e cor entre as espécies e o estágio larval. A eclosão dá origem a larva no primeiro ínstar que é pequena e pálida com menos de 1mm de comprimento, após as primeiras horas de eclosão na parte anterior começa um escurecimento na parte posterior e amarelamento do corpo da larva, é possível observar duas cerdas caudais, as cerdas laterais são pouco evidente de forma que nem são visíveis. No segundo ínstar as larvas são levemente maiores do que as L1, com menos de 2 mm de comprimento, mas nesse estágio é possível observar quatro cerdas caudais ao invés de duas. No terceiro ínstar as larvas aumentam de tamanho e espessura, podendo chegar até 3mm de comprimento e mantém as quatro cerdas caudais. No quarto ínstar as larvas atingem até 4mm de comprimento e além das quatro cerdas caudais as cerdas laterais se tornam protuberantes e visíveis, além disso, no quarto ínstar também ocorre uma esclerotização anal dorsal. Ao final do estágio L4, as larvas param de se alimentar e iniciam o processo para se tornarem pupas (LAWYER *et al.*, 2017).

### **2.1.2.3 Pupa**

As larvas, ao final do quarto ínstar, começam a ficar pálidas e a apresentar a região anterior distendida. Essa nova fase, denominada de pré-pupa, dura aproximadamente 24 horas até a formação da pupa. A pupa dos flebotomíneos apresenta de 3-4 mm de comprimento e possui mudança na coloração de branco à laranja, a marrom avermelhado até preto, à medida que a eclosão se aproxima (LAWYER *et al.*, 2017).

### **2.1.2.4 Adultos**

Os adultos são insetos pequenos com diversas cerdas corporais e com hábito de descansar as asas em posição de 45° em relação ao corpo. O voo desses insetos é caracterizado por pequenos saltos, que acontecem a uma altura de até 1,5 m do chão. O aparelho bucal desses

insetos consiste em seis estiletes. Os machos possuem uma estrutura na ponta do abdômen utilizada durante a reprodução para segurar a fêmea. Eles possuem hábitos noturnos e se alimentam de soluções açucaradas que na natureza podem ser obtidas a partir de néctar. Somente as fêmeas realizam alimentação sanguínea, fonte necessária de proteínas para a maturação dos ovários (LAWYER *et al.*, 2017). A expectativa de vida desses insetos em laboratório é em torno de 15 A 17 dias (FERREIRA *et al.*, 2019)

## 2.2 Leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que infectam diversos mamíferos, incluindo os seres humanos, por meio da picada dos flebotomíneos. Segundo relatório da ONU, em 2018, 97 de 200 países foram considerados endêmicos para as leishmanioses, representando mais de 350 milhões de pessoas habitando em áreas de transmissão de *Leishmania* e chegando a registrar quase 2 milhões de novos casos infectados por ano. A doença está intimamente relacionada com a pobreza e é uma das Doenças Tropicais Negligenciadas (DNT) que tem grande impacto no sistema de saúde pública de países subdesenvolvidos, afetando o desempenho de trabalhadores e exacerbando a pobreza (BURZA, 2018; SOARES & TURCO, 2003; BENALLAL *et al.*, 2022).

As leishmanioses podem se apresentar como diferentes formas clínicas: Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV).

A LT possui diversas apresentações, a depender da espécie de *Leishmania* e da resposta imunológica do hospedeiro. A forma cutânea localizada é caracterizada pela infiltração da derme e epiderme por histiócitos contendo amastigotas que causam lesões auto curativas, mas que deixam cicatrizes aparentes na pele. Cerca de 700 mil a 1,2 milhões de casos são registrados a cada ano. A forma mucocutânea pode ser primária ou considerada um agravo no quadro de leishmaniose cutânea localizada. Essa forma é de incidência rara, ocorrendo em até 5% dos casos de LT, manifestando-se como alteração nas mucosas. Por fim, a LV, causada pela *L. infantum* é responsável por 200 mil a 400 mil casos anuais e é considerada a forma mais grave e fatal se não tratada. Nesse quadro o parasito infecta os órgãos do hospedeiro sendo os mais frequentes o fígado, baço, linfonodos e medula óssea, a hepatomegalia é uma característica marcante (ANVERSA *et al.*, 2017; BURZA, 2018; BENALLAL *et al.*, 2022).

Atualmente já foram registradas mais de 50 espécies de *Leishmania* no mundo, sendo 21 espécies de importância médica. Nas Américas as principais espécies de *Leishmania* são, *L. infantum*, *L. brasiliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana* e *L. mexicana*. Especificamente no Brasil, 8 espécies já foram isoladas de pacientes doentes e 21 estados brasileiros já relataram incidência de casos de leishmaniose visceral em humanos (LVH) (ANVERSA *et al.*, 2017; BURZA, 2018).

### 2.2.1 Parasito e ciclo de desenvolvimento

*Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório e se reproduz, preferencialmente, por divisão binária. As formas amastigotas, durante o repasto sanguíneo são ingeridas pelo inseto vetor, os flebotomíneos. O sistema digestivo dos flebotomíneos pode ser dividido em três partes: o intestino anterior (estomodeo), revestido por quitina; intestino médio (mesentério), que possui um epitélio simples de borda escovada com microvilosidades revestindo o lúmen; e intestino posterior (proctodeo), também revestido por quitina incluindo o triângulo pilórico e reto, e os túbulos de Malpighi (DVORAK *et al.*, 2018). Essas formas são ovaladas com presença de um flagelo curto interiorizado, e ao entrar no trato digestivo do flebotomíneo, acontece a primeira modificação morfofisiológica, se transformando em promastigotas procíclicas, que vão para o intestino médio e são envolvidas pela Matriz Peritrófica (MP), que faz parte do processo digestivo dos insetos hematofagos, sendo uma membrana semipermeável. Estas que são mais ativas, se replicam e se transformam em nectomonadas longas. Ainda dentro dessa MP essas formas são expostas a um ambiente cheio de enzimas proteolíticas secretadas em resposta ao repasto sanguíneo dos flebotomíneos (DOSTÁLOVÁ & VOLF, 2012).

As tripsinas são as principais enzimas digestivas dos flebotomíneos e a sua secreção depende da expressão do gene *Lltryp2*, que é reduzida durante a ingestão, e do gene *Lltryp1* que induz a sua secreção sendo maior entre 12 a 24h após o repasto sanguíneo. Nos adultos fêmeas a transcrição do gene *Lltryp2* não tem muita atuação quanto nos estádios larvais tardios e nos indivíduos machos (TELLERIA, *et al.* 2010).

O parasito secreta quitinase, o que facilita esse escape das ações das enzimas, agindo na MP, atrasando o processo e permitindo com que o parasito termine o processo de modificações. Quando a MP é quebrada por enzimas dos flebotomíneos, as nectomonadas

longas escapam das ações das enzimas digestivas pela abertura posterior e se ligam às microvilosidades do intestino médio. O próximo estágio são nectomonadas curtas, chamadas leptomonadas, que continuaram a multiplicação; estas se transformam em promastigotas metacíclicas, que são a forma infecciosos, ou se ligam ao revestimento de quitina da válvula estomodeal como haptomônadas. No estágio avançado de desenvolvimento, massas de nectomonadas secretam filamentos de proteofosfoglicano (PSG – Promastigote Secretary Gel), obstruem o intestino médio torácico do inseto. (DOSTÁLOVÁ & VOLF, 2012)

As formas promastigotas metacíclicas são formas altamente infectantes, com corpo celular pequeno e flagelo grande, facilitando a mobilidade. Juntamente com a obstrução do intestino médio, ocorre a danificação da válvula estomodeu, que permanece aberta, facilita o refluxo de parasitas quando o flebotomíneo faz uma nova alimentação sanguínea, ocorrendo a inoculação dos parasitos no hospedeiro vertebrado. As formas promastigotas metacíclicas, agora no hospedeiro vertebrado, evadem a lise mediada pelo sistema complemento e usam a interação com as moléculas deste sistema para se estabelecerem como parasitos intracelulares. Ali se transformam em amastigotas no fagolisossomos e se dividem rapidamente por fissão binária. Devido ao grande número de amastigotas ocorre o rompimento do macrófago e, assim, a disseminação do parasito. O inseto vetor, ao realizar o hematofagia no hospedeiro infectado, ingere junto com o sangue, macrófagos infectados ou amastigotas, completando o ciclo do parasito (ALEXANDER & ROSSELL, 1992; BATES, 2007; SHOWLER & BOGGILD, 2017, CDC, 2019).

*Leishmania* podem ser classificadas, taxonomicamente, de acordo com a sua localização no aparelho digestivo de vetor, assim, aquelas que aderem à porção anterior e média do intestino são do subgênero *Leishmania* e aquelas que possuem uma fase de divisão que se aderem ao intestino posterior são do subgênero *Viannia* (AÑEZ; NIEVES; CAZORLA, 1889; BATES, 2007; AKHOUNDI *et al.*, 2016; CDC, 2019). Outra classificação sugerida por Spinosa *et al* (2016), classifica-os com um novo subgênero *Leishmania* (*Mundinia*) Shaw, Camargo & Teixeira, 2016 que é criado para o complexo *L. enriettii* que inclui *L. martiniquensis*. (SPINOSA *et al.*, 2016) No Brasil são encontradas as seguintes espécies que podem infectar o ser humano: *L. (Leishmania) amazonensis* Lainson e Shaw 1982; *L. (L.) infantum*; *L. (L.) guyanensis* Floch, 1954; *L. (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911, emend Matta 1913; *L. (V.) lainsoni* Silveira *et al.* 1987; *L. (V.) naiffi* Lainson e Shaw, 1989; *L. (V.)*

*lindenbergi* Silveira *et al.* 2002; *L. (V.) panamensis* Lainson e Shaw, 1972; *L. (V.) shawi* Lainson *et al.* 1989 (AKHOUNDI *et al.*, 2016; SPINOSA *et al.*, 2016).

### **2.3 Iscas açucaradas**

Como descrito anteriormente, as fêmeas adultas de flebotomíneos são hematófagas, necessitando de repasto sanguíneo para maturação dos ovários, e ambos os sexos se alimentam de açúcares de plantas como néctar, melado ou frutas. Esse açúcar ingerido atua como fonte de energia para o inseto adulto, tendo relação direta com o desenvolvimento do inseto, mas também tem relação com o estabelecimento de parasitos dentro do trato digestivo de fêmeas. Os parasitos absorvem açúcares presentes no conteúdo intestinal do inseto, auxiliando no seu desenvolvimento (JACOBSON *et al.*, 2001).

Com uma alimentação baseada em açúcares provindo de plantas, foi descrito o possível uso de iscas de açúcar para o controle desses insetos e do desenvolvimento de leishmanias, auxiliando nas medidas de controle dos patógenos transmissíveis por vetores (QUALLS *et al.*, 2015).

### **2.4 Óleos Essenciais**

Os compostos secundários ou compostos orgânicos voláteis (COV) produzidos pelo metabolismo das plantas, são geralmente compostos lipofílicos de baixo peso molecular e exibem uma diversidade de compostos com ação biológica e farmacológica. Dessa forma, a International Standard Organization (ISO) em 2013, definiu que óleos essenciais (OE) como compostos químicos obtidos de partes de plantas por meio da destilação, arraste a vapor d'água e por prensagem dos pericarpos de frutos cítricos (ISO/Tc 54, 2023).

O termo 'óleo' é devido a suas características físico-químicas como serem substâncias líquidas e hidrofóbicas em temperatura ambiente onde sua principal característica é a volatilidade se diferenciando assim de óleos fixos obtidos de sementes como o óleo de milho ou óleo de girassol (OLIVEIRA & JOSE; 2007). Os óleos essenciais são obtidos de diferentes

partes das plantas, como raízes, folhas, frutos, flores e outros, por meio de diferentes métodos de extração (DOOST *et al.*, 2020).

As maneiras de obtenção de OE são aplicadas através de diferentes métodos de acordo com o material da planta utilizado. A hidrodestilação, maceração, extração por solvente, enfleurage, gases supercríticos e microondas são exemplos de técnicas utilizadas para a extração, os métodos mais utilizados são o arraste a vapor e a hidrodestilação (OLIVEIRA & JOSE; 2007; DOOST *et al.*, 2020).

#### **2.4.1 Características Botânicas de *Eugenia pyriformis***

A família Myrtaceae, é uma das famílias mais importantes da flora brasileira, com 121 gêneros descritos e cerca de 5 mil espécies identificadas onde uma delas é a *Eugenia pyriformis*, uma planta nativa da Mata Atlântica brasileira, que possui os nomes vulgares de Uvaia, conhecida também popularmente como uvalha, ubaia, uvaia do mato, uvaieira, uvalheira, orvalho e azedinha (JACOMINO *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2022).

A planta produz cerca de 5 kg de fruto por ano e o tamanho médio da árvore é 5 à 15 m com copa arredondada ou alongada. As folhas são opostas, glabras (sem pelo) com tamanho médio de 4-7 cm, quando jovens apresentam coloração vermelha-rosada. Já as flores são hermafroditas, tetraméricas, com muitos estames e o fruto é do tipo baga, arredondado, com epicarpo fino e aveludado. As sementes são grandes com cerca de 2 a 4 sementes por fruto e apresentando alta capacidade de germinação (JACOMINO *et al.*, 2018).

Ecologicamente, a planta desperta interesse e é utilizada em sistemas agroflorestais por apresentar madeira dura, e por serem resistentes a doenças, além de apresentam frutos comestíveis, onde seu fruto atrai diferentes espécies de vertebrados que dá a essa espécie a característica de ser usada no processo de reflorestamento de áreas heterogêneas degradadas e de preservação permanente (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

A uvaia floresce em diferentes épocas do ano, de acordo com o clima e a região em que a planta se encontra, ainda sim, poucos estudos sobre a fenologia dessas plantas estão disponíveis. Outra característica que contribui para essa variação é que, mesmo com um alto

potencial, essa espécie não é domesticada (Danner *et al.*, 2010; SGANZERLA *et al.*, 2021). A espécie apresenta alta variabilidade genética dentro de uma mesma população dando características diferentes a cada planta e sendo necessário o fruto para a identificação dessas variações (SILVA *et al.*, 2018; SGANZERLA *et al.*, 2018; SGANZERLA *et al.*, 2019).

#### **2.4.2 Óleo Essencial de folhas de *Eugenia pyriformis***

O OEEp vem sendo trabalhado em diversos estudos com diferentes metodologias e aplicabilidades. A caracterização de OE pode variar de acordo com a parte usada para a extração, a metodologia utilizada, a localização da planta, e devido esses fatores os compostos majoritários podem variar (DURAZZINI *et al.*, 2019; DE SOUZA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2022).

A ação antioxidante e anti-inflamatória é relatada em diferentes estudos e está associado principalmente a moléculas bioativas como os compostos voláteis presentes nos óleos essenciais (RUFINO *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2012; DONADO-PESTANA *et al.*, 2018; SGANZERLA *et al.*, 2019). Outra característica é a ação antimicrobiana de diferentes compostos da planta (MEDEIROS *et al.*, 2019; BASTOS *et al.*, 2017; KAUFFMANN *et al.*, 2016; CHAVASCO *et al.*, 2014).

A ação leishmanicida do óleo essencial sob a espécie *Leishmania amazonensis* foi descrita por Martinez & Petersen (2014). Já Medeiros e outros. (2019) observou efeito larvicida do OE em carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* com diminuição de 72,25% na eficiência reprodutiva de larvas tratadas com o OE.

A obtenção de óleos essenciais de Uvaia tem demonstrado aplicações industriais deste material em aplicações industriais a curta e longa escala com o custo de fabricação proposto em média por 622,9 a 1102,6 US\$ kg<sup>-1</sup> de acordo com o estudo de Klein e colaboradores em 2021.

Dessa maneira, estudos com o OEEp são promissores e podem dar à sociedade um retorno benéfico, sendo assim este trabalho visa estudar mais aspectos relacionados ao uso

deste OE, como iscas açucaradas para vetores de patógenos de importância médica e médica veterinária.



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a bioatividade do Óleo Essencial de *Eugenia pyriformis* (OEEp) sobre *Lutzomyia longipalpis* e *Leishmania infantum*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Estabelecer um Procedimento Operacional Padrão (POP) para instalação e manutenção de uma colônia *Lu. longipalpis*.

Estabelecer e manter uma colônia de *Lu. longipalpis* no Departamento de Medicina da Universidade Federal de Lavras.

Extrair e caracterizar o Óleo Essencial (OE) de folhas de *Eugenia pyriformis*.

Avaliar o efeito de iscas açucaradas contendo OEEp sobre *Lu. longipalpis* em condições de laboratório.

Avaliar o potencial leishmanicida do OEEp sobre formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania infantum*.

## REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, J.; RUSSELL, D. G. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. **Advances in parasitology**, v. 31, p. 175–254, 1992.
- ANVERSA, L. *et al.* Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira** (1992), v. 64, n. 3, p. 281–289, 2018.
- AÑEZ, N.; NIEVES, E.; CAZORLA, D. The validity of the developmental pattern in the sandfly gut for classification of *Leishmania*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 5, p. 634–635, 1989.
- AKHOUNDI, M. *et al.* A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007.
- BASTOS, L. A. Ethanolic extracts of different fruit trees and their activity against *Strongyloides venezuelensis*. **Int J Mod Biol Res**, n. 5, p. 1–7, 2017.
- BENALLAL, K. E. *et al.* Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the Maghreb region: A systematic review of distribution, morphology, and role in the transmission of the pathogens. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 16, n. 1, p. e0009952, 2022.
- BURZA, S. Leishmaniasis. ” Lancet. **Lancet**, v. 392, p. 951–970, 2018. Acesso em: 05 fev. 2019.
- CHAVASCO, J. Avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de extratos de plantas do cerrado do Sul de Minas Gerais. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, p. 13–20, 2014.
- DONADO-PESTANA, C. M. *et al.* Polyphenols from Brazilian native Myrtaceae fruits and their potential health benefits against obesity and its associated complications. **Current opinion in food science**, v. 19, p. 42–49, 2018.
- DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1. [s.l: s.n.].
- DOOST, A. Recent advances in food colloidal delivery systems for essential oils and their main components. **Em: Food Science & Technology**, v. 99. [s.l: s.n.]. p. 474–486.
- DURAZZINI, A. M. S. *et al.* *Eugenia pyriformis* Cambess: a species of the Myrtaceae family with bioactive essential oil. **Natural Product Research**, p. 1–5, 2019.
- DVORAK, V.; SHAW, J.; VOLF, P. Parasite biology: The vectors. Em: The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases. **Cham: Springer International Publishing**, 2018. p. 31–77.
- FERREIRA, T. N. *et al.* Transmission blocking sugar baits for the control of *Leishmania* development inside sand flies using environmentally friendly beta-glycosides and their aglycones. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 614, 2018.

JACOBSON, R.; SCHLEIN, Y.; EISENBERGER, C. The biological function of sand fly and *Leishmania* glycosidases. **Medical microbiology and immunology**, v. 190, n. 1–2, p. 51–55, 2001.

JACOMINO, A. P. *et al.* Uvaia— *Eugenia pyriformis* Cambess. Em: Exotic Fruits. [s.l.] **Elsevier**, 2018. p. 435–438.

KLEIN, E. J. *et al.* Techno-economical optimization of uvaia (*Eugenia pyriformis*) extraction using supercritical fluid technology. **The journal of supercritical fluids**, v. 174, n. 105239, p. 105239, 2021.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniases: a review. **Medical and veterinary entomology**, v. 4, n. 1, p. 1–24, 1990.

KAUFFMANN, C. *et al.* Potential antileishmanial activity of essential oils of native species from southern Brazil. **Environment and natural resources research**, v. 6, n. 4, p. 18, 2016.

LAWYER, P. *et al.* Laboratory colonization and mass rearing of phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae). **Parasite** (Paris, France), v. 24, p. 42, 2017.

