

UFRRJ
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

Avaliação do potencial pulicida do óleo essencial de
Curcuma zedoaria

Francielle Daiane de Freitas Lopes Luna

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Avaliação do potencial pulicida do óleo essencial de *Curcuma zedoaria*

FRANCIELLE DAIANE DE FREITAS LOPES LUNA

Sob a Orientação do Professor
Douglas Siqueira de Almeida Chaves

E Coorientação das Professoras
Alaíde de Sá Barreto
Naomi Kato Simas

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção
do grau de **Mestra em Química**,
Programa de Pós-Graduação em
Química, Área de concentração
Química.

Seropédica, RJ
Agosto de 2023

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L961a Luna, Francielle Daiane de Freitas, 1988-
Avaliação do potencial pulicida do óleo essencial de
Curcuma zedoaria / Francielle Daiane de Freitas Luna.
- Seropédica, 2023.
70 f.

Orientador: Douglas Siqueira de Almeida Chaves.
Coorientadora: Alaíde de Sá Barreto.
Coorientadora: Naomi Kato Simas.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação Em
Química, 2023.

1. Pulgas. 2. Curcuma zedoaria. I. Chaves,
Douglas Siqueira de Almeida , 1981-, orient. II.
Barreto, Alaíde de Sá, -, coorient. III. Simas, Naomi
Kato, -, coorient. IV Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação Em Química. V.
Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Francielle Daiane de Freitas Lopes Luna

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 17/08/2023

Douglas Siqueira de Almeida Chaves. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Yara Peluso Cid Dr^a. UFRRJ

João Carlos Palazzo de Mello. Dr. UEM



Emitido em 2023

TERMO Nº 940/2023 - PPGQ (12.28.01.00.00.00.60)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 18/08/2023 17:39)
DOUGLAS SIQUEIRA DE ALMEIDA CHAVES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
ICBS (12.28.01.22)
Matrícula: ###050#5

(Assinado digitalmente em 18/08/2023 15:23)
YARA PELUSO CID
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DCFar (12.28.01.00.00.00.47)
Matrícula: ###004#7

(Assinado digitalmente em 11/09/2023 13:19)
JOÃO CARLOS PALAZZO DE MELLO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.949-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/documentos/> informando seu número: **940**, ano: **2023**, tipo:
TERMO, data de emissão: **18/08/2023** e o código de verificação: **5f3db300d9**

Ao meu Deus
À minha querida irmã Flaviane, sem ela esse sonho não seria possível
Aos meus gatos Pretinho, Branquinho e In Memorian Xiaomiaumiau

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela sua infinita misericórdia e bondade mesmo eu não sendo merecedora da sua graça e amparo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves, gostaria de expressar minha gratidão pela oportunidade e confiança que foram dispensadas a mim. Um excelente orientador, sempre sensível às dificuldades e demandas que enfrentei durante meu percurso no mestrado.

Às minhas coorientadoras Dra. Alaide Barreto e Dra. Naomi Simas, pela oportunidade, confiança e suporte.

À professora Dra Cristiane Cardoso, que não mediu esforços em me ajudar nos ensaios com a acetilcolinesterase, minha eterna gratidão.

À professora Dra. Rosane Nora e a Técnica Cristiane Alves por todo auxílio nas análises cromatográficas no laboratório do Departamento de Química Orgânica.

À professora Dra. Yara Peluso, ao Dr. Diefrey Campos, pela disponibilidade e todo suporte com os experimentos *in vitro* no laboratório do Departamento de Ciências Farmacêuticas.

Ao professor Dr. Cristiano Riger e a Mestranda Nathalia Camargo por toda ajuda, dedicação e acompanhamento das análises de toxicidade feitas no laboratório do Departamento de Química.

À todos colegas de laboratório, em especial Debora Pereira, Bianca Augusto e Adriana Rocha, por serem pessoas maravilhosas e por toda ajuda, compreensão e suporte.

Aos meus pais, Valdeci Lopes e Edimê Lopes, que são à base do meu desenvolvimento como pessoa e a felicidade que encontro para percorrer caminhos difíceis.

Ao meu marido, Diogo Luna, que sempre me apoiou em todas minhas escolhas e sempre esteve disposto a me ajudar, meu grande amor e melhor amigo.

Aos meus irmãos, Flaviane Lopes, Fabiana Lopes e cunhado Augusto Monteiro, por me orientarem tanto espiritualmente quanto materialmente, amo vocês.

Ao meu irmão Doriedson Lopes e aos meus sobrinhos Gabriel Lopes e Ana Karolina Lopes, obrigada por estarem em minha vida e serem motivo da minha alegria, amo vocês.

A minha sogra Nancy Luna, minha segunda mãe, por me fazer enxergar que podemos ser fortes e superar todas as dificuldades, minha eterna gratidão e amor.

À todos meus amigos e familiares, pelo apoio e aconselhamentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

LUNA, Francielle Daiane de F. Lopes. **Avaliação do potencial pulicida do óleo essencial de *Curcuma zedoaria***. 2023. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

Curcuma zedoaria, popularmente conhecida como zedoaria, é uma planta da família Zingiberaceae, cuja origem é indiana. Atualmente, é cultivada no Brasil e em países do sul e sudoeste da Ásia. Neste estudo, foi avaliado o potencial bioinseticida do óleo essencial (OE) extraído dos rizomas da espécie *C. zedoaria* (Zingiberaceae). O OE foi obtido por hidrodestilação (3h) e identificado por CG/EM. O rendimento foi de 0,15% e os 3 principais constituintes químicos encontrados foram o 1,8-cineol (24,11%), a cânfora (12,13%) e a curzerenona (9,68%). Nos bioensaios realizados para estágios do ciclo reprodutivo da pulga *C. felis felis*, pelo método de impregnação com papel filtro, com concentrações finais para o OE de *C. zedoaria* variando de 10 a 1000 $\mu\text{g.cm}^{-2}$. Os resultados demonstraram que as pulgas adultas apresentaram mortalidade de 100% a partir da concentração de 800 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ em 24 h e 48 h, diferindo-se dos estágios de pupa com 94,23% de mortalidade na concentração de 396 $\mu\text{g.cm}^{-2}$, larva com 100% de mortalidade na concentração de 117,5 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ em 24 h e 48 h e ovos com 98% de mortalidade na concentração de 396 $\mu\text{g.cm}^{-2}$. Quanto à ação inibitória do OE de *C. zedoaria* frente à enzima acetilcolinesterase, verificada através do método modificado de Ellman, pode-se verificar que a atividade observada, utilizando-se o OE, quando comparado ao controle, comprovou baixa inibição, uma vez que o óleo inibiu cerca de 20% da atividade enzimática, mesmo em sua maior concentração. Nos ensaios de toxicidade utilizando-se como modelo de pesquisa a levedura *S. cerevisiae*, pode-se observar que o OE de *C. zedoaria* apresentou alta toxidez, já que no ensaio realizado houve dano mitocondrial, portanto, prejudicando o desenvolvimento celular. A pesquisa necessita de maiores estudos, já que apesar de apresentar potencial bioinseticida nos diferentes estágios de desenvolvimento da pulga *C. felis felis*, o OE mostrou-se tóxico nos ensaios realizados com a levedura *S. cerevisiae*.

Palavras-chave: Óleo essencial; *C. zedoaria*; ectoparasitas.

ABSTRACT

LUNA, Francielle Daiane de F. Lopes. **Evaluation of the pollicidal potential of the essential oil of *Curcuma zedoaria***. 2023. Dissertation (Master's in Chemistry). Institute of Chemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

Curcuma zedoaria, commonly known as zedoary, is a plant belonging to the Zingiberaceae family, native to India. It is currently cultivated in Brazil and in countries in South and Southwest Asia. In this study, the bioinsecticidal potential of the essential oil (EO) extracted from the rhizomes of *C. zedoaria* (Zingiberaceae) was evaluated. The EO was obtained by hydrodistillation (3h) and identified by GC/MS. The yield was 0.15%, and the three main chemical constituents found were 1,8-cineole (24.11%), camphor (12.13%), and curzerenone (9.68%). In the bioassays conducted for the reproductive stages of the flea *C. felis felis*, using the filter paper impregnation method, with final concentrations of *C. zedoaria* EO ranging from 10 to 1000 $\mu\text{g.cm}^{-2}$. The results showed that adult fleas exhibited 100% mortality starting from the concentration of 800 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ at 24 h and 48 h, differing from the pupal stages with 94.23% mortality at the concentration of 396 $\mu\text{g.cm}^{-2}$, larvae with 100% mortality at the concentration of 117.5 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ at 24 h and 48 h, and eggs with 98% mortality at the concentration of 396 $\mu\text{g.cm}^{-2}$. Regarding the inhibitory action of *C. zedoaria* EO on the acetylcholinesterase enzyme, as verified through the modified Ellman method, it was observed that the activity observed, using the EO, when compared to the control, demonstrated low inhibition, as the oil inhibited approximately 20% of the enzymatic activity, even at its highest concentration. In toxicity assays using the yeast *S. cerevisiae* as a research model, it was observed that *C. zedoaria* EO exhibited high toxicity, as the assay resulted in mitochondrial damage, thus impairing cellular development. Further studies are required, as despite showing bioinsecticidal potential against different developmental stages of the flea *C. felis felis*, the EO proved to be toxic in the assays conducted with the yeast *S. cerevisiae*.

Keywords: Essential oil; *C. zedoaria*; ectoparasites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas químicas dos componentes dos óleos essenciais identificados em espécies da família Zingiberacea.....	6
Figura 2: <i>Curcuma zedoaria</i> e seus rizomas	8
Figura 3: Estrutura química da curcumina.	8
Figura 4: Estruturas químicas dos principais compostos sesquiterpenos e monoterpenos encontrados nos óleos essenciais de <i>Curcuma zedoaria</i>	9
Figura 5: Esquema da relação dos metabolitos primários com a biossíntese dos metabólitos secundários	11
Figura 6: Representação esquemática de um sistema de cromatografia a gás	13
Figura 7: Cromatógrafo a gás e espectrômetro de massas do tipo quadrupolo.....	15
Figura 8: Representação da pulga <i>Ctenocephalides felis felis</i>	16
Figura 9: Ciclo biológico da pulga.	17
Figura 10: Leveduras de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
Figura 11: Placa de ensaio da AchE.	27
Figura 12: Cromatograma de íons totais do óleo essencial de <i>Curcuma zedoaria</i>	31
Figura 13: Estruturas químicas dos três principais componentes identificados no óleo essencial de <i>Curcuma zedoaria</i> , por Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classes farmacológicas de parasitocidas com seus respectivos mecanismos de ação.....	19
Tabela 2: Ensaio de AChE (esquema de pipetagem µL)	26
Tabela 3: Esquema de poços do ensaio de AChE	27
Tabela 4: Composição química do óleo essencial de <i>Curcuma zedoaria</i>	31
Tabela 5: Mortalidade dos ovos, larvas, pupas e adultos de <i>Ctenocephalides felis felis</i> (teste <i>Screening</i>).....	38
Tabela 6: Ensaio definitivo para a determinação da mortalidade das pulgas em suas diferentes fases de vida.....	39
Tabela 7: Mortalidade eficaz no ciclo de vida da pulga com óleo essencial de <i>Curcuma zedoria</i>	40
Tabela 8: Concentração letal 50 e 90 do OE de <i>Curcuma zedoaria</i>	41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Avaliação da toxidez do OE de <i>Curcuma zedoaria</i> em meio YPD	35
Gráfico 2: Avaliação da toxidez do OE de <i>Curcuma zedoaria</i> em meio YPDGLY na viabilidade celular e danos na ativação mitocondrial.....	36
Gráfico 3: Atividade da acetilcolinesterase em diferentes concentrações da enzima	44
Gráfico 4: Efeito do óleo essencial de <i>Curcuma zedoaria</i> sobre a atividade de acetilcolinesterase.....	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	4
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1	Família Zingiberaceae.....	6
2.2	Gênero <i>Curcuma</i>	7
2.3	<i>Curcuma zedoaria</i>	7
2.4	Óleos essenciais.....	9
2.4.1	Composição dos óleos essenciais.....	10
2.4.2	Métodos de extração de óleos essenciais.....	12
2.4.3	Análise de óleos essenciais.....	13
2.4.4	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.....	14
2.5	<i>Ctenocephalides felis felis</i>	15
2.5.1	Medidas de controle de ectoparasitas.....	18
2.5.2	Controle mecânico.....	18
2.5.3	Controle químico.....	18
2.5.4	Classes químicas inibidoras da acetilcolinesterase.....	20
2.6	A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudo.....	21
2.7	Importância do uso de óleos essenciais como alternativa aos inseticidas.....	22
3	OBJETIVOS.....	24
3.1	Geral.....	24
3.2	Específicos.....	24
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1	Material vegetal.....	25
4.2	Extração do óleo essencial de <i>Curcuma zedoaria</i>	25
4.3	Análise da composição do óleo essencial de <i>Curcuma zedoaria</i> por CG/DIC e CG/EM.....	25
4.4	Atividade anticolinesterásica do óleo essencial.....	26
4.5	Atividade <i>in vitro</i> do óleo essencial contra <i>Ctenocephalides felis felis</i> em todas as fases do ciclo de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulta.....	27
4.5.1	Teste de mortalidade.....	27
4.5.2	Mortalidade no ciclo evolutivo da pulga (Teste de <i>Screening</i>).....	27

4.5.3	Mortalidade no ciclo evolutivo da pulga (Teste definitivo).....	28
4.5.4	Avaliação da atividade adulticida <i>in vitro</i> do óleo essencial contra <i>Ctenocephalides felis felis</i>	28
4.5.5	Avaliação da atividade ovicida, larvicida e pupicida <i>in vitro</i> do óleo essencial contra <i>Ctenocephalides felis felis</i>	28
4.6	Avaliação da toxicidade do OE de <i>Curcuma zedoaria</i> em modelo eucarioto de <i>Saccharomyces cerevisiae in vitro</i>	29
4.6.1	Meios de cultura.....	29
4.6.2	Preparação de repique e inóculo.....	29
4.6.3	Ensaio de Toxidez.....	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	Componentes e caracterização química do óleo essencial de <i>Curcuma zedoaria</i> ..	31
5.2	Avaliação da toxidez do OE de <i>Curcuma zedoaria</i>	34
5.3	Mortalidade contra as pulgas <i>Ctenocephalides felis felis</i> em diferentes estágios do ciclo de vida.....	38
5.4	Avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase.....	44
6	CONCLUSÕES	47
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais sempre estiveram presentes na história da humanidade, sendo utilizadas das mais variadas formas. Com o avanço tecnológico houve uma necessidade de compreender e explicar o mecanismo de ação dessas plantas no organismo humano, o que resultou em vários estudos e experimentos para comprovação científica do uso das substâncias oriundas dessas plantas.

De acordo com Nicoletti (2002), o uso de ervas medicinais sempre foi valorizado na cultura popular, sendo constante fonte de investigações científicas, porque, na maioria das vezes, há confirmação do efeito terapêutico a elas atribuído, através dos resultados obtidos nos estudos desenvolvidos, com o emprego de drogas de origem vegetal.

Dentre essas plantas podemos destacar a *Curcuma zedoaria* pertencente à família Zingiberaceae, com rizomas que apresentam grande quantidade de óleos essenciais. Originária da Índia e, popularmente, conhecida como zedoária (ALMEIDA, 2012), atualmente, é cultivada no Brasil e em países do sul e sudoeste da Ásia. Consumida como tempero, agente aromatizante, tônico, no tratamento para distúrbios menstruais, vômitos, dor de dente e como aromatizante em perfume (SRIVASTAVA et al., 2013). Os rizomas desta planta também são popularmente conhecidos por serem utilizados no tratamento da estomatite, como estimulante, anti-flatulento, diurético, antidiarreico, antiemético, antipirético, purgativo e para limpar e curar úlceras, feridas e outros tipos de doenças da pele (MATSUDA et al., 2001).

Morikawa et al., (2002) cita a utilização da *C. zedoaria* no tratamento de diferentes distúrbios, incluindo câncer cervical, hepatite, inflamações, processos dolorosos, entre outros. Alguns componentes do óleo essencial extraídos do gênero *Curcuma* são: farnesol, β -elemeno, curzerenona, 1,8-cineol, cânfora, curcumenol e curcumenona (YANG et al., 2011).

Além das inúmeras atividades biológicas associadas ao óleo essencial (OE) obtido do rizoma de *C. zedoaria*, estudos mostram que o OE possui uma boa ação inseticida contra ectoparasitas (SINGH et al., 2002).

Considerando o Brasil como o país com a segunda maior população de cães e gatos em todo o mundo, além de ocupar a terceira posição em número total de animais de estimação, o país abriga um total impressionante de 139,3 milhões de pets (ABINPET, 2023).

Nesse contexto, estando os mesmos em condições de infestação por ectoparasitas podem transmitir doenças ao ser humano. Infestações por *C. felis felis* (pulgas) são comuns e podem provocar desconfortos e reações alérgicas em humanos, bem como a transmissão de zoonoses. Dessa forma faz-se necessário um crescente esforço em diminuir essa transmissão, através do controle e eliminação destes ectoparasitas (BEVILACQUA, et al., 2015).

Embora os produtos químicos sejam os mais utilizados e sendo assim essenciais para o controle dos ectoparasitas, estes podem apresentar-se prejudiciais ao meio ambiente, aos animais em geral e ao ser humano. Além disso, os ectoparasitas estão se tornando resistentes a determinados inseticidas e esse fator, muitas vezes, está diretamente ligado ao uso indiscriminado dos produtos ou ao seu alto grau residual, podendo prejudicar o meio ambiente, água, ar e solo (SOUZA, 2013; CASTRO, et al., 2021).

Com isso, percebe-se uma crescente preocupação e interesse em utilizar produtos alternativos com menor impacto ao meio ambiente, às pessoas e a fauna (ZANANI, et al., 2022).

Nessa perspectiva, o uso de OE vem mostrando-se como uma alternativa promissora de bioinseticida, considerado ecologicamente correto devido à alta biodegradabilidade, fácil obtenção e segurança ambiental em comparação aos agentes químicos (BAPTISTA et al., 2021).

