



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO DEPARTAMENTO
DE PÓS-GRADUAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
DA SAÚDE

CLEIDJANE GOMES FAUSTINO

**ESTUDO QUÍMICO E DA ATIVIDADE LARVICIDA E
REPELENTE DO ÓLEO ESSENCIAL DA RESINA DE
Protium heptaphyllum (Aubl.) Marchand FRENTE AO *Aedes*
(stegomyia) aegypti (Linneu 1762)**

MACAPÁ

2018

CLEIDJANE GOMES FAUSTINO

**ESTUDO QUÍMICO E DA ATIVIDADE LARVICIDA E REPELENTE DO ÓLEO
ESSENCIAL DA RESINA DE *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand FRENTE
AO *Aedes (stegomyia)aegypti* Linneu**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá-UNIFAP, como requisito para obtenção do título de mestre em ciências da saúde.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Antônio de Medeiros

MACAPÁ

2018

CLEIDJANE GOMES FAUSTINO

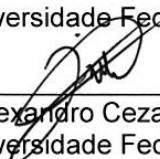
**ESTUDO QUÍMICO E DA ATIVIDADE LARVICIDA E REPELENTE DO ÓLEO
ESSENCIAL DA RESINA DE *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand FRENTE
AO *Aedes (stegomyia) aegypti* Linneu**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na
área de concentração Ensaios Biológicos,
como requisito para obtenção do título de
mestre em ciências da saúde.

DATA DE APROVAÇÃO: 05/03/2018



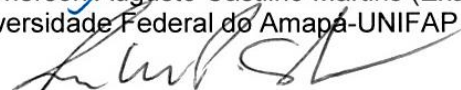
Prof. Dr. Fernando Antônio de Medeiros (Orientador)
Universidade Federal do Amapá-UNIFAP



Prof (a) Dr. Alexandre Cezar Florentino (Examinador Externo)
Universidade Federal do Amapá-UNIFAP



Prof (a) Dr. Emerson Augusto Castilho Martins (Examinador)
Universidade Federal do Amapá-UNIFAP



Prof (a) Dr. Raimundo Nonato Souto Picanço (Examinador)
Universidade Federal do Amapá-UNIFAP



Prof (a) Dr. Roberto Messias Bezerra (Examinador Suplente)
Universidade Federal do Amapá-UNIFAP

MACAPÁ

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborado por Mara Patrícia Corrêa Garcia CRB-2/1248

615.321

F268e Faustino, Cleidjane Gomes

Estudo químico e da atividade larvívica e repelente do óleo essencial da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand frente ao *Aedes (stegomyia) aegypti* Linneu / Cleidjane Gomes Faustino ; orientador, Fernando Antônio de Medeiros. - Macapá, 2018.
74 f.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

1. Atividade larvívica. 2. Óleo essencial. 4. Plantas medicinais. 5. Dengue - Prevenção. I. Medeiros, Fernando Antônio de, orientador. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

DEDICATÓRIAS

“Dedico este trabalho a Deus e aos meus pais e irmãos, a minha tia Socorro Faustino, e ao meu namorado e companheiro Fernando Medeiros por tudo que fizeram e fazem por mim”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado à sabedoria e paciência para esperar o tempo certo. Pois sem o discernimento do senhor não teria chegado aonde cheguei. Só tenho a agradecer pelos obstáculos que venci no decorrer desse caminho que suportei graças à força obtida na fé.

Aos meus pais e irmãos que me deram força e palavras amigas no decorrer da vida. Agradeço em especial a minha mãe uma guerreira que nunca mediu esforços para me ajudar, uma amiga e conselheira incansável que sempre acreditou no meu potencial. E a todos meus familiares por tudo de bom que me proporcionaram no decorrer dessa jornada. Agradeço em especial a minha tia e mãe Socorro Faustino pelo apoio e conselhos proferidos no momento certo.

Minha gratidão ao meu orientador e namorado Fernando Antônio de Medeiros, pela orientação deste trabalho de dissertação pelo profissional exemplar que é. Obrigada por sua dedicação, por muitas vezes deixou de aproveitar os seus finais de semana para me orientar.

Aos meus amigos de mestrado por tudo de bom que me ensinaram e pela oportunidade de conhecê-los. Agradeço em especial a César, Caroline, Helison. A técnica do laboratório ARTROLAB Karen pela sua dedicação e paciência em transmitir seus conhecimentos. Aos voluntários que participaram do teste de repelência o meu muito obrigada.

Aos meus professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde PPGCS pelo os ensinamentos passados.

A todos dos Laboratórios de Absorção Atômica e Bioprospecção e do Arthropoda (ARTHROLAB) da Universidade do Federal do Amapá-Unifap. Em especial aos professores Raimundo Nonato e Roberto Messias Bezerra por terem me acolhido tão bem e pela ajuda tanto experimental quanto teórica durante esse período.

A CAPES, pela concessão de bolsa de estudo durante o curso.

E aqueles que não foram citados, mas estiveram presentes nas horas em que mais precisei, seja para brindar, seja para rir, para abraçar, ou apenas compartilhar um silêncio.

Enfim, agradeço a todos que tiveram paciência comigo ao longo dessa jornada, que por vezes é estressante em seu percurso, porém é tão gratificante ao seu final.

EPÍGRAFE

Desistir nunca... O caminho é longo, mas a vitória é certa (Raphael Gouveia Monteiro).

LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS, QUADROS E TABELAS

Figura 1-	Ciclo de desenvolvimento do mosquito <i>Ae. aegypti</i>	26
Figura 2-	Mapa georeferenciado do local da coleta do material vegetal (resina e exsicata) da espécie <i>P. heptaphyllum</i> , localizado no município de Macapá, Amapá, Brasil.....	33
Figura 3-	Espectros de massas dos óleos essenciais da resina de <i>P. heptaphyllum</i> obtidos por CG-EM para: a) p-cimeno; b) α -pineno; c) α -felandreno e d) α -terpineno.....	45
Gráfico 1-	Valores médios do número de picadas avaliados em função do tempo de exposição em minutos usando a dose de 250 ppm do óleo essencial da resina de <i>P. heptaphyllum</i> e do controle negativo (veículo), frente aos mosquitos de <i>Ae. aegypti</i>	50
Gráfico 2-	Valores médios do número de picadas avaliados em função do tempo de exposição em minutos usando a dose de 500 ppm do óleo essencial da resina de <i>P. heptaphyllum</i> e do controle negativo (veículo), frente aos mosquitos de <i>Ae. aegypti</i>	51
Gráfico 3-	Valores médios do número de picadas avaliados em função do tempo de exposição em minutos usando a dose de 1000 ppm do óleo essencial da resina de <i>P. heptaphyllum</i> e do controle negativo (veículo), frente aos mosquitos de <i>Ae. aegypti</i>	52
Gráfico 4-	Valores médios do número de picadas ao longo do tempo (30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos) nas concentrações de 250, 500 e 1000 ppm do óleo essencial da resina de <i>P. heptaphyllum</i> frente ao mosquito <i>Ae. aegypti</i>	53
Gráfico 5-	Valores médios e desvio padrão do percentual de picadas ao longo do tempo (30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos) nas concentrações de 250, 500 e 1000 ppm do óleo essencial da resina de <i>P. heptaphyllum</i> frente a mosquito <i>Ae. aegypti</i>	54
Quadro 1-	Composição química de <i>P. heptaphyllum</i>	23
Quadro 2-	Rendimento do óleo essencial da resina de <i>P. heptaphyllum</i> obtido através da técnica de arraste a vapor.....	40
Quadro 3-	Apresenta os principais componentes químicos identificados Por CG-MS do óleo essencial da resina de <i>P. heptaphyllum</i> Tempo de retenção e % de rendimento.....	43
Tabela 1-	Rendimento do óleo essencial da resina de <i>P. heptaphyllum</i> obtido através da técnica de arraste a vapor.....	41
Tabela 2-	Valores médios e desvio padrão do índice mortalidade de larvas de <i>Ae. aegypti</i> para o controle negativo e as concentrações de 20, 40, 80, 100 e 160 ppm de óleo essencial da resina do <i>P. heptaphyllum</i> e aplicação dos testes Anova e Tukey.....	46

Tabela 3-	Valores médios e desvio padrão frente ao <i>Ae. aegypti</i> nas concentrações de 250, 500 e 1000 ppm e controle negativo do óleo essencial da resina do <i>P. heptaphyllum</i>	49
------------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

<i>Ae. aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BM	Biomassa Vegetal (resina)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amapá
°C	Graus Celsius
CL₅₀	Concentração Letal para Matar 50 % de Indivíduos de uma Determinada População
CL₉₀	Concentração Letal para Matar 90 % de Indivíduos de uma Determinada População
DEET	N-N-Dimetil-meta-toluamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EUA	Estados Unidos da América
g	Grama
CG-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometro de Massa
h	Hora
HAMAB	Herbário Amapaense
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
IEPA	Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá
Mg	Miligramas
mL	Militro
MS	Ministério da Saúde
Nº	Número
OMS	Organização Mundial de Saúde
<i>P. heptaphyllum</i>	<i>Protium heptaphyllum</i>
ppm	partes por milhão
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TO	Teor de Óleo Essencial
UNIFAP	Universidade Federal do Amapá
VO	Volume de Óleo Essencial

RESUMO

As plantas medicinais são utilizadas desde os primórdios da humanidade, sendo inseridas no tratamento de diversas patologias. Os óleos essenciais são constituídos de substâncias voláteis oriundos do metabolismo secundário vegetal de plantas aromáticas. São formados em células especiais encontradas em diversas partes das plantas tais como: folhas, flores, sementes, caules e raízes. Há uma diversidade de plantas que são utilizadas na fabricação de produtos larvicidas e repelentes, sendo estes utilizados na prevenção de doenças transmitidas pelo vetor *Aedes aegypti* tais como: dengue, zika, chikungunya e febre amarela. O objetivo deste trabalho é obter e caracterizar quimicamente o óleo essencial da resina de *Protium heptaphyllum* e avaliar sua atividade larvicida e de repelência frente ao *Ae. aegypti*. A resina coletada foi de espécimes de *P. heptaphyllum* foram coletadas no município de Macapá-Amapá-Brasil. O óleo essencial foi extraído pela técnica de arraste a vapor em aparelho de Clevenger. A caracterização química do óleo essencial foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometro de Massa (CG-MS) e sua atividade larvicida e de repelência foram realizadas frente ao *Ae. aegypti* através de técnicas preconizadas pelo Ministério da Saúde. Os bioensaios realizados ofereceram excelentes resultados. O rendimento do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* obteve um percentual de 3,1%. A cromatografia gasosa acoplada aos espectrômetros de massas teve como constituintes majoritários o p-cimeno (60,59%), α -pineno (12,99%) e biciclo-heptano (10,05%), representando os três juntos 83,63% da composição do óleo essencial. Para a ação larvicida do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* nas 24 horas foi encontrada uma mortalidade de 100 % nas concentrações de 100 e 160 ppm e 96 % na concentração de 80 ppm. Nas primeiras 4 horas de teste foi possível observar uma mortalidade de 98 % nas concentrações de 100 e 160 ppm. Através dos resultados do ensaio larvicida foi possível estabelecer uma CL₅₀ de 28,66 ppm e CL₉₀ de 82,0 ppm para o tempo de 48 horas após aplicação deste. Com relação à atividade repelente do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum*, foi possível obter nos tempos de 150 e 180 minutos uma proteção maior, mostrando que com o passar do tempo o produto não perde seu efeito.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Prevenção. Dengue.

ABSTRACT

Medicinal plants have been used since the beginning of mankind, being inserted in the treatment of various pathologies. Essential oils are constituted of volatile substances originating from the secondary metabolism of aromatic plants. They are formed in special cells found in various parts of plants such as leaves, flowers, seeds, stems and roots. There are a variety of plants that are used in the manufacture of larvicidal products and repellents, which are used to prevent diseases transmitted by *Aedes aegypti* vector such as dengue, Zika, Chikungunya and yellow fever. The objective of this work is to obtain and characterize the essential oil of *Protium heptaphyllum* resin and to evaluate its larvicidal and repellency activity against *Ae. aegypti*. The resin collected from specimens of *P. heptaphyllum* were collected in the municipality of Macapá-Amapá-Brazil. The essential oil was extracted by the steam entrainment technique in a Clevenger apparatus. The chemical characterization of the essential oil was performed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometer (GC-MS) and its larvicidal and repellency activity were performed against *Ae. aegypti* by techniques recommended by the Ministry of Health. The bioassays performed offered excellent results. The yield of the essential oil of the *P. heptaphyllum* resin obtained a percentage of 3.1%. The gas chromatography coupled to mass spectrometers had as main constituents p-cymene (60.59%), α -pinene (12.99%) and bicycloheptane (10.05%), all three of which together represented 83.63 % of the composition of the essential oil. For the larvicidal action of *P. heptaphyllum* resin essential oil at 24 hours a 100% mortality was found at concentrations of 100 and 160 ppm and 96% at the concentration of 80 ppm. In the first 4 hours of the test it was possible to observe a mortality of 98% in concentrations of 100 and 160 ppm. Through the results of the larvicidal assay it was possible to establish a LC50 of 28.66 ppm and LC90 of 82.0 ppm for the time of 48 hours after application of this. With respect to the repellent activity of the essential oil of *P. heptaphyllum* resin, it was possible to obtain a greater protection in the times of 150 and 180 minutes, showing that with the passage of time the product does not lose its effect.

Keywords: Medicinal plants. Prevention. Dengue.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1.1	Plantas Medicinais e Óleos Essenciais	18
1.1.2	Considerações sobre a Família Burseraceae e Descrição Botânica.....	20
1.1.3	Gênero <i>Protium</i>.....	20
1.1.4	Considerações Botânicas e Químicas de <i>Protium heptaphyllum</i>.....	22
1.1.5	Mosquito do Gênero <i>Aedes</i>.....	25
1.1.6	Doenças Transmitidas por Mosquito Hematófago: <i>Aedes aegypti</i>....	27
1.1.7	Atividade Larvicida e de Repelência.....	29
5	OBJETIVOS.....	32
5.1	OBJETIVO GERAL.....	32
5.2	OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	32
6	METODOLOGIA.....	33
6.1	COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	33
6.2	EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE RENDIMENTO.....	34
6.3	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DA RESINA DE <i>Protium heptaphyllum</i>.....	35
6.4	ENSAIO BIOLÓGICOS.....	36
6.4.1	Obtenção das Larvas do <i>Aedes aegypti</i>.....	36
6.4.2	Avaliação da Atividade Larvicida Frente ao <i>Aedes aegypti</i>.....	36
6.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE REPELENTE FRENTE AO MOSQUITO <i>Aedes aegypti</i>.....	37
6.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
7	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	41
7.1	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA RESINA DE <i>P. heptaphyllum</i>.....	41
7.2	PERFIL CROMATOGRÁFICO DO ÓLEO ESSENCIAL DA RESINA DE <i>P. heptaphyllum</i> E PRINCIPAIS CONSTITUINTES.....	42
7.3	ATIVIDADE LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DA RESINA DE <i>P. heptaphyllum</i> FRENTE ÀS LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i>	46
7.4	DETERMINAÇÃO DA CL₅₀ E CL₉₀ DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Protium heptaphyllum</i> FRENTE ÀS LARVAS DO <i>Aedes aegypti</i>.....	47
7.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE REPELÊNCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DA RESINA DE <i>Protium heptaphyllum</i>.....	48
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
	REFERÊNCIAS.....	58
	APÊNDICE.....	72
	ANEXOS.....	74

1 INTRODUÇÃO

Desde os tempos remotos o ser humano busca nos recursos naturais meios para melhorar sua qualidade de vida e consequentemente ampliar as chances de sobrevivência. As civilizações primitivas observando as plantas utilizadas na alimentação foram experimentando-as no combate às doenças, as quais muitas apresentaram eficácia curativa, ainda que empiricamente. Essas informações foram sendo passadas para as gerações seguintes (CUNHA, 2007).