LUCKHART, S. *et al.* Reframing critical needs in vector biology and management of vector-borne disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 2, p. e566, 2010.

MARTINEZ, Pedro A.; PETERSEN, Christine A. Chronic infection by *Leishmania amazonensis* mediated through MAPK ERK mechanisms. **Immunologic research**, v. 59, n. 1, p. 153-165, 2014.

MEDEIROS, J. P. *et al.* Biocidal potential of *Eugenia pyriformis* essential oil in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in the free-living cycle. **Pesquisa veterinária brasileira [Brazilian journal of veterinary research]**, v. 39, n. 11, p. 879–888, 2019.

OLIVEIRA, E. F. *et al.* Alternative method for the mass rearing of *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* (Diptera: Psychodidae) in a laboratory setting. **Journal of medical entomology**, v. 52, n. 5, p. 925–931, 2015.

OLIVEIRA, H. Geographical ecology and conservation of *Eugenia L.*(Myrtaceae) in the Brazilian Cerrado: Past, present and future. **Austral Ecology**, n. 1, p. 95–104, 2019.

OLIVEIRA, S. M.; MARQUES DE; JOSE, V. **Age Processos de extração de óleos essenciais Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR**. [s.l.: s.n.].

PEREIRA, M. C. *et al.* Characterization and antioxidant potential of Brazilian fruits from the Myrtaceae family. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 12, p. 3061–3067, 2012.

QUALLS, W. A. *et al.* Control of sand flies with attractive toxic sugar baits (ATSB) and potential impact on non-target organisms in Morocco. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 87, 2015.

RANGEL, E. F.; SHAW, J. J. Brazilian sand flies: Biology, taxonomy, medical importance and control. Berlin, Germany: **Springer**, 2018.

READY, P. D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. **Annual review of entomology**, v. 58, n. 1, p. 227–250, 2013.

RUFINO, M. DO S. M. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010.

SAFYANOVA, V. M. Laboratory cultivation of sandflies (Diptera; Phlebotominae). **Bulletin of the World Health Organization**, v. 31, n. 4, p. 573–576, [s.d.].

SALOMÓN, O. D. *et al.* *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 7, p. 831–846, 2015.

SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R. L.; MESSER, G. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 20, p. 9944–9948, 1992.

SGANZERLA, W. Nutritional, physicochemical and antimicrobial properties of uvaia pulp (*Eugenia pyriformis* Cambess). **Communications in Plant Sciences**, n. 1, p. 1–7, 2018.

SGANZERLA, W. Variability in the molecular, phenological, and physicochemical characteristics of uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess-Myrtaceae) accessions from the Brazilian Atlantic rainforest. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 35, 2021.

SGANZERLA, W. G. *et al.* Geographical discrimination of uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) by principal component analysis. *Journal of the science of food and agriculture*, v. 99, n. 15, p. 6778–6787, 2019.

SHOWLER, A. J.; BOGGILD, A. K. Protozoan Diseases: Leishmaniasis. **Em: International Encyclopedia of Public Health**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 97–102.

SILVA, P. G. da *et al.* Characteristics of the fruits of two uvaia populations grown in Salesópolis, SP, Brazil. **Revista Brasileira de fruticultura**, v. 40, 2018.

SOARES, R. P. P.; TURCO, S. J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 3, p. 301–330, 2003.

de Souza, J. H., Michelon, A., Banhuk, F. W., Staffen, I. V., Klein, E. J., da Silva, E. A., & Menolli, R. A. (2020). Leishmanicidal, Trypanocidal and Antioxidant Activity of Amyrin-Rich Extracts from *Eugenia pyriformis* Cambess. **Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR**, 19(4), 343–353. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2020.113368.14258>

SPINOSA, O. A. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**, n. 4, p. 430–442, 2018.

TELLERIA, E. L. *et al.* Trypsin-like serine proteases in *Lutzomyia longipalpis*--expression, activity and possible modulation by *Leishmania infantum* chagasi. **PloS one**, v. 5, n. 5, p. e10697, 2010.

VOLF, P.; VOLFOVA, V. Establishment and maintenance of sand fly colonies. **Journal of vector ecology: journal of the Society for Vector Ecology**, v. 36, p. S1–S9, 2011.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). [s.l.] **American Entomological Institute**, 1994.

## **SEGUNDA PARTE**

### **PROCEDIMIENTO OPERACIONAL PADRONIZADO (POP)**



**PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO**

**Documento:**  
**Manutenção Colônia de *Lutzomyia longipalpis***  
**(Jacobina)**

**Número documento:**  
**XXXX**

**Página** \_\_\_/\_\_\_

**HISTÓRICO DE REVISÕES**

<b>Data</b>	<b>Versão</b>	<b>Alterações</b>	<b>Elaborado</b>	<b>Revisado</b>	<b>Aprovado</b>
Data aprovação	00	Não se aplica	Ingrid Marciano Alvarenga	Jamile Macedo	Samara Graciane da Costa Latgé

Próxima revisão: após **1 ano** da última aprovação

**Data de Aprovação:** \_\_/\_\_/\_\_

**Versão 00**



## PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO

**Documento:**

**Manutenção Colônia de *Lutzomyia longipalpis*  
(Jacobina)**

**Número documento:**

**XXXX**

**Página \_\_\_/\_\_\_**

### 1 OBJETIVOS

Descrever atividades de manutenção e manejo da colônia de *Lutzomyia longipalpis* (Jacobina)

### 2 APLICABILIDADE

Aplicável a todos os integrantes do Laboratório de Biologia Parasitária II que desenvolvem atividades com *Lu. longipalpis*

### 3 DEFINIÇÕES

Este procedimento padronizado para colônia de *Lutzomyia longipalpis* faz se necessário para padronizar as atividades e prevenir diferentes problemas de queda na densidade da colônia.

O modelo utilizado foi baseado nas descrições de Lawyer *et al.* (2017), que leva em consideração a biologia desses insetos e suas preferências. Como, fornecer um ambiente ideal que mimetize o ecossistema natural de *Lu. longipalpis*, sendo esse, áreas de clima tropical ou subtropical com temperatura e umidade mais elevadas e grande disponibilidade de matéria orgânica no solo.

Garantir as condições ideais para reprodução e desenvolvimento desses insetos é essencial para a manutenção e crescimento da colônia. Garantindo também, maior disponibilidade de espécimes no desenvolvimento de pesquisas relacionadas à eles.

**Data de Aprovação: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_**

**Versão 00**



## PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO

**Documento:**

Manutenção Colônia de *Lutzomyia longipalpis*  
(Jacobina)

**Número documento:**

XXXX

Página \_\_\_/\_\_\_

#### 4 SIGLAS

- (p/v)- Peso por volume;
- mL - mililitros;
- g- grama;
- °C- graus celsius;
- cm- centímetro;
- L- litro;
- mm- milímetro;
- h- hora;

#### 5 REFERÊNCIAS

Sharma U, Singh S. Insect vectors of Leishmania: Distribution, physiology and their control. J Vector Borne Dis. 2008;45:255–72.

Lawyer P, Killick-Kendrick M, Rowland T, Rowton E, Volf P. Laboratory colonization and mass rearing of phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae). Parasite [Internet]. 2017;24:42. Available from: <http://www.parasite-journal.org/10.1051/parasite/2017041>

Data de Aprovação: \_\_/\_\_/\_\_

Versão 00





## PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO

**Documento:**

**Manutenção Colônia de *Lutzomyia longipalpis*  
(Jacobina)**

**Número documento:**

**XXXX**

**Página \_\_\_/\_\_\_**

## 6 DESCRIÇÃO

### 6.1 Preparo soluções, ração e potes de gesso

O preparo dos itens utilizados na colônia deve ser observado e realizado de acordo com a demanda necessária. O material não deve ser preparado em excesso para não haver contaminação por fungos, bactérias ou ácaro.

#### 6.1.1 Solução Sacarose 70 % (p/v)

Todos os materiais utilizados durante o preparo da solução Sacarose e para armazenamento devem ser autoclavados anteriormente para evitar contaminação de microrganismos. Entre eles, bastão de vidro, béquer de vidro 600 mL, béquer de vidro 250 mL e frasco de vidro 400 mL.

##### 6.1.1.1 Equipamentos

- Autoclave
- Mergulhador ebulidor elétrico
- Microondas
- Balança analítica

**Data de Aprovação: \_\_/\_\_/\_\_**

**Versão 00**



## PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO

**Documento:**

**Manutenção Colônia de *Lutzomyia longipalpis*  
(Jacobina)**

**Número documento:**

**XXXX**

**Página \_\_\_/\_\_\_**

### 6.1.1.2 Material

- Açúcar refinado
- Água deionizada
- Espátula
- Fervedor de alumínio
- Bastão de vidro
- Béquer de vidro 600 mL
- Béquer de vidro de 250 mL
- Frasco de vidro 400 mL

Preparar 300 mL de solução açucarada para aproximadamente um mês. Com o auxílio de uma balança analítica, pesar 210 g de açúcar refinado em um béquer de 500 mL. Ferver aproximadamente 250 mL de água deionizada com um fervedor de alumínio. Adicionar a água quente ao açúcar refinado vagarosamente e misturar com a ajuda de uma bastão de vidro até que a solução chegue a marca de 300 mL no béquer de vidro. A mistura deve então ser homogeneizada, a ponto de não serem observados grãos de açúcar, em banho maria no fervedor de alumínio e transferida para o frasco de vidro de 400 mL. A solução deve ser etiquetada com data de processamento, levada para autoclavagem e armazenada em geladeira a 4 °C.

**Data de Aprovação: \_\_/\_\_/\_\_**

**Versão 00**



## PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO

**Documento:**

Manutenção Colônia de *Lutzomyia longipalpis*  
(Jacobina)

**Número documento:**

XXXX

Página \_\_\_/\_\_\_

### 6.1.2 Ração Larvas

#### 6.1.2.1 Equipamentos

- Processador ou triturador
- Autoclave

#### 6.1.2.2 Material

- Peneira
- Bandeja
- Funil
- Frasco de vidro
- Terra adubada natural (evitar adubo químico)
- Fezes de coelho secas
- Ração de coelho comercial

A ração das larvas é uma composição de Terra adubada, fezes de coelho secas e ração de coelho. Para o preparo é necessário moer cada um dos componentes individualmente em um liquidificador ou processador, peneirar, transferi-los para frascos de vidro e autoclavar. Após esse processo, esses componentes podem ser mantidos devidamente lacrados separadamente para facilitar a produção da ração para as larvas.

Para produzir a ração das larvas utiliza-se a proporção de 1:1:1 de cada componente já processado, sendo, terra adubada, fezes de coelho e ração de coelho. A mistura deve ser

Data de Aprovação: \_\_/\_\_/\_\_

Versão 00



## PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO

**Documento:**

**Manutenção Colônia de *Lutzomyia longipalpis*  
(Jacobina)**

**Número documento:**

**XXXX**

**Página \_\_\_/\_\_\_**

devidamente homogeneizada antes do uso, podendo ser através da agitação do frasco de vidro tampado. Todos os frascos de vidro devem ser etiquetados com a data de processamento e autoclavagem.

### 6.1.3 Potes de Gesso

#### 6.1.3.1 Material

- Estilete
- Colher de Sopa
- Papel Toalha
- Recipiente plástico ou béquer de plástico de 400 mL
- Pote de plástico descartável com tampa 250 mL
- Gesso em pó
- Água

Nos potes de plásticos realizar um furo no fundo de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro com o auxílio de um estilete, este furo será essencial para manter a umidade necessária dentro do pote. As tampas também devem ser cortadas, retirando a parte central na mesma medida, este furo será utilizado no processo de “sugar” e liberar as fêmeas adultas nos potes.

Em um recipiente plástico coloque 5 colheres de gesso, acrescente a água aos poucos até obter uma massa homogênea sem pedaços sólidos, a massa precisa ser consistente e não pode ficar muito diluída. Os potes já preparados devem ser colocados em cima de cerca de 3

**Data de Aprovação: \_\_/\_\_/\_\_**

**Versão 00**



## PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO

**Documento:**

**Manutenção Colônia de *Lutzomyia longipalpis*  
(Jacobina)**

**Número documento:**

**XXXX**

**Página \_\_\_/\_\_\_**

folhas de papel toalha. Deposite aproximadamente um centímetro da massa do gesso para cobrir o fundo do pote. Deixe que seque naturalmente.

### **6.1.4 Potes para oviposição**

#### **6.1.4.1 Material**

- Papel de gramatura 150g/m<sup>2</sup> ou 180g/m<sup>2</sup>, branco ou cor clara
- Tecido voil de 10X10cm
- Chumaço de Algodão

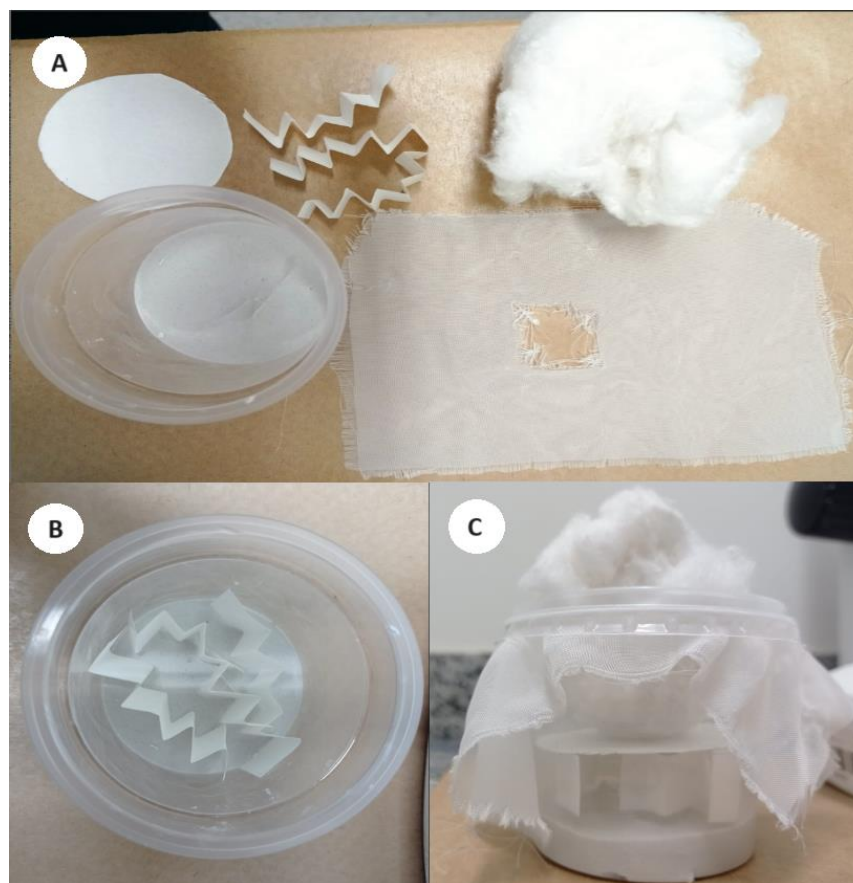
Para preparar os potes para oviposição deve recortar um círculo em papel de gramatura 150g/m<sup>2</sup> ou 180g/m<sup>2</sup>, preferencialmente na cor branco ou cor clara para permitir uma boa visualização dos ovos, a circunferência deve ser do tamanho do fundo do pote de gesso. Também deverão ser recortadas três formas retangulares de papel com aproximadamente 5x1cm, esses retângulos deverão ser dobrados de forma que fiquem sanfonados e posicionados no pote de gesso com a altura de 1 cm para cima, para que sirvam de suporte para o círculo de papel que será colocado por cima. Esse processo serve para criar um segundo plano e assim aumentar a superfície de contato para a oviposição das fêmeas e garantir mais ovos. Em um quadrado de tecido voil de 10x10cm recorte em seu centro um círculo de 1,5cm de diâmetro, o mesmo tamanho da circunferência na tampa do pote. Tampe o pote, de forma que o tecido fique posicionado abaixo da tampa e os furos em ambos alinhados. Nesses furos deve ser colocado um chumaço de algodão que realize o fechamento da área. Deve-se atentar para que o chumaço

**Data de Aprovação: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_**


**Versão 00**

seja o suficiente para não deixar espaços que as fêmeas possam fugir, mas que não seja muito apertado que dificulte o manuseio e ele não deve entrar em contato com a superfície de papel elevada dentro do pote, para que o espaço das fêmeas não seja prejudicado.

Figura 1 – Composição do pote de oviposição onde são depositadas as fêmeas engorgitadas de flebotomíneos.



Legenda. A- Todos os itens que compõem o pote de oviposição sendo eles, uma forma sanfonada e um círculo de papel cartonado, um pedaço de tecido voil, um chumaço de algodão, um pote descartável de 125ml com gesso cobrindo o fundo. B- Posicionamento dos papéis sanfonados no fundo do pote. C- Resultado final do pote para a oviposição.

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO</b>	
<b>Documento:</b> <b>Manutenção Colônia de <i>Lutzomyia longipalpis</i></b> <b>(Jacobina)</b>	<b>Número documento:</b> <b>XXXX</b>	
	<b>Página</b> ___/___	

Fonte: Alvarenga (2024)

### 6.1.5 Potes de larvas e adultos

Após o processo de *brushing out*, devem restar somente os ovos. As formas em papéis serão retiradas e o tecido voil e algodão serão substituídos por um papel toalha dobrado 4 vezes e posicionado abaixo da tampa, com o intuito de vedar o furo.

### 6.2 Procedimento

Para que a qualidade e quantidade dos insetos seja mantida, a manutenção da colônia deve ser realizada no mínimo 3 vezes por semana, segunda, quarta e sexta. O intervalo entre as manutenções não deve ultrapassar três dias e o ritmo de alimentações também, salvo em situações extraordinárias, por exemplo podendo ser realizada menor frequência de alimentações quando a colônia estiver com baixa densidade de insetos fêmeas. Nesta situação a quantidade de fêmeas nas gaiolas não é suficiente para realizar 3 alimentações sanguínea por semana.

As etapas descritas abaixo devem ser feitas todos os dias da manutenção: alimentação das larvas, manejo dos adultos, repasto sanguíneo e *brushing out*.

<b>Data de Aprovação:</b> __/__/____	<b>Versão 00</b>
--------------------------------------	------------------



## PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO

**Documento:**

**Manutenção Colônia de *Lutzomyia longipalpis*  
(Jacobina)**

**Número documento:**

**XXXX**

**Página \_\_\_/\_\_\_**

### 6.2.1 Alimentação de larvas

#### 6.2.1.1 Equipamentos

- Microscópio estereoscópio

#### 6.2.1.12 Material

- Pincel
- Gaze
- Ração de larvas

Para o manejo das larvas de *Lu. longipalpis* é necessário identificar as fases de desenvolvimento para administrar corretamente a quantidade de ração.

As larvas levam de 3 a 4 semanas para chegar à fase de pupa. As larvas possuem 4 estádios de desenvolvimento e variam de <1 a < 4 mm, durante o desenvolvimento.

- **Larvas L1** - No primeiro instar possuem cabeça escura, minúsculas cerdas laterais e duas cerdas caudais.
- **Larvas L2 e L3** - No segundo e terceiro instar possuem quatro cerdas caudais e são diferenciadas pelo tamanho, e sutis cerdas laterais no terceiro ínstar.