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi caracterizar quimicamente o OE de *C. zedoaria*, avaliar o potencial inseticida contra o ectoparasita *C. felis felis*, estabelecer a dose tóxica em modelos eucariotos de *Saccharomyces cerevisiae* e investigar a ação anticolinesterásica do OE, visando propor um mecanismo de ação envolvido.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Família Zingiberaceae

A ordem Zingiberales é constituída por cerca de 2.000 espécies de plantas herbáceas e rizomatosas, distribuídas em oito famílias. Zingiberaceae é a família mais representativa dentro da ordem, apresentando 57 gêneros e mais de 1.947 espécies (JUDD et al., 2009; SOUZA & LORENZI, 2012). Apresenta ampla distribuição em áreas tropicais e semitropicais de todo o mundo, sendo que o maior centro de dispersão se encontra na Ásia Tropical (PAMPLONA, 2006). Representada por plantas herbáceas perenes, aromáticas, geralmente com rizomas dos quais nascem caules aéreos, que transportam folhas com larga bainha na base e que envolve o caule (VIMALA; NORHANOM; YADAV, 1999; SCHIMIDT, 2000).

O valor econômico, cultural e histórico das plantas dessa família é resultante da sua utilização na medicina tradicional chinesa e no período das grandes navegações com a difusão das especiarias (ex: gengibre, cúrcuma). O gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), uma especiaria nativa das ilhas do Pacífico, é utilizado há mais de dois mil anos como condimento na Ásia. Além disso, suas propriedades medicinais têm sido valorizadas em tradições terapêuticas como a medicina Chinesa e Ayurvédica (LIU, et al., 2019). O açafrão (*Curcuma longa* L.) é valorizado na culinária e na medicina popular. Na medicina popular, suas propriedades medicinais têm sido amplamente reconhecidas e utilizadas para diversos fins de saúde (MARCHI, et al., 2016).

Pesquisas com os OEs das espécies dessa família demonstram similaridade em sua composição química, como por exemplo, 1,8-cineol, cânfora, α -pineno, canfeno e zingibereno (JARIKASEM, et al., 2005; ANGEL, 2014) (**Figura 1**).

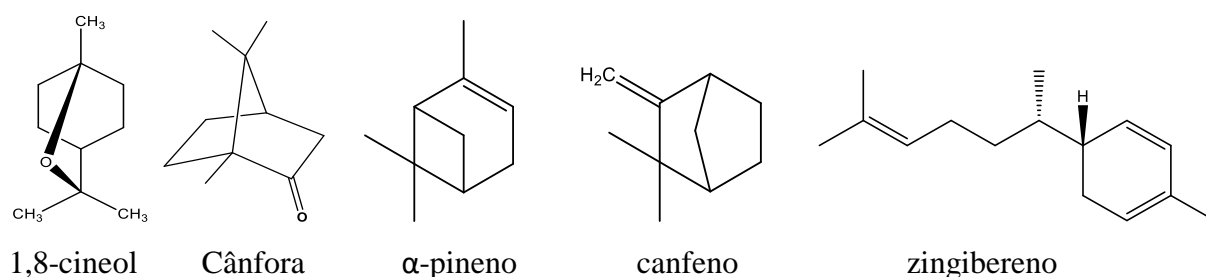


Figura 1: Estruturas químicas dos componentes dos óleos essenciais identificados em espécies da família Zingiberaceae.

2.2 Gênero *Curcuma*

O gênero *Curcuma* pertence à família Zingiberaceae e possui mais de 160 espécies. Sendo um gênero endêmico das regiões do Sudeste Asiático, onde são cultivadas suas espécies e utilizada terapeuticamente pela população (KANASE & KHAN, 2018).

O gênero *Curcuma* é amplamente distribuído na Ásia Tropical da Índia, Sul da China, Sudeste da Ásia, Papua Nova Guiné, Norte da Austrália e Tailândia, que parecem ser as áreas mais ricas neste gênero (FARIA JÚNIOR, 2019).

As plantas, deste gênero, são grandes herbáceas aromáticas, possuindo folhas grandes oblongo-lanceoladas e oblíquo-nervadas, o limbo se reúne na base formando um pseudocaule. Possuem flores dispostas em espiga contendo brácteas côncavas e tubérculos taxonomicamente denominados rizomas. O rizoma principal ou central é arredondado, com ramificações laterais compridas e tuberizadas (CECÍLIO FILHO et al., 2004; MANS, et al., 2019).

O fato dos rizomas deste gênero serem utilizados de forma popular (infusões, temperos, extratos) e tradicionalmente em diversas patologias despertou o interesse para sua investigação, sendo que alguns autores relacionam parte da sua atividade à presença de óleos essenciais em sua composição (MATA et al., 2004; ALMEIDA, 2012; XIANG, et al., 2018). Com a comprovação da eficiência da utilização do rizoma do gênero *Curcuma* no tratamento de várias doenças e distúrbios fisiológicos, inúmeros trabalhos têm sido desenvolvidos, no sentido de identificar os constituintes químicos, bem como, relacioná-los à sua ação terapêutica (PAMPLONA, 2006).

Tal cenário justifica a escolha da espécie *C. zedoaria* como possível fonte de OE e a avaliação de suas propriedades biológicas, considerando a sua importância e suas diversas aplicabilidades, nos campos da saúde, controle de insetos e outros microorganismos.

2.3 *Curcuma zedoaria*

Curcuma zedoaria (**Figura 2**) conhecida, popularmente como zedoária, falso açafão ou “gajitsu”. Sendo utilizada desde a Idade Média como condimento, aromatizante e para fins terapêuticos (SCHULZ et al., 2002; LI et al., 2011). Apesar de ser uma espécie nativa do Ceilão, Indonésia, China e Índia, onde são cultivadas e usadas terapeuticamente, no Brasil esta planta adaptou-se as condições naturais e climáticas dos Estados de São Paulo e Paraná. (NAVARRO, 2004; PAMPLONA, 2006).



Figura 2: *Curcuma zedoaria* e seus rizomas
Fonte: Anand & Bhuktar (2019).

O rizoma principal de *C. zedoaria* apresenta forma piriforme ou arredondado, carnudo, com ramificações secundárias laterais compridas. A planta é acaule e de seu rizoma partem de 4 até 5 folhas longamente pecioladas, internas lanceoladas, lisas, de cor-verde pálida, marcadas por sulcos oblíquos na face inferior, de 25 a 50 cm de comprimento e de 12 a 16 cm de largura, formando na parte inferior, pela justaposição, uma espécie de estirpe. As flores são brancas-amareladas e acham-se em uma longa espiga central verde envolvida pela bainha das folhas. Dos rizomas laterais podem nascer outras tantas plantas independentes que podem viver isolada da planta originária. (KATO & FISHER, 1996).

Srivastava et al. (2011) relataram que os compostos ativos isolados do extrato etanólico dos rizomas de *C. zedoaria*, como curcumina (**Figura 3**), podem ser efetivamente usados como antioxidantes e antiinflamatórios.

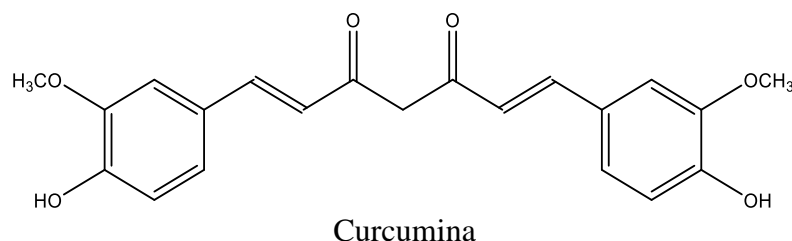


Figura 3: Estrutura química da curcumina
Fonte: Monton et al.,(2016).

Já em relação ao OE extraídos dos rizomas foram observadas variações nos constituintes químicos, que podem ser atribuídas aos fatores ambientais que alteram a composição da substância, como temperatura, precipitação, umidade, localização do vegetal, entre outros.

Porém, de modo geral, foram encontrados sesquiterpenos no rizoma de *C. zedoaria*, no qual furanodieno, curdiona e curzerenona (**Figura 4**) foram os mais citados. Além dos sesquiterpenos, também foram identificados dos OE monoterpênicos como: 1,8-cineol, limoneno e a cânfora (**Figura 4**). (MAU et al., 2003; LOBO et al., 2008; DOSOKY et al., 2019; JENA et al., 2020).

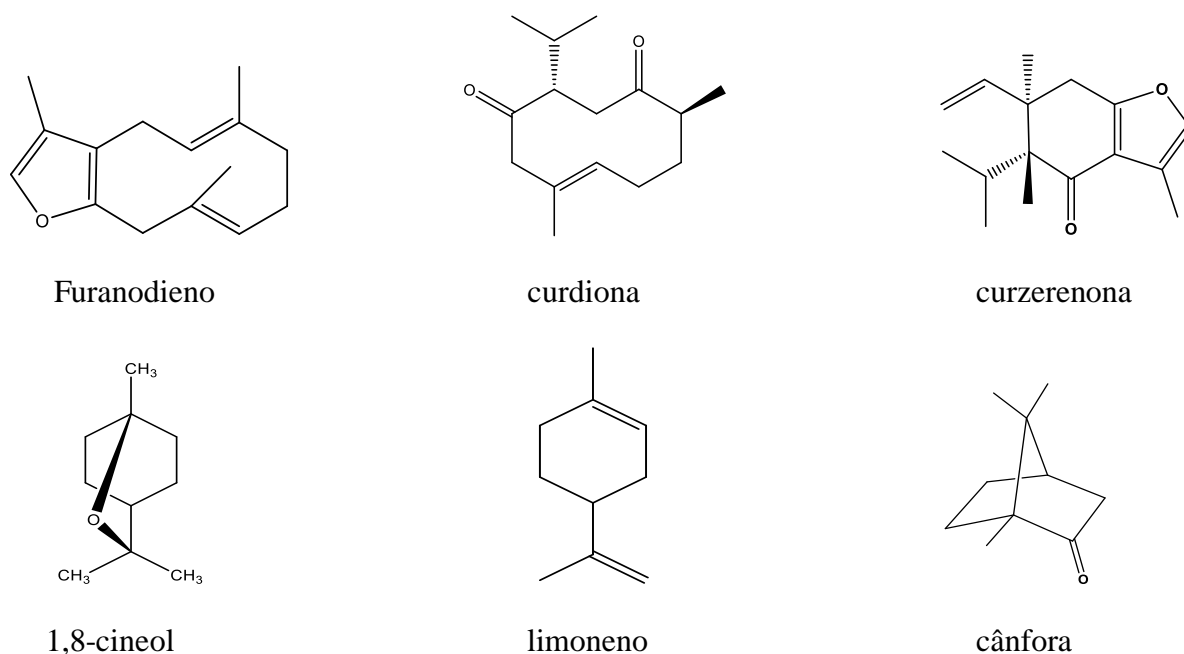


Figura 4: Estruturas químicas dos principais compostos sesquiterpenos e monoterpênicos encontrados nos óleos essenciais de *Curcuma zedoaria*

2.4 Óleos essenciais

Os OEs são conhecidos e utilizados desde o início da história da humanidade com diversas funções, como oferecer sabor a comidas e bebidas; disfarçar odores desagradáveis, entre outras; demonstrando assim uma antiga tradição sociocultural e socioeconômica na utilização destes produtos (MACHADO & JUNIOR, 2011). Atualmente os OEs são conhecidos por suas aplicações etnomédicas, culinárias e cosmeceúticas (SHAKERI et al., 2014). Atribui-se aos OEs também efeitos farmacológicos como antivirais, inseticidas, antimicóticos, antiparasitários, antileishmania, antiinflamatórios, antioxidantes, citotóxicos e biocidas contra uma ampla gama de organismos, como bactérias, fungos, vírus e protozoários (SIVASOTHY et al., 2012).

Os OEs são considerados produtos aromáticos resultantes do metabolismo especial das plantas, produzidos e armazenados nos órgãos secretores desses vegetais. Essas estruturas

secretoras podem ser externas, tricomas secretores e osmóforos, ou internas, canais e bolsas, podendo ser encontradas em várias partes destas plantas, nomeadamente, folhas, frutos, flores, gomos, sementes, ramos, cascas, raízes e caules, podendo a sua composição variar consoante a sua localização (CHRISTAKI et al., 2012; CUNHA et al., 2012). Os chamados OEs também são denominados popularmente de compostos aromáticos ou ainda de óleos voláteis. Seus componentes predominantes são metabólitos secundários da classe dos terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos) e fenilpropanoides, que conferem as características organolépticas a esses compostos e que obrigatoriamente são extraídas mediante técnicas específicas que não altere sua composição química (BRESSANIN, et al., 2017). Frequentemente há variações na quantidade e composição dos OEs, tanto em nível genético e fisiológico, como também devido a fatores externos, como condições de cultivo, colheita, condições pós-colheita, fatores ambientais, entre outros (DE ALMEIDA, et al., 2020).

2.4.1 Composição dos óleos essenciais

Quimicamente a constituição dos óleos essenciais varia desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e compostos com enxofre. No OE, tais compostos estão presentes em diferentes concentrações, normalmente variando de acordo com as características de cada planta (SIMÕES & SPITZER, 2003).

A formação dos compostos dos óleos essenciais se dá a partir da derivação química de terpenoides, originados a partir do ácido mevalônico, ou de fenilpropanoides, provindos do ácido chiquímico (SIMÕES et al., 2017).

Em geral, os terpenoides são os constituintes predominantes nos óleos essenciais, mas alguns óleos são também compostos de outros grupos químicos, tais como fenilpropanoides. Na realidade, devido a presença de uma grande variedade de compostos, pertencentes a diferentes classes químicas, quase todos os óleos essenciais são extremamente complexos em sua composição (GIRARD, 2005).

Podemos afirmar que uma grande diversidade de substâncias vegetais é constituída de terpenoides, os quais englobam todas as substâncias de origem biossintética derivadas de unidades do isopreno (SIMÕES & SPITZER, 2003).

Os terpenos são biossintetizados a partir de metabólitos primários por no mínimo duas rotas diferentes (**Figura 5**): a rota do ácido mevalônico, onde três moléculas de acetil-CoA são ligadas, a partir de uma série de etapas da rota, para formar esse ácido e posteriormente, o

IPP (isopentenil-pirofosfato) o qual originará terpenos maiores; e a rota do metileritritol fosfato (MEP), onde o gliceraldeído 3- fosfato e piruvato levam à formação do isopentenil-pirofosfato (IPP) (TAIZ & ZEIGER, 2017).

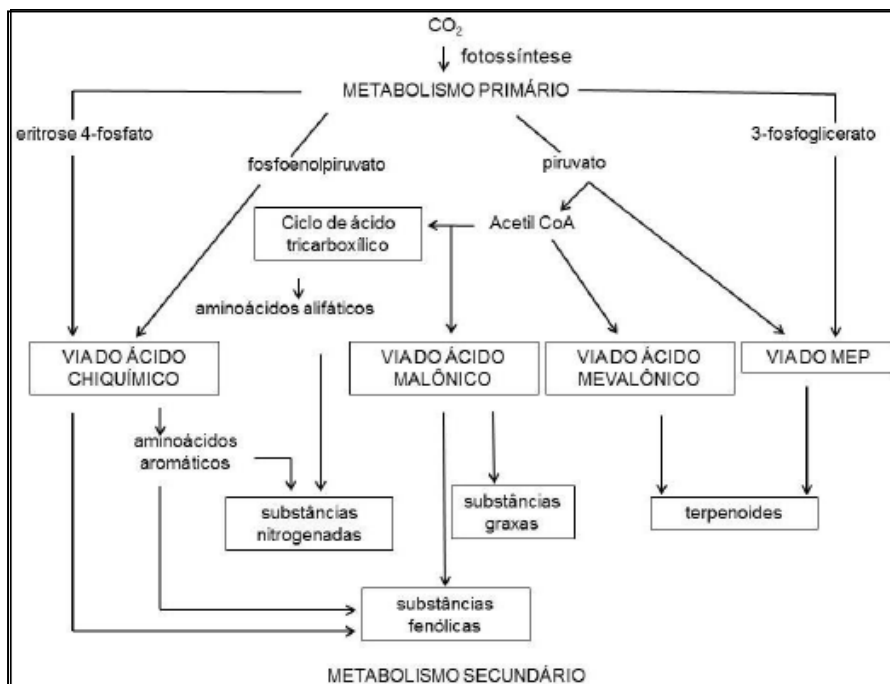


Figura 5: Esquema da relação dos metabólitos primários com a biossíntese dos metabólitos secundários. Fonte: Adaptado de Taiz & Zeiger (2017).

Nos óleos voláteis os compostos terpênicos encontrados com maior frequência são os monoterpenos (C10) (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos (C15). Já os diterpenos (C20) são encontrados apenas em OEs extraídos com solventes orgânicos devido à alta temperatura de volatilização desses compostos (SIMÕES, 2017).

2.4.2 Métodos de extração de Óleos Essenciais

Como relatado acima os OEs são constituídos de uma mistura complexa de substâncias, muitas delas facilmente termodegradáveis. Dessa forma, aspectos como qualidade e composição dos óleos essenciais são muito influenciados pela metodologia de extração utilizada (SIMÕES et al., 2007).

Existem vários métodos de extração e esses variam de acordo com a localização do óleo na planta e com a proposta de utilização do mesmo. Dentre os métodos utilizados para

extração dos óleos essenciais podemos citar: extração com solventes orgânicos; prensagem a frio; extração com CO₂ supercrítico e arraste direto por vapor d'água (NEVES, 2011).

A destilação por vapor d'água é sem dúvida o método mais utilizado para a extração de óleos essenciais de plantas. Pode ser utilizado para extração de óleos de diversos vegetais, tais como: folhas, raízes, ramos, gramíneas, sementes e um pequeno grupo de flores (AZAMBUJA, 2018).

Na sua forma mais simples destilação é definida como "evaporação e subsequente condensação de um líquido." Isto ocorre, devido aos movimentos moleculares induzidos termicamente dentro do líquido, resultando na ejeção de algumas das moléculas para a superfície do mesmo. O fluxo de vapor age como o transportador dessas moléculas. A liberação do óleo essencial presente em uma planta é devido à ruptura da parede celular, causado pelo aumento da pressão induzida pelo calor (BASER & BUCHBAUER, 2010).