O uso de plantas medicinais foi uma das primeiras manifestações da humanidade em relação à busca de meios que pudessem aliviar suas dores e enfermidades. A explicação para os bons resultados nas ações: analgésica, antiinflamatório, antifúngica entre outras se dá pelo fato da farmacologia ter como uma das principais fontes de princípios ativos as plantas. O trabalho com plantas medicinais inicia-se na identificação da espécie, coleta adequada, pré-tratamento e armazenamento correto, passando pelos estudos químicos, farmacológicos (pré-clínicos e clínicos, desenvolvimento tecnológicos, controle de qualidade, entre outros) e termina com a utilização, que também devem ser adequados para que os resultados sejam satisfatórios (HAMILTON, 2003).

Dentre as diversas práticas de utilização das plantas medicinais o uso de óleos essenciais como agentes terapêuticos é evidenciado desde a antiguidade, é o que relatam os registros históricos de mais de seis mil anos atrás, que traz desde práticas religiosas entre os Egípcios, integradas à cura de males, às unções da realeza e à busca de bem-estar físico (TYRREL, 1990).

Historicamente os produtos naturais têm um papel importantíssimo no desenvolvimento de agentes inseticidas, sendo conhecida como inseticidas botânicos e, juntamente como os inseticidas inorgânicos (arsenicais, fluorados, entre outros), fizeram parte da chamada Primeira Geração de inseticidas, tendo como principais representantes, piretro, rotenona e nicotina (CASIDA; QUISTAD, 1998; FARIA, 2009). Essas substâncias fizeram do Brasil, em meados do século XX, um dos maiores produtores e exportadores de inseticida botânico do mundo (MENEZES, 2005). O uso desses inseticidas se manteve até início da década de 40 quando o entomologista suíço Paul Müller, em 1939, descobriu as propriedades inseticidas do diclorodifeniltricloroetano (DDT) no combate ao mosquito transmissor

da malária, descoberta esta que lhe rendeu o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina (FARIA, 2009), e surgindo a chamada Segunda Geração de inseticida.

O uso exagerado do DDT levou ao surgimento de resistência ao inseticida, ao aparecimento de problemas ambientais, devido à alta toxicidade desses produtos sintéticos, e sua proibição na década de 70 em muitos países (D'AMATO, et al., 2002).

Atualmente a crescente preocupação da sociedade por produtos cada vez mais seguros ao meio ambiente e ao homem, que não causem efeitos nocivos a organismos não-alvos, fez ressurgir à busca por inseticidas botânicos (VENDRAMIM; CASTIGLIONI, 2000). Dentre os produtos naturais para fins inseticidas, os óleos essenciais são considerados os mais importantes (COSIMI, et al., 2009), devido a sua alta lipofilicidade, propriedade esta que proporciona um maior poder de penetração no tegumento do inseto (KIM et al., 2003). Podendo agir desde enzimas digestivas até as neurológicas (ISMAN, 2006).

Outras linhas de interesse dos óleos essenciais são suas propriedades larvicida e repelente de insetos. Estudos têm demonstrado que diversos óleos essenciais apresentam um excelente efeito larvicida e repelente para as mais diversas espécies de insetos (ISMAN, 2000). Assim sendo, a comunidade científica vêm cada vez mais realizando estudos que empregam os óleos essenciais no combate a mosquitos transmissores de endemias, a exemplo do *Aedes* e *Anopheles*, haja visto o grande número de casos de doenças transmitidas por estes.

Segundo dados do Ministério da Saúde, o Brasil registrou mais de 1.600.000 casos de dengue em 2015, com 863 óbitos confirmados, e mais de 20.000 casos da febre chikungunya, com previsão de 3 a 4 milhões de casos de Zika em 2016 no continente americano (BRASIL, 2015). O crescente número de novos casos de dengue, chikungunya e mais recentemente da Zika no Brasil, assim como em outros países, caracterizam essas endemias como um grande problema de saúde pública mundial, fazendo-se necessário e urgente à busca de alternativas que possam fazer o controle do vetor dessas doenças.

A utilização de plantas medicinais, sobre tudo as produtoras de óleos essenciais, com propriedades capaz de atuar em diversas fases de desenvolvimento do vetor, se apresenta como uma das formas mais promissoras de controle dessas endemias (ROEL, 2001). Neste sentido este trabalho se propõe a avaliar atividade

larvicida e de repelência do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum*, conhecida popularmente por breu branco frente ao mosquito *Ae. aegypti*.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Plantas Medicinais e Óleos Essenciais

Os produtos do metabolismo vegetal que são sintetizados e degradados por várias reações anabólicas e catabólicas estão divididos em dois grandes grupos: o dos metabólitos primários, oriundos dos processos fotossintéticos que incluem carboidratos, óleos, gorduras e proteínas, que estão envolvidas nas reações bioquímicas comuns para todas as plantas e dos metabólitos secundários que apresentam estruturas complexas, baixo peso molecular e marcantes atividades biológicas (VON POSER, 2004).

Alguns autores acreditam que a sobrevivência de uma determinada espécie não está assegurada unicamente pelo fato dela garantir sua reprodução e defende-se de predadores, mas a qualquer intempérie que haja sobre sua sobrevivência. Os metabólitos secundários são substâncias químicas que tem por função atuar como mecanismos de defesa contra ataque de predadores e as eventuais mudanças ambientais que estão presentes nos vegetais em concentrações distintas e variam de acordo com a parte da planta (DEWICK, 2009; CARVALHO, 2004; GARCEZ et al., 2013).

A presença de metabólitos secundários nas plantas também varia de acordo com o local e exposição que esta sofre por diversos fatores ambientais externos e internos. A estes constituintes são referidas ações farmacológicas seja isoladamente ou em conjunto com outros compostos o que chamamos de fitocomplexo (CAPASSO; GRAHDOLINI; MASCOLO, 2000).

Em relação às interferências externas, a temperatura e a luminosidade apresentam um papel relevante na fotossíntese, pois a interação destes fatores garante um ambiente ideal para o processo fisiológico. Porém, quando em excesso a essas variações ocorrem alterações na produção de metabólitos secundários. Entretanto, algumas espécies se adaptam ao seu habitat natural e são capazes de resistir a essas mudanças de temperatura. Observa-se esse fenômeno quando plantas produtoras de óleo essencial em períodos em que a temperatura elevada provoca a perda excessiva dessas substâncias voláteis, mesmo que esta espécie vegetal seja de clima semiárido (SOUZA et al., 2008).

A prática de uso dos produtos naturais, particularmente da flora com fins medicinais teve, início praticamente com a humanidade. Os vestígios do uso de plantas medicinais foram encontrados nas civilizações mais antigas considerando-se uma das práticas mais remota que o homem utilizava para cura, prevenção e tratamento de doenças servindo como importante fonte de compostos biologicamente ativos (ANDRADE; CARDOSO; BASTOS, 2007).

O uso de plantas para fins curativos é favorecido devido a pouca quantidade de espécies que demonstram toxicidade e a fácil obtenção e aceitação pela população, somado à eficácia de seus constituintes comprovados em estudos experimentais, e a viabilidade econômica de se produzir a partir de produtos oriundos de origem vegetal. Aumentando o interesse em desenvolver pesquisas para comprovação e efetivação de suas respectivas atividades biológicas (VIEGAS JÚNIOR, 2003).

A fitoterapia baseia-se na cura de doenças através das plantas ou partes destas. Dentre as diversas formas utilizadas com as plantas o uso dos óleos essenciais é uma das práticas mais comuns pelos adéquo desta terapia. Os óleos essenciais são constituídos de diversas substâncias voláteis encontradas em minúsculas glândulas nos mais diversos locais da planta tais como: partes externas e centrais das raízes, caule, folhas, flores ou frutos (PRICE, 1999).

Mesmo utilizando o termo “óleo”, não são obrigatoriamente gordurosos e diferenciam-se dos óleos fixos por serem altamente voláteis. Os óleos essenciais são substâncias orgânicas com aromas fortes ou perfumadas, frequentemente a sua consistência é aquosa e límpida pode se firmar em temperaturas menores. São solúveis em álcool, éter e em alguns compostos graxos, podendo ser incolores ou demonstrar alguns tons claros ou inclusive fortes e opacos. Os óleos essenciais são chamados de voláteis porque quando, expostos ao ar em temperaturas ambiente evaporam, podem ser chamados nas mais diversas formas refringentes ou etéreos, porém o termo mais empregado é o de óleo essencial, pois o mesmo representa as essenciais ou os compostos odoríferos das plantas (ANDREI; COMUNE, 2005).

Os óleos essenciais são compostos de elementos orgânicos tais como: carbono, oxigênio e hidrogênio, produzindo então moléculas de alcoóis, aldeídos, ésteres, óxidos, cetonas, fenóis, hidrocarbonetos, ácidos orgânicos, compostos orgânicos nitrogenados e sulfurados e terpenos. Demonstram composição complexa, com exceção do sândalo, que contém 95% do mesmo componente

(santalol) e os outros 5% de composição diversa. A relevante importância econômica e ecológica é relacionada aos terpenos, que são incolores, amarelados (se associados aos carotenóides) ou esverdeados (se associados às clorofilas) (ANDREI; COMUNE, 2005).

As principais atividades relatadas a óleos essenciais são atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, anticolinesterásica, antiparasitária, analgésica, sedativa, antitumoral, entre outras (PURNHAGEN, 2010). Nos últimos anos as pesquisas envolvendo substâncias com potencial ação repelente e inseticida estão voltadas a espécies que produzem óleos essenciais que, devido à sua volatilidade e baixa persistência se, degradam rapidamente no meio ambiente, além de serem capazes de agir nas funções fisiológicas e bioquímicas dos insetos (ARIDOGAN et al., 2002; ISMAN, 2000; SANTOS et al., 2010; COITINHO et al., 2011).

1.1.2 Considerações Sobre a Família Burseraceae e Descrição Botânica

Segundo um estudo realizado por Maia et al., (1998), as famílias mais predominantes na produção de óleos essenciais na Amazônia são: Annonaceae, Aristolochiaceae, Asteraceae, Bignoniaceae, Burseraceae, Caesalpiniaceae, Cyperaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Gramineae, Lamiaceae, Lauraceae, Mimosaceae, Monimiaceae, Myristicaceae, Myrtaceae, Phytolaceae, Piperaceae, Rutaceae, Scrophulariaceae, Verbenaceae, e a família da Zingiberaceae.

A Burseraceae é uma família de plantas angiospérmicas distribuídas entre 20 gêneros com mais de 800 espécies. Espécies, tendo uma característica marcante à resina aromática e estando presente na maior parte das espécies. Sua distribuição ocorre em qualquer um dos trópicos, mas apresenta uma vasta riqueza na América do Sul. Espécies de Burseraceae são endêmicas na região amazônica sendo, relatado no Brasil sete gêneros: *Bursera*, *Commiphora*, *Crepidospermum*, *Dacryodes*, *Protium*, *Tetragastris* e *Trattinnickia* (DALY, 1987; ANDRADE; HIGUCHI, 2009; RÜDIGER et al., 2007; MARQUES et al., 2010).

As espécies desta família podem alcançar até 25 metros de altura, apresentam tronco espesso de 50 a 60 cm de diâmetro na sua base a, casca da

árvore com coloração vermelho-escuro, o caule possui ductos verticais esquizógenos proeminentes, apresenta folhas opostas, com flores miúdas em panículas terminais, suas flores são avermelhadas dispostas em inflorescências fasciculadas axilares, actinomorfas, diclamídeas com corola dialipétala e ovário súpero, seus frutos do tipo cápsula são coriáceos e deiscentes e possuem pericarpo avermelhado quando maduro, e os frutos são drupas avermelhadas possuindo quatro sementes (CARLQUIST, 1992; MATOS, 1997).

As espécies da família Burseraceae são atrativas para comercialização e exploração sustentável da região amazônica através de manejo florestal e, são bastante exploradas economicamente como fonte de matéria prima para perfumes devido à produção de uma seiva oleosa rica em óleo essencial e triterpenos (LANGENHEIM, 2003). Muitos ribeirinhos e indígenas utilizam o *P. heptaphyllum* o breu branco como é conhecido popularmente, para calafetar canoas e embarcações aumentando a resistência das madeiras de baixa densidade ao ataque de organismos xilófagos e decompositores (LORENZI, 1998).

1.1.3 Gênero *Protium*

A floresta Amazônica apresenta uma grande diversidade de espécies vegetais das quais muitas nem foram descobertas. O gênero *Protium* é encontrado em abundância nesta região com 73 plantas, sendo 42 endêmicas, representando uma concentração mais de 60% de todas as espécies (FINE et al., 2005).

O gênero mais estudado da família Burseraceae é o *Protium* encontrado, extensamente na floresta amazônica com, 146 espécies. As espécies que constituem o gênero de ocorrência no Brasil são *Tetragastris panamensis*, *P. nitidum*, *Trattinickia rhoifolia* e *P. subsserratum* (BATISTA, CARVALHO, 2006). Na medicina popular, é empregado como repelentes de insetos, expectorantes e no tratamento de distintas patologias, tendo comprovações para atividade anti-inflamatória, antinociceptiva, imunoestimulante e antineoplásica (MIRANDA et al., 2000; FINE et al., 2005; MELO et al., 2007).

O gênero *Protium* produz uma resina de alto valor comercial e uso extensivo pela população em geral. Ela é secretada de maneira natural ou por lesões feitas no tronco das árvores e em determinados casos é, possível encontrar pequenas

quantidades de resina aderida ao tronco. Conforme a resina entra em contato com o ar inicia-se o processo de endurecimento formando pelotas que se desprendem com relativa facilidade por vezes se acumulando no solo e em volta do tronco (PLOWDEN, 2001).