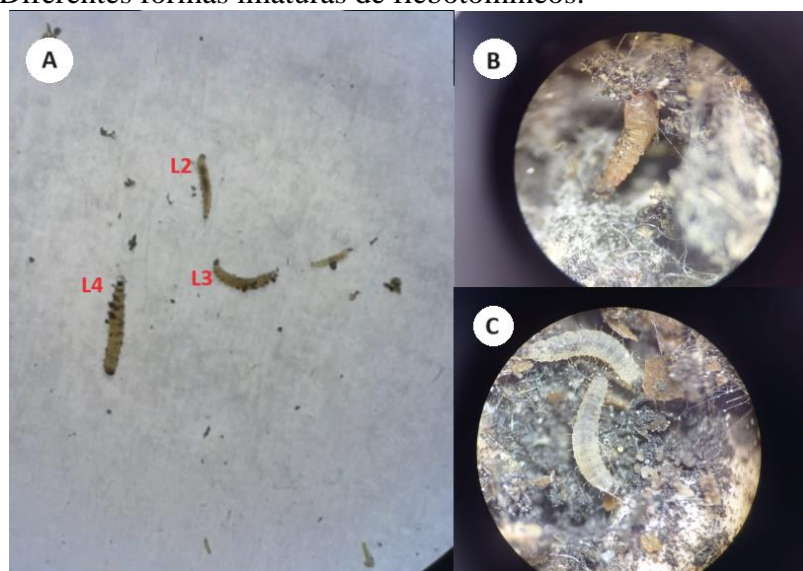
**Data de Aprovação: \_\_/\_\_/\_\_**

**Versão 00**



- **Larvas L4** - No quarto instar elas são maiores, também possuem 4 cerdas caudais; mas as cerdas laterais são mais pronunciadas e possuem uma placa anal dorsal fortemente esclerotizada.
- **Larvas L4 tardias** - No fim do quarto instar, param de se alimentar e esvaziam o conteúdo intestinal, se tornando esbranquiçadas. Em aproximadamente 24 horas as larvas tornam-se pupas.

Figura 2 – Diferentes formas imaturas de flebotomíneos.



Legenda A- Larva em diferentes estádios larvais para comparação de tamanho. B- Pupa de *Lutzomyia longipalpis* com aumento em microscópio estereoscópico. C- Larva L4 de *Lu. longipalpis* com aumento em microscópio estereoscópico.

Fonte: Alvarenga (2024)

Para alimentação das larvas é utilizada a mistura preparada à base de ração de coelho, fezes de coelho e terra adubada comercial. O preparo dos componentes está descrito no item 6.1.2. De preferência os componentes da mistura devem ser misturados apenas na hora da



## PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO

**Documento:**

**Manutenção Colônia de *Lutzomyia longipalpis*  
(Jacobina)**

**Número documento:**

**XXXX**

**Página \_\_\_/\_\_\_**

utilização e na quantidade necessária. Os ingredientes devem ser misturados na proporção 1:1:1 em uma garrafa de vidro.

O processo de alimentação deve sempre ser realizado com o auxílio de um microscópio estereoscópio, para observar o desenvolvimento das larvas, correta alimentação, umidade, presença de ácaros ou crescimento de eventuais colônias de fungos.

Os potes de larvas são mantidos em caixas retangulares com tampa de 18 L forradas com duas camadas de papel toalha umedecidos com água. As caixas são deixadas em incubadora a temperatura de 27°C +/- 1°. A umidade das caixas deve ser controlada de forma que os potes não fiquem ressecados, pois as larvas de *Lu. longipalpis* são sensíveis ao ressecamento.

Em dias de manejo da colônia, retirar da incubadora as caixas contendo os potes de larvas. Os potes devem ser retirados da caixa para manipulação e o papel toalha que recobre o fundo deve ser trocado em cada manutenção para evitar contaminação dos potes ou crescimento de ácaros.

Para alimentação das larvas em estágio L1, a mistura de ração deve ser peneirada em gaze, para garantir um substrato mais fino. Para isto é necessário prender com elástico uma gaze na boca da garrafa de vidro que contém a mistura de ração.

**Data de Aprovação: \_\_/\_\_/\_\_**

**Versão 00**

**Documento:****Manutenção Colônia de *Lutzomyia longipalpis*  
(Jacobina)****Número documento:****XXXX****Página \_\_\_/\_\_\_**

Figura 3 – Pote com mistura para alimentação das larvas de flebotomíneos.



Legenda: Frasco com mistura de ração para larvas com gaze amarrada à abertura para peneirar a ração, de forma que só as partículas menores sejam administradas as larvas L1.


Fonte: Alvarenga (2024)

Uma camada fina de ração deve ser colocada de forma a recobrir a superfície dos potes. Somente começar a colocar ração quando o número de larvas L1 for maior que o número de ovos não eclodidos. Se a relação larvas/ovos não eclodidos for baixa, deixar o pote sem alimento e aguardar o próximo dia de manutenção. Colocar comida sem a presença de larvas pode levar ao aparecimento de fungos.

Para alimentação dos potes de larvas L2 a L4 a ração é oferecida conforme armazenada, sem necessidade de utilização de gaze. Uma fina camada de ração deve ser colocada no pote recobrendo o substrato anterior, misturar a ração nova ao substrato anterior utilizando o cabo de um pincel. Este procedimento ajuda a aerar todo o substrato facilitando a alimentação das larvas e diminuindo o crescimento de fungos.

A quantidade de ração a ser oferecida deve ser observada levando em conta a densidade larval dos potes. Como não é possível dosar a quantidade de ração oferecida em cada pote,

**Data de Aprovação: \_\_/\_\_/\_\_****Versão 00**

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO</b>	
<b>Documento:</b> <b>Manutenção Colônia de <i>Lutzomyia longipalpis</i></b> <b>(Jacobina)</b>	<b>Número documento:</b> <b>XXXX</b>	
	<b>Página</b> ___/___	

algumas características podem ajudar o operador a identificar se a quantidade de alimento oferecida está sendo suficiente.

- As larvas ingerem mais comida de acordo com o avanço do desenvolvimento, por isso é necessário observar a população de larvas nos potes para oferecer a ração. Se em um mesmo pote diferentes estágios (ex. L2 e L4 tardia) forem identificados, pode indicar pouca comida sendo oferecida.

- Se as larvas estiverem subindo pela superfície ou furando o papel que recobre os potes, pode indicar pouca ração sendo oferecida. Caso as larvas escapem dos potes, deve-se utilizar um pincel fino e macio para colocá-las de volta ao pote.

- O crescimento exagerado de fungos na superfície do substrato pode indicar muita ração sendo oferecida. Neste caso não é necessário retirar o fungo, ele pode ser misturado ao substrato, utilizando o cabo de um pincel. É necessário quebrar as placas de fungo formadas assim as larvas conseguem consumir o fungo. Oferecer menos comida até que o fungo seja consumido.

### **6.2.2 Potes de larvas em estágio mais avançado**

Potes contendo larvas L4 tardias e pupas não devem ser alimentados. Antes de abrir os potes com larvas L4 tardia e pupas, observar nos potes a presença de adultos. Neste caso, abrir o pote dentro da gaiola de adultos (**Conferir tópico 6.2.4**) antes de manipular as larvas.

<b>Data de Aprovação:</b> __/__/____	<b>Versão 00</b>
--------------------------------------	------------------



## PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO

**Documento:**

**Manutenção Colônia de *Lutzomyia longipalpis*  
(Jacobina)**

**Número documento:**

**XXXX**

**Página \_\_\_/\_\_\_**

Se necessário mexer o substrato com o cabo de um pincel para liberar adultos presos no substrato. Depois observar os potes com o auxílio de um microscópio estereoscópio, para a presença de pupas e de pupas vazias, e também a presença de ácaros.

**Observação Importante:** se ocorrer o aparecimento de ácaros, os potes contaminados devem ser imediatamente separados dos outros potes e todo material utilizado na manipulação deve ser desinfetado e autoclavado quando possível. Potes de adultos muito antigos acumulam substrato não consumido, o que facilita o aparecimento de ácaros. Se o pote for antigo, pupas vazias e emergência de poucos adultos, descartar o pote.

### 6.2.3 Armazenamento dos potes

Cada pote individualmente deve ser tampado com uma folha de papel toalha dobrada 4 vezes, com exceção dos potes de oviposição com tecido voil e algodão. Os potes serão armazenados em caixa plásticas de 18 L, em cada caixa devem ser colocados no fundo duas camadas de papel toalha e umedecidos com água deionizada, e os potes organizados acima desses papéis para manter a umidade. As caixas devem ser tampadas, etiquetadas se são caixas contendo potes de oviposição e çarvas iniciais ou contendo potes com aparecimento de adultos e pupas para facilitar o manejo. As caixas devem ser armazenadas em incubadora à temperatura de 27°C +/- 1°.

**Data de Aprovação: \_\_/\_\_/\_\_**

**Versão 00**



## PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO

**Documento:**

**Manutenção Colônia de *Lutzomyia longipalpis*  
(Jacobina)**

**Número documento:**

**XXXX**

**Página \_\_\_/\_\_\_**

### 6.2.4 Manejo de adultos

#### 6.2.4.1 Material e equipamentos

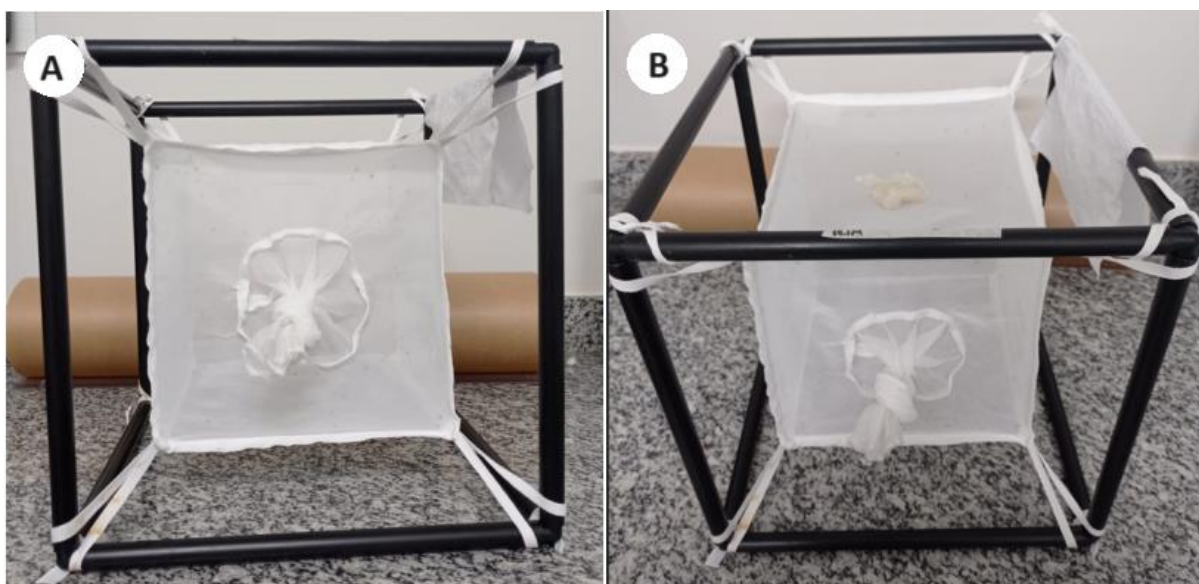
- Estrutura de metal ou plástica, cúbica de aproximadamente 30x30cm;
- Gaiola de voil cúbica com aproximadamente 25x25cm, com um tunel de voil no diâmetro da mão de um operador (+/- 5 cm), e com elásticos em cada vértice para amarração à estrutura.

A gaiola dos adultos consiste em uma estrutura cúbica que garante suporte para uma gaiola de voil presa entre os vértices uma da outra por elásticos para garantir a sustentação. A gaiola deve conter um tunel pelo qual o operador irá inserir os potes contendo adultos para liberá-los dentro dela. Deve sempre verificar a gaiola de voil para caso haja furos, para evitar que os insetos não fujam.

**Data de Aprovação: \_\_/\_\_/\_\_**

**Versão 00**

Figura 4 – Gaiolas para manejo de flebotomíneos adultos.



Legenda: A- Gaiola de adultos, feita com tecido voil e amarrada nos vértices de uma estrutura de plástico para sustentação. B- Na parte superior da gaiola é possível observar o algodão embebido de solução açucarada para nutrição dos adultos e o papel toalha umedecido com água para manter a umidade adequada aos insetos.

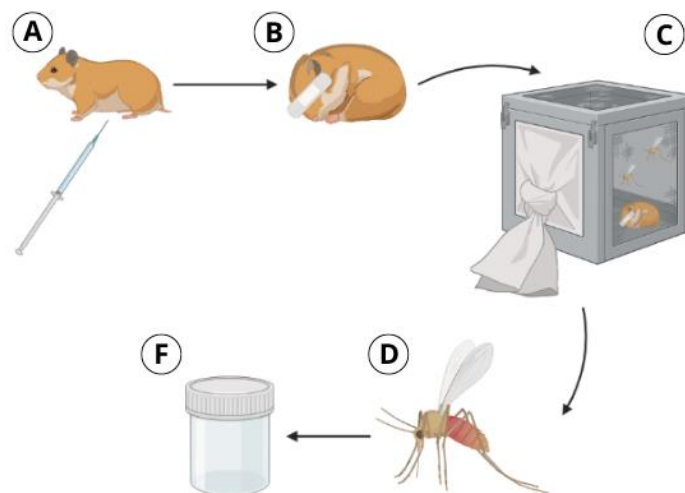
Fonte: Alvarenga (2024)

Após a liberação de todos os adultos na gaiola, colocar folhas de papel umedecidas com água deionizada nas arestas da gaiola, para manutenção da umidade. Como fonte de alimentação para os adultos utilizaremos a solução açucarada 70% (p/v) preparada anteriormente. Colocar em uma placa de Petri a solução açucarada, o suficiente para embeber um pequeno chumaço de algodão, aproximadamente o tamanho de uma moeda. Retirar o excesso de solução do algodão, sem deixar muito seco, o algodão deve ser colocado na parte superior da gaiola. Descartar a solução açucarada que sobrar na placa de Petri, não devolver para o frasco estoque. Colocar a gaiola em um saco plástico e fechar, para que a umidade seja mantida. As gaiolas devem ser armazenadas em incubadora à temperatura de 27°C +/- 1°.

### 6.2.5 Repasto sanguíneo

Após 48h da emergência dos adultos é realizada a primeira alimentação das fêmeas por repasto sanguíneo utilizando Golden hamsters. No mesmo dia, é realizada uma segunda alimentação na gaiola é que serão separadas as fêmeas para oviposição, para garantir que todas se alimentem antes de serem separadas.

Figura 5 – Esquema do processo de sedação, repasto sanguíneo e oviposição das fêmeas de flebotomíneos utilizando Hamster.



Legenda: A- Aplicação do sedativo com seringa conforme descrito no tópico 6.2.5.1. B- Preparo do hamster já sedado vedando os olhos com algodão e esparadrapo. C- Inserção do hamster dentro da gaiola com os adultos. D e E- Fêmea alimentada é realocada ao pote de oviposição.

Fonte: Alvarenga (2024)





## PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO

**Documento:**

**Manutenção Colônia de *Lutzomyia longipalpis*  
(Jacobina)**

**Número documento:**

**XXXX**

**Página \_\_\_/\_\_\_**

### 6.2.5.1 Sedação de hamsters

- Gaze;
- Algodão;
- Álcool 70%;
- Água deionizada;
- Fita esparadrapo;
- Seringa de insulina 1ml;
- Ketamina 5%;
- Xilazina 5%;
- Gaiola Growing tamanho P, para transporte;

O hamster que será usado na alimentação dos flebotomíneos é separado antes de iniciar a rotina da colônia, deixando em uma caixa sem água e ração por um período de até 1h. Para anestesia do hamster é utilizado 30UI de Ketamina 5% com 10UI de Xilazina 5%, para um animal pesando 200g. Preparado para a injeção, o hamster é imobilizado segurando atrás da cabeça apoiado sobre uma superfície, e é injetado a mistura na parte posterior entre a coxa e o rabo, intramuscular. Após a sedação, o animal é preparado cobrindo os olhos com um chumaço de algodão, e colocado na gaiola de primeira alimentação por aproximadamente 30 minutos. Depois, em uma outra gaiola que receberá a segunda alimentação.

**Data de Aprovação: \_\_/\_\_/\_\_**

**Versão 00**



## PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO

**Documento:**

**Manutenção Colônia de *Lutzomyia longipalpis*  
(Jacobina)**

**Número documento:**

**XXXX**

**Página \_\_\_/\_\_\_**

### 6.2.5.2 Biotério de hamster

#### 6.2.5.2.1 Material

- Gaiola tipo Growing tipo G;
- Bebedouro de embutir em gaiola;
- Ração para roedores de laboratório autoclavável;
- Ração de grãos sortidos para roedores;
- Maravalha;
- Papelão;
- Papel picado;

Os Golden hamsters utilizados na colônia de insetos são oriundos do Biotério do Departamento de Parasitologia Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. São alocados em caixas tipo Growing tamanho G, com água e ração de laboratório balanceada *ad libitum*. O fundo da caixa é coberto por maravalha, além de enriquecimento ambiental com folhas de papel picados, ração de grãos e rolo de papel higiênico. O manejo dos hamster é feito de duas a três vezes por semana, para evitar o estresse. Na manutenção das gaiolas de hamster são feitas trocas da maravalha, da água filtrada e é colocada ração balanceada.

**Data de Aprovação: \_\_/\_\_/\_\_**

**Versão 00**


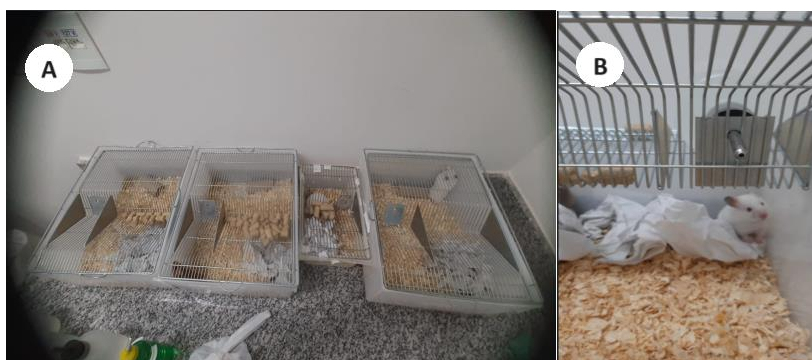
	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO</b>	
<b>Documento:</b> <b>Manutenção Colônia de <i>Lutzomyia longipalpis</i></b> <b>(Jacobina)</b>	<b>Número documento:</b> <b>XXXX</b>	
	<b>Página</b> ___/___	

Figura 6 – Gaiolas tipo growing para manejo de hamster no Biotério Experimental.



Legenda: A- Disposição de gaiolas tipo growing tamanho G e P no biotério, com maravalha, ração e objetos para enriquecimento ambiental dos hamsters. B- Visão do interior da gaiola com bebedouro de água disponível e ração à vontade.

Fonte: Alvarenga (2024)

Após a alimentação dos flebotomíneos, o hamster retorna para a gaiola no biotério experimental, e só é utilizado novamente após 7 dias. Cada animal é utilizado 4 vezes e após este período, os que não houver nenhuma intercorrência e forem constatados que estão saudáveis, são doados.

## 6.2.6 Oviposição

### 6.2.6.1 Material

- Gaiola de adultos;
- Bomba vácuo Dia-Pump;
- Mangueira transparente;

<b>Data de Aprovação:</b> __/__/__	<b>Versão 00</b>
------------------------------------	------------------



**PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO**

**Documento:**

**Manutenção Colônia de *Lutzomyia longipalpis*  
(Jacobina)**

**Número documento:**

**XXXX**

**Página \_\_\_/\_\_\_**

- Potes de oviposição;
- Gaze;

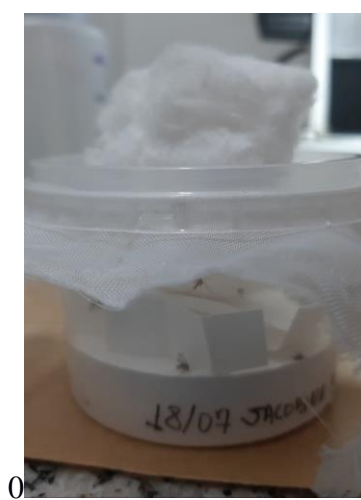
Após 48 h da **primeira alimentação** as fêmeas são colocadas para oviposição, antes desse processo o pote que será feita a varredura de ovos é colocado nessa gaiola e dele são liberados as fêmeas que já realizaram oviposição. Juntos, essa gaiola será submetida a uma **segunda alimentação** de 10 a 15 minutos. Ao final do tempo, todas as fêmeas da gaiola são sugadas utilizando um compressor e confinadas nos potes de oviposição. A gaiola contendo apenas machos é colocada no freezer para posterior higienização.