Existem três tipos de extração via destilação por vapor d'água, cuja distinção é feita pela forma como se estabelece o contato entre a amostra e a água (líquida ou vapor). A primeira é chamada de hidrodestilação, nessa a amostra fica imersa na água contida em um recipiente; a segunda ocorre pela ação do vapor da água colocada em ebulição e separada da amostra por uma tela; e a terceira por injeção direta de vapor no material acondicionado em cesto metálico (WILLIAMS, 1996). Dentre esses métodos o mais simples e mais economicamente viável é a hidrodestilação, no qual o material vegetal absorve a água, durante o processo de ebulição, e o óleo contido nas células difunde-se através da parede celular por meio de osmose. Posteriormente, esse é vaporizado e levado pela corrente de vapor. (BASER & BUCHBAUER, 2010).

2.4.3 Análise de Óleos Essenciais

A cromatografia a gás é uma técnica analítica usada para separar e analisar compostos voláteis e semivoláteis em uma mistura, ocupando um lugar de destaque, devido a sua versatilidade para efetuar a separação e quantificação de espécies químicas. Sua constituição se dá de uma fase móvel e outra estacionária. A fase móvel é utilizada para transportar a amostra sobre a fase estacionária, de modo que devido às diferentes propriedades dos componentes da mistura elas são separadas (MONTAGNER, et al., 2021).

Na fase móvel a amostra é vaporizada e introduzida em um fluxo de um gás adequado ou gás de arraste – específico para cada detector. Este fluxo de gás com a amostra vaporizada

passa por um tubo contendo a fase estacionária FE (coluna cromatográfica), onde ocorre a separação da mistura (**Figura 6**). A FE pode ser um sólido adsorvente (Cromatografia Gás-Sólido) ou, mais comumente, um filme de um líquido pouco volátil, suportado sobre um sólido inerte (Cromatografia Gás-Líquido com Coluna Empacotada ou Recheada) ou sobre a própria parede do tubo (Cromatografia Gasosa de Alta Resolução) (SKOOG, et al., 2014; MONTAGNER, et al., 2021).

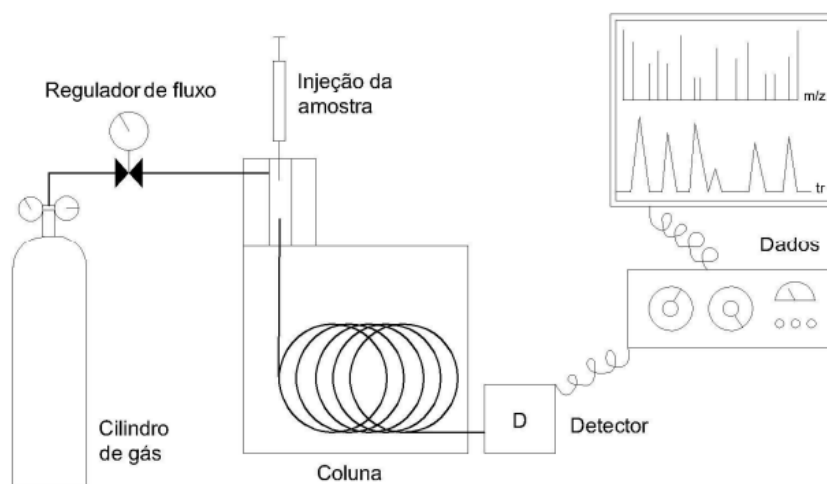


Figura 6: Representação esquemática de um sistema de cromatografia a gás
Fonte: Montagner (2021).

A utilização da cromatografia abrange muitas áreas do conhecimento, e suas funcionalidades são incontáveis. Os trabalhos envolvendo essas técnicas vêm aumentando com o passar do tempo, o que torna difícil acompanhar sua evolução nas diferentes áreas (CROMA, 2016).

Comparando com os demais tipos de cromatografia, a CG possui excelente poder de separação ou resolução de constituintes de uma mistura, possibilitando a análise de dezenas de substâncias presentes na amostra, além disso, apresenta-se como um método simples, sensível e efetivo para separar os componentes das misturas, por essas razões é considerada uma das ferramentas mais importantes em química (LINDE, 2006).

Além disso, é amplamente usada para análises quantitativas e qualitativas de espécies químicas e para determinar constantes termoquímicas tais como calores de solução e vaporização, pressão de vapor e coeficientes de atividade. A cromatografia a gás é também usada para monitorar os processos industriais de forma automática: analisam-se as correntes

de gás periodicamente e realizam-se reações de forma manual ou automática para compensar variações não desejadas (LINDE, 2006).

Por ser uma técnica muito sensível de acordo com a quantidade de amostra utilizada na cromatografia gasosa, existe a possibilidade de utilizá-la como técnica preparativa, apenas na faixa de microgramas (10^{-6}) a miligramas (10^{-3}). Essa característica pode ser considerada um fator crítico e limita a utilização de outras técnicas (COLLINS et al., 2006; SKOOG, et al., 2014).

2.4.4 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

A caracterização química dos constituintes dos óleos essenciais é realizada frequentemente através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), a fim de identificar substâncias distintas dentro de uma amostra teste, já que estes resultam de uma mistura de vários componentes orgânicos voláteis complexos.

A associação entre a cromatografia gasosa e a espectrometria de massas (**Figura 7**) é relativamente simples, uma vez que as características de funcionamento do cromatógrafo a gás são suficientemente compatíveis com a necessidade de alto vácuo do espectrômetro de massas (ARDREY, 2003).

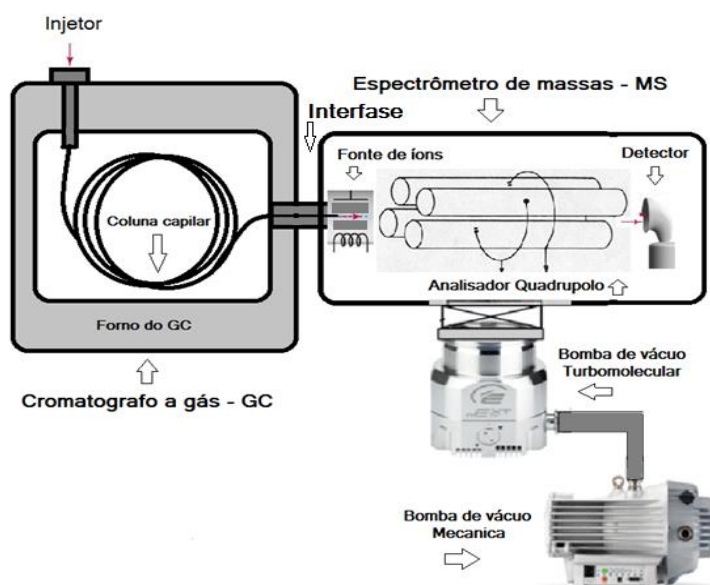


Figura 7: Cromatógrafo a gás e espectrômetro de massas do tipo quadrupolo
Fonte: Redígolo (2020).

Enquanto a cromatografia gasosa separa os componentes de uma mistura a espectroscopia de massa irá atuar na caracterização/identificação dos compostos, cujo princípio está fundamentado em medir a propriedade denominada relação massa e carga (m/z) de uma substância, a qual se fragmenta em outros íons moleculares característicos oriundos do composto precursor de interesse. Estes fragmentos iônicos também são separados em função de m/z . Como cada composto apresenta uma fragmentação própria, caracterizada pelos fragmentos formados e a abundância dos mesmos, isto acaba funcionando como uma impressão digital do composto analisado. Combinando essas duas técnicas é possível ter tanto uma análise qualitativa como quantitativa e avaliar uma solução contendo uma série de compostos químicos (MOLDOVEANU & DAVID, 2017).

Existem diversas aplicações para o uso da CG/EM, que vai desde análises ambientais, detecção de drogas, investigações e identificações de amostras desconhecidas, entre outros.

2.5 *Ctenocephalides felis felis*

Atualmente, os animais domésticos ocupam tantas e tão variadas funções na sociedade humana, sendo incalculáveis os benefícios dessa convivência para a melhoria das condições fisiológicas, sociais e emocionais principalmente de crianças e idosos (BARREIRA et al., 2023). Entretanto, por se apresentarem como uma importante fonte de infecção por ectoparasitas, bactérias, fungos e vírus (OLIVEIRA, et al., 2021), a manifestação de todos os benefícios dessa convivência pode ser prejudicada se a saúde desses animais não for objeto de prioridade. Segundo Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET, 2023), o Brasil tem a segunda maior população de cães e gatos de todo o mundo e é o terceiro maior país em população total de animais de estimação. Considerando os ectoparasitas, como um dos responsáveis pela transmissão de agentes patogênicos para seus hospedeiros e à população humana, faz-se necessário um crescente esforço em diminuir essa transmissão, através do controle e eliminação destes ectoparasitas (BEVILACQUA, et al., 2015).

As pulgas são insetos ápteros, holometabólicos, de coloração castanha, de corpo comprimido lateralmente e que medem de 1 a 8 milímetros. Com quase 3000 espécies descritas, a subespécie vulgarmente conhecida como pulga do gato, *Ctenocephalides felis felis*, (**Figura 8**) é a de maior prevalência em cães e gatos e amplamente distribuída em todo o mundo (CARLOTTI & JACOBS, 2000; RUST, 2005).



Figura 8: Representação da pulga *Ctenocephalides felis felis*

Fonte: ROCHE (2022).

Uma das suas principais características é a presença de peças bucais perfurantes, o que permite a perfuração da pele do hospedeiro para a alimentação. São conhecidas pela habilidade de realizar grandes saltos, que são resultado tanto da adaptação de seu último par de pernas como também da presença de resilina, que é uma proteína elástica que auxilia no salto (SUTTON & BURROWS, 2011).

Dentre as doenças causadas em animais domésticos pelas pulgas *C. felis felis*, popularmente conhecida como “pulga do gato”, estão a dermatite alérgica, devido às picadas de pulga (DAPP) (RUST, 2005), além de transmitirem agentes causadores de doenças como bactérias, filarídeos e cestóides (BLAGBURN & DRYDEN, 2009).

Adicionalmente, a ocorrência de populações não controladas de pulgas em cães e gatos pode ainda provocar prurido intenso, levando a automutilação e anemia (CARLOTTI & JACOBS, 2000). Em alguns indivíduos, a exposição às picadas de pulgas, eventualmente, leva a uma condição mais séria de dermatite alérgica, também conhecida como hipersensibilidade à picada de pulga (DAPP). Uma vez que tenha ocorrido a sensibilização, o recrudesimento das lesões pode ser desencadeado apenas por um pequeno número de picadas, embora a sensibilidade varie entre os indivíduos (CARLOTTI & JACOBS, 2000).

Quanto ao ciclo evolutivo, de maneira geral possui duração aproximada de 30 dias, (LINARDI & GUIMARÃES, 2000) podendo estender-se até 174 dias (DRYDEN, 1994), dependendo das condições de temperatura e umidade. Em seu ciclo biológico estão presentes quatro estágios: ovo, larva, pupa e adultos (**Figura 9**). Quando no hospedeiro uma pulga adulta se alimenta 5 minutos e de 24 a 36 h após a primeira alimentação iniciam a postura,

essas são capazes de ovipor de 40-50 ovos por dia (CADIERGUES et al., 2001; DRYDEN, 1989).

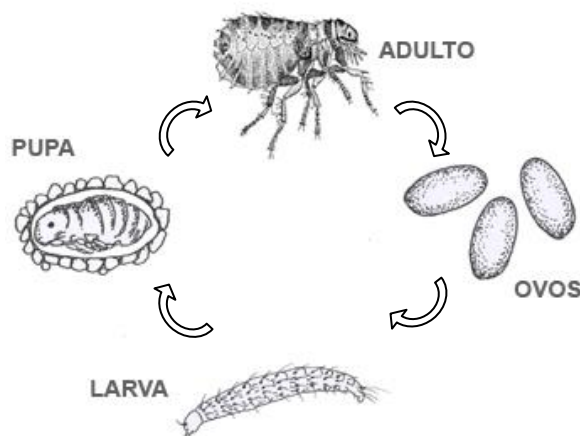


Figura 9: Ciclo biológico da pulga

Fonte: CDC (2017).

O ciclo biológico desses parasitos tem início a partir da presença de machos e fêmeas na pelagem do hospedeiro, a deposição dos ovos pode ocorrer no ambiente ou no próprio animal. Após os dez dias de maturação do ovo as larvas eclodem. (BOWMAN, 2010; MARCONDES, 2011), e se alimentam de resíduos orgânicos (LINARDI & GUIMARÃES, 2000).

Futuramente em condições ambientais favoráveis, momento a partir do qual, as larvas irão evoluir para mais dois estágios em um período médio de 15 dias, então ocorre transição para pupa, posteriormente para o estágio adulto em até 28 dias, podendo assim parasitar o hospedeiro (BOWMAN, 2010; MARCONDES, 2011).

2.5.1 Medidas de controle de ectoparasitas

As pulgas são ectoparasitas responsáveis pela transmissão de doenças, podendo causar grande impacto na população. Existem muitas maneiras de realizar prevenção e controle desses ectoparasitas, como, por exemplo, inseticidas pelo uso de shampoos, coleiras, “sprays”, “spot-nos” (líquidos de aplicação imediata sobre as pulgas), sabonetes, talcos, comprimidos, entre outros (RUST, 2005).

Os programas de controle possuem como fundamento a combinação de métodos mecânico/culturais (manejo das condições ambientais) e de métodos químicos (uso adequado de produtos seletivos) (FLORENCIO, 2013).

2.5.2 Controle mecânico

A primeira etapa para o controle mecânico de pulgas, segundo Linardi e Guimarães (2000) nos animais domésticos, como cães e gatos de pelo curto, é a higiene aliado à catação manual e à retirada mecânica das pulgas frequentemente. O controle mecânico deste parasito envolve muitos aspectos, inclusive o sociocultural. Este método visa principalmente alterar e/ou remover as condições que propiciam o desenvolvimento de populações de pulgas num ambiente interno e externo, onde os ovos, larvas e pupas residem – e dos animais, que abrigam a fase adulta do parasita (RUST, 2005).

Dentre as medidas a serem tomadas para o controle do ambiente externo, incluem-se o uso de aspirador de pó, a lavagem do piso e da cama do animal, o manejo adequado da vegetação e solo, e a restrição do contato do cão com outros animais, externos ao domicílio (MELO, 2006).

2.5.3 Controle químico

Até o início da Segunda Guerra Mundial, a seleção de inseticidas era muito limitada, porém com o advento da guerra que se conheceu as propriedades dos organoclorados, dos quais o DDT é o mais conhecido (SANTOS, 2002). No entanto, devido à persistência e biomagnificação destes pesticidas na cadeia alimentar, seu uso entrou em declínio e logo eles foram substituídos pelos inibidores da acetilcolinesterase (SHARMA, 2006). E assim, posteriormente, inúmeras novas formulações, com diferentes mecanismos de ação foram sintetizadas (**Tabela 1**).

Atualmente existem variados tipos de formulações e métodos de aplicação de inseticidas como: sabonetes, xampus, pós molháveis, concentrados emulsionáveis, talcos, “spray”, colares impregnados, “spot-on”, “strip-on”, “pour-on”, que são empregados no controle dos principais ectoparasitos de cães e gatos (SCOTT et al., 2002).

Tabela 1: Classes farmacológicas de parasitocidas com seus respectivos mecanismos de ação

CLASSE	EXEMPLO	MECANISMO DE AÇÃO
Organoclorados-1	DDT	“Vazamento” dos canais de sódio de neurônios
Organoclorados-2	Dieldrin	Bloqueio dos canais de cloreto GABA-érgicos
Organofosforados	Coumafós	Inibição da acetilcolinesterase
Carbamatos	Carbaryl	Inibição da acetilcolinesterase
Piretróides	Permetrim	“Vazamento” dos canais de sódio de neurônios
Formamidinas	Amitraz	Ligação a receptores de octopamina
Spinosinas	Spinosad	Agonista do receptor nicotínico colinérgico
Neonicotinoides	Imidacloprid	Agonista do receptor nicotínico colinérgico
Avermectinas	Ivermectina	Ativação de canais de cloreto
Fenilpirazóis	Fipronil	Bloqueio dos canais de cloreto GABA-érgicos
Isoxazolinás	Afoxolaner	Bloqueio dos canais de cloreto GABA-érgicos

Fonte: Adaptação de knolhoff & Onstad (2007).

Boa parte dos produtos químicos utilizados para controle de ectoparasitas de importância veterinária atua como neurotoxinas, seletivamente no sistema nervoso de artrópodes (COOP, 2002). Entretanto, o uso indiscriminado e de maneira incorreta desses produtos pode levar ao desenvolvimento de resistência dos ectoparasitas ao tratamento, levando preocupações quanto à segurança humana e ambiental. Como no caso dos carbamatos, organofosforados e organoclorados, por exemplo, que são produtos utilizados há mais tempo e que hoje sabe-se da resistência dos insetos contra eles (HALOS et al., 2014, COOP, 2002).

O uso descontrolado dessas novas medicações, além de provocar episódios de resistências, podem também gerar casos de tolerância, em que se percebe uma menor suscetibilidade dos insetos ao tratamento, que pode ser resultado da variabilidade genética dentro de uma população de pulgas por meio da seleção natural (BENELLI & PAVELA, 2018; COLES & DRYDEN, 2014; HALOS et al., 2014).

2.5.4 Classes químicas inibidoras da acetilcolinesterase

Acetilcolinesterase (AChE) (EC 3.1.1.7) é a enzima responsável por catalisar a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina levando a liberação de acetato e colina. A

acetilcolina é um dos mais importantes neurotransmissores nos insetos, e a inibição da AChE leva a um colapso sináptico generalizado que paralisa o inseto até a morte.