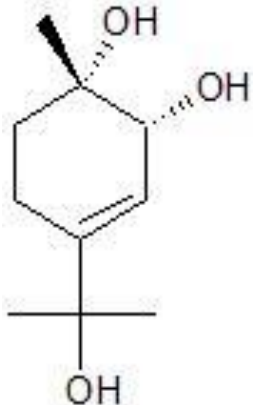
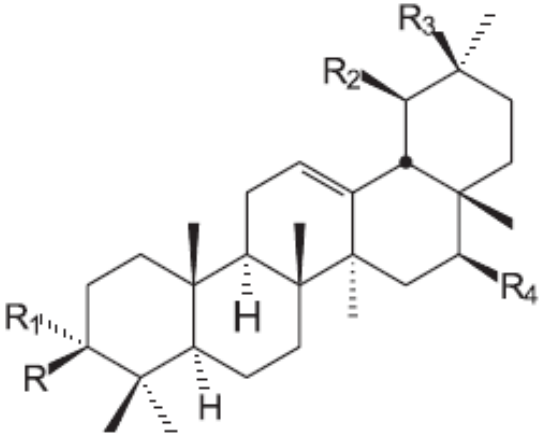
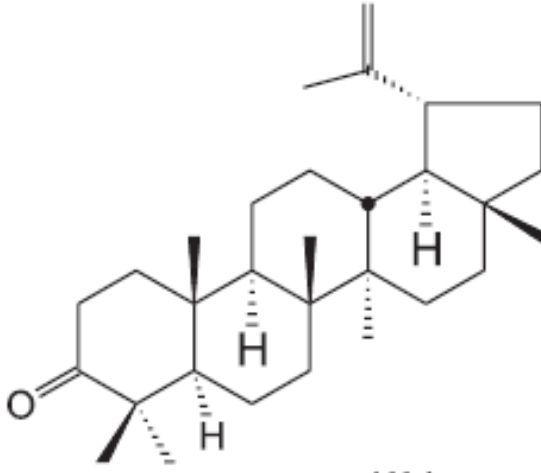
Quanto aos gêneros da família o *Bursera* apresenta forte potencial farmacológico, entre as espécies estudadas com atividades comprovadas estão *B. Graveolens* com ação antimicrobiana e anti-inflamatória (ROBLES et al., 2005). O extrato etanólico de *B. odorata*, que inibiu linhagens celulares HCT-116 (células do câncer do colo retal humano) (MURILLO-ÁLVAREZ et al., 2001). Já o *B. tokinensis* apresentou atividade citotóxica contra as linhas celulares de KB (carcinoma humano oral), (câncer do colón humano) e LNCAP (câncer de próstata humano) (JUTIVIBOONSUK et al., 2005).

No estudo realizado por Vitor et al.,(2009), com a resina de *P. Kleinii*, foram isolados dois terpenos: α e β -amirina ainda no mesmo trabalho foi demonstrado a atividade anti-inflamatória da espécie através de modelo de colite ulcerativa suprimindo a interleucina1 e a COX-2 ocorrendo o aumento de interleucina 10. *P. kleinii*, destaca-se a atividade antinociceptiva do triterpeno isolado breína (OTUKI et al., 2001). Há ainda a espécie *P. bahianum*, onde a resina envelhecida demonstrou atividade repelente (PONTES et al., 2007)

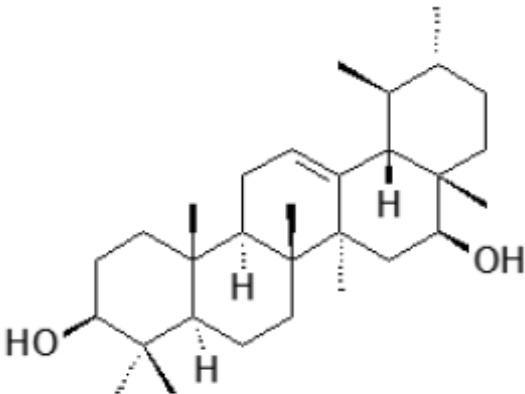
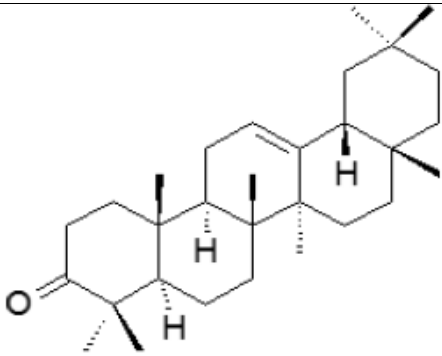
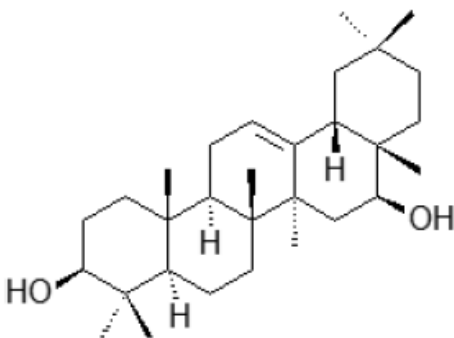
1.1.4 Considerações Botânicas e Químicas de *Protium heptaphyllum*

A espécie *P. heptaphyllum* é conhecido popularmente como almecegueira, breu-branco-verdadeiro, almecegueira cheirosa, goma limão, almécega do Brasil, breu, incenso, breu branco verdadeiro, pau de breu, árvore de incenso, ibiracica entre outras denominações, Ocorre em todo Brasil sendo largamente encontrada na região amazônica. A resina é constituída por substâncias terpênicas, sendo o óleo essencial rico em monoterpenóides (VIEIRA JÚNIOR; SOUZA; CHAVES, 2005; VIEIRA JÚNIOR et al., 2007). Alguns constituintes químicos relatados para *P. heptaphyllum* estão descritos no Quadro 1 com suas respectivas estruturas químicas.

Quadro 1- Composição química de *P. heptaphyllum*

Substância	Referência
 (<i>p</i>-ment-3-eno-1, 2,8-triol)	Bandeira et al., 2002
 α-amirina	Vieira Júnior; Souza; Chaves, 2005.; Vieira Júnior et al., 2007.
 Leupenona	Vieira Júnior; Souza; Chaves, 2005.;

Continua

 Breina	Vieira Júnior et al., (2005)
 β-amirenonda	Vieira Júnior et al.,(2005)
 Maniladiol	Vieira Júnior et al.,(2005)

Conclusão

Entre as atividades farmacológicas descritas na literatura de *P. heptaphyllum* estão, à atividade ansiolítica e antidepressiva (ARAGÃO et al., 2006); hepatoproteção (OLIVEIRA et al., 2005); gastroprotetora (ARAUJO et al., 2011); antidermatofítica (HOUËL et al., 2015) e citostática contra células tumorais (TAYLOR et al., 2013).

1.1.5 Mosquito do Gênero *Aedes*

O *Ae. aegypti* é proveniente da África ocorrendo sua inserção nas Américas durante o período da colonização é prevalente em áreas tropicais e subtropicais (BRAGA; VALLE, 2007). O mosquito *Ae. aegypti* pertence à família Culicidae, filo Arthropoda, classe Hexapoda e ordem Díptera, e destaca-se como vetor de doenças como: dengue, zika, chikungunya e febre amarela. O gênero *Aedes* só foi descrito em 1818 logo verificou-se que a espécie *Ae.aegypti* descrita anos antes apresenta, características morfológicas e biológicas semelhantes às de espécies do gênero *Aedes* não às do já conhecido gênero *Culex* então foi estabelecido o nome *Ae aegypti* (BRASIL, 2001).

O desenvolvimento urbano associado à falta de controle sanitário e coleta de lixo inadequado favoreceu, a proliferação deste mosquito hematófago através de criadouros naturais e domiciliares. Mais presentes em áreas urbanas e regiões com alta densidade populacional, onde as fêmeas do mosquito possuem maior disponibilidade de alimentos e locais para desova. Outro fator que favorece a presença destes insetos é o clima a elevação da temperatura propicia a eclosão de ovos até alcançar a fase adulta do mosquito *Ae. aegypti* (BARRET et. al., 2006).

Outro fator que também atrai o mosquito *Ae. aegypti* é o suor humano, o qual apresenta um cheiro forte produzindo e liberando substâncias atrativas aos mosquitos, e dependendo da raça se torna mais concentrado e atrativo para várias espécies de mosquitos. Entre essas substâncias duas merecem uma atenção especial: o ácido láctico e dióxido de carbono (CO_2), que em diferentes quantidades no organismo atraem mosquitos hematófagos (MUKANANA et al., 2004). Na pele humana o ácido láctico é o produto final da glicólise durante o metabolismo anaeróbico das células mioepiteliais das glândulas sudoríparas ecrinas, que estão presentes em todo o corpo em grande quantidade e desempenham um papel importante na termorregulação (TORRES-ESTRADA; RODRIGUEZ, 2003).

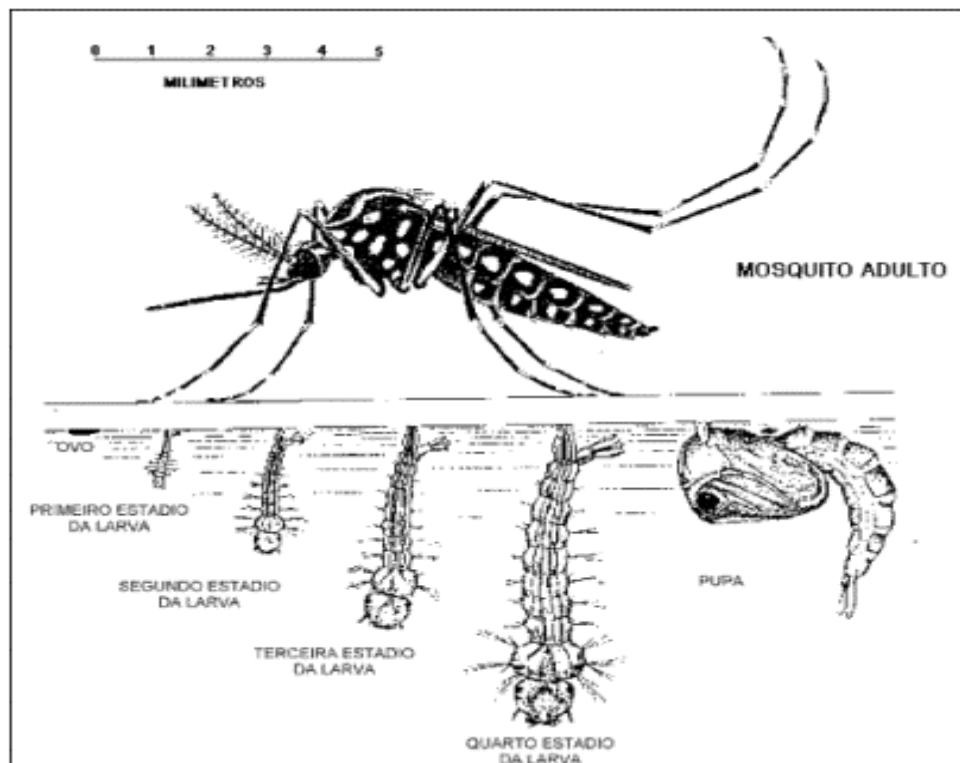
O sucesso das fêmeas em realizar o repasto sanguíneo depende da localização do hospedeiro. Sendo assim, estímulos internos e externos combinados desencadeiam alguns eventos com a finalidade de facilitar o seu encontro com os mosquitos. Os mosquitos fêmeas sugam sangue para produzir ovos. Se o mosquito da dengue estiver infectivo poderá transmitir o vírus da dengue neste processo. Em geral, os mosquitos sugam uma só pessoa a cada lote de ovos, entretanto o

mosquito *Ae. aegypti* tem uma peculiaridade que se chama “discordância gonotrófica” que significa capacidade de picar mais de uma pessoa para um mesmo lote de ovos que se produz (TORRES-ESTRADA; RODRIGUEZ, 2003).

Nas condições adequadas após, a alimentação da fêmea ocorre a postura dos ovos, que inicialmente apresentam uma coloração branca e com o passar do tempo adquirem uma cor negra devido ao contato com o oxigênio e, medem aproximadamente 0,4mm de comprimento. Os ovos apresentam uma resistência ao ressecamento e com isso permanecem no ambiente por até 450 dias o que constitui uma grande vantagem, pois sobrevivem por vários meses em ambientes secos se tornando viáveis e propícios a eclosão após um período chuvoso (BRASIL, 2012).

A fase de larva do *Ae. aegypti* é o período onde ocorre a alimentação e crescimento do mosquito. Sendo dividido em quatro fases estágios: L1, L2, L3 e o L4 que pode perdurar por várias semanas antes de se transformar em pupa. Quando a quantidade de larvas existentes é proporcional à disponibilidade de alimento e água no criadouro o seu desenvolvimento é rápido para a fase adulta. Se o espaço e a alimentação forem insuficientes ocorre uma competição entre as larvas criando um obstáculo ao amadurecimento do inseto para a fase adulta (BRASIL, 2001).

Figura 1 – Ciclo de desenvolvimento do mosquito *Ae. aegypti*



Fonte: (BRASIL, 2015)

Enquanto que na fase de larva ocorre à alimentação e crescimento, na fase de pupa não há alimentação. Há apenas a transformação para o inseto adulto esta fase do ciclo tem a duração de dois a três dias. Geralmente mantêm-se inativas flutuantes um par de tubos respiratórios ou "trompetas" garante a sua respiração (BRASIL, 2001).

O mosquito na fase adulta apresenta-se com faixas brancas nas bases dos segmentos tarsais e um desenho em forma de lira no mesonoto, o mosquito adulto procura pousar sobre superfícies verticais, após ele emergir da fase de pupa permanece durante várias horas para amadurecimento do exoesqueleto das asas e no caso dos machos a rotação da genitália em 180° (BRASIL, 2001).

O acasalamento ocorre após poucos dias da fase adulta geralmente, durante o voo e, uma única cópula é suficiente para que a produção de ovos da fêmea perdure durante toda a sua vida já que estes ficam armazenadas na espermateca (BRASIL, 2001).

Após a cópula as fêmeas alimentam-se de sangue necessário para o desenvolvimento dos ovos e sua maturação podendo ocorrer, mais de um repasto quando este não for o suficiente para atender as demandas nutricionais (BRASIL, 2001).

1.1.6 Doenças Transmitidas por Mosquito Hematófago: *Aedes aegypti*

Os mosquitos são insetos pequenos hematófagos disseminados mundialmente e causam muita preocupação para as autoridades sanitárias por serem vetores de doenças infecciosas que causam milhares de mortes em todo o mundo. Todos os anos o *Ae. aegypti* vem acometendo crianças e idosos de forma mais agressiva, principalmente em países em desenvolvimento. Com mais de 3000 espécies de mosquitos quatro gêneros são transmissores de doenças em humanos: *Culex*, *Anopheles* e *Mansonia* e o *Ae. aegypti* (BRASIL, 2013; MISNI; NOR; AHMAD, 2017).

O principal vetor da dengue no Brasil e nas Américas são as fêmeas do mosquito *Ae. aegypti*. O agente causador é um arbovírus do gênero *Flavivírus*, família *Flaviviridae* e apresenta quatro sorotipos: DEN-1, DEN-2, DEN-3, e DEN-4. Todos os sorotipos podem levar a quadros graves da doença. A fêmea do mosquito

tem atividade diurna e a transmissão da doença ocorre após o repasto sanguíneo em um hospedeiro contaminado pelo arbovírus. O período de transmissibilidade da doença ocorre tanto no mosquito quanto no homem através de dois ciclos: período de incubação extrínseco e período de incubação intrínseco que dura de 3 a 15 dias (BRASIL, 2008).

A dengue manifesta-se clinicamente através de sinais e sintomas inespecíficos: febre súbita que pode durar de dois a sete dias, dor de cabeça frontal e retro-orbital, dores no corpo, mialgia, náusea e vômito, fraqueza e erupção cutânea, alguns pacientes ainda apresentam anorexia, alteração da sensação de gosto e dor de garganta (RIBEIRO et al., 2006; OMS, 2010; BRASIL, 2013).