**Data de Aprovação: \_\_/\_\_/\_\_**

**Versão 00**

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO</b>	
<b>Documento:</b> <b>Manutenção Colônia de <i>Lutzomyia longipalpis</i></b> <b>(Jacobina)</b>	<b>Número documento:</b> <b>XXXX</b>	
	<b>Página</b> ___/___	

Figura 7 – Pote de oviposição com fêmeas de flebotomíneos engorgitadas



Legenda: Pote de oviposição com as fêmeas já alocadas. Identificação nos potes com data de oviposição, número de controle, quantidade de fêmeas e origem.

Fonte: Alvarenga (2024)

O pote é identificado com o dia da primeira alimentação, a quantidade de fêmeas, a origem da colônia e numerados para controle. Também é adicionado um pequeno chumaço de algodão embebido de solução açucarada entre o tecido e a tampa.

<b>Data de Aprovação:</b> __/__/____	<b>Versão 00</b>
--------------------------------------	------------------

Figura 8 – Bomba à vácuo ou compressor adaptado para sugar insetos.



Legenda: Bomba à vácuo ou compressor atrelado a um pedaço de mangueira transparente com filtro de gaze embutido na sua extremidade que liga ao compressor, para evitar que os insetos sejam sugados para dentro do aparelho. A mangueira é inserida na gaiola e apontada à critério do operador para selecionar as fêmeas que serão sugadas para a mangueira e depois direcionadas ao pote de oviposição.

Fonte: Alvarenga (2024)



## PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO

**Documento:**

**Manutenção Colônia de *Lutzomyia longipalpis*  
(Jacobina)**

**Número documento:**

**XXXX**

**Página \_\_\_/\_\_\_**

### 6.2.7 Higienização das gaiolas

#### 6.2.7.1 Equipamentos

- Freezer

#### 6.2.7.2 Material

- Água Sanitária;
- Água;
- Recipiente plástico;
- Esponja de cozinha;
- Detergente neutro;

Após 24h os insetos mortos são descartados e a gaiola é colocada de molho por 24h em água com água sanitária. Depois lavada com água em abundância e detergente neutro e colocada para secar naturalmente.

**Data de Aprovação: \_\_/\_\_/\_\_**

**Versão 00**



## PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO

**Documento:**

**Manutenção Colônia de *Lutzomyia longipalpis*  
(Jacobina)**

**Número documento:**

**XXXX**

**Página \_\_\_/\_\_\_**

### 6.2.8 *Brushing out*

#### 6.2.8.1 Material

- Pincel;
- Papel toalha;
- Microscópio estereoscópico;
- Contador;

A varredura dos ovos ou *Brushing out* é realizada após 48h da oviposição. E consiste na soltura das fêmeas na gaiola da segunda alimentação seguida pela retirada das carcaças e varredura dos ovos das superfícies de todo o pote como papéis filtro, algodão, tecido e parede do pote utilizando um pincel macio e papel toalha. Depois de varrer todos os ovos para o papel toalha, assim com as carcaças, utilize o tecido de voil para peneirar os ovos, dessa maneira os ovos voltam para o pote e evita que passem as carcaças. Quando os ovos estão todos dispostos sobre o gesso eles são contabilizados e o seu número anotado. A partir desse processo o pote passa a ser fechado com o uso de papel toalha dobrado em quatro vezes. A partir do momento em que as primeiras L1 eclodem, conta-se o número de L1 e acrescenta a ração para larva.

**Data de Aprovação: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_**

**Versão 00**



Figura 9 – Ovos de flebotomíneos observados com microscópio estereoscópico após o processo de *brushing out*.

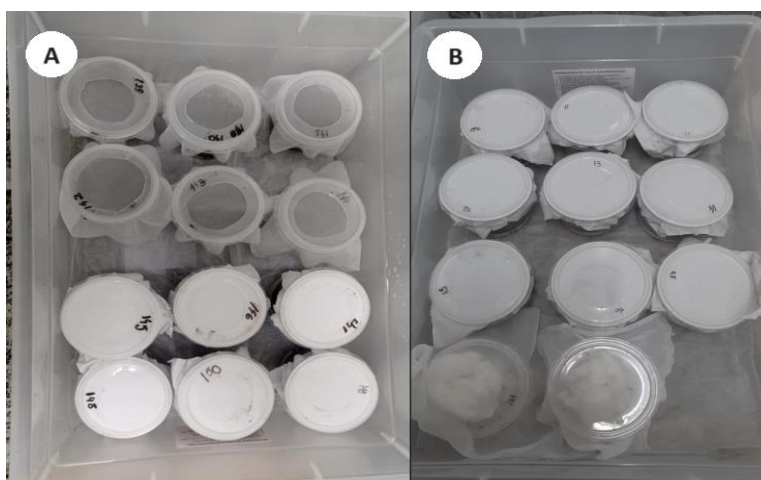


Fonte: Alvarenga (2024)

### 6.2.9 Armazenamento

Os potes contendo ovos, larvas e pupas são organizados em caixas organizadoras de 12L que são preparadas utilizando papel toalha umedecido com água deionizada. As caixas devem separadas em ‘Ovos’, onde são colocados os potes de oviposição e os potes com ovos até o surgimento de L1; ‘Novos’, onde são colocados os potes com larvas até que os adultos comecem a emergir da pupa; ‘Adultos’, aqueles potes que já possuem adultos emergindo. As caixas contendo os potes e as gaiolas são armazenadas em estufas de fotoperíodo, que possuem temperatura em 27°C e umidade controladas constantemente.

Figura 10 – Caixas plásticas de 18 L de armazenamento dos potes com formas imaturas de flebotomíneos.



Legenda: A- Caixa com os potes dos ‘Adultos’, sendo os potes com papel toalha que ainda não emergiram adultos, mas que já apresentam larvas em estágio mais tardio. B- Caixa com potes dos ‘Novos’, com potes de oviposição e outros com papel toalha com larvas, mas em estádios iniciais.

Fonte: Alvarenga (2024)

## 7 TREINAMENTO DO POP

Teórico e prático.

### 7.1 Multiplicadores

Elaboradores, revisores, aprovadores e todos os treinados nas revisões vigentes deste POP.

Data de Aprovação: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Versão 00



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO

**Documento:**  
Manutenção Colônia de *Lutzomyia longipalpis*  
(Jacobina)

**Número documento:**  
XXXX

**Página** \_\_\_/\_\_\_

8 ANEXOS

Cronograma Manutenção (Anexo A)

Data / /		Tarefas Colônia Flebotomíneos	
Dia	Tarefa	Operador	Check
Segunda	Liberar Adultos/ Trocar Algodão		
	Alimentar Larvas		
	<i>Brushing Out</i> (Oviposição quarta)		
	Alimentação Sanguínea (Gaiola de sexta)		
	Oviposição (Alimentadas Sexta)		
	Checar Estoques Ração – Fezes ( ), Ração( ), Terra( )		
	Checar Suprimentos – Sacarose ( ), Água ( ), EtOH ( ), Papel toalha ( )		
	Redes e Potes de Molho		
	Check de Temperatura		
Quarta	Liberar Adultos/ Trocar Algodão		
	Alimentar Larvas		

Data de Aprovação: \_\_/\_\_/\_\_

Versão 00



**PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO**

**Documento:**  
**Manutenção Colônia de *Lutzomyia longipalpis***  
**(Jacobina)**

**Número documento:**  
**XXXX**

**Página** \_\_\_/\_\_\_

	<i>Brushing Out</i> (Oviposição Sexta)							
	Alimentação Sanguínea (Gaiola de Segunda)							
	Oviposição (Alimentadas Segunda)							
	Potes de Gesso							
	Check de Temperatura							
<b>Sexta</b>	Liberar Adultos/ Trocar Algodão							
	Alimentar Larvas							
	<i>Brushing Out</i> (Oviposição Segunda)							
	Alimentação Sanguínea (Gaiola de Quarta)							
	Oviposição (Alimentadas Quarta)							
	Lavar Redes e Potes							
	Retirar Lixo / Registro							
	Check de Temperatura							
<b>Registro</b>	<b>Potes Larvas</b>	<b>Potes Adultos</b>	<b>Potes Ovos</b>	<b>Total</b>	<b>Oviposição Sexta</b>	<b>Oviposição Segunda</b>	<b>Oviposição Quarta</b>	<b>Total Oviposição</b>

**Data de Aprovação:** \_\_/\_\_/\_\_

**Versão 00**



**PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO**

**Documento:**  
**Manutenção Colônia de *Lutzomyia longipalpis***  
**(Jacobina)**

**Número documento:**  
**XXXX**

**Página** \_\_\_/\_\_\_

<b>Retirada</b>		
<b>Fêmeas/Larvas Experimentos</b>		
<b>Quantidade</b>	<b>Data</b>	<b>Responsável</b>
	<b>TOTAL</b>	

**Observações:**

<b>Data de Aprovação:</b> __/__/____	<b>Versão 00</b>
--------------------------------------	------------------



**PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO**

**Documento:**

**Manutenção Colônia de *Lutzomyia longipalpis*  
(Jacobina)**

**Número documento:**

**XXXX**

**Página \_\_\_/\_\_\_**

**9 FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Nome**

**Assinatura**

**ELABORADO**

**Ingrid Marciano Alvarenga**

\_\_\_\_\_

**REVISADO**

**Jamile de Paiva Macedo**

\_\_\_\_\_

**APROVADO**

**Samara Graciane da Costa Latgé**

\_\_\_\_\_

**Aprovado em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_**

**Data de Aprovação: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_**

**Versão 00**

## **TERCEIRA PARTE**

### **ARTIGO**

**TÍTULO:** AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Eugenia pyriformis* SOBRE *Lutzomyia longipalpis* E *Leishmania infantum*

**AValiação DA BIOAtividade DE Óleo ESSENCIAL DE *Eugenia pyriformis* SOBRE *Lutzomyia longipalpis* E *Leishmania infantum***

**EVALUATION OF THE BIOACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF *Eugenia pyriformis* ON *Lutzomyia longipalpis* AND *Leishmania infantum***

ALVARENGA, I.M.; PAIVA, J.M.; CASTRO, P.H.; da COSTA-LATGÉ, S.G.; BARÇANTE, J.M.P.

**RESUMO**

Os flebotomíneos são insetos vetores de diversas *Leishmania* spp, que são agentes causadores das leishmanioses. O protozoário *L. infantum* que é o agente etiológico da leishmaniose visceral americana (LVA), tem como principal vetor fêmeas da espécie *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva). As leishmanioses são consideradas Doenças Tropicais Negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde, sendo de grande impacto no sistema de saúde pública de países subdesenvolvidos. Algumas medidas de controle como, uso de telas mosquiteiros, repelentes e o controle químico, já têm sido empregadas no combate contra as leishmanioses. No entanto, os métodos possuem algumas problemáticas e limitações, por isso, a Organização Mundial da Saúde recomenda a exploração e avaliação de alternativas acessíveis e eficazes a serem utilizadas nas estratégias integrativas de manejo de vetores. Com isso, neste trabalho testamos a bioatividade do óleo essencial de *Eugenia pyriformis* (OEEp) sobre *Lu. longipalpis* em diferentes concentrações (2,5 mg/mL, 5 mg/mL e 7,5 mg/mL) e sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum*. Para isso testamos o efeito do OEEp na fisiologia e comportamento alimentar de *Lu. longipalpis*, avaliando a ingestão da isca açucarada, longevidade, atratividade e repelência dos insetos. Além disso, determinamos a IC50 do OEEp para formas amastigotas e promastigotas de *L. infantum*, estabelecendo o critério para testar formulações de iscas açucaradas que visam bloquear o desenvolvimento do parasito no inseto. Obtivemos um volume final de 4,2 mL (=3,8063 g) com um teor de OEEp de 0,0933%. A composição do OEEp predominante foi de sesquiterpenos hidrocarbonetos (69,55%), seguida pelos compostos sesquiterpenos oxigenados (25,73%), monoterpenos oxigenados (2,3%) e compostos aromáticos (1,39%). Em relação a ingestão, foi possível observar que as fêmeas (80,16%) se alimentaram mais do que os machos (64,89%), e a preferência foi pela isca contendo o controle.



Com relação aos ensaios de atratividade, observamos que a presença do OEEp na isca açucarada não influenciou de maneira significativa a migração dos flebotomíneos dentro da gaiola. Ao compararmos a curva de sobrevivência de fêmeas e machos de *Lu. longipalpis* alimentados verificou-se que não houve diferença significativa entre o grupo controle e as diferentes concentrações do OEEp. Tanto para machos quanto para fêmeas, a mediana de sobrevivência foi de 7 dias para o grupo tratado e de 8 dias para o controle. A potencialidade do OEEp como bloqueador de infecção de *L. infantum* foi testada, e resultou que a concentração necessária para inibir em 50% a proliferação de promastigotas foi de  $57,08 \mu\text{M} \pm 0,1$  do OEEp foi de  $58,33 \mu\text{M} \pm 0,13$  OEEp para inibir a proliferação de amastigotas, com coeficiente de determinação de 0,89 e 0,82, respectivamente.

**Palavras-chaves:** controle, leishmanioses, flebotomíneos.

#### ABSTRACT

Phlebotomine sandflies are vectors of various *Leishmania* spp, the causative agents of leishmaniasis. The protozoan *L. infantum*, responsible for American Visceral Leishmaniasis (AVL), primarily relies on the females of the species *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) as its vector. Leishmaniasis are classified as Neglected Tropical Diseases by the World Health Organization, significantly impacting the public health systems of underdeveloped countries. Control measures such as the use of mosquito nets, repellents, and chemical control have been employed against leishmaniasis. However, these methods have encountered some challenges and limitations. Hence, the World Health Organization recommends exploring and evaluating accessible and effective alternatives for integrated vector management strategies. In this study, we assessed the bioactivity of the essential oil of *Eugenia pyriformis* (OEEp) at different concentrations (2.5 mg/mL, 5 mg/mL, and 7.5 mg/mL) on *Lu. longipalpis* and on promastigote and amastigote forms of *L. infantum*. We investigated the effects of OEEp on the physiology and feeding behavior of *Lu. longipalpis*, including sugar bait intake, longevity, attractiveness, and repellency of the insects. The final volume obtained was 4.2 mL (=3.8063 g) with an OEEp content of 0.0933%. The predominant composition of OEEp was sesquiterpene hydrocarbons (69.55%), followed by sesquiterpene oxygenated compounds (25.73%), oxygenated monoterpenes (2.3%), and aromatic compounds (1.39%). Regarding sugar bait intake, females (80.16%) exhibited higher feeding rates than males (64.89%), with a preference for the control

bait. Attraction tests indicated that the presence of OEEp in sugar bait did not significantly influence the migration of sandflies within the cage. Survival curve analysis showed no significant differences between the control group and the various concentrations of OEEp for both female and male *Lu. longipalpis*. The potential of OEEp as an infection blocker for *L. infantum* was tested, revealing that the concentration required to inhibit 50% of promastigote proliferation was  $57.08\mu\text{M} \pm 0.1$ , and for amastigote proliferation, it was  $58.33\mu\text{M} \pm 0.13$ , with determination coefficients of 0.89 and 0.82, respectively.

**Keywords:** control, leishmaniases, sandflies.

## 1 INTRODUÇÃO

Os flebotomíneos são insetos vetores de diversas *Leishmania* spp, agentes causadores das leishmanioses. Algumas dessas espécies são de importância tanto para saúde humana quanto para animal, como o protozoário *Leishmania infantum* que causa a leishmaniose visceral americana (LVA). Este protozoário é transmitido principalmente através da picada da fêmea de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) durante o repasto sanguíneo (SOUSA-PAULA; OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2020).

As leishmanioses são consideradas Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN's) pela Organização Mundial de Saúde, sendo de grande impacto no sistema de saúde pública e que afeta consideravelmente países subdesenvolvidos e populações em estado de pobreza. Foram 69.665 casos novos de leishmaniose visceral (LV) na Região das Américas, com uma média anual de 2.488 casos durante o período de 2001-2021 (WHO, 2022). Em 2019, foram 2600 casos e 201 óbitos de LV registrados nas Américas, sendo 2529 casos e 196 óbitos no Brasil (PAHO/PLISA), representando a tendência de endemidade no país que se destaca nas Américas.

Como medidas preventivas o Ministério da saúde no Brasil recomenda o uso de telas mosquiteiros nas residências e o uso de repelentes para a população, também é recomendado o uso de coleira à base de deltametrina em cães para repelir os insetos vetores (STOCKDALE; NEWTON, 2013). Em esfera coletiva o ministério indica o controle químico de vetores através da borrifação de inseticidas como, cipermetrina e deltametrina em forma de pó solúvel nas concentrações 125 mg. i.a./m<sup>2</sup> e de 25 mg. i.a/ m<sup>2</sup>, respectivamente. A borrifação deve ser feita em regiões de casos registrados de transmissão autóctone, no interior e exterior de paredes das residências e em canis ou abrigos de animais (DA SAÚDE, 2006). Atualmente o controle químico de vetores é considerado efetivo no Brasil, no entanto, quando aliado a técnicas de atração dos vetores utilizando feromônios sexuais a efetividade pode ser aumentada, levando a agregação desses vetores no local de aplicação do controle (GONZÁLEZ *et al.*, 2019; BRAY *et al.*, 2010). Levando em consideração as limitações e restrições dos métodos convencionais de combate aos flebotomíneos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a exploração e avaliação de alternativas acessíveis e eficazes a serem utilizadas nas estratégias integrativas de manejo de vetores (WHO, 2010).

Os flebotomíneos, em sua fase adulta, possuem uma alimentação à base de fluidos açucarados para ambos os sexos como, tecidos e néctar de plantas, melado, entre outros. Essa nutrição é essencial para garantir energia para suas atividades vitais, sendo a disponibilidade escassa de açúcar um fator limitante para a sobrevivência desses insetos (MÜLLER; SCHLEIN, 2004). As fêmeas possuem a necessidade da ingestão sanguínea para a maturação dos ovos (DVORAK; SHAW; VOLF, 2018). Com base na nutrição desses insetos, diversos estudos têm sido realizados para comprovar a eficácia no controle de vetores de diversos agentes patogênicos utilizando iscas açucaradas como atrativo (MÜLLER; JUNNILA; SCHLEIN, 2010; BEIER *et al.*, 2012).

O uso de óleos essenciais associados às iscas açucaradas é uma alternativa que atende as demandas de saúde pública sem grandes impactos ambientais. Os óleos essenciais são compostos secundários extraídos de plantas através de técnicas como, destilação, arraste a vapor d'água e por prensagem dos pericarpos de frutos cítricos (ISO/Tc 54, 2023). Os óleos essenciais podem ser extraídos de diversas partes das plantas como, raízes, folhas, frutos, flores e entre outros. E já tem sido comprovado eficácia na ação de repelir *Lu. longipalpis* utilizando os óleos essenciais (MOTA *et al.*, 2022).