Sendo assim, a AChE é um alvo importante para o desenvolvimento de novos inseticidas. A AChE é uma serino hidrolase que apresenta variadas formas moleculares que podem ser divididas em formas assimétricas e formas globulares (MASSOULIÉ & BON, 1982). Nos insetos são encontradas apenas as formas globulares: monómeros, dímeros ou tetrâmeros. Estas são secretadas como formas solúveis ou ancoradas à membrana por um domínio hidrofóbico (KIM et al., 2010).

Classes químicas como os organofosforados e os carbamatos, atuam inibindo a ação da enzima acetilcolinesterase. Os carbamatos competem com a acetilcolina pelos sítios de ligação da acetilcolinesterase, causando uma constante estimulação nervosa, levando a morte do inseto por paralisia, porém o processo é reversível, já os organofosforados provocam uma inibição irreversível da acetilcolinesterase, embora tenham o mecanismo de ação similar aos dos carbamatos (MASON et al., 1984).

É importante frisar que as duas classes de compostos são as principais classes de pesticidas utilizadas em todo o mundo. Segundo Assis e colaboradores (2010) as duas classes juntas compartilham cerca de 50 % do mercado mundial de inseticidas / acaricidas. O amplo emprego desses compostos na agricultura no controle de insetos como os mosquitos vetores da dengue e da malária, deve-se à sua eficácia como inseticidas, assim também, como ao fato de que estes compostos possuem decomposição relativamente rápida após a sua aplicação, não se acumulando permanentemente na natureza, se comparado a outros inseticidas. Embora ofereçam menor risco para o meio ambiente, os inseticidas OF e CARB são altamente tóxicos para animais e humanos (SHADNIA, et al., 2005; LOPEZ, et al., 2013; YE, et al., 2013), já que a AChE de vertebrados são similares, em termos de estrutura e função, a dos insetos.

2.6 A levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo

Leveduras são microrganismos pertencentes, em grande parte, ao grupo dos ascomicetos. São fungos unicelulares, eucariontes, heterotróficos, imóveis e com parede celular bem definida e possui como característica importante uma grande heterogeneidade quanto ao tamanho celular, forma, cor e divisão celular, apresentando grandes diferenças mesmo em indivíduos da mesma linhagem. Essas mudanças são resultantes da sensibilidade destes fungos a mudanças nas condições ambientais (FERNANDES, 2009). A levedura *S. cerevisiae* (**Figura 10**) pertence à classe Saccharomycetes, à ordem Saccharomycetales, à

família Saccharomycetaceae e á subfamília Saccharomycetoidea, que abrange 26 gêneros. (KREGER-VAN, 1987; FERNANDES, 2009).



Figura 10: Leveduras de *Saccharomyces cerevisiae*
Fonte: Murtey e Ramasamy (2016).

A levedura *S. cerevisiae* é um microrganismo eucariótico unicelular de formato globular alongado, podendo haver a formação de pseudo-hifas que são resultantes do brotamento multilateral. A *S. cerevisiae* contém todas as principais organelas que também são comuns às células animais, como o núcleo, retículo endoplasmático, as mitocôndrias, aparelho de Golgi, vacúolo, citoesqueleto e se diferencia por apresentar parede celular constituída principalmente por glucano e mananoproteínas (MONTES, et al., 2016).

Apesar de ser mais complexo que bactérias, seu genoma é de fácil manipulação e esse microrganismo apresenta inúmeras vantagens técnicas que possibilitaram um rápido progresso na genética molecular. Algumas de suas vantagens são: o rápido crescimento, células dispersas, a facilidade de plaqueamento de réplicas e isolamento de mutantes, um sistema genético bem definido e um sistema de transformação altamente versátil (GIETZ & WOODA, 2002).

Por apresentar várias vantagens à levedura *S. cerevisiae* vem sendo usada há muito tempo como um modelo robusto para compreensão de diferentes processos celulares. Com a sequência completa do seu genoma, sua similaridade genética e bioquímica com os mamíferos mostrou-se de grande valia como referência para sequenciamento de genes humanos e de outros eucariotos superiores, passando a ser um modelo útil para melhor compreensão de

diferentes funções biológicas, em especial na biologia do câncer, estudos de genética toxicológica e doenças humanas (GOFFEAU, et al., 1996).

Além disso, linhagens de *S. cerevisiae* são usadas de forma frequente nas indústrias química, alimentícia, farmacêutica e na tecnologia ambiental, com fins de biorremediação, tratamento de resíduos e recuperação do solo (PENNACCHIA, et al., 2008; SCHNEIDER, et al., 2009; DEVER, et al., 2016).

2.7 Importâncias do uso de óleos essenciais como alternativa aos inseticidas

Embora os produtos químicos sejam essenciais para o controle dos ectoparasitas, eles podem apresentar-se prejudiciais ao meio ambiente e aos animais em geral, além dos riscos já citados, os ectoparasitas estão se tornando resistentes a determinados inseticidas e esse fator, muitas vezes, está diretamente ligado ao uso indiscriminado dos produtos ou ao seu alto grau residual, podendo prejudicar o meio ambiente, água, ar e solo (SOUZA, 2013; CASTRO, et al., 2021).

Com isso vêm crescendo a preocupação e interesse de utilizar produtos alternativos com menor impacto ao meio ambiente, as pessoas e a fauna, amenizando os riscos (ZANANI, et al., 2022). Assim, o uso de OE apresenta-se como uma alternativa por ser considerado ecologicamente correto devido a alta biodegradabilidade, fácil obtenção e segurança ambiental em comparação aos agentes sintéticos (FERNANDES & FAVERO, 2014).

Nesse contexto, o crescente interesse mundial por produtos derivados da biodiversidade (FUNARI & FERRO, 2005), cria oportunidades para o Brasil devido a sua ampla riqueza vegetal que concedeu ao país o ranking com a maior diversidade genética vegetal do mundo com 45.976 espécies diferentes catalogadas (REFLORA, 2020). Entre os principais ativos dos vegetais a serem isolados dos biomas brasileiro tendo em vista à aplicação econômica no controle de insetos-praga, destacam-se os OEs, que estão presentes nas chamadas plantas aromáticas (SOUZA, 2015).

Os OEs possuem naturalmente substâncias com um amplo espectro de atividade contra insetos, que variam de acordo com os seus constituintes químicos em ação inseticida, inibição da oviposição, regulação do crescimento, repelentes, entre outros (ISMAN, 2000). Muitos compostos químicos dos OEs interferem na atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável pelas conexões neurais e neuromusculares dos artrópodes (SILVA, et al., 2017). Essa inibição da ação da AChE resulta no acúmulo de acetilcolina na sinapse, causando hiperexcitabilidade dos nervos motores e consequentemente convulsão e paralisia nos insetos

(COLOVIC, et al., 2013; LIONETTO, et al., 2013; RAJASHEKAR, et al., 2014). Outros meios de ação dos OEs também abrangem alteração no sistema nervoso octopaminérgico dos insetos, ligando-se a seus receptores e aumentando o estado de excitação dos insetos, algo que não ocorre com mamíferos ou outros animais, sendo mais seguro para humanos e animais (JANKOWSKA et al., 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Caracterizar quimicamente o óleo essencial de *Curcuma zedoaria* e avaliar o potencial inseticida contra o ectoparasita *Ctenocephalides felis felis*, visando identificação de possível mecanismo de ação.

3.2 Específicos

Caracterizar quimicamente o óleo essencial por Cromatografia Gasosa acoplado ao detector de ionização de chamas e Espectrômetro de Massas (CG-DIC e CG-EM);

Determinar a ação pulicida do óleo essencial nas fases do ciclo reprodutivo das pulgas (ovo, larva, pupa e adulto);

Avaliar a ação anticolinesterásica do óleo essencial visando propor um mecanismo de ação envolvido;

Determinar a dose tóxica do óleo essencial em modelos de *Saccharomyces cerevisiae* avaliando o impacto do óleo essencial na sobrevivência das células e na funcionalidade mitocondrial.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Os rizomas frescos de *C. zedoaria* foram coletados no Sítio Estrela do Oriente (GPS 15°55'06.70 S; 57°26'18.70 W) localizado no bairro de Comunidade Santana/MT e enviados pelo pesquisador Dr. Jonas de Miranda (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso-Campus Cáceres). Uma exsicata foi preparada e a espécie foi depositada no Herbário do Instituto de Botânica (RBR-UFRRJ, Brasil), sob o número de registro RBR57757.

4.2 Extração do óleo essencial de *Curcuma zedoaria*

O óleo essencial (OE) dos rizomas da *C. zedoaria*, foi obtido por hidrodestilação em aparelho Clevenger por 3 h contínuas. Para tal, foram pesados 90 g do rizoma fresco cortado em pequenos pedaços. A amostra foi inserida em um balão de 2000 mL, seguido da adição de 1800 mL de água destilada; realizou-se a coleta do destilado por diferença de densidade e o OE foi seco com Na₂SO₄ anidro. Por fim, os óleos puros foram armazenados em frascos de vidro âmbar a -20 °C, para posterior análise em CG/DIC e CG/EM.

4.3 Análise da composição do óleo essencial de *Curcuma zedoaria* por CG/DIC e CG/EM

A análise da composição química foi realizada em um Cromatógrafo a gás 5890 Séries II (Agilent, USA), equipado com um detector de ionização de chama e injetor no modo “split” (1:20); as substâncias foram separadas em uma coluna capilar de sílica fundida similar a DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O gás hélio (He) foi utilizado como gás carreador com fluxo de 1 mL min⁻¹. A programação da temperatura do forno utilizada foi de 60 °C por 2 min com incremento de 5 °C min⁻¹ até 110 °C, seguido por incremento de 3 °C min⁻¹ até 150°C e, finalmente, seguido por incremento de 15 °C min⁻¹ até 290 °C, mantidos por 15 min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 220 e 290 °C, respectivamente. Um Cromatógrafo Gasoso acoplado ao espectrômetro de massas QP-2010 Plus (Shimadzu, JPN) foi utilizado para separar e analisar as substâncias presentes no óleo essencial da planta aromática. O fluxo de hélio, a coluna capilar e a programação de temperatura para a análise por CG-EM foram às mesmas descritas para a análise por CG-DIC. As temperaturas do injetor e de interface foram de 220 e 250 °C, respectivamente. Os espectros de massas foram obtidos com detector quadrupolo operando a 70 eV, com intervalo de massa entre 40 e 400 *m/z* e a razão de 0,5 *scans*⁻¹.

Os componentes foram identificados com base nos cálculos dos índices aritméticos IAx, correlacionando o tempo de retenção dos compostos com o tempo de retenção de uma série homóloga de *n*-alcanos (C7-C30). Sendo os resultados calculados e os modelos de fragmentação dos espectros de massas, comparados com dados da literatura (ADAMS, 2017) e no banco de dados do equipamento (Biblioteca NIST 2008).

4.4 Atividade anticolinesterásica do óleo essencial

A atividade anticolinesterásica e velocidade de reação catalítica foram determinadas pelo método modificado de Ellman (ELLMAN et al., 1961). Para determinação da inibição da enzima AChE, utilizou-se o ensaio quantitativo em microplaca (RHEE et al., 2001; TREVISAN et al., 2003), fazendo uso do leitor de microplaca de 96 poços DR-200B-NM, já a velocidade de reação foi calculada utilizando-se o programa de computador Microplate Manager (Bio-Rad).

Para o ensaio utilizou-se acetilcolina como substrato, a qual é hidrolisada pelas enzimas à tiocolina que reage com o reagente de Ellman (DTNB) produzindo 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina e 5-tio-2-nitrobenzoato.

A ordem em que cada reagente foi pipetado e adicionado aos poços da microplaca foi: solução tampão TRIS/HCl, pH 8, DMSO à 3%, óleo essencial (12 µL) diluído em DMSO 3%, enzima acetilcolinesterase (AChE) e o DTNB (0,012 g) solubilizado em 10 mL de solução tampão TRIS/HCl pH 8. Por último, foi pipetada a acetilcolina(ACh) (0,0868 g) solubilizada em 2 mL de água destilada (**Tabela 2**), dando início a reação. Após, 10 min foi realizada a leitura da placa no aparelho em comprimento de onda de 412 nm, obtendo-se os valores de absorvâncias em cada poço (**Tabela 3 e Figura 11**).

Tabela 2: Ensaio de AChE (esquema de pipetagem µL)

Reagentes	BC	C1(DMSO 3%)	C2	C3	C4
Tampão TRIS/HCl	40	30	30	30	30
DMSO 3%	-	10	-	-	-
OE	-	-	10	10	10
AChE	10	10	10	10	10
DTNB	125	125	125	125	125
ACh	25	25	25	25	25

BC: branco; C: controles.

Fonte: elaboração do autor

Tabela 3 : Esquema de poços do ensaio de AChE

	1	2	3	4	5
A	BC	C1	C2	C3	C4
B	BC	C1	C2	C3	C4
C	BC	C1	C2	C3	C4

Fonte: elaboração do autor

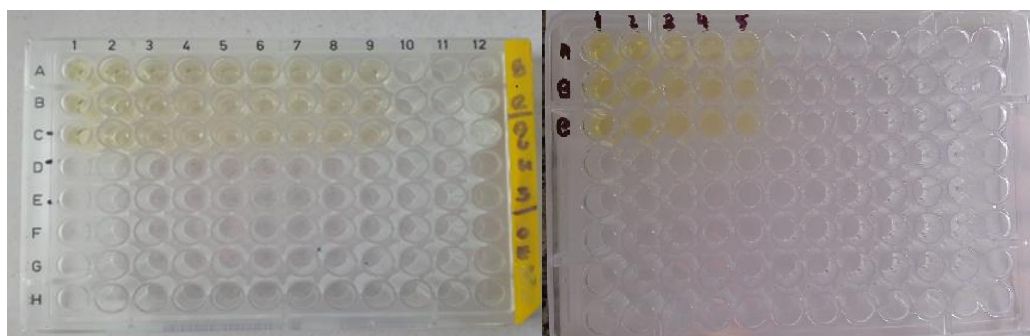


Figura 11: Placa de ensaio da AchE

Fonte: própria

4.5 Atividade *in vitro* do óleo essencial contra *C. felis felis* em todas as fases do ciclo de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulta

4.5.1 Teste de mortalidade

Os experimentos seguiram os padrões estabelecidos pelo Comitê de Ética para Uso Animal do Instituto de Veterinária (CEUA/IV nº 4313110419). As pulgas (adultas), foram obtidas de uma colônia de *C. felis felis* mantida desde 1998 no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

4.5.2 Mortalidade no ciclo evolutivo da pulga (Teste de *Screening*)

Para estabelecer a concentração em que o OE de *C. Zedoária* é capaz de provocar a morte das pulgas em seus diferentes estágios de ciclo de vida, primeiramente faz-se necessária a realização do *Screening* (triagem das concentrações), para que seja possível determinar as faixas de concentração em que OE foi eficaz, possibilitando assim a realização do teste definitivo e a determinação das concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀). Dessa forma o *Screening* do ensaio foi realizado em seis repetições de 10 soluções com concentrações variando de 1,56 µg. cm⁻² a 800 µg.cm⁻².

4.5.3 Mortalidade no ciclo evolutivo da pulga (Teste definitivo)

As análises foram realizadas pelo método de impregnação com papel filtro (LAMBERT et al., 2020). Para a realização dos bioensaios foram feitas diluições seriadas (1:2) a partir da amostra do OE de *C. zedoaria*, obtendo-se assim, 10 soluções com concentrações variando de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $50000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As diluições foram feitas utilizando-se acetona como diluente, já que esta possui a capacidade de solubilizar o OE. Após preparadas, homogeneizou-se as diluições em ultrassom Ultrasonique por aproximadamente 20 minutos.

Para o controle positivo foi utilizado o Fipronil a $400 \mu\text{g.cm}^{-2}$; preparado a partir de uma solução de Fipronil 1mg.mL^{-1} , diluído em acetonitrila. A realização do controle positivo foi feita para garantir a viabilidade da colônia. A impregnação das diluições foi realizada em duas replicatas, com tiras de papel filtro (10 cm^2) para pulgas adultas, e discos de papel filtro ($23,76 \text{ cm}^2$) para imaturos (ovos, larvas e pupas). As tiras foram impregnadas com $200 \mu\text{L}$ e os discos com $470 \mu\text{L}$ de suas respectivas diluições, de modo que as concentrações finais para o OE de *C. zedoaria* ficaram na faixa de 10 a $1000 \mu\text{g.cm}^{-2}$, a secagem de ambas procedeu-se em temperatura ambiente no intervalo de tempo de 1 h.

4.5.4 Avaliação da atividade aduítica *in vitro* do óleo essencial contra *Ctenocephalides felis felis*

Após impregnação e secagem, as tiras foram colocadas em tubos de ensaio contendo 10 adultos não alimentados de *C. felis felis*, que foram vedados com tecido não tecido (TNT) e elástico. Os tubos de ensaios foram acomodados em câmaras climatizadas a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ com umidade relativa de $75 \pm 10\%$, avaliando-se a motilidade das pulgas 24 e 48 h após as mesmas serem colocadas em contato com as fitas impregnadas. Contabilizaram-se as pulgas vivas com auxílio de um microscópio estereoscópico.

4.5.5 Avaliação da atividade ovicida, larvicida e pupicida *in vitro* do óleo essencial contra *Ctenocephalides felis felis*

Após impregnação e secagem, os discos secos (com aproximadamente 55 mm de diâmetro), foram inseridos em placas de petri (60 mm x 15 mm), juntamente com 10 larvas alimentadas, no terceiro instar de desenvolvimento, As placas de petri, já fechadas, foram alocadas em câmaras climatizadas a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ com umidade relativa de $75 \pm 10\%$. Avaliando-se a motilidade das larvas 24 e 48 h após as mesmas serem colocadas em contato com os discos impregnados.

Para avaliação de ovos e pupas, foram realizados os mesmos procedimentos diferenciando apenas o intervalo de tempo. Nos ovos avaliaram-se a eclodibilidade após 72 h, ou seja, ovos que eclodiram dando origem às larvas eram contabilizados como vivos, já em pupas quantificaram-se os adultos emergidos do pupário após incubação por 15 dias, com auxílio de um microscópio estereoscópico.