O Zika é um vírus de RNA e fita simples transmitido pelo mosquito *Ae. aegypti* que, causa uma doença febril aguda leve semelhante à dengue. A transmissão normalmente ocorre durante o repasto do mosquito, mas há evidências de transmissão do vírus por via congênita. O diagnóstico diferencial é feito principalmente para dengue e chikungunya, após o descarte das mesmas é incluído um teste para zika. Muitas pessoas infectadas com o ZIKV não manifestam sintomas ou apresentam uma forma branda da doença, seus sintomas mais comuns são: febre, exantemas, artralgias, conjuntivite, mialgia e dor cefaléias com duração máxima de uma semana. Em geral os sintomas não incomodam o suficiente para se buscar atendimento médico (OLIVEIRA MELO et al., 2016).

A infecção pelo vírus Zika na gravidez vem provocando danos a saúde e desenvolvimento do bebê tais como: aumento dos casos de microcefalia congênita e outras complicações neurológicas. O vírus da Zika tem atração pelo sistema nervoso e já se sabe que se multiplica no cérebro do feto quando atravessam à via placentária, as lesões neurológicas que ocorrem ainda estão sendo investigadas para identificar o mecanismo de ação do vírus (SCHULER-FACCINI, 2015).

A chikungunya é uma doença causada pelo vírus membro da família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*. A doença causada pelo CHIKV conhecida como febre chikungunya é caracterizada clinicamente por: febre, cefaléia, mialgias, exantema e artralgia. Em algumas pessoas a sintomatologia pode persistir por meses ou anos e às vezes evolui para artropatia crônica incapacitante. O impacto da infecção pelo CHIKV na gravidez vem sendo amplamente estudado com evidências de alto risco para abortamento no primeiro trimestre e transmissão materno fetal no último trimestre (GÉRARDIN et al., 2008).

O vírus da febre amarela pertence ao gênero *Flavivírus* da família *Flaviviridae* (do latim *flavus* = amarelo), ele pertence ao mesmo gênero e família de outros vírus responsáveis por doença ao ser humano entre as quais a dengue. A febre amarela é uma doença infecciosa aguda, febril, não contagiosa de curta duração (no máximo de 12 dias) e de gravidade variável. As manifestações clínicas podem ser representadas pelas fases evolutivas da doença e à forma mais grave pode levar à morte por insuficiência hepática e renal (LOPES, 2009).

A febre amarela é transmitida ao homem pela picada do mosquito fêmea infectada possui caráter sazonal sendo mais frequente entre os meses de janeiro e abril, quando fatores ambientais propiciam o aumento da densidade vetorial. Atualmente são reconhecidos dois ciclos básicos de circulação do vírus da febre amarela: um urbano simples do tipo homem-mosquito-homem em que o *Ae. aegypti* é o principal vetor. E outro ciclo é o silvestre envolvendo diferentes espécies de mosquitos (TAUIL, 2010).

Atualmente medidas estão sendo empregadas para o controle e erradicação das doenças transmitidas pelo mosquito *Ae. aegypti*, através de incentivos a pesquisas para produção de vacinas e novos produtos capazes de agir nas funções fisiológicas e bioquímicas deste vetor (BRASIL, 2009).

1.1.7 Atividade Larvicida e de Repelência

Para a realização do controle do mosquito *Ae. aegypti*, estão sendo realizadas intervenções nas áreas: de saneamento do meio ambiente, atividades de educação que visam à diminuição dos criadouros que são fontes potenciais de disseminação deste mosquito e o seu combate direto por meio de agentes químicos, físicos e biológicos (TEIXEIRA et al., 2002).

Vários métodos estão sendo utilizados no combate do *Ae. aegypti*, tem sido utilizado a aplicação de substâncias químicas para o controle de mosquitos vetores de doenças. Para as formas imaturas são utilizados os larvicidas para larvas e ovicida para ovos, e inseticidas para os mosquitos na fase adulta (FORATTINI, 2002). As estratégias utilizadas para o controle do *Ae. aegypti* no Brasil são

principalmente os inseticidas químicos onde se destacam os organofosforados e piretróides (LUNA et al., 2004).

Para a fase larval utiliza-se outra forma de atuação como medida preventiva a ação contra larvas geralmente ocorre através de contato ou ingestão da substância tóxica. A ação de contato ocorre quando a substância é liberada no meio ambiente e atinge a superfície corpórea das larvas ou suas vias respiratórias causando a morte (KATHRINA; ANTONIO, 2004; MENEZES, 2005).

Quando atuam por ingestão a penetração da substância por via oral vai danificar o sistema digestório e a biossíntese de hormônios da ecdise ou a formação da camada de quitina da cutícula do inseto provocando uma diminuição do peristaltismo (movimentos intestinais). Resultando numa acentuada perda de apetite o que pode resultar na morte do inseto por inanição (KATHRINA; ANTONIO, 2004; MENEZES, 2005).

Essas medidas de contenção do vetor são vantajosas e promissoras visto que o desenvolvimento até a forma adulta pode levar até 10 dias para completar-se, por isso a eliminação deste estágio de vida do mosquito é fundamental (BRASIL, 2009).

Os repelentes são substâncias químicas que efetuam sobre os mosquitos adultos uma ação de inibir o comportamento de busca pelo hospedeiro. Os repelentes sintéticos como o N, N-dietil-3-metilbenzamida (DEET), utilizados principalmente em áreas endêmicas de forma extensiva para proteção contra picadas de mosquitos. Apresentam como desvantagem reações cutâneas como: alergia, sensibilidade, toxicidade etc. A resistência aos mosquitos se dá ao fato destes deixarem resíduos no meio ambiente (CHOU et al., 1997; NENTWIG, 2003; CANEPPELE et al., 2010; RIBAS; CARREÑO, 2010).

Entretanto, assim como ocorre com os repelentes sintéticos os larvicidas comercializados deixam resíduos no meio ambiente causando danos e degradação ambiental. O controle químico do vetor ainda é uma das formas mais utilizadas principalmente por meio de aplicações de inseticidas organofosforados e piretróides (BRASIL, 2009). Porém, o uso frequente e descontrolado desses produtos têm evidenciado o aparecimento de populações resistentes de mosquitos causando danos ambientais provocados por seu uso intensivo (LUNA et al., 2004; CARVALHO; SILVA, 2000; POLANCZYK et al., 2003).

O fumacê que vem sendo utilizado no combate aos mosquitos do *Ae. aegypti*, causa muitos malefícios a saúde humana. Pois, o mesmo tem em sua composição

Malathion considerado pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) como potencialmente cancerígeno para os seres humanos (VALLE, PIMENTA, CUNHA, 2015).

Nesse contexto a procura por alternativas seguras ao controle dos vetores é de extrema importância para a saúde pública. Com a descoberta de novas substâncias que sejam efetivas na prevenção de pragas e ofereçam segurança e viabilidade econômica aplicáveis aos programas integrados de controle de insetos para eliminação de doenças provocadas por estes além de possuir baixo impacto ambiental (VIEGAS JÚNIOR, 2003).

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Extrair e caracterizar quimicamente o óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* e avaliar sua atividade larvícida e de repelência frente ao *Ae. aegypti*.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

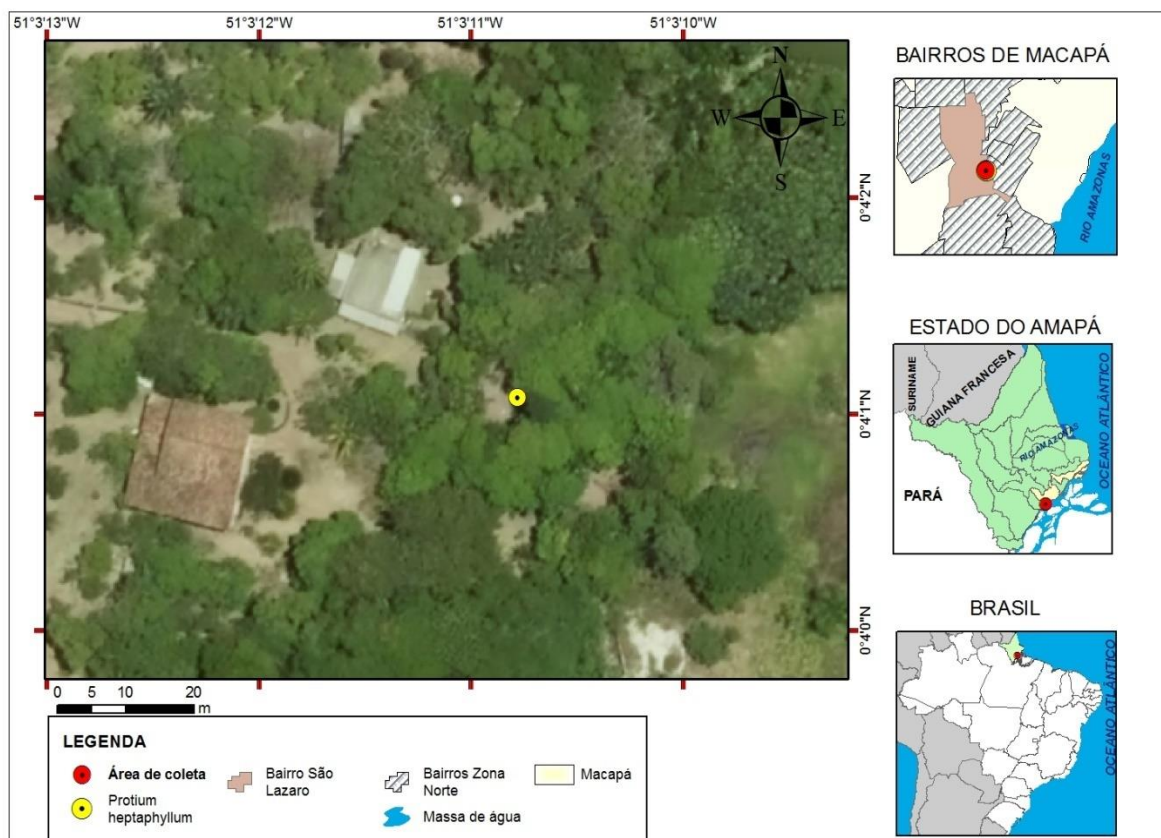
- Realizar a extração e caracterização química do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum*;
- Avaliar a ação larvícida do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* frente às larvas do *Ae. aegypti*;
- Avaliar a ação repelente do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* frente ao mosquito do *Ae. aegypti*.

6 METODOLOGIA

6.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Os materiais vegetais, resina e exsiccatas, foram coletados de espécimes de *P. heptaphyllum*, no mês de outubro de 2016, em uma área urbana preservada denominada de Sitioca São Benedito localizada a rua Manoel Francisco de Souza nº414, Bairro de São Lázaro, município de Macapá, estado do Amapá – Brasil, com coordenadas Latitude 0°4'1"N e Longitude 51°3'10"W. (Figura 2). A resina foi utilizada para a obtenção do óleo essencial e a exsicata coletada e preparada foi encaminhada ao Herbário Amapaense HAMAB do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá -IEPA, a qual foi utilizada para identificação por técnicos botânicos, através de análise morfológica e por comparação com exsiccatas já depositadas no herbário, obtendo a numeração 019059 e para compor a coleção botânica daquele herbário.

Figura 2 – Mapa georeferenciado do local da coleta do material vegetal (resina e exsicata) da espécie *P. heptaphyllum*, localizado no município de Macapá, Amapá, Brasil.



Sistema de Coordenadas Geográficas: SIRGAS 2000

Fonte: IEPA, IMAP e IBGE 2017 Elaborador: Rosiney Ferreira

A coleta do material vegetal (resina) foi realizada nas primeiras horas da manhã, pois neste período se encontra uma maior concentração de óleo essencial e diminui a perda do mesmo (BLANK et al., 2005). Posteriormente o material vegetal foi encaminhado ao Laboratório de Absorção Atômica e Bioprospecção da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), onde se realizou a trituração, seguida à extração do óleo essencial.

6.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE RENDIMENTO

A resina coletada foi lavada em água corrente para remoção da sujeira, e posteriormente triturada através de ficção em grau de porcelana até obtenção de partículas pequenas. Uma amostra de 100g do material triturado foi pesada em balança de precisão e submetida extração do óleo essencial através da técnica tradicional de arraste a vapor em aparelho de Clevenger, prosseguindo da seguinte forma:

A biomassa da resina seca e triturado, 100 g foi inserida num erlemayer de 1000 mL, adicionada 700 mL de água destilada até completar imersão da biomassa de resina. Em seguida, foi adaptado ao erlemayer um extrator de Clevenger e levado a aquecimento em uma chapa aquecedora.

Antes do início da operação de destilação, o extrator foi aferido com água destilada, através do tubo de retorno, com objetivo de manter o sistema operando dentro de equilíbrio hidrodinâmico. Ao condensador, foi conectado o sistema de refrigeração e colocada à tampa do tubo de retorno. Em seguida, foi ligada a chapa aquecedora, regulada à temperatura de ebulição da água, em mistura com a biomassa, dando início ao processo de extração de óleo essencial.

Quando a mistura de água e biomassa da resina entrou em ebulição os vapores de água e os voláteis foram conduzidos em direção ao condensador onde foi realizada a troca de calor condensando os vapores com a água de refrigeração

em operação denominada de destilação. Nessa etapa, pôde-se observar no tubo separador do extrator as formas líquidas do óleo essencial sobrenadando a água.

Transcorrido três horas de extração a leitura do volume de óleo essencial extraído foi determinada diretamente na escala volumétrica do tubo separador.

Para o cálculo do rendimento de extração de óleo essencial o processo foi repetido por cinco vezes, conforme descrito por Santos et al., (1998):

- a) Pesaram-se cinco alíquotas de 100g da resina de *P. heptaphyllum*;
- b) Procedeu-se a extração pela técnica de arraste de vapor, conforme descrito acima, por um período de 3h para cada amostra;
- c) Determinou-se o volume do óleo essencial extraído diretamente na escala do tubo separador do aparelho de Clevenger;
- d) Posteriormente removeu o óleo essencial sobrenadante com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, transferindo para um recipiente hermeticamente fechado e acondicionou em refrigerado a 5°C, protegendo-o da luz.

Para determinação do teor de rendimento utilizou-se a seguinte equação, usando o volume do óleo como a média do volume obtido nas cinco extrações:

$$TO = Vo \times 100 \times Bm^{-1}$$

Onde:

TO = teor de óleo essencial em porcentagem (mL de óleo essencial em 100 g de biomassa úmida);

Vo = volume de óleo essencial lido diretamente na escala do tubo separador;

Bm = biomassa vegetal (resina);

100 = fator de conversão para porcentagem

6.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DA RESINA DE *Protium heptaphyllum*

O óleo essencial obtido a partir da resina de *P. heptaphyllum* foi analisado no Laboratório Multiusuário de Produtos Naturais da Universidade Federal da Paraíba em Cromatógrafo Gasoso acoplada a Espectrômetro de Massas da Shimadzu,

modelo CGMS-QP2010 Ultra, equipado com uma coluna capilar RTX-5MS (30 mm x 0,25 mm, espessura de película 0,25 μ m), tendo como fase estacionária o 5% difenil-95% dimetil-polissiloxano. A temperatura do forno foi programada de 60-250 °C a uma taxa de aquecimento de 3°C/min. A fonte de íons foi ajustada a 200°C e a ionização eletrônica a 0,84 kV. Usou-se como gás transportador o hélio, a uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min e pressão de entrada de 57,0KPa.