A família Myrtaceae, é uma das famílias mais importantes da flora brasileira, com 121 gêneros descritos e cerca de 5 mil espécies identificadas onde uma delas é a *Eugenia pyriformis*, uma planta nativa da Mata Atlântica brasileira, conhecida popularmente como Uvaia, uvalha, ubaia, uvaia do mato, uvaieira, uvalheira, orvalho e azedinha (Lisbôa *et al.*, 2011; Jacomino *et al.*, 2018; Silva, 2022). Ecologicamente, a planta desperta interesse e é utilizada em sistemas agroflorestais por apresentar madeira dura, e por serem resistentes a doenças, além de apresentam frutos comestíveis, onde seu fruto atrai diferentes espécies de vertebrados que dá a essa espécie a característica de ser usada no processo de reflorestamento de áreas heterogêneas degradadas e de preservação permanente (Oliveira *et al.*, 2019).

Neste trabalho testamos a aplicação do óleo essencial de *Eugenia pyriformis* (OEEp) na composição de iscas açucaradas tóxicas para utilização no controle de flebotomíneos e no bloqueio do desenvolvimento da infecção no inseto. Para isso testamos o efeito do OEEp na fisiologia e comportamento alimentar de *Lu. longipalpis*, avaliando a ingestão da isca açucarada, atratividade e repelência e longevidade dos insetos. Além disso, determinamos a IC50 do OEEp para formas amastigotas e promastigotas de *L. infantum*, estabelecendo o

critério para testar formulações de iscas açucaradas que visam bloquear o desenvolvimento do parasito no inseto.

Ao empregar esta abordagem inovadora de entrega de compostos através de iscas de açucaradas tóxicas, esta investigação tem o potencial de oferecer uma estratégia mais direcionada do que os métodos convencionais, contribuindo para os esforços contínuos no combate à transmissão das Leishmanioses.

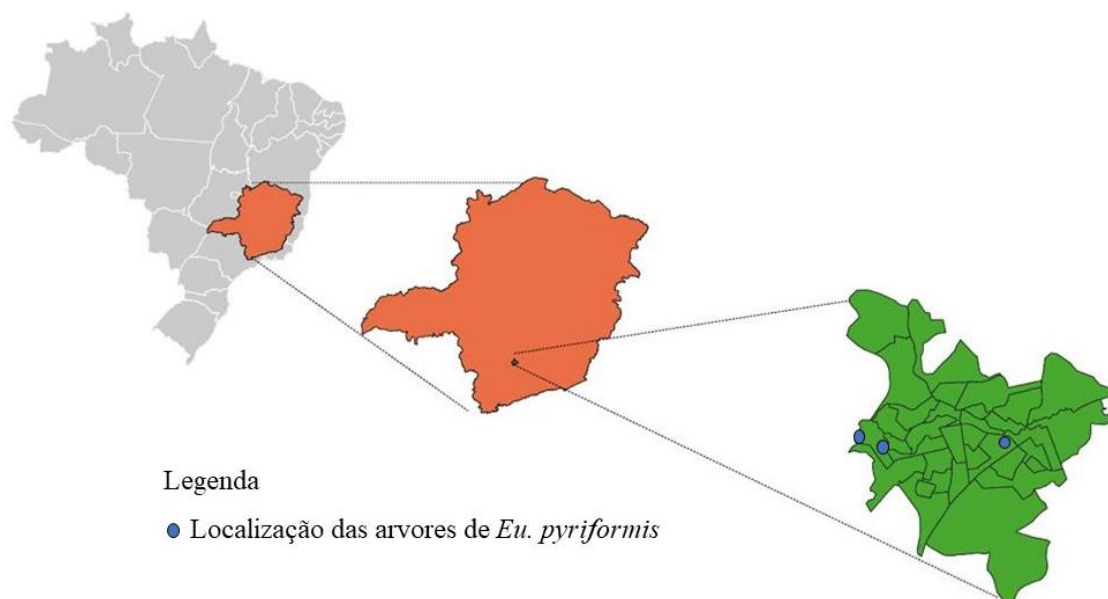
## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção do Óleo Essencial de *Eugenia pyriformis* (OEEp)**

#### **2.1.1 Dados da Coleta**

Folhas de *E. pyriformis* foram coletadas no município de Perdões, sul do estado de Minas Gerais, Brasil em três pontos (Figura 1) (-21.095773, -45.103423 ; -21.097315, -45.099013; -21.095886, -45.082412), a 848 metros acima do nível do mar, no período de 05 e 06 de novembro de 2022. Durante esse período, foram obtidos dados de temperatura 25 e 26°C máxima e 10 e 11°C mínima respectivamente.

Figura 1 - Mapa do Brasil com evidência de Minas Gerais e o município de Perdões, onde foram coletadas as folhas de *Eugenia pyriformis*, em novembro de 2022.



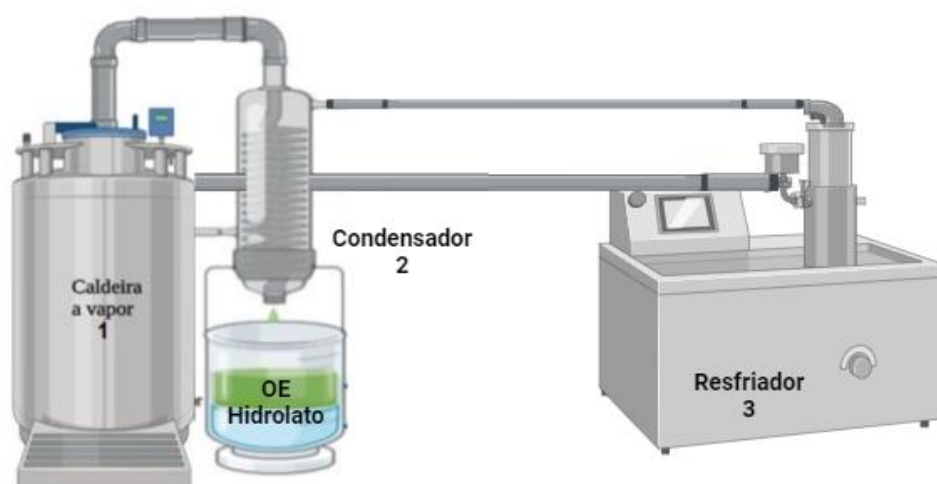
Legenda: Mapa do Brasil (cinza) com evidência de Minas Gerais (vermelho) e o município de Perdões (verde), onde foram coletadas as folhas de *Eugenia pyriformis* das árvores nas áreas marcadas com círculo azul, em novembro de 2022.

Fonte: Alvarenga *et al.* (2024)

### 2.1.2 Extração de OEEp

As folhas foram fragmentadas manualmente e submetidas à técnica de destilação de vapor em um destilador Marconi MA480 (Figura 2). A proporção planta-água foi de 500 g de folhas fragmentadas para de 2L de água destilada, sendo colocados dentro da dorna as folhas em um suporte com furos, encaixado sobre a água, sem que o material vegetal entrasse em contato com a água. A extração foi realizada por 1 hora e 30 minutos, por vez, sendo realizada 3 extrações por dia, durante 2 dias, e 2 extrações em mais um dia, totalizando 8 processos completos, que após finalizar o processo em cada dia, o óleo extraído foi transferido para um recipiente e refrigerado a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 24 horas para separação do óleo essencial do hidrolato, coletado o sobrenadante, que era o OE e colocando em um recipiente âmbar (KOKETSU & GONÇALVES, 1991). O rendimento do óleo essencial foi determinado pela relação entre a massa seca das folhas e a massa do óleo essencial (%).

Figura 2 – Processo de extração por arraste a vapor de água.



Legenda: 1. Na caldeira a vapor é colocada água destilada, o material vegetal em um suporte com furos sofre a água sem entrar em contato. O vapor da água passa pelo material vegetal até o condensador (2), que deposita o óleo essencial e o hidrolato por uma torneira. O vapor passa pelo processo de condensação no resfriador.

Fonte: Alvarenga *et al.* (2024)

### 2.1.3 Caracterização do OEEp

A caracterização química foi realizada utilizando cromatógrafo a gás Agilent 6890N acoplado a espectrômetro de massas quadripolar (Agilent 5973N) com ionização por impacto de elétrons (70 eV). O aparelho foi equipado com uma coluna DB-5MS (30m x 0,25mm I.D., película de fase de 0,25  $\mu$ m) e as seguintes condições foram aplicadas: volume injetado de 1  $\mu$ L no modo splitless; temperatura do injetor de 250 °C; fonte de íons a 230 °C; faixa de varredura de 40 - 700 Daltons; gradiente de temperatura do forno de 40 °C a 300 °C a uma taxa de 4 °C/min; utilização do hélio como gás de arraste a um fluxo de 0,5 mL/min. A amostra foi preparada a partir da pesagem de 2 mg do OEEp em balança analítica e diluição em 1 mL de diclorometano. A interpretação e identificação dos espectros de massa foram realizadas por comparação com o banco de dados do espectro de massa Wiley NBS e literatura de referência (ADAMS, 2007). Os resultados foram expressos como porcentagem relativa da área do pico no cromatograma.

## **2.2 Atividade do OEEp**

### **2.2.1 Atividade do OEEp**

A atividade do OEEp sobre diferentes aspectos da fisiologia de *Lu. longipalpis* foi determinada utilizando o OEEp na composição de iscas açucaradas (FERREIRA *et al.*, 2018). Os seguintes parâmetros foram avaliados: longevidade, preferência, quantificação da ingestão das iscas açucaradas e atratividade. A atividade leishmanicida foi determinada por ensaios com amastigotas e promastigotas calculando a DL50%.

#### **2.2.1.1 Insetos**

Os testes inseticidas consistiram na avaliação dos seguintes parâmetros: longevidade, preferência, quantificação da ingestão das iscas açucaradas e atratividade sobre insetos *Lu. longipalpis* (Jacobina, Bahia, Brasil) mantidos no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Os insetos foram mantidos sob temperatura de  $26 \pm 2$  °C e os adultos alimentados *ad libitum* com solução de sacarose 70% (p/v) autoclavada em algodão. Para a oviposição, as fêmeas foram alimentadas com sangue de coelho citratado, utilizando um aparato artificial (Hemotek – Discovery Workshops, Reino Unido) a 37 °C por 1 h utilizando pele de frango como membrana. As fêmeas ingurgitadas foram transferidas para recipientes para oviposição. Os ovos foram separados das fêmeas mortas após a oviposição e criados para preservar a colônia (Safyanova, 1964). Os ensaios foram conduzidos utilizando insetos recém emergidos (0-24 h) e não expostos previamente à solução de sacarose.

As iscas açucaradas foram preparadas utilizando-se uma solução de sacarose 2 M, DMSO 4%, corante alimentício verde 10% (v/v) (Mix, Brazil) e OEEp nas concentrações de 2,5 mg/mL, 5,0 mg/mL e 7,5 mg/mL. Como controle foi utilizada uma solução de sacarose 2 M, DMSO 4%, corante alimentício laranja 10% (v/v) (Mix, Brazil).

A longevidade dos insetos não é afetada pela utilização de DMSO na concentração de 4% (v/v) e os corantes alimentícios utilizados foram testados previamente, demonstrando que



os insetos não possuem preferência por um ou outro corante dependendo da cor utilizada (FERREIRA *et al.*, 2022).

### **2.2.1.1. Ensaio de preferência alimentar**

Insetos recém emergidos foram colocados em gaiolas (13x13x13 cm) e mantidos por 3 dias com controle da umidade, sem qualquer fonte de alimentação. Após esse período, grupos de 50 insetos foram transferidos para uma nova gaiola contendo simultaneamente uma placa com a solução controle e uma placa com a isca açucarada de OEEp 2,5 mg/mL (machos e fêmeas foram testados em gaiolas separadas). As soluções foram oferecidas aos insetos em placas de Petri conforme descrito no item 2.2.1.1. Após 3 horas de alimentação, os insetos foram coletados para dissecação do divertículo e intestino médio. As amostras foram maceradas em 3 uL de água destilada e centrifugadas em microcentrífuga por 10 segundos (Spin). Os experimentos foram realizados em duplicata biológica.

#### Identificação e quantificação da ingestão das iscas açucaradas

Para quantificação dos valores de absorvância, foram utilizados 1 µL da amostra macerada e medidos em um Nanodrop 2000C (Thermo, Waltham, EUA) com a opção UV-visível, avaliando os comprimentos de onda entre 200 nm e 750 nm, avaliando os pontos do corante verde e laranja, que foram padronizados utilizando corante em diferentes concentrações. As curvas obtidas a partir da leitura das amostras foram comparadas às curvas padronizadas, dessa forma confirmando a qual cor cada curva pertencia, e comparando com o observado na cor do corante no divertículo e intestino médio na dissecação dos insetos.

Após isso, foram acrescentados 38 µL de água destilada e novamente foi realizada a homogeneização. Para quantificar os açúcares foi confeccionada uma Curva Padrão onde utilizaremos quantidades de glicose na faixa de 0 – 20 µg. A Curva Padrão e a quantificação de açúcares foi realizada pelo processo de quantificação de carboidratos totais pelo método fenol-sulfúrico (VIEL *et al.*, 2018). As amostras desenvolvem uma coloração amarelo-alaranjada, sendo a absorvância medida em espectrofotômetro UV/VIS em 490nm.

Para o emplacamento das amostras foi utilizado placa de PCR com 96 poços, onde o volume final foi de 25 uL. Foram pipetados em escala crescente de 0,5,1,5,2,5 uL de amostra

para 25, 20, 10, 0 uL H<sub>2</sub>O MiliQ respectivamente, depois 25 uL de fenol 5% (p/v) e 125 uL de Ácido Sulfúrico. Depois a placa foi selada, e incubada a 80° por 30 min. Depois da incubação foram transferidos para a placa de fundo chato e transparente, e lida a absorbância em espectrofotômetro UV/VIS em 490 nm. Todas as amostras foram feitas em triplicata.

Para calcular a correlação das curvas, foi usado o cálculo de Abs x glicose (ug) e Abs x amostra (uL), utilizando CORREL (inglês). Usando programa de Microsoft Excel as curvas foram consideradas aquelas que tiveram uma correlação de 98-99%. Para calcular a concentração foi calculada a inclinação das curvas, utilizando a função inclinação do Microsoft Excel.

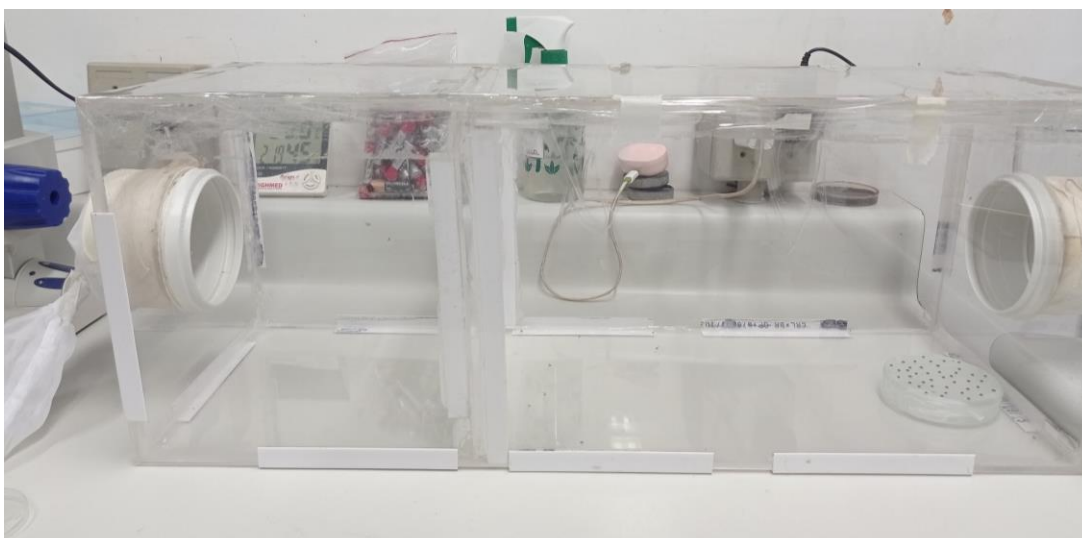
$$\text{Açúcar Total Amostra (ug/uL)} = \frac{\text{Inclinação (amostra Abs/uL amostra)}}{\text{Inclinação (curva padrão Abs/ug glicose)}}$$

### **2.2.1.2 Ensaios de atratividade**

Para determinar o potencial de atratividade das iscas açucaradas contendo o *OEEp*, utilizamos uma gaiola de acrílico (70x25,5x25,5 cm), separada em dois compartimentos medindo 24 e 46 cm de comprimento, respectivamente. A parede interna possui orifícios permitindo a passagem dos insetos. Machos e fêmeas foram avaliados separadamente. Foram utilizados para cada ensaio, um total de vinte fêmeas e vinte machos recém eclodidos.

Os insetos foram colocados no lado menor da gaiola de acrílico e as iscas açucaradas na extremidade do lado maior (Figura 3). As iscas foram oferecidas aos insetos em placas de Petri contendo 40 gotas de 5 µL da solução de sacarose 70% (p/v) (controle) ou a solução de OE a 2,5 mg/mL. O lado maior da caixa de acrílico foi dividido em 3 seções de tamanhos iguais para facilitar a avaliação da migração dos insetos. A contabilização do número de insetos em cada seção da caixa foi avaliada após 30 min, 1, 2, 3 e 4 h. Após a inserção dos insetos, a caixa foi coberta com um tecido escuro, para que a movimentação dos insetos não fosse afetada por variações de luminosidade ou qualquer movimentação na sala. Para a contabilização dos insetos, o tecido era cuidadosamente retirado. Os experimentos foram realizados em duplicata biológica.

Figura 3 – Caixa de acrílico utilizada nos experimentos de atratividade com flebotomíneos e iscas açucaradas.



Legenda: Caixa de acrílico utilizada nos experimentos de atratividade. A esquerda, quadrante menor onde os insetos são inseridos. A direita, quadrante maior onde a placa de Petri com gotas da isca açucarada (controle ou OEEp) é colocada.

Fonte: Alvarenga *et al.* (2024)

### 2.2.1.3 Ensaio de longevidade de *Lu. longipalpis* mediante ingestão de OEEp

Cinquenta machos e cinquenta fêmeas de *Lu. longipalpis* recém eclodidos foram transferidos para uma gaiola cúbica (13 cm cada lado) contendo em seu interior uma placa de Petri recoberta com Parafilme® e 20 gotas de iscas açucaradas com corante verde (5 µl/gota), conforme descrito por Costa e colaboradores (2019). Foi montada uma gaiola para cada concentração do OEEp a ser testada: 2,5 mg/mL, 5,0 mg/mL e 7,5 mg/mL. Na gaiola controle foi utilizada uma solução de sacarose a 70% p/v contendo corante laranja, nas mesmas condições das gaiolas teste.

Para manter a umidade durante os ensaios, os papéis absorventes foram devidamente umedecidos com 1mL de água destilada e posicionados nas laterais das gaiolas de teste. As gaiolas foram então acondicionadas em sacos plásticos e transferidas para incubadoras do tipo BOD, mantidas a uma temperatura de  $26 \pm 1$  °C e uma faixa de umidade entre 50-70%.

Após um período de 24 horas, foi realizada a coleta de 10 machos e 10 fêmeas de cada grupo experimental. A avaliação da ingestão das iscas açucaradas foi conduzida mediante a observação do corante alimentício sob um microscópio estereoscópio.

A mortalidade dos insetos, bem como a ingestão das iscas, fora monitorada diariamente ao longo do experimento, que prosseguiu até a ocorrência do óbito de todos os insetos. As placas de Petri contendo as gotas de solução foram substituídas a cada 2-3 dias, visando manter as condições ideais para a realização dos ensaios. Destaca-se que todos os experimentos foram conduzidos em duplicata biológica para garantir a robustez dos resultados obtidos.

## **2.3 Ensaio para avaliação do potencial leishmanicida do OE $Ep$**

### **2.3.1 Manutenção *Leishmania infantum* e células DH 82**

As culturas de células de *L. infantum* (Cepa:MCAN/BR/2002/BH401) foram replicadas e contabilizadas na câmara de Neubauer. Para que pudesse calcular a quantidade necessária na realização dos testes.