4.6 Avaliação da toxicidade do OE de *Curcuma zedoaria* em modelo eucarioto de *Saccharomyces cerevisiae* *in vitro*

4.6.1 Meios de cultura

Para a realização do experimento a cepa utilizada foi *Saccharomyces cerevisiae* (BY4741) que foi adquirida da companhia Euroscarf, localizada em Frankfurt, na Alemanha.

Neste trabalho foram utilizadas duas formulações de meios de cultivo: meio Yeast Peptone Dextrose (YPD) 2% líquido, composto de 1% de extrato de levedura (Difco/USA), 2% de peptona (Difco/USA) e 2% de glicose (Sigma); YPD 2% sólido, composto de 1% de extrato de levedura (Difco/USA), 2% de peptona (Difco/USA), 2% de glicose (Sigma) e 2% de ágar (Kasvi) para solidificar o meio. Os frascos erlenmeyer contendo meio YPD 2% líquido foram preparados obedecendo à proporção de 20% de volume do frasco/volume de meio de cultura líquido. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos. O meio sólido era vertido em placas estéreis em ambiente estéril proporcionado por uma cabine de fluxo laminar (com filtro HEPA, Marca Esco®).

4.6.2 Preparação de repique e inóculo

Os repiques, uma técnica laboratorial baseada na transferência de um microrganismo de um meio de cultura para outro com a finalidade de manter as células utilizadas nutridas e metabolicamente ativas, foram preparados através da transferência de alçada de cultura para superfície de ágar contendo YPD 2% sólido em um tubo *viale*. Este tubo era incubado a 28 °C por 24 h em estufa incubadora refrigerada (BOD, Marca SOLAB®).

Para o preparo do inóculo a fim de se trabalhar com as células na fase de crescimento respiratório (segunda fase de crescimento celular, com concentrações da suspensão celular acima de 2,8 mg/mL), uma massa de células do repique fresco foi transferida diretamente para o erlenmeyer contendo meio YPD líquido. O inóculo consiste em uma técnica laboratorial baseada na transferência de um microrganismo para um ambiente rico em nutrientes necessários para promover o crescimento celular, resultando em uma maior disponibilidade de

células para a realização dos experimentos.

O inóculo foi incubado a 28 °C por 22 h sob agitação de 160 rpm em incubadora tipo shaker (Incubadora orbital refrigerada, Marca NOVATECNICA®). Após o crescimento das células, a concentração das mesmas foi determinada através da medida da absorvância em espectrofotômetro (UV/Vis, Marca Biospectro®) a 570 nm.

4.6.3 Ensaio de Toxidez

Uma suspensão celular (3 mg.mL^{-1}) foi incubada com 0,6 mg/mL de OE de *C. zedoaria*, por 2 h a 28 °C e agitação a 160 rpm. Os ensaios foram realizados com um grupo controle que não foi exposto a nenhum agente, um grupo de células sob estresse oxidativo expostas ao peróxido de hidrogênio (1,0 mM), e por fim, um grupo de células incubadas com o OE. Após o tempo de incubação, alíquotas das suspensões celulares correspondentes a 40 µg de células foram diluídas em água destilada estéril, e em seguida plaqueadas no meio de cultura sólido YPD 2% e meio YPGLY 2% por espalhamento utilizando a alça de Drigalski flambada a cada contato com as suspensões celulares.

Os resultados são expressos em quantidade de colônias encontradas nas placas com meio de cultura. O meio YPGLY é onde avaliamos se há dano mitocondrial ou não, uma vez que, ao empregarmos este meio, compelimos a levedura a recorrer à mitocôndria para a sua sobrevivência.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Componentes e caracterização química do óleo essencial de *Curcuma zedoaria*

O óleo essencial dos rizomas de *C. zedoaria* apresenta coloração lilás, com rendimento de 0,15%. O valor de rendimento encontrado após a extração também aparece nos estudos conduzidos por Syamsir et al., (2017), o qual descrevem rendimentos variando de 0,14 a 0,13% para o óleo essencial de rizomas frescos de *C. zedoaria* provenientes da Malásia.

A identificação dos constituintes químicos do OE de *C. zedoaria* por CG-EM é apresentada na (Tabela 4 e Figura 12). Ao todo, 33 substâncias foram identificados nesse estudo.

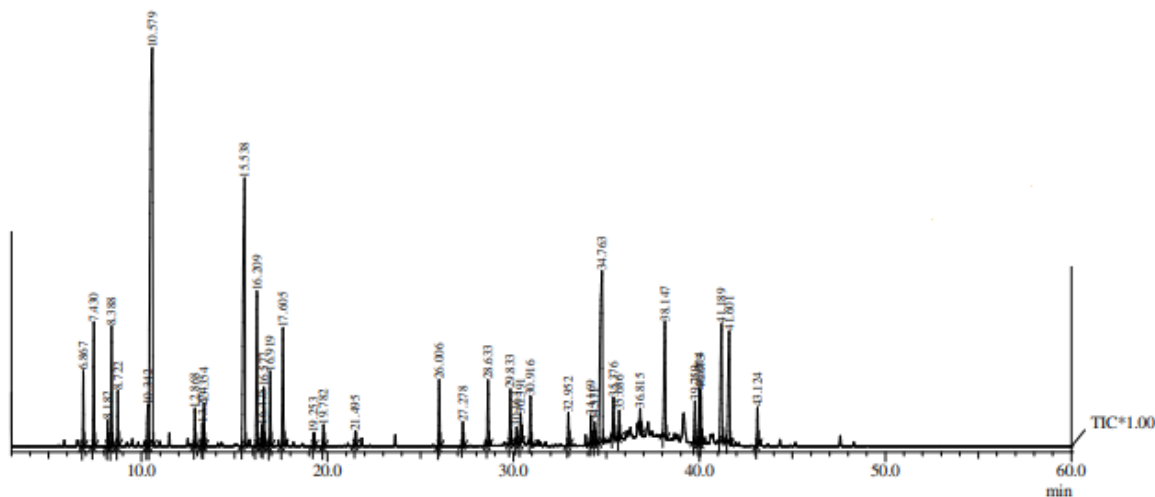


Figura 12: Cromatograma de íons totais do óleo essencial de *Curcuma zedoaria*

Tabela 4: Composição química do óleo essencial de *Curcuma zedoaria*

OEC	Compostos	I.R lit	% Área
Hidrocarbonetos monoterpênicos			
1	α-pineno	932	1,46
2	Canfeno	946	2,66
3	Sabineno	969	0,49
4	β-Pineno	974	2,65
5	Mirceno	988	1,08
6	Limoneno	1024	1,63
Monoterpenos oxigenados			
7	1,8 cineol	1026	24,11
8	2-nonanona	1087	0,77
9	Linalol	1095	0,92
10	Cânfora	1141	12,13
11	2-nonanol	1155	4,44
12	Isoborneol	1162	0,43
13	δ-terpineol	1165	1,42

14	Borneol	1174	1,84
15	Terpinen-4-ol	1186	3,26
16	α -terpineol	1226	0,26
17	Carvona	1239	0,49
18	Acetato de bornil	1284	0,29
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos			
19	β -elemeno	1389	1,66
20	β -Cariofileno	1417	0,54
21	(Z)- β -Farseno	1440	1,53
22	Trans-Muurola-3,5-dieno	1451	1,41
23	Aromadendrano dihidro	1460	0,34
24	Germacreno A	1508	1,19
25	Germacreno B	1559	0,8
Sesquiterpenos oxigenados			
26	Curzereno	1499	0,8
27	Curzerenona	1605	9,68
28	α -Murol	1644	0,7
29	α -Mudesmol	1652	0,55
30	Intermediol	1658	0,35
31	Germacrona	1693	4,26
32	Curcumenol	1733	1,23
33	Curcumen-12-ol-beta(Z)	1754	0,69
34	n.i	n.i	0,31
35	n.i	n.i	1,12
36	n.i	n.i	1,02
37	n.i	n.i	1,30
38	n.i	n.i	4,33
39	n.i	n.i	4,21
40	n.i	n.i	0,93
Hidrocarbonetos monoterpênicos			9,97
Monoterpenos oxigenados			50,81
Monoterpenos totais			60,78
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos			7,74
Sesquiterpenos oxigenados			18,26
Sesquiterpenos totais			26,00
Fenilpropanóides			-
N.I			13,22
Total			100,00

OEC: Ordem de eluição na coluna cromatográfica; I.R: Índice de retenção; N.I: Composto não identificado.

O Perfil cromatográfico do óleo essencial apresentou maior composição de monoterpênicos 60,78% em relação aos sesquiterpenos 26%. Perfil cromatográfico semelhante é apresentado nos estudos de Junior et al., (2020), que a partir da CG/EM identificaram 27 compostos, em sua maioria monoterpênicos oxigenados e sesquiterpenos.

Os constituintes majoritários encontrados foram o 1,8-cineol (24,11%), cânfora (12,13%) e a curzerenona (9,68%) (**Figura 13**).

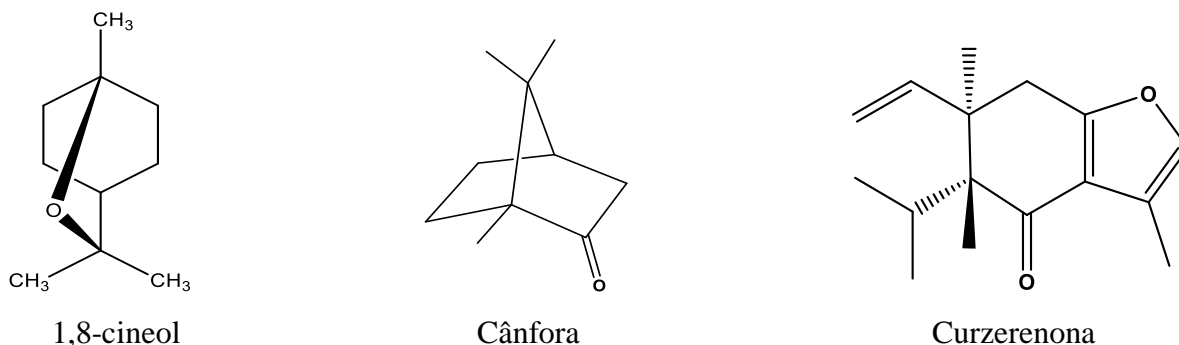


Figura 13: Estruturas químicas dos três principais componentes identificados no óleo essencial de *Curcuma zedoaria*, por Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

A composição química encontrada no experimento é compatível com os dados da literatura. Junior et al., (2020), avaliaram o óleo essencial dos rizomas de *C. zedoaria* obtidos em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil e os compostos majoritários encontrados foram: 1,8-cineol (43,49%), curzerenona (13,40%) e cânfora (12,29%).

Em concordância, nos estudos de Dosoky et al. (2019), realizados através do método de CG-EM, nos Estados Unidos, os principais componentes do óleo de rizoma de *C. zedoaria* foram: 1,8-cineol (7,0–38,4%), curzerenona/epi-curzerenona (20,9–29,4%), α -copaeno (17,4%) e cânfora (8,6–8,8%).

Faz-se necessário salientar que alguns estudos apresentam resultados diferentes tanto na composição como na porcentagem dos constituintes químicos majoritários, quando comparados à pesquisa realizada. Retnowati et al., (2014), obtiveram através do método CG-EM 20 compostos totais, sendo os majoritários a cânfora (49,51%), álcool isobornílico (12,66%), borneol (4,23%), furanodieno (3,61%) e furanodienona (3,49%). Já Angel et al., (2014), descreveram para o óleo essencial extraído dos rizomas fresco da *C. zedoaria* coletados na cidade Trichur, Kerala, Índia, através do método CG-EM os principais constituintes químicos epicurzerenona (19%), ar-curcumeno (12,1%), zingibereno (12%) e β -sesquifelandreno (9,8%).

Essas variações podem ser atribuídas a diferentes fatores, tanto intrínsecos como em nível genético e fisiológico, quanto extrínsecos como: método e época de cultivo e colheita, métodos e formas de extração, origem geográfica da planta, fatores ambientais, entre outros (DE ALMEIDA, et al., 2020).

Entre os vários componentes encontrados no OE de *C. zedoaria*, o composto 1,8-cineol, também denominado cineol, eucaliptol ou 1,8-epoxi-p-mentano, apresentou-se como o composto majoritário com 24,11%. O 1,8-cineol é um monoterpene, encontrado no óleo essencial de muitas plantas aromáticas, sendo considerado o composto majoritário presente em vários OEs de diferentes espécies (ANDRADE et al., 1994; ARAÚJO et al., 2003; TSCHIGGERL & BUCAR, 2010; KUMAR et al., 2012).

O 1,8 cineol mostrou-se em diferentes estudos um importante componente inseticida, apresentando toxicidade contra piolhos da cabeça humana, *Pediculus humanus capitis* (YANG, et al, 2004), larva de *Aedes aegypti* (BATISH et al., 2008) e pupa de *Musca domestica* (KUMAR, et al., 2012). Também notou-se ação repelente contra *Acanthoscelides obtectus*, além de reduzir a fertilidade, diminuir a eclosão de ovos, aumentar a mortalidade larval e prejudicar a emergência de adultos nessa espécie (PAPACHRISTOS; STAMOPOULOS, 2002) . Mas por outro lado mostra baixo efeito acaricida já que a taxa de mortalidade, foi de apenas 37,5%, em carrapatos adultos aos 6 dias após a imersão em solução a 5% (WALL, 2013).

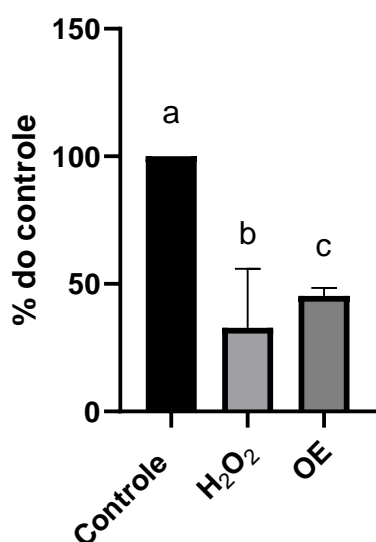
5.2 Avaliação da toxidez do OE de *Curcuma zedoaria*

De acordo com Soares et al. (2005), células eucarióticas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* são altamente adequadas para avaliar a capacidade antioxidante e da toxidez de diferentes compostos, proporcionando resultados rápidos, reprodutíveis e que podem ser correlacionados aos observados em seres humanos.

Desta forma, o ensaio de toxidez teve como objetivo analisar o número de células viáveis da levedura *S. cerevisiae* geradas a partir de uma célula exposta ao OE de *C. zedoaria* e ao agente estressor utilizado Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂), revelando o quanto às substâncias influenciaram ou não a geração de células filhas.

Diversos estudos tem utilizado o H_2O_2 , em diferentes ensaios devido suas características de agente oxidante, exercendo um papel importante no estresse oxidativo, já que é capaz de atravessar a membrana celular, de forma, relativamente, fácil e gerar o radical hidroxil ($\bullet OH$), gerando estresse oxidativo (BARREIROS, 2006).

As células de *S. cerevisiae* foram tratadas com H_2O_2 (1,0 mM) e OE de *C. zedoaria* na concentração de 0,6 mg/mL em meio de cultura YPD (meio rico em glicose, com a levedura atuando na fase fermentativa) e YPGLY (meio sem glicose e rico em glicerol, com a levedura ativando as mitocôndrias, atua na fase respiratória), com resultados expressos em número de unidades formadoras de colônias (**Gráficos 1 e 2**).

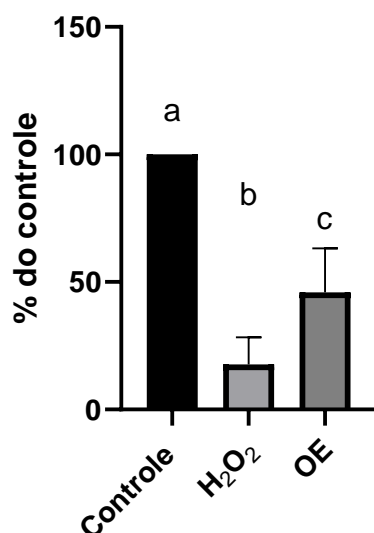


a- células sem tratamento b- células tratadas com H_2O_2 c- células tratadas com óleo essencial

Gráfico 1: Avaliação da toxidez do OE de *Curcuma zedoaria* em meio YPD

Ao analisarmos detalhadamente o **gráfico 1**, observamos que a primeira barra se refere ao controle, no qual as células de *S. cerevisiae*, não foram submetidas a substâncias que possam prejudicar o seu desenvolvimento. Na segunda barra, as células estão expostas ao H_2O_2 , que é um agente estressor, como visto anteriormente, causando a toxicidade das células e levando a morte celular. Já na terceira barra, as células estão sob a ação do OE de *C. zedoaria*.

Ao compararmos as três barras, observamos que o OE de *C. zedoaria*, aproxima-se quantitativamente das células submetidas ao H_2O_2 . Assim, pode-se verificar que o OE se comporta de maneira tóxica, prejudicando o desenvolvimento celular.



a- células sem tratamento b- células tratadas com H₂O₂ c- células tratadas com óleo essencial

Gráfico 2: Avaliação da toxidez do OE de *Curcuma zedoaria* em meio YPDGLY na Viabilidade Celular e Danos na Ativação Mitocondrial.

Os resultados das análises de viabilidade celular e impacto na funcionalidade mitocondrial mostram que o OE de *C. zedoaria*, na concentração utilizada, apresentou danos à ativação mitocondrial, pois seu comportamento foi muito distante quando comparado ao grupo controle e muito próximo do grupo de células tratados com H₂O₂.

Se o OE não tivesse causado algum dano na ativação da mitocôndria, a quantidade de colônias encontradas no meio de cultura YPGLY seria maior ou igual ao do grupo controle.

Quanto à viabilidade, pode-se observar que as células colocadas em contato com o OE apresentaram resultados bem próximos ao do H₂O₂, o qual mostra viabilidade baixa nos dois meios (YPD e YPDGLY). Logo, o OE de *C. zedoaria* mostrou-se tóxico nos dois ensaios realizados com os diferentes meios.