Uma amostra do óleo essencial foi diluído em hexano e 10 μ L desta foi injetado no GC/MS. As concentrações relativas (%) correspondentes aos componentes do óleo essencial foram calculadas utilizando o software da Shimadzu. A identificação dos picos foi realizada por comparação dos índices de retenção calculados a partir de uma série n-alcanos (C9 a C17) e pelo padrão de fragmentação do espectro de massas e comparados com dados da biblioteca do equipamento.

6.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

6.4.1 Obtenção das Larvas do *Aedes aegypti*

As larvas de *Ae. aegypti* foram obtidas no Laboratório de Arthropoda (ARTHROLAB) da Universidade do Federal do Amapá, de uma colônia da cepa Rockfeller e para geração de larvas, todas em estágio L3 para que não atingissem o estágio de pupa durante os experimentos. Foram mantidas em condições climáticas padronizadas em uma sala medindo 12 m² (3m x 4m), com temperatura e umidade controladas (26°C a 28°C e uma 80 % respectivamente) fotoperíodo de 12 horas como preconiza a OMS.

6.4.2 Avaliação da Atividade Larvívora Frente ao *Aedes aegypti*

Para realização da atividade larvívora foi preparada uma solução mãe a 1000 partes por milhão (ppm), utilizando 1 mL (0,9 g) do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum*, solubilizado em 4 mL de DMSO e completado o volume com água destilada para 1000 mL de solução. A partir desta foram preparadas soluções de óleo essencial nas concentrações de 20, 40, 80, 100 e 160 ppm. Os bioensaios

foram realizados em quintuplicata, em becker de vidro com capacidade de 100 mL, ao qual adicionou-se inicialmente 80 mL de água destilada, seguida da adição da solução mãe do óleo essencial, na quantidade correspondente a concentração a ser testada e homogeneizada a mistura. Posteriormente foram adicionadas as larvas de *Ae. aegypti* completando-se o volume para 100 mL de solução. Foram preparados dois grupos controles negativos um com os veículos água destilada e o DMSO, na proporção usada para dissolução do óleo essencial e o outro usando somente água destilada.

Foram utilizadas 10 larvas por grupos testes, sendo a leitura da mortalidade realizada nos períodos de 1, 2, 4,8, 24 e 48 horas após as larvas serem expostas às soluções. As larvas foram consideradas mortas quando observadas ausência total de movimentos voluntário ou por estimulação exaustiva externa do recipiente com pipetas Pasteur.

Para obter o índice de mortalidade para cada tratamento, calculado através da formula:

$$\text{Índice de mortalidade} = \frac{\text{Nº. de larvas mortas}}{\text{Nº. de larvas expostas}}$$

6.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE REPELENTE FRENTE AO MOSQUITO *Aedes aegypti*

Por tratar-se de pesquisas envolvendo tanto seres humanos como animais o projeto foi submetido à plataforma Brasil obtendo-se o número do CAAE 62616416.0.0000.0003. Para utilização das codornas o projeto foi submetido à Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal do Amapá com protocolo nº. 011/2017 emitido em 26 de abril de 2017 com o parecer de Isenção.

Os mosquitos utilizados no ensaio de repelência foram fêmeas de *Ae. aegypti* adultas com idade variando entre 4 a 15 dias obtidas do insetário do Laboratório de Arthropoda da Universidade Federal do Amapá, composto de dois cômodos um para manutenção de imaturos e outro de adultos todos climatizados com temperatura variando entre 26°C a 28°C e a umidade relativa do ar entre 70 a 80%, com uma

fotofase de 12 horas (claro/escuro). Os mosquitos utilizados nos experimentos foram todos saudáveis, não havendo nenhum risco de transmissão de doenças.

A dieta dos indivíduos adultos foi constituída de solução açucarada a 10% (machos e fêmeas) e sangue de *Coturnix coturnix* (codornas) para realização da postura.

Para a criação da colônia foi utilizada Cubas plásticas contendo meio litro de água e adicionado os ovos do *Ae. aegypti*. As larvas foram alimentadas a cada três dias com ração industrializada para gatos. Foram realizados todos os dias a manutenção da colônia após a eclosão das larvas fazendo a retirada das pupas e inserindo-as em uma gaiola.

Para o desenvolvimento do ensaio foi utilizado o protocolo padrão de avaliação de repelentes em humanos recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2009).

A partir da solução mãe a 1000 ppm do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* foram obtidos mais duas soluções: 500 e 250 ppm, sendo utilizadas no ensaio de repelência as concentrações: 250, 500 e 1000 ppm.

Para participação do experimento foram selecionados 20 voluntários com idades entre 18 e 45 anos sem antecedentes de reações alérgicas a picada de mosquitos e sem enfermidades dermatológicas aparentes. Foram excluídos da pesquisa os participantes com reações alérgicas a picadas de mosquitos e enfermidades dermatológicas. Todos os voluntários que participaram foram informados sobre os objetivos da pesquisa, a metodologia e os possíveis efeitos adversos dos produtos antes de assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Antes da realização dos bioensaios de repelência foi solicitado a cada participante a abstinência de produtos hidratantes no corpo por 12 horas antes do ensaio. No dia do experimento cada participante procedeu com lavagem dos antebraços e mãos com água e sabão neutro. Posteriormente, os antebraços foram higienizados com álcool 70% e deixando secar completamente. No momento do ensaio as mãos foram protegidas por luvas de látex e o antebraço foi protegido com plástico filme para evitar o contato com os mosquitos. Uma área de 3cmX10cm foi marcada no antebraço direito de cada voluntário, região esta destinada à aplicação de até 1 mL de cada produto em estudo, incluindo os controles negativos (veículos)

e positivo, neste caso foi usado um repelente comercial a base DEET (Diethyl Toluamide).

O bioensaio foi realizado no intervalo das 09:00 às 13:00h, em uma sala com temperatura de 26°C à 28°C e umidade relativa de 70% à 80 %. Para a realização do experimento 50 mosquitos fêmeas foram acondicionados em gaiola de tamanho 40cmX40cmX40cm e mantidos em jejum por 24 horas de antecedência do teste.

Para dar início aos ensaios os produtos testes e controles foram aplicados 30 minutos antes do início da exposição, posteriormente o braço foi introduzido na gaiola com a presença dos mosquitos deixando a área do antebraço exposta por um período de 3 minutos sendo contado o número de pousos e permanência do mosquito que normalmente ocorre em 15 segundos e/ou picadas. Todos os testes foram realizados em quatrouplicata para cada concentração e controles.

Os dados obtidos neste bioensaio foram usados para calcular o tempo completo de proteção e o percentual de inibição contra picadas conferidas em cada tratamento.

O tempo completo de proteção, expresso em minutos, para cada teste foi aquele transcorrido entre o tempo de aplicação da substância na pele do voluntário e a confirmação da primeira picada e/ou pouso do mosquito por um período de 15 segundos.

O percentual de proteção contra picadas foi determinado através da formula proposta por Rutledge et al., (1985):

$$\text{(\% de proteção)} = \frac{\text{Nº de picadas no controle negativo} - \text{Nº picadas com óleo}}{\text{Nº de picadas no controle negativo}} \times 100$$

6.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental utilizado no ensaio larvicida foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e cinco repetições. Os dados obtidos na mortalidade foram analisados pelo programa prisma 5.03. em análise Probit foi possível determinar a Concentração Letal que causa mortalidade de 50% e 90% da população (CL₅₀ e CL₉₀). A porcentagem de mortalidade foi determinada por média e desvio padrão e submetidos à análise de variância (ANOVA ONE WAY). A

comparação entre médias dos tratamentos foram realizadas pelo teste de Tukey sendo considerado estatisticamente significativo quanto $P < 0,05$, as análises foram realizadas no programa prisma 5.03.

O desenho amostral do ensaio de repelência foi inteiramente casualizado em relação ao tipo de concentrações do óleo essencial (250, 500 e 1000 ppm). As proporções de inibição de picadas determinadas foram transformadas em média e desvio padrão. A comparação entre médias dos tratamentos foram realizadas pelo teste de Anova e Tukey, sendo considerado estatisticamente significativo quanto $P < 0,05$, as análises foram realizadas no programa prisma 5.03.

7 RESULTADO E DISCUSSÃO

7.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA RESINA DE *P. heptaphyllum*

A tabela abaixo apresenta os valores em mL de óleo essencial extraído da resina de *P. heptaphyllum* obtidos pela técnica de arraste de vapor em aparelho de Clevenger, cujo experimento foi montado para determinação do percentual de rendimento do mesmo.

Tabela 1 - Rendimento do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* obtido através da técnica de arraste a vapor.

Nº. de Extração	Biomassa da Resina (g)	Volume de óleo obtido (mL)
1º	100	3,1
2º	100	3,2
3º	100	3,0
4º	100	3,0
5º	100	3.2
Média de volume (mL)		3,1±0,1

Para realização do cálculo utilizou a média dos volumes de óleo essencial extraído, ou seja, $V_o = 3,1\text{mL}$, como a biomassa utilizada foi de 100 g, temos que o Teor de Rendimento (TO) é igual à média do volume obtido, ou seja, $TO = 3,1$, isto implica dizer que o $TO = 3,1\%$, ou seja, o percentual de rendimento do óleo essencial extraído da resina de *P. heptaphyllum*, nas condições do experimento utilizado, foi de 3,1%.

O percentual de rendimento do óleo essencial da resina do *P. heptaphyllum* obtido neste trabalho, de forma geral, pode ser considerado como um bom rendimento uma vez que na maioria dos trabalhos descrito na literatura para óleos essenciais os valores de rendimentos não ultrapassam 2%, porém em se tratando do óleo essencial da resina do *P. heptaphyllum*, o resultado obtido está dentro da média de valores descritos na literatura espécies do gênero *Protium* (SOUZA SILVA, 2006).

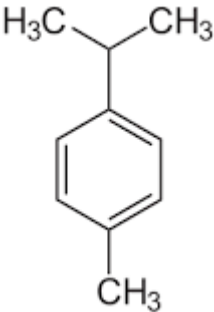
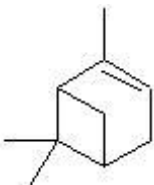
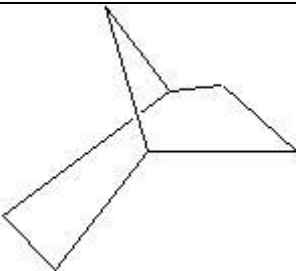
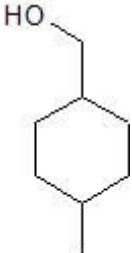
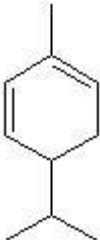
Vários fatores podem interferir no rendimento dos óleos essenciais entre estes pode-se citar época do ano que foi realizada a coleta, as partes das plantas que foram utilizadas, o horário que foi realizada a coleta, tempo de extração,

procedimento utilizado, entre outros. Todos esses fatores devem ser observados pelo pesquisador em prol de um bom rendimento assim como podem está relacionado diretamente com a qualidade e viabilidade do óleo essencial (BLANK et al., 2005).

7.2 PERFIL CROMATOGRÁFICO DO ÓLEO ESSENCIAL DA RESINA DE *P. heptaphyllum* E PRINCIPAIS CONSTITUINTES

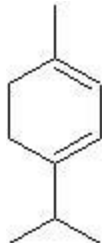
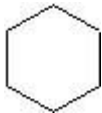
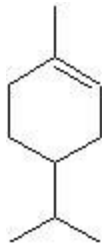
A composição química do óleo essencial de *P. heptaphyllum* foi analisada e os seus compostos foram identificados através da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. No Quadro 3 são apresentados os principais constituintes químicos identificados no óleo essencial extraído da resina de *P. heptaphyllum*, e seus percentuais de rendimento. O p-cimeno apresentou-se como o composto majoritário, com um rendimento de 60,59% em comparação aos demais constituintes do óleo essencial da resina do *P. heptaphyllum*, corroborando com os dados encontrados na literatura acerca da composição química da espécie descrita por SIANE et. al., (2004). Outro dado que chama atenção é que os oito constituintes majoritários formam mais de 96% do rendimento do óleo essencial.

Quadro 3- Apresenta os Principais componentes químicos identificados por CG-MS do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum*, tempo de retenção e % de rendimento.

No. Picos	Tempo de Retenção	% da área do Pico	Nome Químico	Estrutura Química
25	8,77	60,59	P-Cimeno	
10	5,92	12,99	α -Pineno	
26	8,89	10,05	Biciclo-Heptano	
35	13,42	3,73	Ciclohexanometanol	
20	7,80	3,15	α -Felandreno	

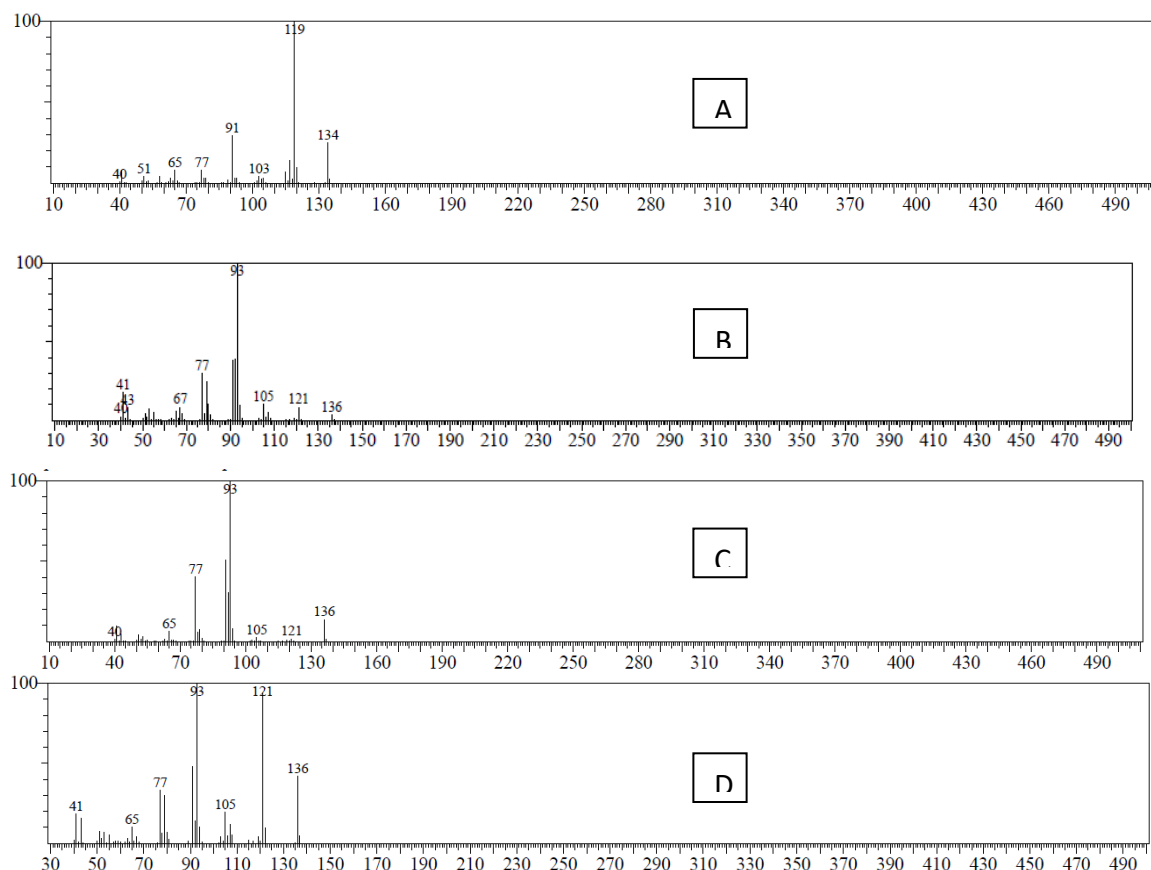
CONTINUA

Quadro 3 – Apresenta os componentes químicos majoritários identificados na cromatografia gasosa.