### **2.3.2 Testes *in vitro* com *Leishmania infantum* e OE $Ep$**

A atividade *in vitro* dos compostos contra amastigotas intracelulares de *L. infantum* foi realizada utilizando macrófagos caninos (DH82), de acordo com a metodologia adaptada descrita por Dias *et al.* (2015). Esses experimentos foram realizados no Laboratório de Imunobiologia e Controle de Parasitos, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

O OE $Ep$  foi testado em amastigotas de *L. infantum* nas seguintes concentrações de teste de 250 $\mu$ M, 25 $\mu$ M, 2,5 $\mu$ M, 0,25 $\mu$ M e 0,025 $\mu$ M, e para o controle foi usado Miltefosina (Sigma-Aldrich) nas mesmas concentrações do OE $Ep$ . Os valores obtidos foram comparados com uma dose-resposta curva para obter o IC50.

Os testes de ação leishmanicida *in vitro* também foram realizados em promastigotas de *L. infantum* (Cepa:MCAN/BR/2002/BH401). Diluídas com 100 µL de *Leishmania* para 900 µL de meio de diluição. Para formação dos pellets foram plaqueados 50 µL da solução por poço, sendo aproximadamente  $1 \times 10^6$  parasitos por poço. Posteriormente foram adicionados nos poços o OEEp nas seguintes concentrações: 250 µM, 25 µM, 2,5 µM, 0,25 µM e 0,025 µM, e para o controle foi usado Miltefosina (Sigma-Aldrich) nas mesmas concentrações do OEEp, todos em volume final de 50µl. Depois para atestar a viabilidade celular, foi aplicado 10uL de MTT em cada poço (sem remover o sobrenadante) e então colocados em estufa por 4 horas. No final das 4 horas, a reação foi interrompida pela adição de 100 µl de isopropanol acidificado (0,7% HCl 10N), a mistura homogeneizada, e em seguida, é realizada a leitura ELISA em absorbância no comprimento de onda de 570 nm.

Foram realizadas duplicatas para cada concentração de OEEp e controle, tanto nos testes realizados para as amastigotas quanto nas promastigotas.

## 2.4 Testes estatísticos

As análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism 6.0 para Windows (San Diego, CA, Estados Unidos). Para identificar outliers foi utilizado o método ROUT baseado na taxa de falsa descoberta (FDR) e Q foi estabelecido em 1%. Para determinar a normalidade dos dados, o teste de D'Agostino-Pearson Omnibus K2 foi utilizado. Para comparação dos dados normalmente distribuídos, utilizou-se Teste T não pareado ou análise de variância (ANOVA unidirecional) seguida de testes de comparações múltiplas de Tukey. Comparações com  $p < 0,05$  foram consideradas significantes. Para os dados não paramétricos utilizamos o teste de Mann-Whitney. Os resultados são expressos como médias  $\pm$  SD. As curvas de sobrevivência foram comparadas utilizando o teste de Log-rank Mantel-Cox.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Extração e Caracterização do OEEp

Os estudos com OEs em diferentes abordagens vêm crescendo, principalmente com plantas nativas. E como forma de agregar mais aos estudos com OE voltados para área de controle de vetores de patógenos, o presente estudo selecionou a planta *Eugenia pyriformis* para ser o objeto de estudo visando o controle de *Lutzomyia longipalpis*. Para obtermos o OEEp, a partir de 4.500g de folha, foi possível extrair o volume final de 4,2 mL (=3,8063 g) com um teor de OEEp de 0,0933%.

A composição do OEEp foi determinada por CG/EM e foi identificado um total de vinte e sete compostos constitutivos (Tabela 1). A classe predominante foi a de sesquiterpenos hidrocarbonetos (69,55%), seguida pelos compostos sesquiterpenos oxigenados (25,73%), monoterpenos oxigenados (2,3%) e compostos aromáticos (1,39%). Dentre os sesquiterpenos hidrocarbonetos majoritários foram identificados os compostos  $\beta$ -Cariofileno (28,21%),  $\beta$ -elemeno (7,93%),  $\alpha$ -Copaeno (5,73%) e  $\beta$ -Gurjuneno (5,11%). Dentre os sesquiterpenos oxigenados os compostos majoritários foram o Óxido de cariofileno (12,79%), (+)-Espatuleno (6,58%) (Tabela 1).

Tabela 1 – Caracterização química do Óleo Essencial de folhas de *Eugenia pyriformis*. Continua.

Classe compostos	Identificação da substância	TR (min)	Área (%)
Monoterpeno Oxigenado	Trans-Verbenol	25,692	0,65
Sesquiterpenos Hidrocarboneto	$\gamma$ -Elemene	31,098	0,88
Sesquiterpenos Hidrocarboneto	Ylangene	32,384	0,64
Sesquiterpenos Hidrocarboneto	$\alpha$ -Copaene	32,595	5,73
Sesquiterpenos Hidrocarboneto	(-)- $\beta$ -bourbonene	32,887	1,76
Sesquiterpenos Hidrocarboneto	$\beta$ -Elemene	33,035	7,93
Sesquiterpenos Hidrocarboneto	Isocaryophyllene	33,599	0,85

Classe compostos	Identificação da substância	TR (min)	Área (%)
Sesquiterpenos Hidrocarboneto	$\beta$ -Caryophyllene	34,151	28,21
Sesquiterpenos Hidrocarboneto	$\beta$ -copaene	34,4	2,27
Sesquiterpenos Hidrocarboneto	Aromadendrene	34,699	0,54
Sesquiterpenos Hidrocarboneto	Humulene	35,253	3,47
Sesquiterpenos Hidrocarboneto	Alloaromadendrene	35,395	0,96
Sesquiterpenos Hidrocarboneto	$\gamma$ -Muurolene	35,775	1,78
Sesquiterpenos Hidrocarboneto	Germacrene D	36,034	3,04
Sesquiterpenos Hidrocarboneto	$\beta$ -Selinene	36,313	2,42
Sesquiterpenos Hidrocarboneto	$\beta$ -Gurjunene	36,305	5,11
Sesquiterpenos Hidrocarboneto	$\gamma$ -Cadinene	36,983	0,6
Sesquiterpenos Hidrocarboneto	$\delta$ -Cadinene	37,095	1,97
Sesquiterpenos Hidrocarboneto	trans-Calamenene	37,231	0,85
Compostos Aromáticos/Sesquiterpenos Hidrocarboneto	$\alpha$ -Calacorene	37,856	0,54
Compostos Aromáticos/Sesquiterpenos Hidrocarboneto	(+)-Spathulenol	39,028	6,58
Sesquiterpenos Hidrocarboneto	Caryophyllene oxide	39,195	12,79
Outros	3-Cyclohexene-1-carboxaldehyde, 4-methyl-	39,955	1,65
Sesquiterpeno Oxigenado	(-)-Spathulenol	40,575	0,84
Sesquiterpeno Oxigenado	tau-Muurolol	40,845	2,09
Sesquiterpeno Oxigenado	$\alpha$ -Cadinol	41,195	1,45
Sesquiterpeno Oxigenado	Selin-6-en-4 $\alpha$ -ol	41,324	0,33
Total			95,93

TR - Tempo de retenção

### 3.2 Ensaio de preferência e ingestão

A preferência por uma isca açucarada pode determinar se ela será ou não ingerida pelos insetos, dessa maneira verificamos a preferência entre as iscas de *OEEp* e o controle com sacarose quando oferecidas simultaneamente. Com a dissecação do inseto, pode ser observado a cor do isca a qual ele havia se alimentado (Figura 4) e o processamento do divertículo e intestino médio pudemos avaliar a absorbância a partir do corantes presentes nas iscas açucaradas. A partir do comprimento de onda exposto nas figuras 5 e 6, as amostras padronizadas de corante verde de 0,5% (v/v) e corante laranja de 0,5% (v/v), foi confirmado qual(is) iscas açucaradas foram ingeridas.

Figura 4 – Adultos de *Lutzomyia longipalpis* alimentado em isca açucarada no ensaio de preferência.

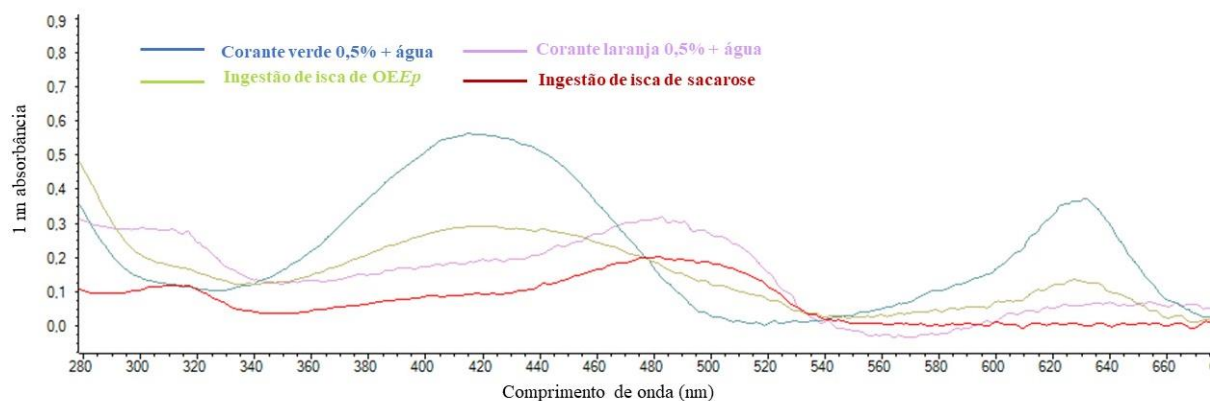


Legenda: A) Fêmea alimentada de isca açucarada de *OEEp* de 2,5 mg/mL com uma mistura de sacarose 2 M, DMSO 4% (v/v), corante alimentício verde 10% (v/v). B) Fêmea alimentada em isca com controle com solução contendo sacarose 2 M, DMSO 4% (v/v), corante alimentício laranja 10% (v/v). C) Divertículo e intestino médio dissecados de flebotomíneos contendo laranja

Fonte: Alvarenga *et al.* (2024)



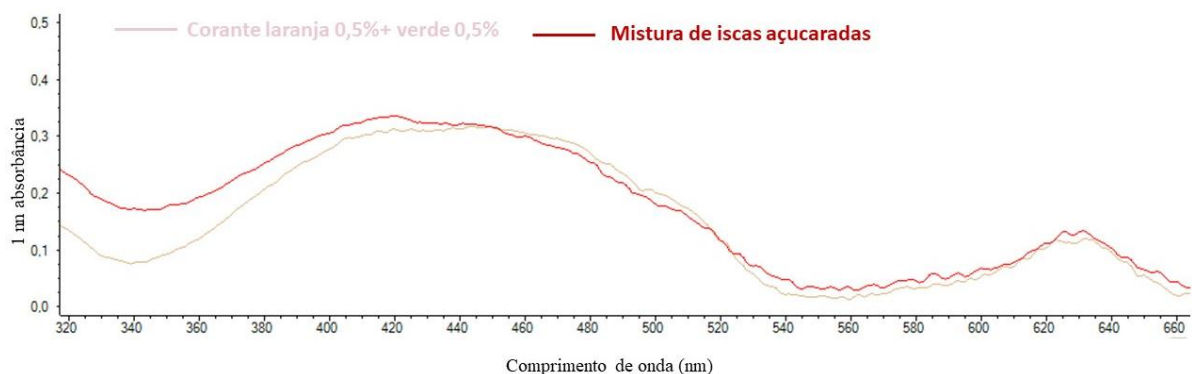
Figura 5 – Curva de comprimento de onda para cores dos corantes verde e laranja presentes nas iscas açucaradas.



Legenda: Curva controle verde: Corante 0,5%+ água; Curva controle laranja: Corante 0,5% + água.

Fonte: Alvarenga *et al.* (2024)

Figura 6 – Curva de comprimento de onda, corantes alimentícios verde e laranja misturados na presentes nas iscas açucaradas.



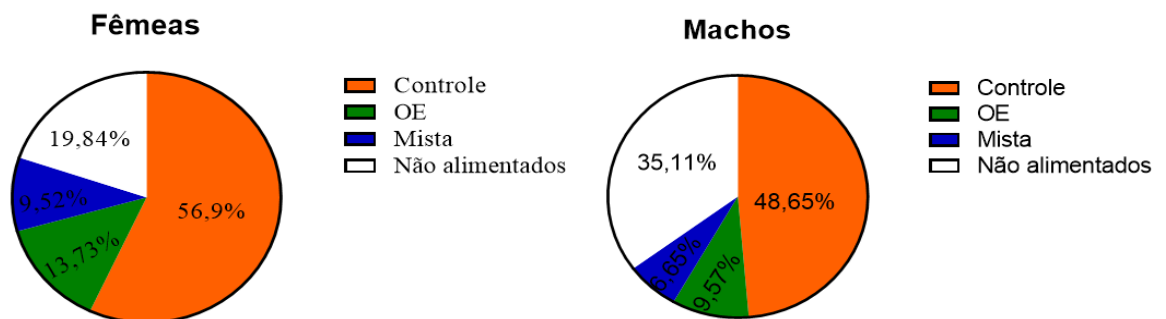
Legenda: Curva controle de iscas mistas: Corante verde 0,5% + corante laranja 0,5%.

Fonte: Alvarenga *et al.* (2024)

Foi possível observar que as fêmeas (80,16%) se alimentaram mais do que os machos (64,89%), e a quando alimentadas a maioria foi pela isca contendo o controle (Figura 7). Sendo 56,9% das fêmeas e 48,65% dos machos preferiram a isca controle, 13,73% das fêmeas e 9,57% dos machos preferiram da isca contendo OEep, e 9,52% das fêmeas e 6,65% dos machos preferiram a mistura de ambas iscas. Enquanto 35,11% dos machos não se alimentaram, 19,84% das fêmeas não se alimentaram (Figura 8). Houve diferença estatística ( $p < 0,0001$ ) na

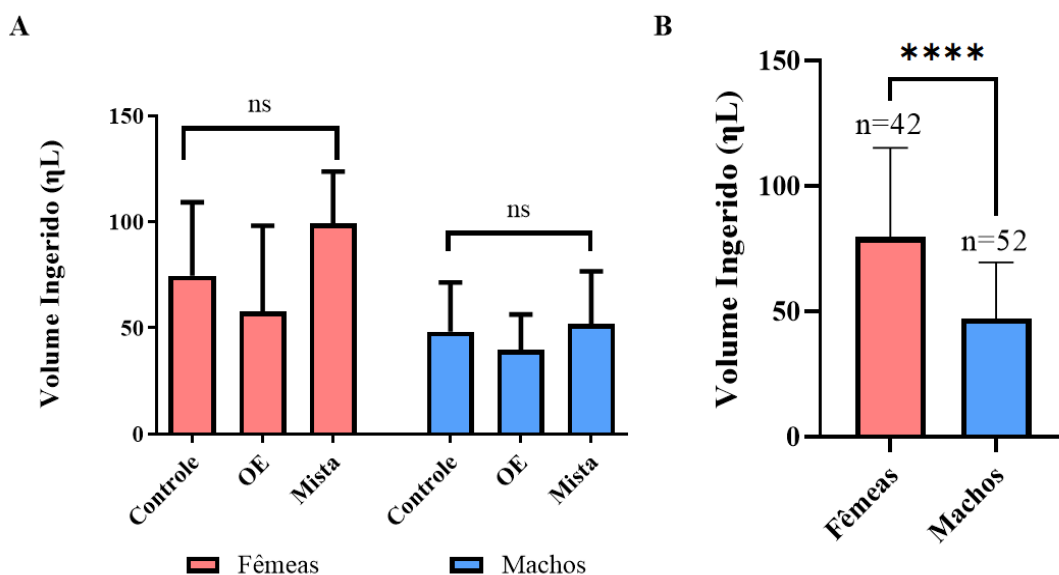
quantidade que as fêmeas ingeriram dos machos, as fêmeas que se alimentaram ingeriram em média 79,60 uL, enquanto os machos que se alimentaram ingeriram em média 47,14 uL (Figura 8). Ambos, quando alimentados por uma das iscas, não houve diferença estatisticamente da quantidade ingerida, demonstrando que não importava qual das iscas eram, eles ingeriram quantidades próximas, sendo nas fêmeas a média de 74,53 nL para o controle, 57,72 nL para isca de OEEp e 99,34 nL para a mistura de ambas. Para os machos em médias foi ingerido 48,13 nL para o controle, 39,54 nL para OEEp e 51,93 nL para mistura de ambas (Figura 8).

Figura 7 – Preferências alimentar de fêmeas e machos de *Lutzomyia longipalpis* expostas durante o período de 3 horas com duas iscas açucaradas, a isca de OEEp de 2,5 mg/mL com uma mistura de sacarose 2 M, DMSO 4% (v/v), corante alimentício verde 10% (v/v) e outra com o controle com solução contendo sacarose 2 M, DMSO 4% (v/v), corante alimentício laranja 10% (v/v), mantidos sob condições controladas de umidade e temperatura. Experimento realizado em duas réplicas em dias diferente com 50 fêmeas e 50 machos cada e gaiolas separadas por sexo.



Fonte: Alvarenga *et al.* (2024)

Figura 8 – Volume ingerido por fêmeas e machos de *Lutzomyia longipalpis* no ensaio de preferência expostas durante o período de 3 horas com duas iscas açucaradas, a isca experimental de OEEp de 2,5mg/mL com uma mistura de sacarose 2 M, DMSO 4% (v/v), corante alimentício verde 10% (v/v) e outra com o controle com solução contendo sacarose 2 M, DMSO 4% (v/v), corante alimentício laranja 10% (v/v), e a mistura de ambas iscas, mantidos sob condições controladas de umidade e temperatura.



Legenda: A) Média de volume ingerido de açúcares de diferentes iscas açucaradas em fêmeas e machos de *Lutzomyia longipalpis*. B) Média do volume total ingerido por fêmeas e machos de *Lutzomyia longipalpis*. Resultados da média de duas replicatas biológicas Teste T não pareado com  $p > 0,0001$ .