Não foram encontrados especificamente na literatura estudos de toxicidade utilizando a levedura *S. cerevisiae*, realizados a partir de OE de *C. zedoaria*. No entanto, algumas pesquisas relacionam a atividade citotóxica do OE de *C. zedoaria*, assim como de seus compostos majoritários isolados, frente a outros modelos celulares eucarióticos *in vivo* e *in vitro*.

Retnowati et al. (2014), avaliaram o nível de toxicidade do OE de *C. zedoaria* em *A. salina*. A extração do OE foi dividida em 5 tempos de coleta. Os resultados indicaram que os óleos essenciais do 5º tempo de coleta por destilação a vapor, testados em larvas de *Artemia*

salina Leach apresentaram maior toxicidade, sendo o valor de CL_{50} de 3,25 ppm (v/v). O óleo pode ser classificado com atividade antitumoral, por apresentar CL_{50} inferior a 40 ppm.

Já Syamsir et al. (2017), investigaram o potencial citotóxico do OE dos rizomas de *C. zedoaria* coletados na Malásia e Indonésia em linhagens de células cancerosas da mama humana (MCF-7 e MDA-MB 231), pulmão (A549 e SK-LU-1) e cervical (HeLa S3 e SiHa). O rizoma malaio *C. zedoaria* foi considerado citotóxico contra as linhagens celulares MCF-7, SK-LU-1, HeLa S3 e SiHa, com valores de IC_{50} sendo inferior a 10 μ g/mL.

Corroborando com as pesquisas de citotoxicidade Chen et al. (2013), em seus estudos concluíram que o OE de *C. zedoaria*, possui efeitos citotóxicos eficientes em células de carcinoma pulmonar de células (CPNPC) e causa apoptose celular. Os autores fornecem informações sobre os mecanismos moleculares subjacentes a apoptose induzida pelo OE de *C. zedoaria* em células NSCLC. O estudo de inibição tumoral *in vivo* mostrou que, após ser injetado por 3 semanas, o OE pode inibir funcionalmente a proliferação tumoral. A taxa de inibição tumoral em camundongos tratados com grandes doses pode chegar a 40%. Foi enfatizado o teor do sesquiterpeno 8,9-desidro-9-formilcicloisolongifoleno, que atingiu aproximadamente 60% no óleo essencial, como um potencial componente antitumoral a ser estudado em pesquisas futuras.

No entanto, é necessário conduzir estudos adicionais para investigar se ocorre sinergismo ou antagonismo entre as substâncias presentes no óleo essencial. Alguns componentes podem interagir entre si, potencializando ou diminuindo os efeitos esperados, o que pode estar contribuindo para a toxicidade observada.

5.3 Mortalidade contra as pulgas *Ctenocephalides felis felis* em diferentes estágios do ciclo de vida

Para avaliar se o OE de *C. zedoaria* poderia causar mortalidade nas fases do ciclo evolutivo (ovo, larva, pupa e adulta) das pulgas da espécie *C. felis felis* e encontrar uma dose eficaz e segura para futuros testes *in vivo*, foi realizado primeiramente o teste de *Screening* (**Tabela 5**), para determinar as concentrações do OE a serem utilizadas no teste de mortalidade definitivo.

Tabela 5: Mortalidade dos ovos, larvas, pupas e adultos de *Ctenocephalides felis felis* com o óleo essencial de *Curcuma zedoaria* (teste *Screening*)

Concentração (µg.cm ⁻²)	ADULTO		LARVA	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Placebo	0,00	0,00	0,00	0,00
1,56	0,00	0,00	0,00	0,00
3,13	5,00	5,00	0,00	0,00
6,25	0,00	0,00	0,00	0,00
12,5	10,00	10,00	0,00	0,00
25	15,00	15,00	0,00	0,00
50	15,00	15,00	100,00	100,00
100	15,00	15,00	100,00	100,00
200	75,00	75,00	100,00	100,00
400	90,00	90,00	100,00	100,00
800	95,00	100,00	100,00	100,00
Concentração (µg.cm ⁻²)	OVO		PUPA	
	72 h		15 dias	
Placebo	5,00		15,00	
1,56	15,00		15,00	
3,13	40,00		35,00	
6,25	25,00		25,00	
12,5	20,00		25,00	
25	55,00		25,00	
50	35,00		25,00	
100	15,00		20,00	
200	40,00		30,00	
400	75,00		50,00	
800	100,00		100,00	
Resultados expressos em % de mortalidade				

Ao se analisar os resultados da **Tabela 5**, pode-se perceber que o OE de *C. zedoaria* apresentou atividade inseticida contra a pulga *C. felis felis* em seus diferentes estágios.

O ovo e a pupa, apesar de já apresentarem resultados satisfatórios na primeira concentração analisada ($1,56 \mu\text{g.cm}^{-2}$), sofreram oscilações durante a análise, impossibilitando a observação de uma linearidade da mortalidade à medida que a concentração aumentava. No entanto, as larvas apresentaram mortalidade de 100% a partir da concentração de $50 \mu\text{g.cm}^{-2}$ até $800 \mu\text{g.cm}^{-2}$, diferindo-se dos estágios de ovo, pupa e adulto em que o OE alcançou de 95% a 100% de mortalidade na concentração máxima analisada ($800 \mu\text{g.cm}^{-2}$). Após a triagem, as concentrações foram escolhidas para o teste definitivo de acordo com sua maior taxa de mortalidade (**Tabela 6 e Tabela 7**).

Tabela 6: Ensaio definitivo para a determinação da mortalidade das pulgas em suas diferentes fases de vida com o óleo essencial de *Curcuma zedoaria*

Concentração ($\mu\text{g.cm}^{-2}$)	OVO 72 h	Concentração ($\mu\text{g.cm}^{-2}$)	LARVA	
			24 h	48 h
Placebo	0,00	Placebo	0,00	0,00
10,00	10,00	47,00	3,33	3,33
20,00	24,00	56,40	3,33	3,33
49,00	34,00	65,80	18,33	18,33
99,00	44,00	75,20	46,67	46,67
198,00	56,00	84,60	65,00	65,00
297,00	88,00	94,00	85,00	85,00
396,00	98,00	117,50	100,00	100,00
		235,00	100,00	100,00

Concentração ($\mu\text{g.cm}^{-2}$)	PUPA 15 dias	Concentração ($\mu\text{g.cm}^{-2}$)	ADULTO	
			24 h	48 h
Placebo	0,00	Placebo	0,00	0,00
10,00	5,77	100,00	1,67	5,00
20,00	13,46	120,00	0,00	3,33
49,00	25,00	160,00	10,00	11,67
99,00	36,54	180,00	23,33	25,00
198,00	53,85	200,00	46,67	48,33
297,00	80,77	300,00	78,33	81,67
396,00	94,23	400,00	95,00	96,67
		800,00	100,00	100,00
		1000,00	100,00	100,00

Resultados expressos em % de mortalidade

Tabela 7: Mortalidade eficaz no ciclo de vida da pulga com óleo essencial de *Curcuma zedoria*

Fase de vida da pulga	Concentração ($\mu\text{g.cm}^{-2}$)	% Mortalidade
Ovo (72 h)	396	98
Larva (24 h)	117,5	100
Larva (48 h)	117,5	100
Pupa (15 dias)	396	94,23
Adulto (24 h)	800	100
Adulto (48 h)	800	100

Freitas et al. (2021) demonstraram em seus estudos que o OE de *I. verum* causou 100% de mortalidade de pulgas adultas na concentração de $400 \mu\text{g.cm}^{-2}$ após 48 h, o que diferiu do presente estudo, que necessitou do dobro da concentração para causar 100% da mortalidade nas pulgas adultas. Porém em $400 \mu\text{g.cm}^{-2}$ após as 48h já alcançou mortalidade de 96,6 %.

Além disso, Freitas et al. (2021) relataram que concentrações de $80 \mu\text{g.cm}^{-2}$, $20,0 \mu\text{g.cm}^{-2}$ e $140 \mu\text{g.cm}^{-2}$ do OE de *I. verum* causaram 100% de mortalidade nos estágios de ovo, larva e pupa, respectivamente. Já a concentração de $40 \mu\text{g.cm}^{-2}$ inibiu completamente o desenvolvimento dos ovos até o estágio adulto. Por sua vez, o OE de *P. graveolens* causou 100% de mortalidade em concentrações mais baixas após exposição por 48 h: $240 \mu\text{g.cm}^{-2}$ contra pulgas adultas; $100 \mu\text{g.cm}^{-2}$ contra pupas; e $35 \mu\text{g.cm}^{-2}$ para inibição do ciclo biológico.

Por outro lado, as concentrações que causaram 100% de mortalidade foram maiores para atividade ovicida ($60 \mu\text{g.cm}^{-2}$) e atividade larvicida ($40 \mu\text{g.cm}^{-2}$). Comparando-se com os resultados obtidos na presente pesquisa, observamos que o OE de *C. zedoria* necessitou de concentrações muito maiores para atingir a mortalidade total da pulga em seus diferentes estágios de vida.

Corroborando com os estudos acima, Finamore (2019) demonstrou mortalidade corrigida de *C. felis felis* adultas induzida pelo óleo de *Cedrela fissilis* de 90% no tempo de 24 h e de 100% no tempo de 48 h na concentração de $40.000 \mu\text{g/mL}$, que corresponde a $800 \mu\text{g.cm}^{-2}$, onde observamos um valor aproximado no presente estudo em relação a mortalidade total de pulgas adultas.

Não foram encontrados especificamente na literatura estudos realizados a partir de OE de *C. zedoaria* frente às pulgas. No entanto, algumas pesquisas demonstraram a atividade inseticida do OE de *C. zedoaria* especialmente contra o mosquito *Aedes aegypti* e outros estudos relacionando a atividade inseticida de diferentes OE de plantas contra pulgas.

Os estudos realizados a partir do OE de *C. zedoaria* incluíram também a avaliação da CL₉₀ e CL₅₀ nos ensaios realizados frente aos ectoparasitas. A (Tabela 8) apresenta os valores de concentração letal obtidos nesta pesquisa:

Tabela 8: Concentração letal 50 e 90 do OE de *C.zedoaria*

Fase da pulga	CL ₅₀ (µg.cm ⁻²)	CL ₉₀ (µg.cm ⁻²)	Slope	R ²
Ovo (72 h)	49,65	370,85	1,47	0,975
Larva (24 h)	77,46	97,55	12,85	0,912
Larva (48 h)	77,46	97,55	12,85	0,912
Pupa (15 dias)	103,08	446,33	2,01	0,989
Adulto (24 h)	255,51	346,11	6,89	0,849
Adulto (48 h)	219,28	329,84	7,23	0,839

Champakaew et al. (2007) observaram boa eficácia larvicida contra mosquitos *A. aegypti* do OE de *C. zedoaria* e sua preparação formulada pela adição de grânulos de areia impregnados ao óleo. A formulação apresentou potencial pronunciado contra larvas de *A. aegypti* com CL₅₀ e CL₉₉ de 33,45 e 83,39 ppm, respectivamente. A aplicação de óleo de zedoaria puro em uma dosagem que rendeu dez vezes a de CL₉₉ ofereceu mortalidade larval completa (100% de mortalidade) por um período de 3 dias, e a mortalidade larval subsequentemente diminuiu para menos de 50% após a aplicação por mais de 5 dias, já a formulação com grânulos de areia impregnados com OE de zedoaria proporcionaram atividade notavelmente mais longa, com mortalidade larval de 100% por um período de 9 dias; e mortalidade abaixo de 50% foi obtida na 3ª semana de aplicação

Chaiyasit et al. (2006), avaliaram a ação adulticida do óleo de *C. zedoaria* contra duas populações de *A. aegypti*, as cepas de laboratório e de campo natural. O bioensaio de atividade adulticida foi realizado pela aplicação tópica do óleo essencial da planta em mosquitos fêmeas. A atividade adulticida revelou que o óleo essencial de *C. zedoaria* foi eficaz em 24 h nas duas populações, com CL₅₀ de 5,94 µg/mg para população de laboratório e 6,02 µg/mg para população do campo. No entanto, a cepa de laboratório foi ligeiramente mais suscetível que a população do campo.

Ainda corroborando com os estudos sobre a atividade do óleo essencial de *C. zedoaria* na espécie do mosquito *A. aegypti*, Oliveira et al. (2019) avaliaram o potencial bioinseticida (OE) extraído dos rizomas da zedoaria. Os rizomas foram coletados durante o período de dormência (inverno) e brotação (verão). Os bioensaios sobre larvas e pupas de *A. aegypti* foram realizados pelo teste de larvas e pupas nos diferentes períodos OE (dormência e brotação), que variam de 500 mg/mL⁻¹ (v/v). Os resultados sobre as larvas e pupas indicam uma CL_{99,9} de (0,01 e 1,38 mg/mL⁻¹), para o OE da dormência, e (0,08 e 2,63 mg/mL⁻¹), para o OE do período de brotação, respectivamente, indicando maior atividade do OE da dormência.

A partir dos resultados encontrados neste estudo e da comparação com outras pesquisas que avaliaram o potencial bioinseticida do OE de *C. zedoaria*, mencionadas acima, pode-se concluir que o OE apresentou um efeito promissor na atividade inseticida contra insetos hematófagos.

Comparando a atividade inseticida de OEs de diferentes plantas contra a pulga *Ctenocephalides felis felis* Lambert et al. (2020), avaliaram a atividade *in vitro* do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* contra pulgas adultas e sua ação na maturação de ovos em adultos de *C. felis felis*. Os resultados obtidos para pulgas adultas foram concentração letal 50 (CL₅₀) de 5,70 µg.cm⁻² em 24 h e 3,91 µg.cm⁻² em 48 h. A CL₉₀ foi de 16,10 µg.cm⁻² e 15,80 µg.cm⁻² em 24 e 48 h, respectivamente. Já a inibição da maturação dos ovos em adultos foi de A CL₅₀ 0,30 µg.cm⁻² e a CL₉₀ de 3,44 µg.cm⁻²

Finamore 2019, encontrou em seus estudos com os óleos essenciais de *Cedrela fissilis*, *Eucalypto globulus*, *Mentha pulegium* e *Mentha arvensis*, diferentes resultados da ação inseticida contra pulgas adultas *C. felis felis*. O OE *C. fissilis* mostrou atividade inseticida com os valores de CL₅₀ de 7404,48 µg/mL e 4021,38 µg/mL após 24 e 48 h, respectivamente. Já o OE de *Eucalypto globulus*, mostrou valores de CL₅₀ de 376428,67 em 24 h e 40873,67 em 48 h. Na análise da CL₅₀ do OE *M. pulegium* de após 48 horas foi encontrado o valor de 11337,88 µg/mL, com intervalo entre 4491,81 – 32154,48 µg/mL. No OE de *Mentha arvensis* os dados não suportaram a análise de próbites.

Freitas et al. (2021), avaliaram a atividade pulicida de dois óleos essenciais *Illicium verum* e *Pelargonium graveolens*. A comparação dos valores estimados de concentração letal dos dois OEs demonstraram que os estágios imaturos foram mais susceptíveis quando medidos pelos valores de CL₅₀, para inibição do ciclo biológico, 18,8 a 36,9 µg.cm⁻² contra ovos,

12,1 a 16,3 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ contra larvas e 35,4 a 67,6 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ contra pupas, respectivamente.

O mesmo padrão foi observado para os valores de CL_{90} estimados, variando de 20,4 a 30,1 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ para inibição do ciclo biológico, 54,5 a 55,6 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ em relação a ovos, 16,8 a 32,3 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ em relação as larvas e 85,4 a 87,9 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ versus pupas. Já para pulgas adultas, as atividades inseticidas medidas por CL_{50} e CL_{90} variaram de 119,1 a 164,6 $\mu\text{g. cm}^{-2}$ e de 209,5 a 258,1 $\mu\text{g.cm}^{-2}$, respectivamente.

Pereira (2022) avaliou em sua pesquisa o potencial inseticida dos OEs de *Baccharis trimera* e *Mimosa verrucosa* contra *C. felis felis*, apresentou os seguintes valores; para CL_{50} 309,52 e 194,5 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ contra ovos, em média 34,57 e 253 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ contra larvas, respectivamente. Já para o estágio imaturo pupa, apenas o OE de *Baccharis trimera* apresentou resultado 324,13 $\mu\text{g.cm}^{-2}$. Para os valores de CL_{90} , apresentaram 1391,85 a 563,08 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ contra ovos, em média 44,93 e 641,2 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ contra larvas, respectivamente. Já para o estágio imaturo pupa, apenas o OE de *Baccharis trimera* obteve resultado 1160,35 $\mu\text{g.cm}^{-2}$. Na pulga adulta os OEs apresentaram para LC_{50} e LC_{90} em 24 h e 48 h os mesmos resultados de 369,22 para *Baccharis trimera* e de 678,13 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ para *Mimosa verrucosa*. Comparando-se a ação pulicida do óleo essencial de *C. zedoaria*, com os resultados de Pereira (2022), podemos observar que para ovos o OE de *C. zedoaria* apresentou CL_{50} 49,65 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ e CL_{90} 370,85 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ com mortalidade satisfatória e concentração letal mais baixa em relação aos OEs de *Baccharis trimera* e *Mimosa verrucosa*. No entanto, contra larvas, o OE de *C. zedoaria* precisou de uma concentração maior CL_{50} 77,46 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ e CL_{90} 97,55 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ se comparado ao OE de *B. trimera*. Já o OE de *M. verrucosa* apresentou uma concentração mais alta com média de CL_{50} 253 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ e CL_{90} 563,08 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ em relação ao OE de *C. zedoaria*. Tanto nos estágios de pupa quanto em pulgas adultas o OE de *C. zedoaria* apresentou uma concentração letal 50 e 90 mais baixas que os dois OEs citados no estudo.

Ao comparar nosso estudo com os resultados obtidos por Freitas et al. (2021), no qual utilizou-se os OEs *I. verum* e *P. graveolens*, podemos inferir que a *C. zedoaria* necessitou de uma concentração muito alta de OE para mortalidade das pulgas em todo ciclo biológico (ovo, larva, pupa e adulto) tanto em CL_{50} quanto CL_{90} .