No. Picos	Tempo de Retenção	% da área do Pico	Nome Químico	Estrutura Química
23	8,41	1,19	α -Terpineno	
16	7,05	1,12	Ciclohexano	
18	7,32	0,89	P-Menteno-3	
		96,43%		

Conclusão

Figura 3- Espectros de massas dos óleos essenciais da resina de *P. heptaphyllum* obtidos por CG-EM para: a) p-cimeno; b) α -pineno; c) α -felandreno e d) α -terpineno.



Dados encontrados por Marques et al., (2010), apontam p-cimeno como um dos componentes majoritários do óleo essencial de duas subespécies, o *P. heptaphyllum* (Aubl.) Marchand subespécie *ulei* (Swat) Daly (PHU) e *P. heptaphyllum* (Aubl.) foram quantificados o p-cimeno (39.93%) e terpinoleno (42.31%), no entanto divergindo no percentual de rendimento destes em relação aos demais componentes.

A análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa e os índices de retenção das resinas e folhas de *Protium* para avaliação anti-inflamatória *in vivo*, caracterizou quimicamente a presença de constituintes monoterpenos e fenilpropanóides: alfa-terpinoleno (22%), p-cimeno (11%), p-cimeno-8-ol (11%), limoneno (5%) e dillapiol (16%) para a resina, enquanto nas folhas foram encontrados os sesquiterpenos (SIANI et al., 1999).

Albino et al., (2017), ao avaliar a influencia da oxidação no oleorresina de *P. heptaphyllum* por GC-FID e GC-MS, encontrou para o oleorresina da planta fresca o terpinoleno na concentração de 28,2-69,7%, enquanto que o oleorresina amadurecido apresentou o p-cimeno variando entre 18,7 e 43,0% e p-cymen-8-ol (8,2-31,8%).

As análises realizadas por cromatografia gasosas acopladas a espectrometria de massa do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* demonstrou um excelente resultado com componente majoritário p-cimeno 60,59%.

7.3 ATIVIDADE LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DA RESINA DE *P. heptaphyllum* FRENTE ÀS LARVAS DE *Aedes aegypti*

A Tabela 1 apresenta os resultados da avaliação da atividade larvicida do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* frente às larvas do *Ae. aegypti*, com valores de concentração do óleo essencial em ppm calculados através do índice de mortalidade.

Tabela 2 – Valores médios e desvio padrão do índice mortalidade de larvas de *Ae. aegypti* para o controle negativo e as concentrações de 20, 40, 80, 100 e 160 ppm de óleo essencial da resina do *P. heptaphyllum* e aplicação dos testes Anova e Tukey

Tempo (horas)	Grupos					
	Controle Negativo	20 ppm	40 ppm	80 ppm	100 ppm	160 ppm
1	0±0	0.2 ±0.44	0±0	0.8±0.83	2±1.41**	5.2±3.34***
2	0±0	0.2±0.44	0.6±0.54	0.8±0.83***	4.6±2.30***	8±2.50***
4	0±0	0.6±0.89	0.6±0.54*	9±1***	9.8±0.44***	9.8±0.44***
8	0±0	3.2±1.78	7.2±1.30***	9.4±0.54***	9.8±0.44***	10±0***
24	0±0	3.4±1.67***	7.2±1.30***	9.6±0.54***	10±0***	10±0***
48	0±0	3.4±1.63***	7.8±1.30***	9.6±0.54***	10±0***	10±0***

* p < 0,05 segundo teste ANOVA com pós teste de Tukey.

** p < 0,01 segundo teste ANOVA com pós teste de Tukey.

*** p < 0,001 segundo teste ANOVA com pós teste de Tukey

O óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* testado apresentou uma excelente atividade larvicida contra ao *Ae. aegypti*, demonstrado através dos índices de mortalidade apresentados na tabela acima, cujos valores extrapolados para percentual apresentaram mortalidade de 100% a partir da concentração de 100 ppm ($\mu\text{g/mL}$) e de 96% para concentração de 80 ppm ($\mu\text{g/mL}$) no tempo de 24 horas. Para as concentrações de 100 e 160 ppm o resultado nas primeiras quatro horas mostrou uma atividade de 98% de morte das larvas, demonstrando uma potente ação larvicida para o produto testado.

Resultado semelhante foi encontrado por Santana et al., (2009) em trabalho com o óleo essencial da casca do caule de *Protium confusum* frente a larvas de *Ae. aegypti*, o qual apresentou uma $CL_{100} = 125 \mu\text{g/mL}$, valor muito aproximado do encontrado para o óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum*, demonstrando ação muito próxima, embora as partes da planta e composição tenham sido diferentes.

7.4 DETERMINAÇÃO DA CL_{50} E CL_{90} DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Protium heptaphyllum* FRENTE ÀS LARVAS DO *Aedes aegypti*

Por meio da análise Probit com valores obtidos do ensaio larvicida foi possível determinar a CL_{50} e CL_{90} , ou seja, determinar as concentrações capazes de causar mortalidade em 50% e 90% das larvas respectivamente. Foi obtido a $CL_{50} = 28.66$ ppm e $CL_{90} = 82$ ppm evidenciando a efetividade potencial larvicida desse produto.

Segundo Cheng et al., (2003), substância com valores de CL_{50} abaixo de 100 $\mu\text{g/mL}$ é tido como um bom agente larvicida. O óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* apresentou uma CL_{50} de 28.66 ppm ($\mu\text{g/mL}$), valor bem abaixo do descrito na literatura para ser considerado como de boa atividade, demonstrando que este é viável para a utilização como larvicida. Outro fator positivo para uso deste é que a resina de *P. heptaphyllum* encontrado em abundância na região Amazônica e a extração do óleo da resina possui um bom rendimento.

Com estes resultados pode-se afirmar que o óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* apresenta-se como um grande promissor de agente larvicida natural para uso em locais de crescimento de larvas do *Ae. aegypti*, necessitando para isso

de estudos de bases tecnológicas para desenvolvimento de produtos acabados e avaliação de toxicidade ao ser humano.

Devido o p-cimeno ser o composto majoritário do óleo essencial da resina do *P. heptaphyllum*, com um teor de aproximadamente 60% em relação aos demais componentes, pode-se pensar em tal atividade ser atribuída a este monoterpene, uma vez que a concentração desse composto é muito superior a dos demais componentes do óleo, no entanto é necessário que ensaios com a substância isolada sejam realizados para confirma esta hipótese.

Também é possível pensar no sinergismo desse como outros componentes encontrados em quantidades variáveis em óleos essenciais. A literatura descreve a ação antimicrobiana do p-cimeno potencializada pelo efeito sinérgico com outras substâncias, a exemplo do carvacrol (OLIVEIRA et al., 2009; SILVA et al., 2010). Uma vez que o α -pineno é o segundo constituinte majoritário, com aproximadamente 13%, e a soma dos dois corresponde a aproximadamente 73% do percentual do óleo, e sabendo que a literatura descreve algumas atividades para este último, a exemplo da atividade antifúngica (GARCIA et al., 2008) e antimicrobiana (YANG et al., 2011), bem como da sua ação inseticida e repelente (MENEZES, 2005). Porque não pensar em atribuir a ação sinérgica desses constituintes?

Embora sabe-se que muitos monoterpenos são encontrados em óleos essenciais como componentes majoritários, no entanto é difícil associar apenas a uma única substância determinada atividade biológica, pois sabe-se que devido à diversidade de compostos presentes nos óleos essenciais muitas vezes a ação biológica ocorre devido a uma ação sinérgica dos constituintes presentes em espécies vegetais. Portanto, para afirmar que ação possa ser oriunda de apenas uma substância é necessários estudos que avaliem ação da substância isoladamente (KUMAR et al., 2011; LIMA et al., 2013).

7.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE REPELÊNCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DA RESINA DE *Protium heptaphyllum*

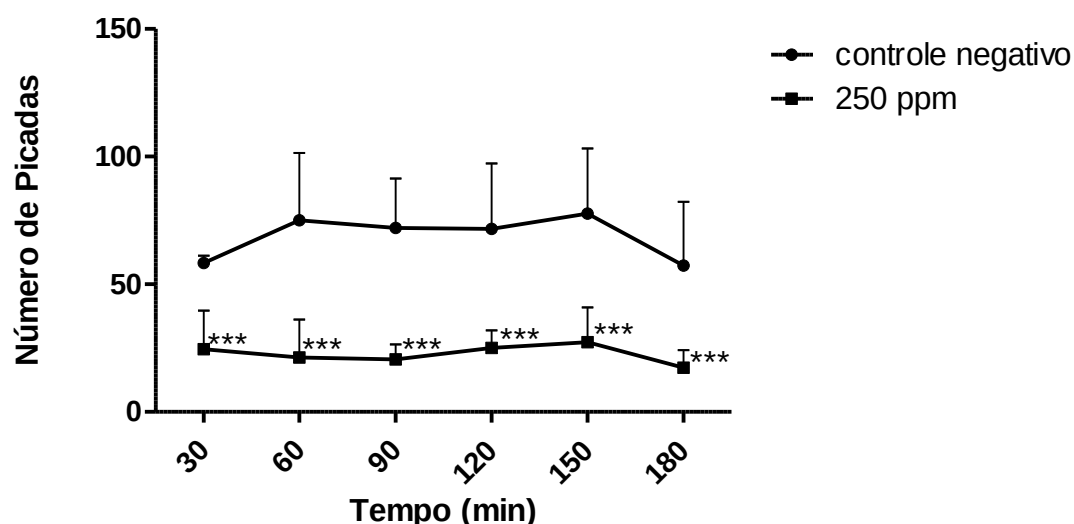
A atividade repelente do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* frente a mosquitos de *Ae. aegypti* testado nas concentrações de 250, 500 e 1000 ppm e controle negativo estão apresentados na tabela abaixo e nos respectivos gráficos 2,

3 e 4, expressos através da média do número picadas, mais ou menos desvio padrão.

Tabela 3 – Valores médios e desvio padrão frente ao *Ae. aegypti* nas concentrações de 250, 500 e 1000 ppm e controle negativo do óleo essencial da resina do *P. heptaphyllum*

Tempo (min. e horas)	GRUPOS TRATADOS			
	Controle Negativo	250 ppm	500 ppm	1000 ppm
30	58,33±2,88	24,5 ± 15,19	21,5±8,34	31±17,60
60	75±26,45	21,25 ±14,97	32,25±13,37	31,25±14,31
90	72±19,46	20,5 ± 5, 91	31±16,43	22,25±8,30
120	71,66±25,65	25 ± 6,87	27,5±13,07	12±4,76
150	77,66±39,57	27,25± 13,72	19±10,42	7,5±2,88
180	57,33±25,00	17,25±6,94	15,75±9,91	7,75±6,94

Gráfico 1-Valores médios do número de picadas avaliados em função do tempo de exposição em minutos usando a dose de 250 ppm do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* e do controle negativo(veículo), frente aos mosquitos de *Ae. aegypti*.



* $p < 0,05$ segundo teste ANOVA com pós teste de Tukey.

** $p < 0,01$ segundo teste ANOVA com pós teste de Tukey.

*** $p < 0,001$ segundo teste ANOVA com pós teste de Tukey

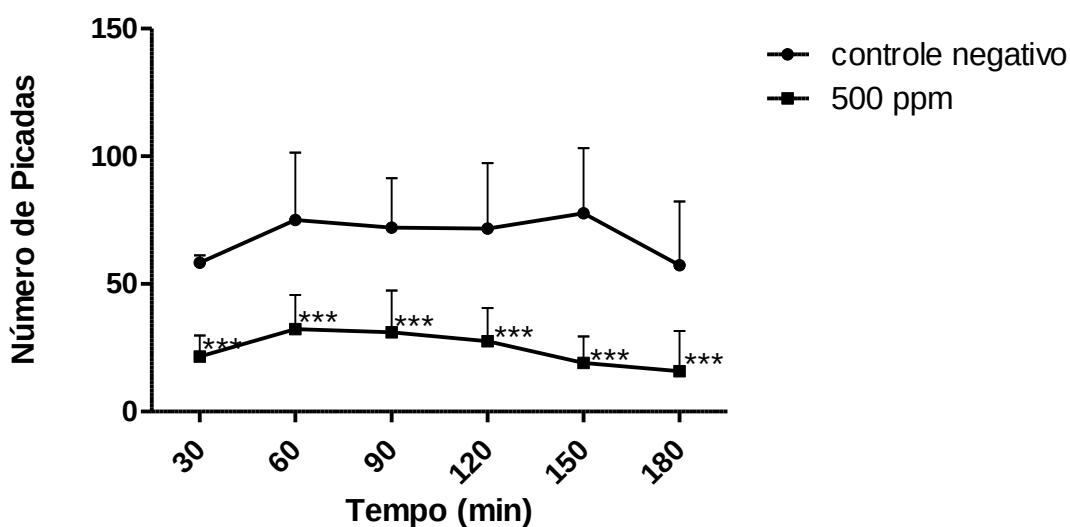
O gráfico acima apresenta as menores médias do número de picadas nos tempos de exposição de 90 e 180 minutos. Estes valores são extremamente significativos ao serem comparados ao controle negativo, apresentando uma significância menor que $p < 0.01$.

No entanto, mesmo sendo estes os menores números de picadas, quando os tempos analisados comparados entre si, percebe-se claramente que não houve diferença significativa entre estes, demonstrando não haver uma relação direta entre de tempo exposição e percentual de proteção do produto em análise. Também percebe-se uma ligeira queda no número de picadas no tempo de 180 minutos, o que implica em uma boa proteção do óleo essencial ao longo do tempo.

Em um estudo realizado por Fradin (1998), com plantas e seus derivados demonstrou uma ação repelente inferior a 2 horas, reforçando que o óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* na concentração de 250 ppm apresenta um bom potencial para utilização de repelente.

Muitos estudos vêm detectando a atividade dos óleos essenciais como bons agentes repelentes, sendo menos tóxicos para o ser humano (KATHRINA; ANTÔNIO, 2004).

Gráfico 2 - Valores médios do número de picadas avaliados em função do tempo de exposição em minutos usando a dose de 500 ppm do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* e do controle negativo (veículo), frente aos mosquitos de *Ae. aegypti*.



* $p < 0,05$ segundo teste ANOVA com pós teste de Tukey.