Fonte: Alvarenga *et al.* (2024)

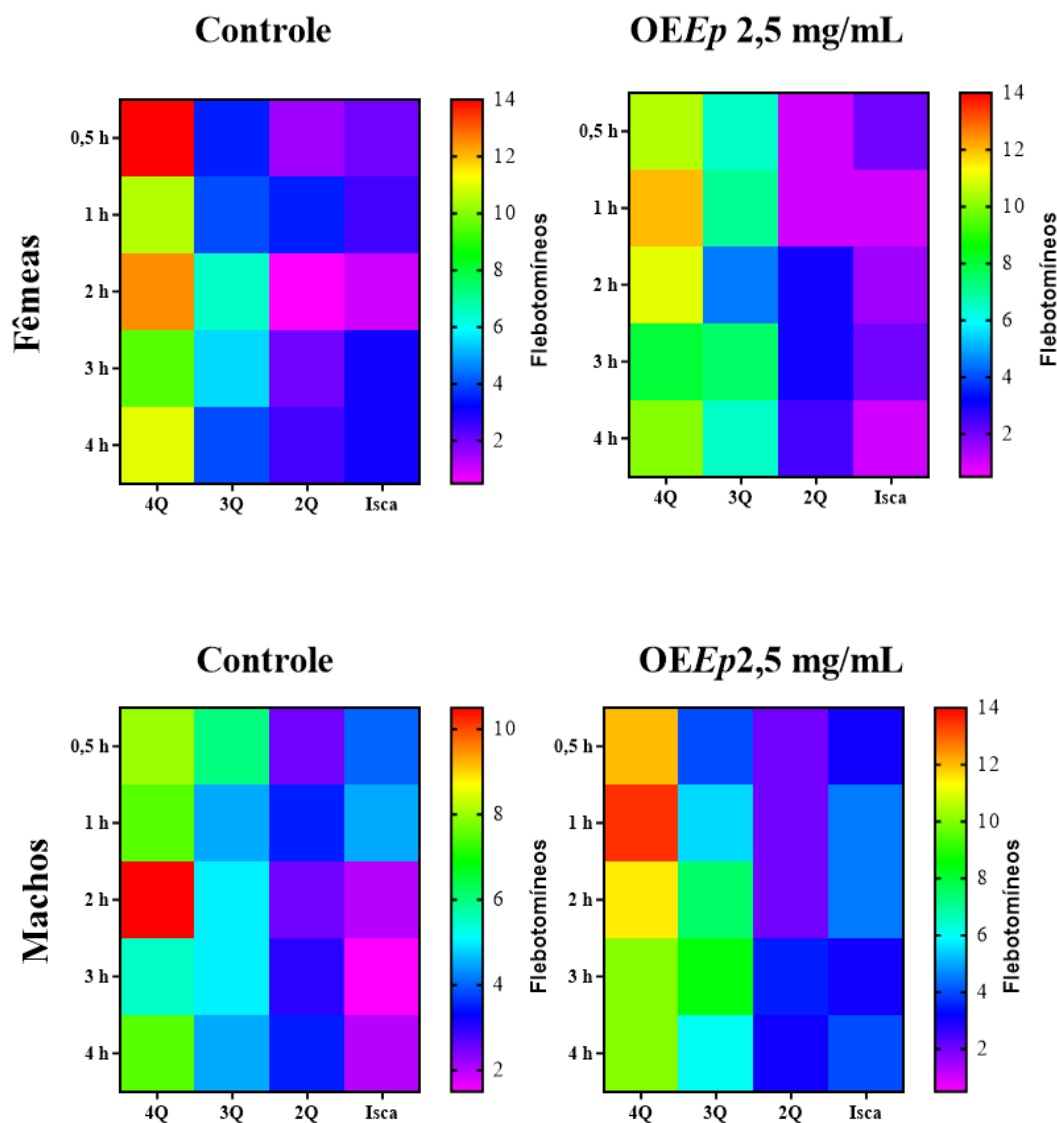
### 3.3 Ensaios de atratividade

As propriedades repelentes e atrativas dos OE possuem impacto na eficiência das iscas açucaradas. Para isso, testamos se o OEEp altera o movimento dos flebotomíneos em um sistema parcialmente fechado.

Observamos que a presença do OEEp na isca açucarada não influenciou de maneira significativa a migração dos flebotomíneos dentro da gaiola. Como podemos observar na figura 9, tanto os machos quanto as fêmeas se movimentaram pouco ao longo do tempo, com uma grande quantidade de insetos permanecendo na região em que foram liberados.

Não houve diferença na migração dos insetos quando comparamos o perfil obtido ao longo tempo do grupo controle e do grupo exposto a isca açucarada contendo *OEEp* 2,5 mg/mL.

Figura 9 – Efeito de atração do *OEEp* em machos e fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*. Movimentação dos insetos ao longo do tempo na presença de uma isca açucarada.

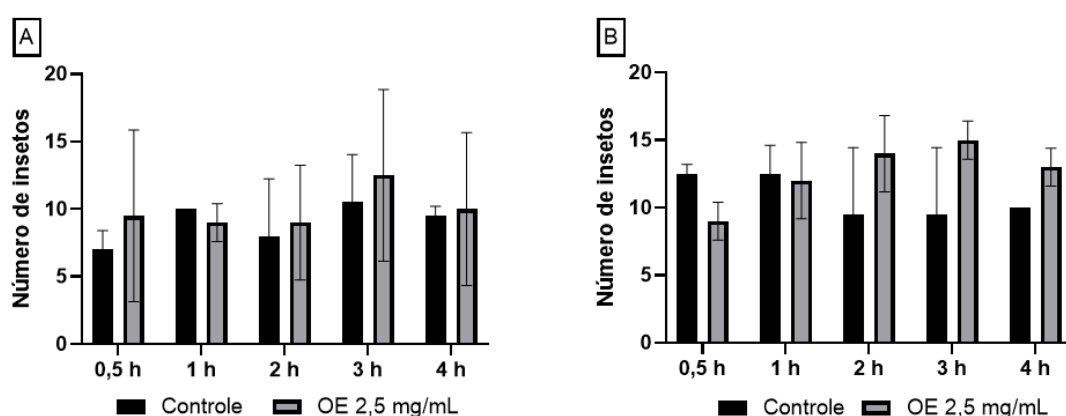


Legenda: Insetos adultos recém eclodidos machos ou fêmeas, foram colocados em uma gaiola de acrílico contendo, em uma de suas extremidades a isca açucarada controle (sacarose 2 M, DMSO 4% (v/v), corante alimentício laranja 10% (v/v) ou isca açucarada contendo *OEEp* (sacarose 2 M, DMSO 4% (v/v), corante alimentício verde 10% (v/v) e *OEEp* 2,5 mg/mL). A contabilização dos insetos nas diferentes seções da caixa foi realizada em 0,5 h, 1, 2, 3 e 4 horas, após inserção dos insetos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SD de duas replicatas biológicas contendo 20 insetos por gaiola.

Fonte: Alvarenga *et al.* (2024)

Quando comparamos o número de insetos que passaram do lado de soltura para o lado que contém a isca açucarada, observamos na figura 10 que um maior número de machos passa para a seção da caixa que contém a isca açucarada no grupo experimental (sacarose + OEEp 2,5 mg/mL) em comparação com o grupo controle (sacarose) ao longo tempo, no entanto os resultados não foram diferentemente significativos.

Figura 10 – Efeito de atração do OEEp em machos e fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*. Número médio de insetos no lado da gaiola contendo a isca açucarada após 0,5 h, 1, 2, 3 e 4 horas.



Legenda: Insetos adultos recém eclodidos machos ou fêmeas, foram colocados em uma gaiola de acrílico contendo, em uma de suas extremidades a isca açucarada controle (sacarose 2 M, DMSO 4% (v/v), corante alimentício laranja 10% (v/v) ou isca açucarada contendo OEEp (sacarose 2 M, DMSO 4% (v/v), corante alimentício verde 10% (v/v) e OEEp 2,5 mg/mL). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SD de duas replicatas biológicas contendo 20 insetos por gaiola. Teste não paramétrico de Mann-Whitney, não significativo.

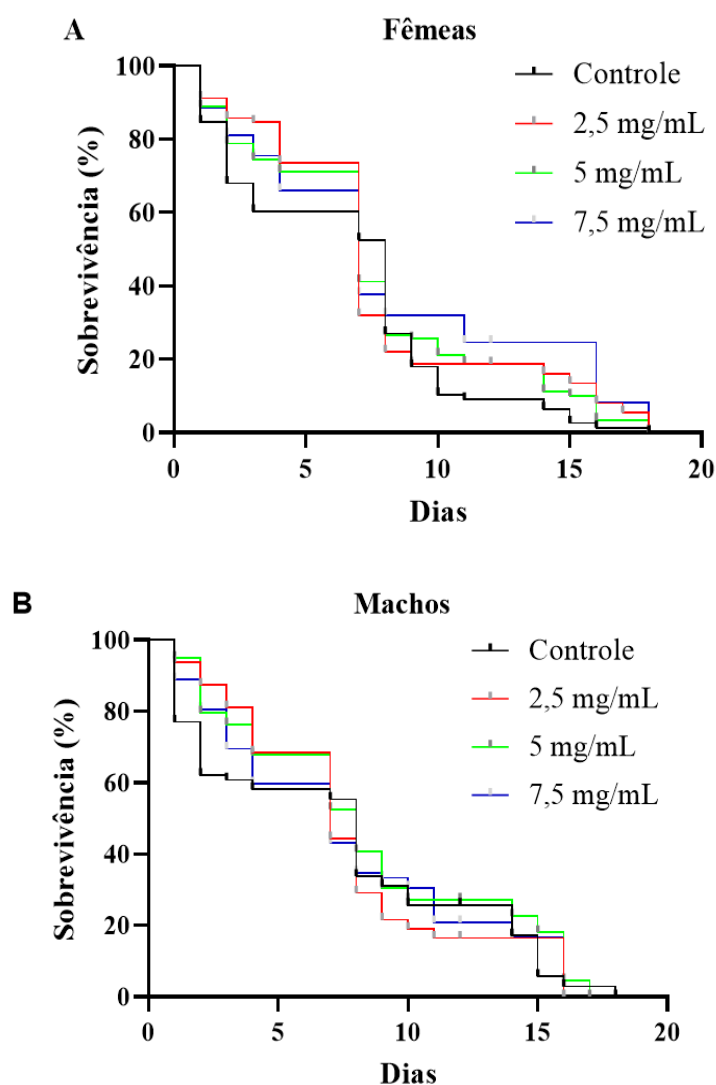
Fonte: Alvarenga *et al.* (2024)

### 3.4 Efeito OEEp na sobrevivência de *Lu. longipalpis*

Métodos de controle de insetos podem estar relacionados com a mortalidade imediata ou com o efeito exercido na longevidade do inseto. Portanto, trabalhar com iscas açucaradas que poderiam interferir na sobrevivência dos insetos adultos é uma estratégia que foi avaliada no presente estudo com o OEEp. Ao comparamos a curva de sobrevivência de fêmeas machos de *Lu. longipalpis* alimentados com diferentes concentrações de OEEp (2,5 mg/mL, 5 mg/mL e 7,5 mg/mL), verificou-se que não houve diferença significativa entre a curva de sobrevivência

do grupo controle e as curvas obtidas quando diferentes concentrações do *OEEp* foram testadas. Tanto para machos quanto para fêmeas, a mediana de sobrevivência foi de 7 dias para o grupo tratado e de 8 dias para o controle.

Figura 11 – Longevidade de fêmeas e machos de *Lutzomyia longipalpis* alimentados com iscas açucaradas contendo diferentes concentrações do *OEEp*, mantidos sob condições controladas de umidade e temperatura. A mortalidade dos insetos foi avaliada diariamente. Os grupos controle foram alimentados com solução contendo sacarose 2 M, DMSO 4% (v/v), corante alimentício laranja 10% (v/v) e os grupos experimentais foram alimentados com uma mistura de sacarose 2 M, DMSO 4% (v/v), corante alimentício verde 10% (v/v) e *OEEp* nas concentrações de 2,5 mg/mL, 5,0 mg/mL ou 7,5 mg/mL.

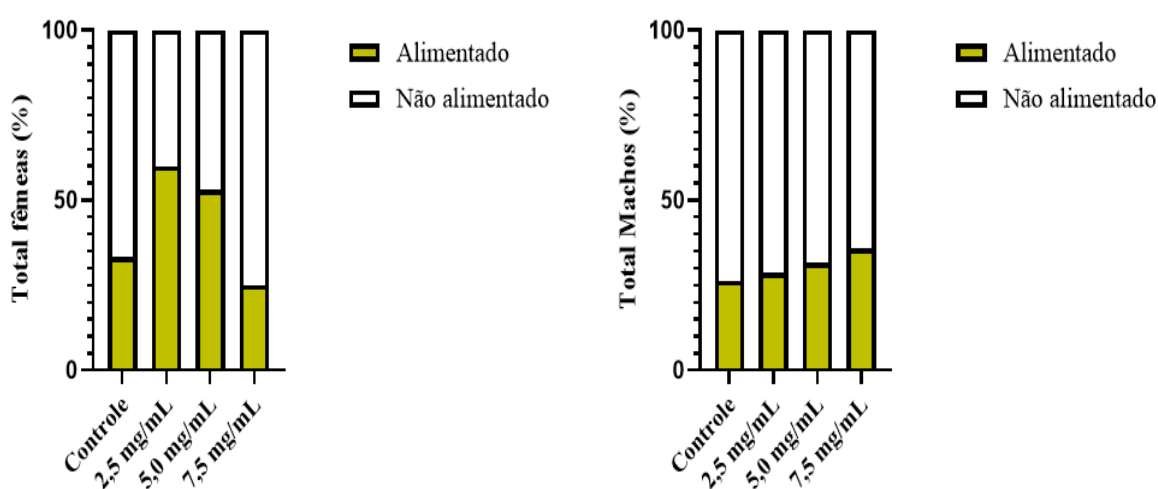


Legenda: (A) Fêmeas. (B) Machos. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes. Para cada repetição foram utilizadas pelo menos 50 fêmeas e 50 machos. Para análise estatística foi realizado o teste log-rank de Mantel-Cox, considerando curvas diferentes se  $p < 0,05$ .

Fonte: Alvarenga *et al.* (2024)

Após as primeiras 24 h do início do ensaio de sobrevivências, foram coletados insetos para verificar se haviam se alimentado das iscas açucaradas. As fêmeas se alimentaram mais do que os machos, sendo que na isca de controle foi em média de 33,33% de fêmeas que se alimentaram e a média de 26,31% dos machos; na isca de *OEEp* na concentração de 2,5 mg/mL uma média de 60% das fêmeas se alimentaram, e uma média 28,57% dos machos se alimentaram dessa isca; a média de 52,94% das fêmeas se alimentaram das iscas com *OEEp* de 5 mg/mL, e a média de 31,57% dos machos; e para iscas com *OEEp* a 7,5 mg/mL a média de 25% das fêmeas se alimentaram e em médias 35,71% dos machos, sendo a única isca que os machos em média se alimentaram mais que as fêmeas. Houve uma percentual inversamente proporcional de fêmeas alimentadas a concentração da isca com *OEEp*, quanto menor era a concentração do *OEEp* mais fêmeas se alimentaram (60% das fêmeas se alimentaram da isca de *OEEp* de 2,5 mg/mL) e quando a concentração era maior, menos fêmeas se alimentaram (25% das fêmeas se alimentaram na isca *OEEp* de 7,5 mg/mL). E também houve menos fêmeas alimentadas na gaiola que havia a isca com controle (33,33%) do que nas que havia a concentração de *OEEp* em 2,5 mg/mL (60%) e 5 mg/mL (52,94%). Em relação aos machos não se verificou grande diferença na preferência.

Figura 12 – Porcentagem de fêmeas e machos de *Lutzomyia longipalpis* alimentados nas iscas açucaradas nas primeiras 24 h do ensaio de sobrevivência. Os grupos controle foram alimentados com solução contendo sacarose 2 M, DMSO 4% (v/v), corante alimentício laranja 10% (v/v) e os grupos experimentais foram alimentados com uma mistura de sacarose 2 M, DMSO 4% (v/v), corante alimentício verde 10% (v/v) e *OEEp* nas concentrações de 2,5 mg/mL, 5,0 mg/mL ou 7,5 mg/mL.



Fonte: Alvarenga *et al.* (2024)

### 3.5 Atividade leishmanicida do OEEp

Iscas açucaradas podem desempenhar um papel fundamental no bloqueio da instalação de uma infecção em insetos vetores, a potencialidade do OEEp como bloqueador de infecção de *L. infantum* foi testada. A concentração necessária para inibir em 50% a proliferação de promastigotas foi de  $57,08\mu\text{M} \pm 0,1$  do OEEp foi de  $58,33\mu\text{M} \pm 0,13$  OEEp para inibir a proliferação de amastigotas. O coeficiente de determinação foi de 0,89 e 0,82 respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos utilizando o controle de Miltefosina de 0,89 e 0,88 promastigota e amastigota, respectivamente, que é a droga utilizada para tratamento canino.

Tabela 2. Concentração requerida para inibir 50% da proliferação de formas evolutivas de *Leishmania infantum* com OEEp e Miltefosina

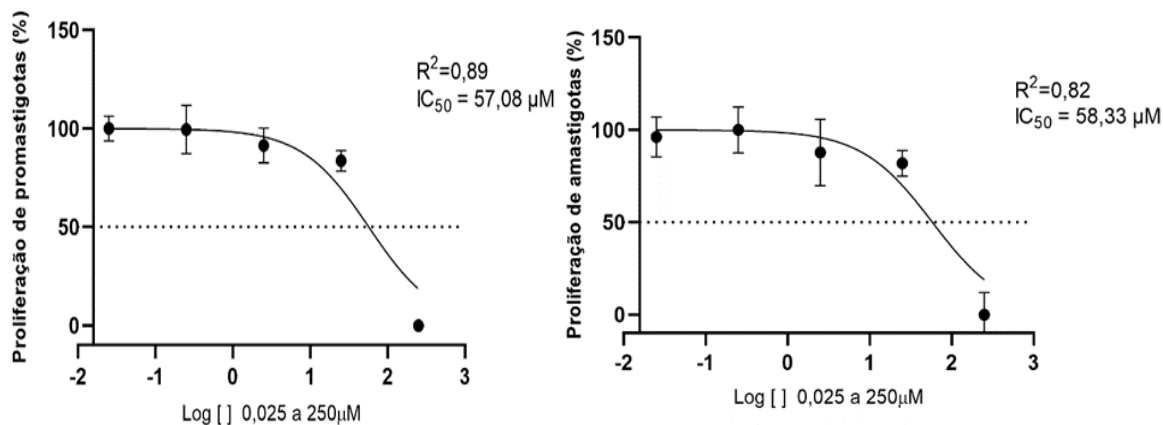
Composto	Promastigota		Amastigota	
	IC <sub>50</sub> $\mu\text{M}$	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> $\mu\text{M}$	R <sup>2</sup>
OEEp	$57,08 \pm 0,1$	0,89	$58,33 \pm 0,13$	0,82
Miltefosina	$6,6 \pm 0,12$	0,89	$1,5 \pm 0,12$	0,88

Legenda da tabela: IC<sub>50</sub>: Concentração requerida para inibir 50% da proliferação de amastigotas ou promastigotas.  $\pm$  desvio padrão. R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinação – Avalia a qualidade do ajuste de um modelo de regressão. Varia de 0 a 1 (Mais próximo de 1 à Melhor o coeficiente).

Fonte: Alvarenga *et al.* (2024)

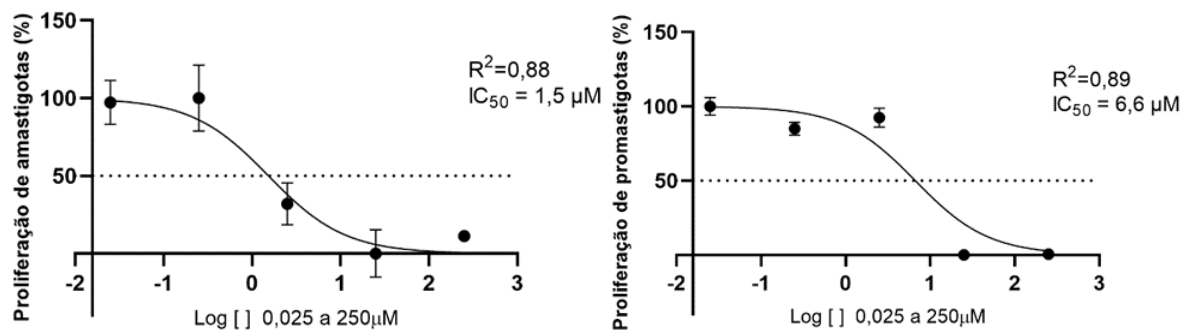


Figura 13 – Curva dose-resposta *Leishmania infantum* (Cepa MCAN/BR/2002/BH401) nas formas de amastigotas infectado macrofagos caninos (DH82) e promastigotas, tratadas com OEEp nas concentrações 250µM, 25µM, 2,5µM, 0,25µM e 0,025µM.



Fonte: Alvarenga *et al.* (2024)

Figura 14 – Curva de proliferação de *Leishmania infantum* (Cepa MCAN/BR/2002/BH401) nas formas de amastigotas infectando macrofagos caninos (DH82) e promastigotas tratadas com Melfitosina (Sigma-Aldrich) nas concentrações 250µM, 25µM, 2,5µM, 0,25µM e 0,025µM.