Com base nos achados deste estudo e em comparação com a literatura disponível, é possível notar que há uma grande diferença nas concentrações letais encontradas. Isso pode ser explicado pela composição química das plantas responsáveis pela produção dos óleos essenciais analisados

5.4 Avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase

Para realização dos ensaios de inibição da enzima acetilcolinesterase (peixe elétrico/*Electrophorus electricus*- adquirida da Sigma Co), primeiramente foi elaborada uma padronização de diluição da enzima, para determinar a atividade enzimática, assim como a concentração adequada para realização dos experimentos (**Gráfico 3**).

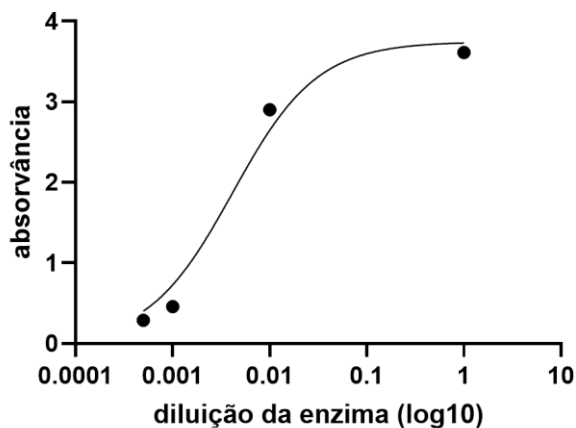


Gráfico 3: Atividade da acetilcolinesterase em diferentes concentrações da enzima

De acordo com o **Gráfico 3** a atividade enzimática foi satisfatória com as diluições utilizadas. A diluição escolhida para realização dos ensaios subsequentes foi de 0,01(log10) que corresponde a concentração enzimática de 0,176 mU/mL.

Após o ensaio da diluição enzimática, realizou-se a avaliação do potencial inibitório da atividade da enzima acetilcolinesterase utilizando o OE de *C. zedoaria* como um possível inibidor. A escolha das concentrações do OE para o ensaio da acetilcolinesterase envolveu uma triagem baseada em estudos prévios realizados a partir do método de Ellman e diluições seriadas em DMSO 3%. Durante a triagem, diferentes concentrações foram testadas para avaliar a atividade anticolinesterase.

Constatou-se que concentrações maiores que 0,5 mg/mL e menores que 0,125 mg/mL não apresentaram ação inibitória relevante frente à acetilcolinesterase. Portanto, essas concentrações foram consideradas fora da faixa de interesse para o ensaio.

Logo, as concentrações utilizadas foram: 0,125; 0,25 e 0,5 mg/mL (**Gráfico 4**).

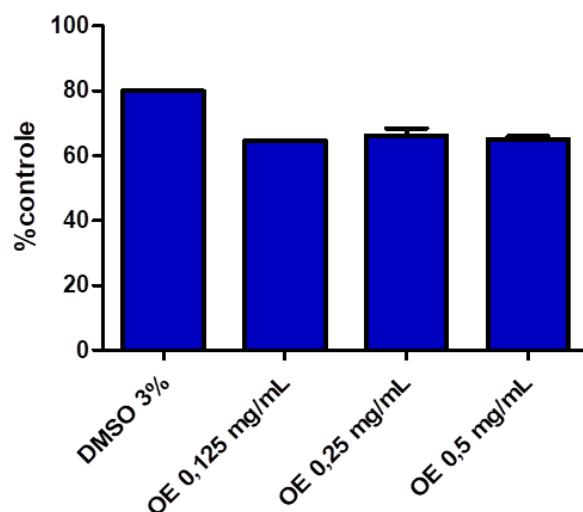


Gráfico 4: Efeito do óleo essencial de *Curcuma zedoaria* sobre a atividade de acetilcolinesterase

Como observado no **Gráfico 4**, as concentrações utilizadas não foram capazes de inibir a atividade da acetilcolinesterase, uma vez que não houve interferência na inibição da enzima. A atividade observada utilizando-se o óleo essencial quando comparado ao controle comprovou baixa inibição, uma vez que o óleo inibiu cerca de 20% da atividade enzimática, mesmo em sua maior concentração.

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima que desempenha papel essencial no mecanismo colinérgico, sendo capaz de catalisar a hidrólise da acetilcolina na transmissão do impulso nervoso na sinapse colinérgica entre neurônios. A enzima está ligada à membrana basal entre as membranas pré- e pós-sinápticas desempenhando seu papel fisiológico (RANG *et al.*, 2004).

Numerosos óleos essenciais têm demonstrado atividade de inibição contra a AChE, incluindo plantas da família Zingiberaceae como a *Curcuma longa* (BARBOSA, 2018). Essa atividade é explicada pela identificação de constituintes desses óleos como monoterpenos neral, geranial e linalol (DOHI *et al.*, 2009; PICOLLO *et al.*, 2008), sesquiterpenos como óxido de cariofileno, tumerona e alguns fenilpropanóides (FUJIWARA *et al.*, 2010). Que se mostraram potenciais inibidores da AChE.

Oliveira *et al.* (2019), utilizaram o método de Marson *et al.* (2002) em seus estudos para avaliar a atividade inibitória do OE de *C. zedoaria* sobre a enzima AChE e conclui que entre

as concentrações de 0,039 a 0,156 mg/mL⁻¹, houve uma inibição significativa da enzima. No entanto, os resultados obtidos na presente pesquisa, utilizando o método modificado de Ellman, mostraram-se pouco eficazes na inibição da AChE nas concentrações avaliadas.

6 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se observar, primeiramente, por meio da análise cromatográfica, que o OE de *C. zedoaria* é rico em constituintes monoterpênicos e sequiterpênicos, possuindo, ainda, como constituintes químicos majoritários o 1,8-cineol (24,11%), a cânfora (12,13%) e a curzerenona (9,68%), os quais estão relacionados com diversas propriedades do OE, dentre elas: atividade antiinflamatória, antimicrobiana, antiparasitária, inseticida e antioxidante.

No que se refere à ação do OE contra a pulga *C. felis felis*, os resultados obtidos demonstraram atividade inseticida em todos os estágios do ciclo reprodutivo da pulga (ovos, larvas, pupa e adultos).

Nos ensaios de atividade anticolinesterásica, pode-se verificar que a atividade observada, utilizando-se o OE quando comparado ao controle, comprovou baixa inibição, uma vez que o OE inibiu cerca de 20% da atividade enzimática, mesmo em sua maior concentração (0,5 mg/mL).

Na apuração dos dados obtidos através dos ensaios de toxicidade utilizando-se como modelo de pesquisa a levedura *S. cerevisiae*, pode-se observar que o OE de *C. zedoaria* apresentou alta toxidez, já que no ensaio realizado houve dano mitocondrial, portanto, prejudicando o desenvolvimento celular.

Diante dos resultados obtidos até o momento, podemos inferir que o O.E de *C. zedoaria* apresentou-se como um potencial bioinseticida frente à pulga *C. felis felis*, podendo futuramente, com a produção de novos estudos, tornar-se uma alternativa menos prejudicial para a população usuária se comparado aos inseticidas de uso comum.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABINPET. Informações gerais do setor pet. Disponível em:< <http://abinpet.org.br/infos-gerais/>>. Acesso em: 28 de julho de 2023.
- ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **Illinois USA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream**, p. 0–804, 2017.
- ALMEIDA, M.C. Efeitos do processamento por radiação em espécies da família zingiberaceae: açafrão (*Curcuma longa* L.), gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) e zedoária [*Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe]. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). IPEN, São Paulo, 2012.
- ANAND, J.; BHUKTAR, A. Phytochemical screening of Rhizome extract of *Curcuma zedoaria* (Christm) Roscoe by HPLC-MS technique. **International Journal of Life Sciences (IJLSI), Special Issue**, v. A13, p. 53-57, 2019.
- ANDRADE, N. M.; ALENCAR, J. W.; CUNHA, A. H.; SILVEIRA, E. R. Volatile constituents of *Psidium pohlianum* and *Psidium guyanensis* Pers. **Journal of Essential Oil Research**, v. 6, p. 299–300, 1994.
- ANGEL, G. R. et al. Essential oil composition of eight starchy *Curcuma* species. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 233-238, 2014.
- ARAÚJO, E. C. C.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; ANDRADE NETO, M.; LIMA, M. A. A. et al. Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martiusii* Benth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3760– 3762, 2003.
- ARDREY, R. E. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction, Wiley: Huddersfield, 2003.
- ASSIS, C. R. D.; CASTRO, P. F.; AMARAL, I. P. G.; CARVALHO, E. V. M. M.; CARVALHO JR, L. B.; BEZERRA, R. S. Characterization of acetylcholinesterase from the brain of the amazonian tambaqui (*Colossoma macropomum*) and in vitro effect of organophosphorus and carbamate pesticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n.10, p. 2243–2248, 2010.
- AZAMBUJA, W. Leoessenciais - Métodos de extração de óleos essenciais, 2018.
- BARBOSA, C. O. Caracterização química e atividades biológicas dos óleos essenciais e extratos alcoólicos das espécies *Ocimum* spp. (manjerição) e *Curcuma longa* (açafrão da terra). Tese (Doutorado em Biotecnologia)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 142f, 2018.
- BARREIRA T., M. J.; NEIVA OLIVEIRA MARIANO, R.; MARTINS ROSA, Y.; RIBEIRO HENRIQUE, E.; HONORATO NASCIMENTO, G.; J. BARROS SILVESTRE, L. "Animais de estimação e sua influência na saúde mental do ser humano." **Revista Científica do Tocantins**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2023

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BASER, K.H.C.; BUCHBAUER, G. Handbook of essential oils: Science, Technology and Applications. Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis, 2010.

BATISH, D. R. et al. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology and Management**, v. 256, n. 12, p. 2166–2174, 2008.

BAPTISTA, Yago Alves. Efeitos de óleos essenciais sobre *Lasioderma serricorne* (Fabricius) (Coleoptera: Anobiidae). 2021.

BENELLI, G.; PAVELA, R. Beyond mosquitoes-Essential oil toxicity and repellency against bloodsucking insects. **Industrial Crops and Products**, v.117, p. 382–392, 2018.

BEVILACQUA, M.; FERRARI, J.; GRANJA, M; KNEREK, A.; NOSKOSKI, M.; ROMANOSKI, C. A; VEIGA, M; FLORES, R. A.; GOTTLIEB, J.; GASPARIN, W. J. Estudo epidemiológico de ectoparasitas em cães e gatos na região norte do RS/Brasil. 2014. Disponível em:<http://mostra.ideau.com.br/2014/mostra_ideau_2014_anais/trabalhos/2014025010.pdf> Acesso em: 28 de julho de 2022.

BRESSANIN, Gracieli Gomes Nonato. Efeito Acaricida de Óleos Essenciais das Plantas Alpinia zerumbet e Curcuma zedoaria (Zingiberaceae) no Controle de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). Cuiabá-MT, 2017. 51p. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) - Universidade de Cuiabá, Mato Grosso, 2017.

BLAGBURN, B.L.; DRYDEN, M.W. Biology, Treatment, and Control of Flea and Tick Infestations. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 39, n. 6, p.1173–1200, 2009.

BOWMAN, Dwight D. Georgis – Parasitologia veterinária. 9 ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2010.

CADIERGUES, M. C. et al. First blood meal of *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae) on dogs: time to initiation of feeding and duration. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 1, p. 214-215, 2001.

CARLOTTI, D.N.; JACOBS, D.E. Therapy, control and prevention of flea allergy dermatitis in dogs and cats. **Veterinary Dermatology**, v.11, p.83-98, 2000.

CASTRO, J. S. M.; MOUTINHO, F. F. B. Relatos de intoxicação humana e animal com produtos químicos de uso veterinário em Niterói, RJ. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 9, n. 1, p. 99-105, 2021.

CDC- Centers for Disease Control and Prevention Health. Divisão de Doenças Parasitárias e Malária. 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/fleas/index.html>. Acesso em: 14 maio 202

CECÍLIO FILHO, A. B.; SOUZA, R. J.; FAQUIM, V.; CARVALHO, C. M. Época e densidade de plantio na produção de *Curcuma*. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1021 – 1026, 2004.

CHAIYASIT, D. et al. Essential oils as potential adulticides against two populations of *Aedes aegypti*, the laboratory and natural field strains, in Chiang Mai province, northern Thailand. **Parasitology research**, v. 99, n. 6, p. 715-721, 2006.

CHAMPAKAEW, D.; CHOOCHOTE, W.; PONGPAIBUL, Y.; CHAITHONG, U.; JITPAKDI, A.; TUETUN, B.; PITASAWAT, B. Larvicidal efficacy and biological stability of a botanical natural product, zedoary oil-impregnated sand granules, against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Parasitology research**, v.100, n.4, p.729–737, 2007.

CHEN, Chien-chang et al. Chemical constituents and anticancer activity of *Curcuma zedoaria* roscoe essential oil against non-small cell lung carcinoma cells in vitro and in vivo. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 47, p. 11418-11427, 2013.

CHRISTAKI, E.; BONOS, E.; GIANNENAS, I.; FLOROU-PANERI, P. Aromatic plants as a source of bioactive compounds. **Agriculture**, v. 2, n. 3, p. 228-243, 2012.

COLES, T. B.; DRYDEN, M. W. Insecticide/acaricide resistance in fleas and ticks infesting dogs and cats. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2014.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P. S. Fundamentos de Cromatografia. Editora Unicamp - Campinas, SP. 2006.

COLOVIC, M.B., KRSTIC, D.Z., LAZAREVIC-PASTI, T.D., BONDZIC, A.M., VASIC, V.M. Acetylcholinesterase inhibitors: **pharmacology and toxicology**. *Current Neuropharmacology*, v.11, p.315-335, 2013.

COOP, R.L.; TAYLOR, M.A.; JACOBS, D.E.; JACKSON, F. Ectoparasites: recent advances in control, **Trends in Parasitology**, v.18, n.2, p. 55-56, 2002.

CROMA. Avaliação de adulteração em alimentos. 2022.

CUNHA, A. P.; NOGUEIRA, M.T.; ROQUE, O.R.; BARROSO, J.M.G. Plantas Aromáticas e Óleos Essenciais: Composição e Aplicações, Lisboa. 2012.

DE ALMEIDA, J. C.; ALMEIDA, P. P.; GHERARDI, S. R. M. Potencial antimicrobiano de óleos essenciais: uma revisão de literatura de 2005 a 2018. **Nutri Time**, v. 17, n. 01, p. 8623-8633, 2020.

DEVER, T. E.; KINZY, T. G.; PAVITT, G. D. Mechanism and Regulation of Protein Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, v. 203, n. 1, p. 65–107, 2016.

DOHI, S.; TERASAKI, M.; MAKINO, M. Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.57 n.10, p.4313–4318, 2009.

DOSOKY, N. S.; SATYAL, P.; SETZER, W. N. Variations in the volatile compositions of *Curcuma* species. **Foods**, v. 8, n. 2, p. 53, 2019.

DRYDEN, M. W. Host association on-host longevity and egg production of *Ctenocephalides felis felis*. **Veterinary Parasitology**, v. 34, n 1-2, p. 117-122, 1989.

DRYDEN, M. W.; SMITH, V. Cat flea (Siphonaptera: Pulicidae) cocoon formation and development of naked flea pupae. **Journal of Medical Entomology**, v. 31 n.2 p.272-277, 1994.

DRYDEN, M. W. Flea and tick control in the 21st century: challenges and opportunities. **Veterinary Dermatology**, v.20 ,n.5, p.435–440, 2009.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.

FARIA JÚNIOR, Hélio Pena. Substratos alternativos no cultivo de cúrcuma sob telas de sombreamento. 2019. 37f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

FERNANDES, E. T. ; FAVERO, S. Essential oil of *Schinus molle* L. for Most.1855 *Sitophilus zeamais* (Coleoptera Curculionidae) in maize. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 9, n. 1, p. 225-231, 2014.

FERNANDES, P. M. B. Levedura: do pão à biotecnologia. Vitória, ES: Edufes, 2009.

FINAMORE, Mariana Cunha. Atividade pulicida de óleos essenciais de *Cedrela fissilis*, *Mentha pulegium*, *Mentha arvensis* e *Eucalyptus globulus* em *Ctenocephalides felis felis*. 2019. 37 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

FREITAS, J. P. et al. Efficacy and residual effect of *Illicium verum* (star anise) and *Pelargonium graveolens* (rose geranium) essential oil on cat fleas *Ctenocephalides felis felis*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, n. 4, 2021.

FLORENCIO, Cássio do Nascimento. Eficácia de um talco contendo carbaril e cipermetrina no controle de *Ctenocephalides felis felis* e *Rhipicephalus sanguineus* em cães.. 2013. 34 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

FUJIWARA, M.; YAGI, N.; MIYAZAWA, M. Acetylcholinesterase inhibitory activity of volatile oil from *Peltophorum dasyrachis* Kurz ex Bakar (yellow batai) and Bisabolane-type sesquiterpenoids. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58,n.5, p.2824–2829, 2010.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.15, n.2, p. 178-182, 2005.

GIETZ, R. D.; WOODA, R. A. Methods in Enzymology. **Elsevier Science**, v. 350, 2002.

GIRARD, E.A. Volume, Biomassa e Rendimento de Óleos Essenciais do Craveiro (*Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum) em Floresta Ombrófila Mista. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Departamento de pós-graduação em Ciências Florestais, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 genes. **Science**, v.274, n.5287 ,p. 563-567, 1996.

HALOS, L. et al. Fleacontrol failure? Myths and realities. **Trends in Parasitology**, v.30 n.5, p. 228–233, 2014.

ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, v.19, p. 603-608, 2000.

JANKOWSKA, M.; ROGALSKA, J.; WYSZKOWSKA, J.; STANKIEWICZ, M. Molecular targets for components of essential oils in the insect nervous system-a review. **Molecules**. V. 23 p. 34, 2017.

JARIKASEM, S.; THUBTHIMTHED, S.; CHAWANANORASETH, K.; SUNTORNTANASAT, T.; BROPHY, J.J. Essential oils from three *Curcuma* species collected in Thailand. **Acta Hort.**, v. 677, p. 37-41, 2005.