** $p < 0,01$ segundo teste ANOVA com pós teste de Tukey.

*** $p < 0,001$ segundo teste ANOVA com pós teste de Tukey

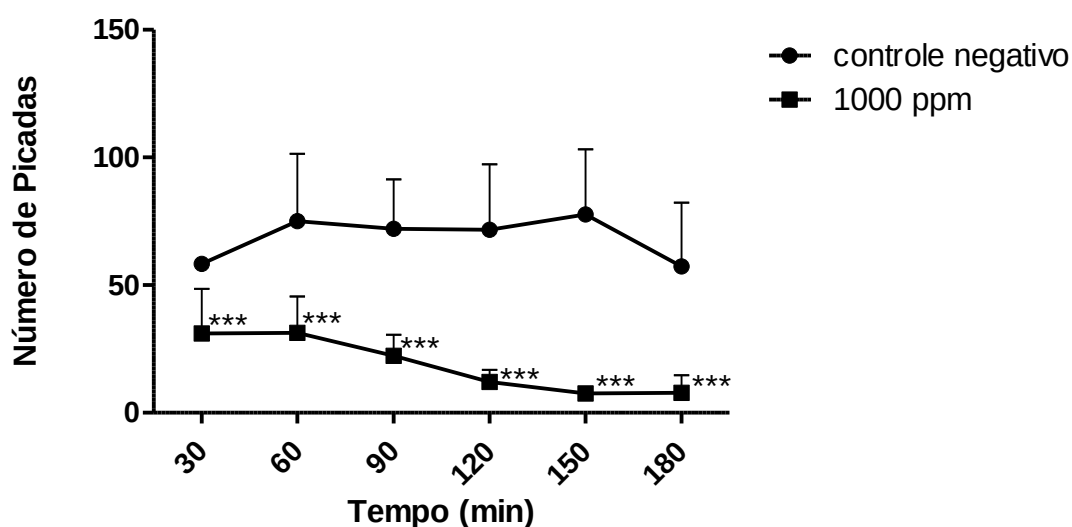
O óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* na concentração de 500 ppm apresentou uma ação repelente significativa quando comparados ao controle negativo com $p < 0.01$. quando comparados os tempos de exposição ao mosquito *Ae. aegypti* observa-se um aumento inicial do número de picadas dos 30 aos 60 minutos após aplicação do produto, a partir daí ocorre uma estabilização com ligeira queda no número de picadas ao longo do tempo. Este resultado é semelhante ao encontrado para a concentração de 250 ppm, o qual demonstrou maior proteção no tempo de 180 min. mostrando assim que este produto é eficaz ao longo do tempo.

Diversos produtos à base de plantas apresentam um efeito repelente comprovado e compostos ativos, que agem sinergicamente, possuindo

características que poderiam ser empregadas como alternativas dirigidas para o controle e monitoramento das populações de mosquitos (ISMAN, 2006; NAVARRO et al., 2009).

Um fator positivo para utilização de óleos essenciais é que são obtidos de recursos renováveis, rapidamente degradáveis, com baixo potencial de resistência, fácil acesso e baixo custo de produção (ROEL, 2001). Sendo a região Amazônica uma área que se encontra uma flora rica e diversa, este tipo de estudo vem se desenvolvendo de maneira ampla e apresentando bons resultados.

Gráfico 3- Valores médios do número de picadas avaliados em função do tempo de exposição em minutos usando a dose de 1000 ppm do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* e do controle negativo(veículo), frente aos mosquitos de *Ae. aegypti*.



* $p < 0,05$ segundo teste ANOVA com pós teste de Tukey.

** $p < 0,01$ segundo teste ANOVA com pós teste de Tukey.

*** $p < 0,001$ segundo teste ANOVA com pós teste de Tukey

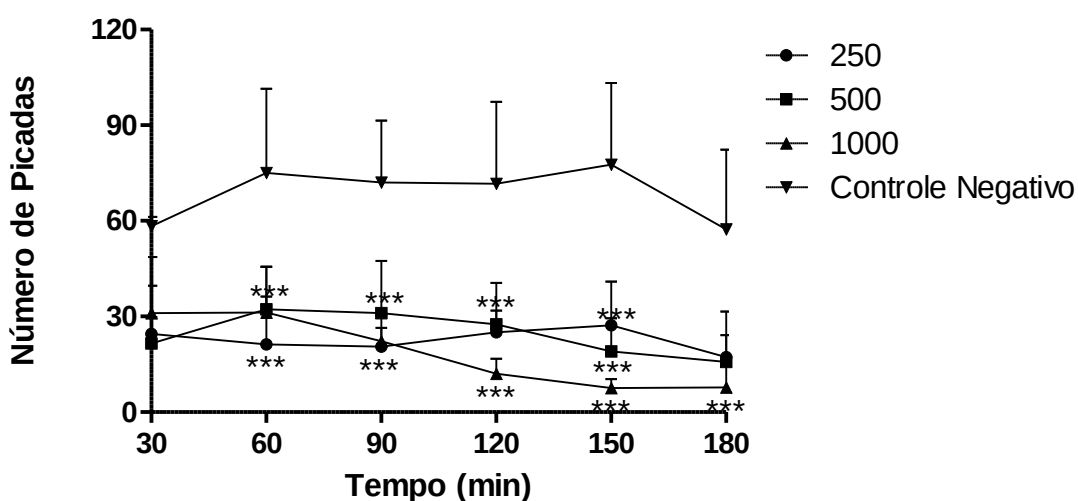
O óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* na concentração de 1000 ppm apresentou uma excelente proteção contra picadas do mosquito *Ae. aegypti*, quando comparado ao controle negativo, com $p < 0.01$. Nesta concentração observou-se uma estabilização no percentual de proteção nos tempos de 30 e 60 minutos e aumento da proteção ao passar do tempo, atingindo o percentual máximo de proteção de 90% no tempo de 150 minutos, mantendo-se estável aos 180 minutos após aplicação do

produto. Este resultado demonstra uma forte ação repelente do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* frente ao mosquito do *Ae. aegypti*, tornando este um forte candidato para desenvolvimento de um produto com ação repelente.

A atividade repelente do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* pode estar associada à presença dos constituintes majoritários p-cimeno (~60%), o qual já foi descrito na literatura que o mesmo possui atividade inseticida (MORAIS, 2009) e/ou a associação deste com o α -pineno (~13%), uma vez que os dois juntos representam aproximadamente 73% da composição do óleo em estudo e para os quais já foram demonstrados ação repelente frente ao de *Ae. aegypti*. No entanto estudos complementares com as substâncias isoladas deve ser explorados para que se confirmem esta hipótese.

Os gráficos 5 e 6 representam os índices de proteção de picadas do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* frente a mosquitos de *Ae. aegypti*, sendo que no gráfico 5 os valores estão apresentados em função das médias de picadas versus tempo de aplicação do produto e no gráfico 6 os valores estão apresentados em função do percentual de proteção versus tempo de aplicação, sendo que ambos representam a mesmas coisa, apenas de forma diferentes.

Gráfico 4- Valores médios do número de picadas ao longo do tempo (30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos) nas concentrações de 250, 500 e 1000 ppm do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* frente a mosquitos de *Ae. aegypti*.

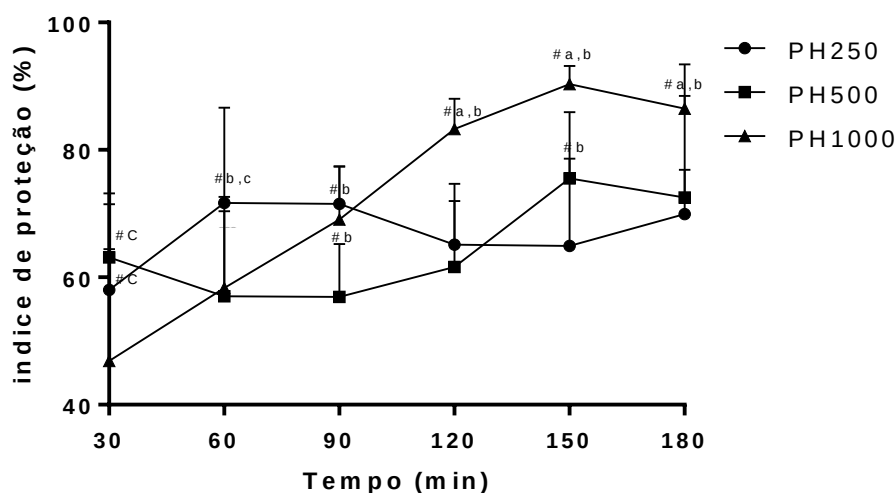


* $p < 0,05$ segundo teste ANOVA com pós teste de Tukey.

** $p < 0,001$ segundo teste ANOVA com pós teste de Tukey.

*** $p < 0,001$ segundo teste ANOVA com pós teste de Tukey

Gráfico 5- Valores médios e desvio padrão do percentual de proteção de picadas ao longo do tempo (30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos) nas concentrações de 250, 500 e 1000 ppm do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* frente a mosquitos de *Ae. aegypti*.



Onde: Significancia * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $p^{\#} < 0.001$, sendo ^a comparado com PH250, ^b comparado PH500 e ^c comparado com grupo pH1000.

O gráfico acima apresenta uma comparação entre as diferentes concentrações do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* testado e o controle negativo, comparando entre si os valores obtidos em função do tempo de aplicação. No tempo de 30 minutos após aplicação do produto nas diferentes concentrações não foi demonstrado nenhuma significância entre os números de picadas e/ou percentual de proteção, ao passo que no tempo de 60 minutos os resultados de 500 e 1000 ppm foram semelhantes e divergindo significativamente para maior número de picadas quando comparados a concentração de 250 ppm ($p < 0.01$), demonstrando esta ser mais eficiente neste tempo de exposição.

Já no tempo de 90 minutos, a concentração de 500 ppm manteve-se semelhante ao valor de 60 minutos e divergindo significativamente ($p < 0.01$) para maior número de picadas quando comparados as concentrações de 250 e 1000 ppm, demonstrando maior atividade para essas duas concentrações. No tempo de 120 minutos o número de picadas foi maior para as concentrações de 250 e 500

ppm, com valores semelhantes para as duas e divergindo significativamente ($p < 0.01$) quando comparado com 1000 ppm, sendo este mais eficiente. De acordo com esses resultados, em uma análise das concentrações testadas do produto (250, 500 e 1000 ppm) em função do tempos (30, 60, 90 e 120) não foi possível estabelecer uma relação direta entre estas.

Dando continuidade as análises do número de picada em função das concentrações versus tempo, observou-se que em 120 minutos houve diminuição do número de picadas à medida que se aumentou a concentração de óleo essencial utilizado, sendo significativamente diferentes ($p < 0.01$) quando comparados entre si. Já quando se analisou as diferentes concentrações no tempo de 180 minutos observou-se também uma diminuição no número de picadas à medida que a concentração foi aumentada, no entanto as concentrações de 250 e 500 ppm não foram estatisticamente significante quando comparadas entre si, porém foram significantes ($p < 0.01$) quando comparadas a concentração de 1000 ppm, sendo este ultimo o menor número de picadas para todas a concentrações e tempos testados. Este resultado mostra que nos tempo de 150 e 180 minutos após aplicação do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum*, pode-se estabelecer uma relação direta, ou seja, à medida que se aumenta a concentração este torna-se mais eficiente no que se refere a repelência do mosquito do *Ae. aegypti*.

O efeito repelente de algumas plantas tem sido apontado como uma forma eficaz em evitar a infestação de mosquitos causadores de doença. Levando conseqüentemente à redução da permanência dos mosquitos, com isso, diminuindo a oviposição e que se complete seu ciclo de desenvolvimento trazendo benefícios à população (ANDRADE et al., 2013).

Esses resultados indicam que o óleo testado, apresenta-se com um potencial muito bom para repelência frente ao *Ae. aegypti*, principalmente nas concentrações mais elevadas e sendo mais eficiente nos tempos de 150 e 180 minutos após aplicação do produto, evidenciando que este não perde seu efeito ao longo do tempo, fato extremamente importante para o desenvolvimento de produtos a base de óleo essencial uma vez que os mesmo são extremamente voláteis.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho o óleo essencial obtido a partir da resina de *P. heptaphyllum* apresentou um percentual de rendimento de 3,1% e tendo como constituintes majoritários o p-cimeno (60,59%), α -pineno (12,99%) e biciclo-heptano (10,05%), representando os três juntos 83,63% da composição do óleo essencial;

No que tange aos bioensaios realizados para as atividades larvicida e repelente foi possível observar que o óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* apresenta uma excelente atividade tanto larvicida quanto de repelente frente a larvas e mosquitos do *Ae. aegypti*, respectivamente sendo:

- ✓ Para a ação larvicida do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum*, foi encontrado uma CL₅₀ de 28,66 ppm e CL₉₀ de 82,0ppm para tempo de 48 horas após aplicação deste. Para a atividade repelente foi observado que nas concentrações de 250, 500 e 1000 ppm o óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* foi eficaz quando comparado ao controle negativo, apresentando um percentual de repelência que variou de 46% a 90% de proteção, sendo este ultimo encontrado para 1000 ppm;
- ✓ Ainda em relação à atividade repelente, foi possível observar que nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos após aplicação do produto não foi possível estabelecer uma relação de efeito versus tempo de aplicação do produto, no entanto nos tempo de 150 e 180 minutos pode-se observa que a medida em que se aumentou a concentração do produto seu efeito foi potencializado, assim como esse efeito também foi aumentado a medida que se aumentou o tempo de aplicação do óleo essencial sobre a pele;
- ✓ Apesar dos resultados obtidos terem confirmado um efeito repelente, é necessário estudos adicionais que visem determinar o tempo de duração da ação repelente do óleo essencial, bem como para testá-lo contra outras espécies de mosquitos.

Assim sendo, o óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* apresenta-se como um potente produto a ser utilizado, seja como agente larvicida e/ou repelente frente a larvas e mosquitos de *Ae. eagypti*, respectivamente. No entanto, estudos complementares no que se refere à determinação de toxicidade, desenvolvimento

tecnológico, entre outros, são necessários para que se possa pensar em um produto para uso em humano ou uso por estes.

A descoberta de novas drogas eficazes para o controle de vetor transmissor de doenças como Dengue, Zika vírus, Chikungunya e febre amarela são de grande importância para a saúde pública, uma vez que o combate a larvas e a mosquitos vetores é essencial na prevenção de novos casos, sobre tudo para a população carente que é a mais prejudicada com a transmissão destas doenças.

REFERÊNCIAS

ARIDOGAN, B. C. et al., Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. **Archives of Pharmacal Research**, v. 25, n. 6, p. 860-864, 2002.

ANDRADE, E. A.; HIGUCHI, N. Produtividade de quatro especies arboreas de Terra Firme da Amazonia Central. **Acta Amazonica**, 39:105-112, 2009.

ALBINO, R. C.; OLIVEIRA, P. C.; PROSDOCIMI, F.; DA SILVA, O. F.; BIZZO, H. R.; GAMA P. E.; SAKURAGUI, C. M.; FURTADO, C.; DE OLIVEIRA, D. R. Oxidation of monoterpenes in *Protium heptaphyllum* oleoresins. **Phytochemistry**, v. 136, p. 141-146, 2017.

ANDRADE, S. F.; CARDOSO, L. G.; BASTOS, J. K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckiapopulnea*. **Journal of Ethnopharmacoly**, v.109, n. 3, p. 464-471, 2007.

ANDRADE, L. H.; et al., Efeito repelente de azadiractina e óleos essenciais sobre *Aphisgossypii*Glover (Hemiptera: Aphididae) em algodoeiro. **Revista Ciência Agronômica**, v.44, n.3, p. 628-634, 2013.

ANDREI, P.; COMUNE, A. P. D. **Aromaterapia e suas aplicações**. Rio de Janeiro, v. 7, n. 3, 2005. Disponível em: <http://docslide.com.br/documents/aromaterapia-e-suas-aplicacoes.html>. Acessado em: 18 mar 2016.