Fonte: Alvarenga *et al.* (2024)

## 4 DISCUSSÃO

O método de extração, a parte da planta utilizada, a localização geográfica pode fornecer um composto secundário com diferentes componentes da mesma espécie de planta. No presente trabalho, as folhas úmidas foram usadas para extrair o OEEp com a técnica de arraste de vapor. Um trabalho realizado por Souza e colaboradores (2020) com folhas secas por 7 dias de plantas da mesma espécie, porém com metodologia de extração por CO<sub>2</sub> supercrítico e técnicas assistidas por ultrassom, forneceu uma composição majoritária contendo  $\beta$ -amirina e  $\alpha$ -amirina, diferente do presente estudo que os compostos majoritários foram  $\beta$ -Cariofileno, Óxido de cariofileno, (+)-Espatulenol,  $\alpha$ -Copaeno e  $\beta$ -Gurjuneno. Em outro trabalho que usou partes suspensas da planta, os compostos majoritários foram limoneno, nerolidol,  $\alpha$ -cadinol e óxido de cariofileno e  $\beta$ -pineno (DURAZZINI *et al.*, 2019). Isso pode estar relacionado como foi preparada a folhas ou qual outra parte da planta, como frutos, flores ou galhos, foram usados, e o método de extração, assim como a localização geográfica das árvores, que pode ter variáveis como luz solar, nutrição e irrigação que irão modificar a característica presentes nos compostos secundários das plantas (SGANZERLA *et al.*, 2019). Dessa maneira, o OEEp usado no presente trabalho pode ter diferentes resultados se aplicado em outros experimentos com metodologias diferentes de extração ou diferentes locais de coleta.

Dois dos componentes majoritário do OEEp que são sesquiterpenos hidrocarboneto, o  $\beta$ -Cariofileno, Óxido de cariofileno, são encontrados em diferentes OE de diferentes plantas, podendo exercer atividades biológicas importantes (FIDYT *et al.*, 2016; KARPIŃSKI, 2020). Estudos realizados por Nararak e colaboradores (2020) com óxido de  $\beta$ -Cariofileno avaliaram a segurança biológica e a repelência contra mosquitos, verificando os efeitos fototóxicos e genotóxicos em fibroblastos de camundongos. Os resultados neste estudo revelaram o óxido de  $\beta$ -Cariofileno como sendo um repelente seguro e eficaz contra mosquitos.

A utilização de iscas açucaradas tóxicas (IATs) como forma de controle necessita um estudo detalhado da fisiologia do inseto e hábitos alimentares. Uma questão crítica é a necessidade de ingestão do composto tóxico pelo inseto para que um efeito inseticida ou antiparasitário seja detectado. Assim vários parâmetros precisam ser testados para que um composto possa ser utilizado na composição de IATs.

Estudos com iscas açucaradas contendo OE ou outros componentes vegetais vem sendo desenvolvido para proporcionar novas abordagens no controle de insetos vetores de patógenos (QUALLS *et al.*, 2015; SAGHAFIPOUR *et al.*, 2017). Essas iscas podem apresentar diferentes características como o potencial de afetar a longevidade, reprodução, alimentação e a suscetibilidade à infecção por patógenos (SCHLEIN & JACOBSON, 1994). Considerando que inseticidas convencionais podem deixar resíduos e contribuir com a seleção de insetos resistentes, abordagens alternativas são cruciais para mitigar esses problemas (DENLINGER *et al.*, 2015). Além de demonstrar eficácia, esses estudos indicam que os riscos associados ao uso de iscas são significativamente menores em comparação com os inseticidas químicos tradicionais. No entanto, também é essencial avaliar o impacto das iscas sobre organismos não-alvos a fim de evitar desequilíbrios ecológicos (DIARRA *et al.*, 2021).

No ensaio de atratividade, o comportamento inicial dos insetos na caixa permaneceu consistentemente semelhante ao observado ao final do período de observação, indicando ausência de atratividade e alinhando-se com o estudo conduzido por Ferreira e colaboradores (2019). Neste último, não foram registradas variações no comportamento ao longo da observação do experimento envolvendo iscas açucaradas contendo mandelonitrila. Adicionalmente, ao considerar outros resultados deste estudo, notamos que em experimentos realizados em períodos similares, como o de preferência - conduzido em gaiolas em vez de caixas de acrílico - os insetos se aproximaram e alimentaram-se, evidenciando uma resposta à isca. No entanto, esta reação não foi observada no presente ensaio de atratividade, onde não houve alimentação ou indícios sugestivos de atração. A pequena movimentação observada não é suficiente para relatar um efeito de atratividade do *OEEp*, no entanto é possível notar pelos dados, maior dispersão dos machos ao longo do tempo em relação das fêmeas, o que é esperado para o comportamento de machos (HAMILTON, 2022).

Nesse nosso primeiro estudo, não adicionamos qualquer atrativo às iscas e verificamos um comportamento de movimentação normal, sem atração pelas iscas de *OEEp*, mas também sem atração pelo controle. Embora as iscas de *OEEp* e as iscas mistas tenham sido respectivamente a segunda e terceira escolha, tanto dos machos quanto das fêmeas, essas foram consumidas em quantidades normais comparadas ao controle. Esse é um achado importante, uma vez que a isca ideal, necessariamente não necessita ser atrativa, mas sim palatável para que seja ingerida. A atratividade e a preferência podem ser modificadas utilizando de outros

artifícios como feromônios ou soluções mais úmidas, uma vez que a umidade é um fator atrativo para a alimentação dos flebotomíneos (JUNNILA *et al.*, 2011 ).

No presente estudo, não observamos diferença estatística na curva de sobrevivência de *Lu. longipalpis* alimentadas com iscas açucaradas de OEEp em diferentes concentrações testadas em comparação com o grupo controle. Apesar de não termos verificados diferenças de sobrevivência entre machos e fêmeas, diferente do que foi observado no trabalho de Ferreira e colaboradores (2019) que houve uma diferença na média de sobrevivência entre fêmeas (15 dias) e machos (17 dias) onde os machos tiveram uma média maior, porém foi possível demonstrar que as fêmeas se alimentaram mais do que os machos após as primeiras 24 horas do ensaio de sobrevivência e preferiram as concentrações mais baixas do OEEp. Considerando que as fêmeas também se beneficiam da ingestão de açúcares para obter energia (LAWYER *et al.*, 2017), um OE em baixa concentração e que reduza a longevidade/sobrevivência é desejável como estratégia de controle da transmissão de patógenos, inclusive sob o ponto de vista biotecnológico, visando uma otimização do produto a ser manufaturado.

Nesse sentido, considerando o objetivo de reduzir a transmissão de determinado patógeno, como é nosso foco, em relação às leishmanioses, o ideal seria uma isca que não gerasse um impacto nos insetos, mas sim na transmissão do protozoário. Com isso, espera-se um menor impacto ambiental em organismos não-alvo. Assim, é crucial avaliar a concentração do composto na isca com base não somente na interferência no inseto vetor, mas nos efeitos da isca sobre o patógeno transmitido por esse vetor, que no nosso caso é *L. infantum*.

Ao avaliarmos o efeito do OEEp sobre *L. infantum* em condições de laboratório, foi possível verificar que a dose letal de 50% (DL50) do OEEp para inibir 50% da proliferação de promastigotas (a forma encontrada no inseto vetor) é de  $57,08\mu\text{M} \pm 0,1$ . OEEp demonstrou ser palatável, visto que não houve diferença estatística na quantidade ingerida da isca de OEEp (57,72 nL) comparada a isca de controle (74,53 nL), o que permite que ele seja oferecido como isca açucarada mesmo em concentrações mais altas, que é maior do que a DL50 encontrada no presente estudo. Outros trabalhos que utilizam iscas açucaradas com o objetivo de interferir na infecção do inseto obtiveram resultados notáveis, fornecendo perspectivas valiosas para futuras investigações (FERREIRA *et al.*, 2019).

Quando comparado ao estudo realizado por Durazzini e colaboradores (2019) com *L. amazonensis*, utilizando OEEp pode ser observado que a dose letal 50% (DL50) foi de 2,16

$\mu\text{g}/\text{m}$ . Porém deve-se levar em consideração que os compostos encontrados nos OE são diferentes, devido aos fatores já discutidos no presente trabalho. Um trabalho realizado por de Souza e colaboradores (2020) obteve uma DL50 de 5,98 e 9,38  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para *L. amazonensis* com OEEp extraído de maneira diferentes e tendo compostos majoritários diferentes. Porém o presente estudo é pioneiro quando se trata de testagem de OEEp como leishmanicida e isca açucarada, visando a aplicabilidade do mesmo como uma biotecnologia.

A necessidade premente de enfrentar as leishmanioses, que constituem um desafio global para a saúde pública, é inegável. Diante da complexidade dessa doença negligenciada e dos diversos obstáculos que a acompanham, como a falta de um tratamento eficaz e a presença de resistência medicamentosa, é imperativo adotar abordagens inovadoras e integradas. A busca por novas opções de controle é crucial para mitigar o impacto dessa condição.

Enquanto a atração inicial das iscas mostrou-se limitada, os insights sobre as preferências alimentares entre machos e fêmeas de *Lu. longipalpis* são relevantes para o desenvolvimento de estratégias de manejo. E, para além da perspectiva de controle envolvendo o vetor, nosso estudo demonstrou que o OEEp apresenta efeito letal para amastigotas de *L. infantum* em cultura, o que abre perspectivas para avanço de estudos em outro desafio do controle que é o tratamento humano e animal, uma vez que o arsenal terapêutico é escasso e os antimoniais pentavalentes além de tóxicos, já não apresentam a eficácia e eficiência ideais frente às novas cepas resistentes à droga (SEN & CHATTERJEE, 2011). Esses avanços representam um passo significativo em direção a soluções mais eficazes e seguras para o controle da leishmaniose, e demonstram o potencial deste estudo para contribuir de forma substancial para o campo da saúde pública e controle de doenças transmitidas por vetores.

## 5 CONCLUSÃO

A composição de *OEEp* e os seus efeitos no controle de vetores e ação leishmanicida possui inúmeras variações que podem estar atreladas às espécies de plantas utilizadas, ecossistema de plantas silvestres, modo de extração, entre outros. Neste estudo pudemos explorar um novo mecanismo de controle que leva em consideração as necessidades em saúde pública de se controlar as leishmanioses, no âmbito humano e animal, mas trazendo a luz também alternativas que sejam menos abrasivas ao meio ambiente. Esse tipo de abordagem é importante quando observada sob o ponto de vista de saúde única e é uma chave inicial para o desenvolvimento de futuras pesquisas, para compreender melhor a respeito da volatilidade dos óleos essenciais e as suas capacidades no controle de vetores e possíveis patógenos.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, ed. 4.1 **Biology Department Baylor University** ed. 4.1, 30 Jan. 2017

BEIER, J. C. *et al.* Attractive toxic sugar bait (ATSB) methods decimate population of *Anopheles* malaria vectors in arid environments regardless of the local availability of favored sugar-source. **Malar J**, v. 11, 2012.

BRAY, D. P. *et al.* Synthetic sex pheromone attracts the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* to experimental chicken sheds treated with insecticide. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 1, p. 16, 2010.

Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva: [s.n.].

DA COSTA, S. G. *et al.* Characterization of  $\alpha$ -glucosidases from *Lutzomyia longipalpis* reveals independent hydrolysis systems for plant or blood sugars. **Frontiers in physiology**, v. 10, 2019.

DA SAÚDE, M. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1.a edição 3.a reimpressão. [s.l.:s.n.]. Disponível em: <[https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_controle\\_leishmaniose\\_visceral.pdf](https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral.pdf)>

DA SAÚDE, O. P.-A. Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas. No 11 (Dezembro de 2022). **Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas**, 2022.

DE SOUZA, J. H. *et al.* Leishmanicidal, trypanocidal and antioxidant activity of amyriin-rich extracts from *Eugenia pyriformis* cambess. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 19, n. 4, p. 343–353, Outono 2020.

DENLINGER, D. S. *et al.* Assessing insecticide susceptibility of laboratory *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Journal of medical entomology**, v. 52, n. 5, p. 1003–1012, 2015.

DIARRA, R. A. *et al.* Testing configurations of attractive toxic sugar bait (ATSB) stations in Mali, West Africa, for improving the control of malaria parasite transmission by vector mosquitoes and minimizing their effect on non-target insects. **Malaria journal**, v. 20, n. 1, 2021.

DURAZZINI, A. M. S. *et al.* *Eugenia pyriformis* Cambess: a species of the Myrtaceae family with bioactive essential oil. **Natural Product Research**, p. 1–5, 2019.

DVORAK, V.; SHAW, J.; VOLF, P. Parasite Biology: The Vectors. **The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases**. p. 31–77, 2018.

FERREIRA, T. N. *et al.* Effects of anti-*Leishmania* compounds in the behavior of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. **Pest management science**, v. 78, n. 7, p. 2792–2805, 2022.

FIDYT, K. *et al.*  $\beta$ -caryophyllene and  $\beta$ -caryophyllene oxide—natural compounds of anticancer and analgesic properties. **Cancer medicine**, v. 5, n. 10, p. 3007–3017, 2016.

GONZÁLEZ, M. A. *et al.* Susceptibility of wild-caught *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sand flies to insecticide after an extended period of exposure in western São Paulo, Brazil. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, 2019.

HAMILTON, J. G. C. Chapter 13: **Sand fly sex/aggregation pheromones**. Em: Sensory ecology of disease vectors. Vada, Netherlands: Brill | Wageningen Academic, 2022. p. 349–371.

Iso/Tc 54. Disponível em: <<https://www.iso.org/committee/48956.html>>. Acesso em: 2 nov. 2023.

- JUNNILA, A.; MÜLLER, G. C.; SCHLEIN, Y. Attraction of *Phlebotomus papatasi* to common fruit in the field. **Journal of vector ecology: journal of the Society for Vector Ecology**, v. 36, p. S206–S211, 2011.
- KARPIŃSKI, T. M. Essential oils of Lamiaceae family plants as antifungals. **Biomolecules**, v. 10, n. 1, p. 103, 2020
- KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L. **Óleos essenciais e sua extração por arraste a vapor**. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA, 1991.
- LAWYER, P. *et al.* Laboratory colonization and mass rearing of phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae). **Parasite (Paris, France)**, v. 24, p. 42, 2017.
- MOTA, T. F. *et al.* Screening organic repellent compounds against *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) present in plant essential oils: Bioassay plus an in silico approach. **Acta tropica**, v. 229, n. 106367, p. 106367, 2022.
- MÜLLER, G. C.; JUNNILA, A.; SCHLEIN, Y. Effective control of adult *Culex pipiens* by spraying an attractive toxic sugar baits solution in the vegetation near larval developmental sites. **J Med Entomol**, v. 47, n. 1, p. 63–66, 2010.
- MÜLLER, G. C.; SCHLEIN, Y. Nectar and honeydew feeding of *Phlebotomus papatasi* in a focus of *Leishmania major* in Neot-Hakikar oasis. **J Vector Ecol**, v. 29, n. 1, p. 154–158, 2004.
- NARARAK, J. *et al.* Excito-repellency and biological safety of  $\beta$ -caryophyllene oxide against *Aedes albopictus* and *Anopheles dirus* (Diptera: Culicidae). **Acta tropica**, v. 210, n. 105556, p. 105556, 2020.
- PAHO/WHO Data - Leishmaniasis. Disponível em: <<https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/leish-en.html>>. Acesso em: 31 out. 2023.
- QUALLS, W. A. *et al.* Control of sand flies with attractive toxic sugar baits (ATSB) and potential impact on non-target organisms in Morocco. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 87, 2015.
- SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R. L. Mortality of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi* caused by plant feeding of the sand flies. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 50, n. 1, p. 20–27, 1994.
- SEN, R.; CHATTERJEE, M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 18, n. 12, p. 1056–1069, 2011.
- SGANZERLA, W. G. *et al.* Geographical discrimination of uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) by principal component analysis. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 99, n. 15, p. 6778–6787, 2019.
- SOUSA-PAULA, L. C. DE; OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. *Lutzomyia longipalpis* (sand fly). **Trends in parasitology**, v. 36, n. 9, p. 796–797, 2020.
- STOCKDALE, L.; NEWTON, R. A review of preventative methods against human leishmaniasis infection. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 6, p. e2278, 2013.



## **QUARTA PARTE**

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo investigamos de forma abrangente a utilização do óleo essencial de *Eugenia pyriformis* (OEEp) como um potencial ferramenta de controle para flebotomíneos, com foco especial em *Lutzomyia longipalpis*, o principal vetor de *Leishmania infantum*, causadora da Leishmaniose Visceral Americana (LVA). Diante da complexidade e relevância das leishmanioses como problemas de saúde pública, os resultados obtidos neste estudo contribuem significativamente para a compreensão e busca por estratégias inovadoras e sustentáveis para o controle dessas doenças negligenciadas.

A abordagem adotada, centrada no uso de iscas açucaradas contendo OEEp, apresentou os insights de uma alternativa promissora aos métodos convencionais, muitas vezes baseados em inseticidas com impactos ambientais indesejáveis e propensos à resistência.

Os resultados dos ensaios de sobrevivência, alimentação, atração e preferência indicam que as concentrações de OEEp testadas não apresentaram diferenças significativas em comparação com o controle de sacarose. No entanto, ao avaliar o potencial leishmanicida do OEEp, observou-se uma inibição significativa da proliferação de promastigotas e amastigotas de *L. infantum*. Embora o OEEp não tenha demonstrado efeito inseticida direto, a aceitação como isca açucarada por *Lu. longipalpis* abre caminho para estratégias integradas que combinam a atratividade da isca com seu potencial leishmanicida.

Além disso, a identificação dos compostos majoritários do OEEp, como  $\beta$ -Cariofileno, Óxido de cariofileno, (+)-Espatuleno,  $\alpha$ -Copaeno e  $\beta$ -Gurjuneno, fornece uma base sólida para futuras investigações sobre os mecanismos de ação desses componentes e sua eficácia em condições de campo.

Dessa forma, concluímos que o uso de iscas açucaradas contendo OEEp representa uma estratégia promissora para o controle integrado de flebotomíneos e, por conseguinte, das leishmanioses. As descobertas desta pesquisa abrem portas para novos experimentos e aplicações práticas, contribuindo para o avanço contínuo no campo do controle de vetores e no combate às leishmanioses em contextos de saúde pública.

Ademais, é de grande relevância destacar o marco significativo atingido durante o desenvolvimento desta tese, que foi a bem-sucedida instalação de uma colônia de

flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis*, na Universidade Federal de Lavras (UFLA). Esse feito não apenas contribui para a consolidação do conhecimento sobre a biologia desses vetores, mas também estabelece um valioso Protocolo Operacional Padrão (POP) que será de extrema utilidade para futuros estudos relacionados a *Lu. longipalpis*.

A criação e manutenção de uma colônia de flebotomíneos abrem perspectivas inovadoras para inúmeros experimentos e pesquisas, proporcionando à UFLA uma plataforma robusta para investigações futuras sobre a ecologia, comportamento, fisiologia e controle deste vetor de *Leishmania*. Esse recurso torna-se ainda mais relevante no contexto das leishmanioses, onde a compreensão detalhada da biologia do vetor é crucial para o desenvolvimento de estratégias de controle eficazes.

O estabelecimento do POP reflete o comprometimento com a padronização e a replicabilidade dos procedimentos, promovendo uma abordagem metodológica sólida que pode ser compartilhada e adaptada por outros pesquisadores. Essa conquista posiciona a UFLA como um centro de excelência na pesquisa relacionada a flebotomíneos e reforça o compromisso da instituição com a produção científica de alta qualidade e relevância para a saúde pública.

A partir desta conquista, o nosso grupo na UFLA, estativamente de iniciativas e colaborações nacionais e internacionais voltadas para o controle de leishmanioses. A colônia estabelecida representa não apenas um recurso valioso para a academia, mas também uma ferramenta prática para contribuir significativamente para o entendimento e mitigação das leishmanioses em nível local e global.