JENA, Sudipta et al. Deeper insight into the volatile profile of essential oil of two *Curcuma* species and their antioxidant and antimicrobial activities. **Industrial Crops and Products**, v. 155, p. 112-830, 2020.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. Sistemática vegetal: um enfoque filogenético. Porto Alegre: **Artmed**, 3ªed., 632p, 2009.

JUNIOR, S. L., G., CAMPOS, J. P., MONTEIRO, C. M. DE O., FIOROTTI, J., JÚNIOR, F. E. A. C., TOMÉ, A. L., & PERINOTTO, W. M. DE S. Chemical composition and acaricidal activity of essential oils from fruits of *Illicium verum* and rhizomes of *Curcuma zedoaria* against *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 32, n.6, p.571–576,2020.

KANASE, V.; KHAN, F. "Uma visão geral do valor medicina das espécies de *Curcuma*". **Jornal Asiático de Pesquisa Farmacêutica e Clínica**, v. 11, n. 12, p. 40-45, dez. 2018.

KATO, E. T. M.; FISCHER, D. C. H. Estudo morfo-Histológico e cromatográfico em camada delgada comparativo de raízes e de rizomas de *Curcuma zedoaria* (Bergius) Roscoe — droga, óleo essencial e extrato fluído. **Lecta**, v. 4, n. 2, p. 9 - 26, 1996.

KIM, Y. H.; CHOI, J. Y. ; JE, Y. H. ; KOH, Y. H. ; LEE, S. H. Functional analysis and molecular characterization of two acetylcholinesterases from the German cockroach, *Blattella germanica*. **Insect Molecular Biology**, v.19, n.6, p. 765–776,2010.

KNOLHOFF, L.M.; ONSTAD, D.W. Chapter 7 - Resistance by Ectoparasites, Insect Resistance Management. **Academic Press**, San Diego, In: Ibid. (Ed.), p. 125- 151, 2007.

KREGER-VAN, N. J. W. Classification of yeast. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (Eds.). The yeasts. 2nd ed. London: Academic Press, 1987. p. 5–61.

KUMAR, P.; MISHRA, S.; MALIK, A.; SATYA, S. Compositional analysis and insecticidal activity of *Eucalyptus globulus* (family: Myrtaceae) essential oil against housefly (*Musca domestica*). **Acta Tropica**, v. 122, p. 212–218, 2012.

LAMBERT, M. M. et al. Activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and its main constituent eugenol in the inhibition of the development of *Ctenocephalides felis felis* and the control of adults. **Veterinary Parasitology**, v. 282, p. 109-126, 2020.

LARSEN, K.; LARSEN, S.S. Gingers of Thailand (Chiang Mai: **Queen Sirikit Botanic Garden**, P.184,2006.

LI, S.; YUAN, W.; DENG, G.; WANG, P.; YANG, P. Chemical composition and product quality control of turmeric (*Curcuma longa* L.). **Pharmaceutical Crops**, v. 2, p. 28–54, 2011.

LINARDI, P.M.; GUIMARÃES, L.R. Sifonápteros do Brasil. **FAPESP**, P.291, 2000.

LINDE GÁS LTDA. Cromatografia gasosa. Disponível em: <http://hiq.linde-gas.com.br/international/web/lg/br/like35lgsp_gbr.nsf/docbyalias/anal_gaschrom>. Acesso em :09 de abril de 2022.

LIONETTO, M.G.; CARICATO, R.; CALISI, A.; GIORDANO, ME.;SCHETTINO, T. Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. **BioMed Research International**,v.39,p.1-8, 2013.

LIU, Y.; LIU, J.; ZHANG, Y. Research Progress on Chemical Constituents of *Zingiber officinale* Roscoe. **BioMed Research International**, v.1, p. 1-21, 2019.

LOBO, R. et al. *Curcuma zedoaria* Rosc. (white turmeric): a review of its chemical, pharmacological and ethnomedicinal properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, India, v. 61, n. 1, p. 13-21. 2008.

LOPEZ J. R. S.; JACOBS D. R. JR.; HIMES J. H.; ALEXANDER B.H. Acetylcholinesterase activity, cohabitation with floricultural workers, and blood pressure in ecuadorian children. **Environ Health Perspect**, v.121,p.619–624, 2013.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. Plantas ornamentais no Brasil. São Paulo: Nova Odessa, Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 3ª ed., p.1065-1088, 2001.

MACHADO, B. F. M. T.; JUNIOR, A. F. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Caderno acadêmico Tubarão**, v. 3, n.2, p. 105-127, 2011.

MANS, D. R. et al. Suporte fitoquímico e farmacológico para os usos tradicionais de espécies de Zingiberaceae no Suriname - uma revisão da literatura. **Revista Farmacognosia**, v. 11, n. 6s, p. 1511-1525, 2019.

MARCHI, J. P.; TEDESCO, L.; MELO, A. da C.; FRASSON, C.A.; FRANÇA, V. F.; SATO, S. W.; AMEIATO, E.C.W. Curcuma longa L., o açafrão da terra, e seus benefícios medicinais. **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 20, n. 3, p. 189-194, 2016

MARCONDES, C. B. Entomologia médica e veterinária. 2 ed. São Paulo: **Editora Atheneu**, p. 526. 2011.

MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A. A rapid TLC bioautography method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 51-54, 2002

MASSOULIÉ J.; BON S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. **Annual Reviews Inc.**, v.5, p.57-61, 1982.

MASON, I.; CARR, B. R.; RAINEY, W. E. The Action of Phorbol Ester on Steroidogenesis in Cultured Human Fetal Adrenal Cells. **Endocrine Research**, v. 12, n. 4, p. 447 – 467, 1984.

MATA, A. R.; NELSON, D. L.; AFONSO, R. J. C. F.; GLORIA, M. B. A.; JUNQUEIRA, R. G. J. Identificação de compostos voláteis da *curcuma* empregando microextração por fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. **Ciências Tecnologia Alimentos**, v. 24, n.1, p. 151 - 157, 2004.

MAU, J. et al. Composition and antioxidant activity of the essential oil from Curcuma zedoaria. **Food Chemistry**, Taiwan, v. 82, n. 4, p. 583-591. 2003.

MELO, D. R. Ação de Metarhizium anisopliae (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 e Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre Ctenocephalides felis felis (Boúche, 1835) (Siphonaptera: Pulicidae). 2006. 50 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2006.

MOLDOVEANU, S. D. Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis. Elsevier, V., 2017.

MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; VIZIOLI, B. C.; GOMES, LUIZ E. T. Aspectos analíticos para a determinação de contaminantes ambientais no contexto da ecotoxicologia. Recurso água - Tecnologias e pesquisas para o uso e a conservação de ecossistemas aquáticos. 1ed São Carlos: Editora Cubo, p. 381-414, 2021.

MONTES, O., R.; SALEM, A. Z. M.; 2KHOLIF, A. E.; MONROY, H.; PÉREZ, Z. L. S.; J. L. ANDIGUTIÉREZ, A. Yeast: Description and Structure. In: Yeast Additive and Animal Production. PubBioMed, 2016.

MONTON, C.; CHAROENCHAI, L.; SUKSAEREE, J.; SUEREE, L. Quantitation of curcuminoid contents, dissolution profile, and volatile oil content of turmeric capsules produced at some secondary government hospitals. **Journal of food and drug analysis**, v.24 n.3, p.493–499,2016.

MURTEY, M.; RAMASAMY, P. Sample Preparations for Scanning Electron Microscopy - Life Sciences. In: JANECEK, M.; KRAL, R. (Eds.). Modern Electron Microscopy in Physical and Life Sciences. Rijeka: IntechOpen, 2016.

NAVARRO, D. F.; SOUZA, M. M.; NETO, R. A.; GOLIN, V.; NIERO, R.; YUNES, R. A.; MONACHE, F. D.; CECHINEL FILHO, V. Phytochemical analysis and analgesic properties of *Curcuma zedoaria* grown in Brazil. **Phytomedicine**, v. 9, n. 5, p. 427 - 432, 2002.

NEVES, J. S. Aromaterapia: Um tema para o ensino de Química. 28f. Monografia de Graduação (Licenciatura em Química) - Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília. 2011.

NETTO JR., N. L. *Cúrcuma*. **Revista Racine**, n. 52, p. 51 - 55, 1999

NICOLETTI, M. A. FITOTERAPIA: *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe, Uma possibilidade terapêutica como antifúngico de uso tópico. **Revista Infarma**, v. 14, n. 9/10, 2002.

OLIVEIRA, H. L. M. et al. Bioinsecticide potential of *Curcuma zedoaria* rhizome essential oil. **Bioscience Journal (Online)**, p. 1198-1212, 2019.

OLIVEIRA, J. C. P. et al. Ectoparasitos infestando animais que vivem em contato próximo com seres humanos: um problema real para a perspectiva Saúde Única?. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 73, p. 55-61, 2021.

PAMPLONA, C.R. Perfil fitoquímico e biológico de diferentes partes da *Curcuma zedoaria* (christm.) roscoe,(zingiberaceae) em relação à variação sazonal. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina, 2006.

PAPACHRISTOS, D. P.; STAMOPOULOS, D. C. Toxicity of vapours of three essential oils to the immature stages of *Acanthoscelides obtectus*. **Journal of Stored Products Research**, v. 38, p. 365–373, 2002.

PENNA, S. C.; MEDEIROS, M. V.; AIMBIRE, F. S.; FARIA-NETO, H. C.; SERTIÉ, J. A.; LOPES-MARTINS, R. A. Anti-inflammatory effect of the hydroalcoholic extract of *Zingiber officinale* rhizomes on rat paw and skin edema. **Phytomedicine**, v. 10, n. 5, p. 381 - 385, 2003.

PENNACCHIA, C. et al. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains from different food matrices and their preliminary selection for a potential use as probiotics. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 6, p. 1919–1928, Dec. 2008.

PEREIRA, Nayana de Figueiredo. Avaliação de óleos essenciais das espécies brasileiras *Baccharis trimera* (Less.) DC) e *Mimosa verrucosa* Benth contra *Ctenocephalides felis felis*. 2022. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

PICOLLO, M. I. et al. Anticholinesterase and pediculicidal activities of monoterpenoids. **Fittoterapia**, Amsterdam, v. 79, n. 4, p. 271-278, 2008.

RAJASHEKAR, Y.; RAGHAVENDRA, A.; BAKTHAVATSALAM, N. Acetylcholinesterase inhibition by biofumigant (Coumaran) from leaves of *Lantana camara* in stored grain and household insect pests. **BioMed Research International**, p. 1-6, 2014.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RUTTER, J. M.; MOORE, P. K. Farmacologia. 5 ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2004.

REDÍGOLO, M.M.; COSTA, I.; Vega, O. “Cadernos de ciência da conservação Volume 1. Tintas brasileiras”. Ed. Scortecci. 1ª Ed. 2020.

REFLORA - Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://reflora.jbrj.gov.br/reflora/PrincipalUC/PrincipalUC.do>> Acesso em: 06 Jul. 2022.

RETNOWATI, R.; RAHMAN, M. F.; YULIA, D. Chemical constituents of the essential oils of white turmeric (*Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe) from Indonesia and its toxicity toward *Artemia salina* Leach. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 17, n. 3, p. 393-396, 2014.

RHEE, I. K. et al. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of chromatography. A**, v. 915, n. 1–2, p. 217– 223, abr. 2001.

ROCHE, J. P. Óleos Essenciais: Um Recurso Inexplorado para o Manejo de Pragas de Insetos Urbanos. Sociedade Entomológica da América, 2022. Disponível em: <https://entomologytoday.org/2022/07/14/essential-oils-untapped-resource-managing-urban-insect-pests/>. Acesso em: 12 maio 2023.

RUST, M.K. Advances in the control of *Ctenocephalides felis* (cat flea) on cats and dogs. **Trends in Parasitology**, v. 21, n.5, p. 232-236, 2005.

SANTOS, S. A Química dos Inseticidas (parte I). **Química**, v.85, p.43-47, 2002.

SCHNEIDER, K. et al. Metabolite profiling studies in *Saccharomyces cerevisiae*: an 95 assisting tool to prioritize host targets for antiviral drug screening. **Microbial cell factories**, v. 8, p. 12, 2009.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V.E. Fitoterapia racional. 4.ed. São Paulo: Manole, p.208, 2002.

SCOTT, F. B.; MARTINS, I. V. F.; SOUZA, C. P.; CORREIA, T. R. Aspectos gerais do controle da pulga *Ctenocephalides felis felis* em cães. **A Hora Veterinária**, v. 21, n. 125, p. 13-18, 2002.

SHADNIA,S.; AZIZI, E.; HOSSEINI,R.; KHOEI,S.; FOULADDEL,S.; PAJOUMAND,A.; JALALI,N. & ABDOLLAHI,M. Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. **Human and experimental toxicology**, v.24 p. 439-445,2005.

SHAKERI, A.; KHAKDAN, F.; SOHEILI, V.; SAHEBKAR, A.; RASSAM, G. E.; ASILI, J. Composição química, atividade antibacteriana e citotoxicidade do óleo essencial de *Nepeta ucrainica* L. spp. kopetdaghensis. **Culturas e Produtos Industriais**, v. 58, p. 315-321, 2014.

SHARMA, R.P. - Organophosphates, Carbamates, and the Immune System,. In: GUPTA, R.C.; ALVES, W.M.; SKOLNICK, B.E. Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds. **Elsevier Academic Press**, San Diego. Chapter 35, p.495-507,2006.

SILVA, J.K.R., TRINDADE, R. ALVES, N.S., FIGUEIREDO, P L., MAIA, J.G.S., SETZER, W.N. Essential Oils from Neotropical Piper Species and Their Biological Activities. **International Journal of Molecular Sciences**. V.18, p. 1- 42, 2017.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre / Florianópolis: **Editora UFRGS/ Editora UFSC**, p. 467-495, 2003.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; et al. Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento. Porto Alegre: ArtMed, 2017.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. Óleos Voláteis. In: GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.;MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: Da planta ao medicamento. 6ª ed. Porto Alegre / Florianópolis: **Editora da UFSC e UFRGS**,p.467-495, 2007.

SINGH, G; SINGH, O.P.; MAURYA, S. Investigações químicas e biocidas em óleos essenciais de algumas espécies indianas de Curcuma. Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials, v.45 n.1/2, p.75–81, 2002.

SIRIRUGSA, P.; LARSEN, K.; MAKNOI, C. The genus *Curcuma* L. (Zingiberaceae): distribution and classification with reference to species diversity in Thailand. **Gardens Bulletin**, Singapore, v. 59 n.1/2, p.203–220, 2007.

SIVASOTHY, Y.; AWANG, K.; IBRAHIM, H.; THONG, K.L; FITRAH, N.; KOH, X.P.; TAN, L.K. Composição química e atividades antibacterianas de óleos essenciais de *Zingiber spectabile* Griff. **Jornal de Pesquisa de Óleos Essenciais**, v. 24, n.3, p. 305-313, 2012.

SKOOG, J.; WEST, D. A.; HOLLER, F.; DONALD, M. Fundamentos de Química Analítica - 9ª Ed. Cengage Learning, 2014.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 95-103, 2005.

SOUZA, M.T. Bioprospecção da flora aromática de um segmento de Floresta Ombrófila Mista Montana do Paraná. 2015. 88 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal - Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

SOUZA, M. C. L. Avaliação da ação inseticida e de repelência de *artemisia vulgaris* sobre *Ctenocephalides felis felis* (bouché, 1835) (siphonaptera, pulicidae) em condições de laboratório. 2013. 13f. Monografia (Especialista em Etmologia Urbana - Instituto de Biociências)- Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2013.

SRIVASTAVA, S., MEHROTRA, S., RAWAT, A. Avaliação farmacognóstica dos rizomas de *Curcuma zedoaria* Rosc. **Pharmacognosy Journal**, v.3, p. 18–24, 2011.

SRIVASTIVA N.R., LAL, B.R., KUMAR, S.V., DHIRENDRA, K. Investigação físico-química e fitoquímica de três diferentes espécies de rizoma *Curcuma*. **International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy**, v.4, p. 163–166, 2013.

SUTTON, G. P.; BURROWS, M. Biomechanics of jumping in the flea. **Journal of Experimental Biology**, v.214, n. 5, p. 836–847, 2011.

SYAMSIR, D. R. et al. Chemical constituents and evaluation of cytotoxic activities of *Curcuma zedoaria* (Christm.) roscoe oils from malaysia and indonesia. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 20, n. 4, p. 972-982, 2017.

TAIZ, L., ZEIGER, E., et al. Fisiologia e desenvolvimento vegetal, 6ª edição, **Artemed**, 2017.

TREVISAN, M. T. S. et al. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from plants to treat Alzheimer's disease. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 301– 304, 2003.

TSCHIGGERL, C., BUCAR, F. Investigation of the volatile fraction of Rosemary infusion extracts. **Scientia Pharmaceutica**, v. 78, p. 483–492, 2010.

VIMALA, S.; NORHANOM, S. V.; YADAV, M. Anti-tumour activity in Malaysian Ginger rhizobia used in traditional medicine. **British Journal of Cancer**, v. 80, p.110 - 116 ,1999.

XIANG, H. et al. Phytochemical profiles and bioactivities of essential oils extracted from seven Curcuma herbs. *Industrial Crops and Products*, v. 111, p. 298-305, 2018.

WILLIAMS, DAVID G. The chemistry of essential oils. England: Micelle, 334p, 1996.

WALL, L. E.; R. The use of essential oils in veterinary ectoparasite control: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, p. 2–11, 2013.

YANG, Y.C.; CHOI, H.C.; CHOI, W.S.; CLARK, J.M.; AHN, Y. J. Ovicidal and adulticidal activity of Eucalyptus globulus leaf oil terpenoids against *Pediculus humanus capitis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2507–2511, 2004.

YE, M. et al. Exposição ocupacional a pesticidas e saúde respiratória. **Revista Internacional de Pesquisa Ambiental e Saúde Pública**, v. 10, n. 12, p. 6442-6471, 2013.

ZANANI, R. T. F. F. et al. Eficácia da bioterapia no tratamento contra carrapatos em cães domésticos. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Jandaia-GO*, v.19, n.41, p. 103, 2022.