Amazônia and the Guianas. City University of New York New York, 1987.

ANVISA-CATEC-**Parecer Técnico n2, de 11 de dezembro de 2006**.

ARAGAO, G. F.; CARNEIRO, L. M.; JUNIOR, A. P.; VIEIRA, L. C.; BANDEIRA, P. N.; LEMOS, T. L.; VIANA, G. S. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha - and beta amyrin from *Prothium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 85, n. 4, p. 827-834, 2006.

ARAUJO, D. A. O. V. et al. Gastroprotective effects of essential oil from *Protium heptaphyllum* on experimental gastric ulcer models in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 4, p. 721-729, 2011.

BANDEIRA, P. N.; OTÍLIA PESSOA, D. L.; TREVISAN, M. T. S.; LEMOS, T. L. G. metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum* MARCH. **Quím. Nova**, v.25, n.6, 2002. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000700006. Acessado: 27/10/ 2017.

BARRET, C. F.; CAVASIN, M.; SILVA, H. G.; SILVA I. G. Estudo das alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao extrato bruto etanólico de SapindussaponariaLin (Sapindaceae). **Revista de Patologia Tropical**, p.35:37-57, 2006.

BATISTA, R. W. C.; CARVALHO, J. O. P. Efeito da exploração florestal nas populações de espécies arbóreas da família Burseraceae em uma floresta de terra firme, na região Paragominas, PA. Belém, **Embrapá Amazônia Oriental**, p. 4, 2006.

BLANK, A. F.; FONTES, S. M.; CARVALHO FILHO J. L. S.; ALVES, P. B.; SILVA-MANN, R.; MENDONÇA, M. C.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; RODRIGUES, M. O. Influência do horário de colheita e secagem de folhas no óleo essencial de melissa (*Melissa officinalis* L.) cultivada em dois ambientes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, p.73-78, 2005.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico – **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 37. 2016**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/outubro/18/2016-029-Dengue-publicacao-n-34.pdf> . Acessado em: 29 out 2017.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Epidemiológico da Dengue - **Análise de Situação e Tendências** - 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe>. Acessado em: 03 dez 2017.

BRASIL, Boletim Epidemiológico. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus zika até a semana epidemiológica 51, 2015**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/15/svs2016-be002-dengue-se51.pdf>. Acessado em: 29 mai 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança/ Ministério**

da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão. – 4. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2013. Disponível em: http://www.caism.unicamp.br/PDF/Dengue_manejo_clinico_adulto_crianca_2013_4a_edicao.pdf. Acessado em: 29 nov 2017.

BRASIL, FIOCRUZ. **Parceria traz para o Brasil iniciativa pioneira de pesquisa em dengue.** 2012. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=4853&sid=9>. Acessado em: 18 mar 2016.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. **Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue / ministério da saúde, secretaria de vigilância em saúde, departamento de vigilância epidemiológica.** Brasília : ministério da saúde, 2009. Disponível em: <http://www.saude.mppr.mp.br/arquivos/File/dengue/livroDiretrizes.pdf>. Acessado em: 29 out 2017.

BRASIL, Manual da dengue. **Dengue – Instruções de pessoal para combate ao vetor.** 2001. Disponível em: bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengueFUNASA. Acessado em: 18 mar 2016.

CANEPPELE, M. A. B.; ANDRADE, P. de J. ; SANTAELLA, A. G. Diferentes dosagens de pó inerte e temperaturas em milho armazenado para o controle de gorgulho-do-milho. **Scientia Agrária**, v.11, p.343- 347, 2010.

CAPASSO, F. P. R.; GRAHDOLINI, G.; MASCOLO, N.; **Farmacognosia- Farmaci naturali coro preparazione ed impregoterapêutico.** Milano, Springer Verlag, p.158-169, 2000.

CASSEL, E. ; SERAFINI, L. Produção de óleos essenciais: uma alternativa para a agroindustrial nacional. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Coord.). **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria.** Guaíba: Agropecuária, p. 333-377, 2001.

CHOU, J. T.; ROSSIGNOL, P. A.; AYRES, J. W. Evaluationofcommercialinsectrepellentsonhumanskinagainst *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 34, n. 6, p. 624-630, 1997.

CORREIA, M. P. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil**, vol. 1, p. 89, 1984.

CASIDA, J. E. ; QUISTAD, G. B. Golden age of insecticide research: past, present or future? **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 43, n. 1, p. 1-16, 1998.

CARLQUIST, S. Wood Anatomy of SympetalousDicotyledon Families: A Summary, with Comments on Systematic Relationships and Evolution of the Woody Habit. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.79, n.2, p.303-332, 1992.

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos antiinflamatórios: aspetos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, p. 480, 2004.

CARVALHO, L. A. F.; SILVA, I. G. Avaliação longitudinal da atividade do Temephos a 1% sobre o *Aedes aegypti* (Lin., 1762). **Entomologia y vectores**, n. 7, p. 191-201, 2000.

CITÓ, A. M. G L.; COSTA, F. B.; LOPES, J. A. D.; OLIVEIRA, V. M.; CHAVES, M. H. Identificação de constituintes voláteis de frutos e folhas de *Protiumheptaphyllum*(Albl) March. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.8, p. 4-7, 2006.

CHENG, S. S.; CHANG, H. T.; CHANG, S. T.; TSAI, K. H.; CHEN, W. J. Bioactivity of selected plant essential oil against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 01, p. 99-102, 2003.

COSIMI, S.; ROSSI, E.; CIONI, P. L.; CANALE, A. Bioactivity and qualitative analysis of some essential oils from Mediterranean plants against stored-product pests, Evaluation of repellency against *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Cryptolestes ferrugineus* Stephens and *Tenebrio molitor* L. **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 45, n. 2, p. 125-132, 2009.

COITINHO, R. L. B. C. et al., Toxicidade por fumigação, contato e ingestão de óleos essenciais para *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1885 (Coleoptera: Curculionidae) **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, n. 1, p. 172-178, 2011.

CUNHA, A. P. DA.; **O emprego das plantas aromáticas desde as antigas civilizações até ao presente**. 2007. Disponível em: <www.antoniopcunha.com.sapo.pt>. Acessado em: 05 dez 2017.

D'AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental: uma revisão. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6, p. 995-1002, 2002.

Daly, D. C. **A Taxonomic Revision of Protium (Burseraceae) in Eastern Amazonia and the Guianas**. City University of New York New York, 1987.

DE LIMA, E. M.; CAZELLI, D. S. P.; PINTO, F. E.; MAZUCO, R. A.; KALIL, I. C.; LENZ, D.; SCHERER, R.; ANDRADE, T. U.; ENDRINGER, D. C. Essential Oil from the Resin of *Protium heptaphyllum*: Chemical Composition, Cytotoxicity, Antimicrobial Activity, and Antimutagenicity. **Pharmacogn Mag.** v.12, Suppl. 1, p. S42-S46, 2016.

De ALMEIDA, P. D. O.; BOLETI, A. P. A.; RÜDIGER, A. L.; LOURENÇO, G. A.; VEIGA JUNIOR, V. F.; LIMA, E. S. AntiInflammatory Activity of Triterpenes Isolated from *Protium paniculatum* Oil-Resins. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products**. 2. ed. John Wiley & Sons, Ltd. UK, 2009.

FARIA, A. B. C. Revisão sobre alguns grupos de inseticidas utilizados no manejo integrado de pragas florestais. **Revista Ambiência**, Guarapuava, v. 5, n. 2, p. 345-358, 2009.

FERRAZ, I. D. K.; CAMARGO, J. L. C.; SAMPAIO, P. T. B. Sementes e plantulas de andiroba (*Carapaguianensis* AUBL. e *Carapaprocera* D.C.): aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. **Acta Amazonica**, v.32, p.647-61, 2002.

FRADIN, M. S. Mosquitos and mosquito repellents: a clinician' s guide. **Annals of International Medicine**, v.128, p.931-940, 1998.

FINE, P. V. A. D. C.; Daly, G. V. Munoz, I. Mesones e K. M. Cameron. The contribution of edaphic heterogeneity to the evolution and diversity of Burseraceae trees in the western Amazon. **Evolution**, v.59, n.7, Jul, p.1464-1478, 2005.

FORATTINI, O. P.; **Culicidologia médica**. São Paulo, p. 864, 2002.

GARCIA, R. et al. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p.163-168, 2008.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; SILVA, L. M. G. E.; SARMENTO, U. C. Substâncias de origem vegetal com atividade larvica contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 363-393, 2013.

GÉRARDIN, P.; BARAU, G.; MICHAULT, A.; BINTNER, M.; RANDRIANAIVO, H.; CHOKER, G. et al., **Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Réunion**. *PLOS Med.* 2008;5(3):413-23. DOI:10.1371/journal.pmed.0050060

GUPTA, R. K.; RUTLEDGE, L. C. Role of repellents in vector control and disease prevention. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n. 6, p.82–86, 1995.

HAMILTON, A. **Medicinal plants and conservation: issues and approaches**. International Plants Conservation Unit, 2003.

HEXSEL, C. L.; BANGERT, S. D.; HEBERT, A. A. ; H. W. Current sunscreen issues: 2007 Food and Drug Administration Sunscreen labelling recommendations and combination sunscreen insect repellent products. **Journal of American Academy of Dermatology**, v.10, p.10-16, 2008.

HOUËL, E. et al. Therapeutic switching: from antidermatophytic essential oils to new Leishmanicidal products. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.110 n. 1, p. 106-113, 2015.

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

ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 51, p. 45–66, 2006.

JUTIVIBOONSUK, A.; ZHANG, H.; TENG TAN, G.; MA, C.; VAN HUNG, N.; CUONG, N. M.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; SOEJARTO, D. D.; FONG, H. Bioactive constituents from roots of *Bursera tokinensis*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2745-2751, 2005.

KATHRINA, G. A.; ANTONIO, L. O. J.; Controle biológico de insetos mediante extratos botânicos. In: CARBALL, M.; GUAHARAY, F. (Ed.). **Control biológico de plagas agrícolas**. Managua: CATIE, p.137-160, 2004.

KAPOOR, V. K.; CHAWLA; A. S. Biological significance of triterpenoids. **J ScienIndRes**. v. 45 p. 503-511.1986.

KIM, S. I.; PARK, C.; OHH, M.H.; CHO, H.C.; AHN, Y.J. Contact and fumigant activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Lasioderma serricornis* (Coleoptera: Anobiidae). **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 39, n. 1, p. 11-19, 2003.

KUMAR, G. R. K.; ESWARAN, N.; JOHNSON, T. S. Isolation of high-quality RNA from various tissues of *Jatropha curcas* for downstream applications. **Analytical Biochemistry**, v.413, p.63-65, 2011.

LANGENHEIM, J. H. **Plant resins: chemistry, evolution, ecology and ethnobotany**. 2. Ed. P. 586, Cambridge: timber, 2003.

LIU, Y.; WANG, Y.; WU, M.; CAO, Y.; HUANG, W.; LI, L.; SUN, H. Allicin protects against myocardial apoptosis and fibrosis in streptozotocin-induced diabetic rats. **Phytomedicine**, v. 19, n, 8-9, p.693– 698, 2012.

LIMA, N. P.; CERQUEIRA, S. H. F.; FÁVERO, O. A.; ROMOFF, P.; LAGO, J. H. G. **Composition and Chemical Variation of the Essential Oil from leaves of *Eugenia brasiliensis* Lam. and *Eugenia* sp. (Myrtaceae)**. *Journal of Essential Oil Research*. v. 20, p. 223-225, 2013.

LOPES, A. C. **Tratado de clínica médica**. 2.ed. 3841-3849. São Paulo: Roca; v. 3. 2009.

LORENZI, H.; **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, São Paulo: Plantarum, v.1, 1998.

LUNA, J. E. D.; et al., Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 6, p. 842-843, 2004.

MAIA, R. M.; BARBOSA, P. R.; CRUZ, F. G.; ROQUE, N. F. & FASCIO, M. Triterpenos da Resina de *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae): Caracterização em Misturas Binárias. **Química Nova**, 23(5): 623-626. 2000.

MAIA, J. G. S.; ZOGBHI, M. D. G. B. Óleos essenciais da Amazônia: inventário da flora aromática in: **Tópicos especiais em Tecnologias de Produtos Naturais**, Coordenadores FARIA, Lênio José Guerreiro de Costa, Cristiane Maria Leal, NUMA/POEMA/UFPA, Série POEMA nº7, p. 129 e 133, Bélem, 1998.

MARQUES, D. D.; SARTORI, R.A.; LEMOSI, T.L.G.; MACHADO, L.L.; SOUZA, J.S.N; MONTE, F.J.Q. Chemical composition of the essential oils from two subspecies of *Protium heptaphyllum*. **Acta Amazônia**, v. 40, n.1, 2010.

MATOS, F. J. A. **O formulário fitoterápico do professor Dias da Rocha**. Fortaleza, 2 ed. P. 258, 1997.

MÉLO, M. E. B. **Investigação da genotoxicidade de larvicidas biológicos e sintéticos utilizados para o controle de *Aedes aegypti***. 2009. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Universidade federal do Recife, Pernambuco.

MELO, M. F..F.; MACEDO, S. T.; DALY, D. C. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de nove espécies de *Protium* Burm. f. (Burseraceae) da Amazônia Central, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, 21:503-520, 2007.

MENDONÇA, F. DE. A.; SOUZA, A. V. E.; DUTRA, D. DE A. Saúde pública, urbanização e dengue no Brasil. **Sociedade & Natureza Uberlândia**, v.258, 2009.

MENEZES, E. L. A. **Inseticidas botânicos**: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Seropédica, Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia, p. 58, 2005.

MISNI, N.; NOR, Z.M.; AHMAD, R. Repellent effect of microencapsulated essential oil in lotion formulation against mosquito bites. **J Vector Borne Dis**, v.54, p. 44-53, 2017.

MIRANDA, A. L. P.; SILVA; J. R. A.; REZENDE, C. M. NEVES, J. S.; PARRINI, S. C.; PINHEIRO, M. L. B.; CORDEIRO, M. C.; TAMBORINI, E. PINTO, A. C.; **Planta Med.**,v.66, p. 284, 2000.

MORAIS, L. A. S. de. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 4050-4063, 2009.

MURILLO-ALVAREZ, J. I.; ENCARNACIÓN, D. R.; FRANZBLAU, S. G. Antimicrobial and cytotoxic activity of some medicinal plants from Baja California Sur (México). **Pharm Biol**, v.39, p.445-449, 2001.

MUKABANA, W. R.; TAKKEN, W.; KILLEEN, G. F.; KNOLS, B. G. J.; Allomonal effect of breath contributes to differential attractiveness of humans to the African malaria vector *Anopheles gambiae*. **Malaria Journal**, v.3, p.1-8, 2004.

NAVARRO SILVA, M. A.; MARQUES, F. A.; DUQUE, J. E. L.; Review of semiochemicals that mediate the oviposition of mosquitoes: a possible sustainable tool for the control and monitoring of Culicidae. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n.1, p. 1-6, 2009.

NENTWIG, G. Use of repellents as prophylactic agents. **Parasitology Research, Berlin**, v. 90, n. 1, p. 40-48, 2003.

OLIVEIRA, R. A.; REIS, T. V.; SACRAMENTO, C. K.; DUARTE, L. P.; OLIVEIRA, F. F. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.3, p. 771-775, 2009.

OLIVEIRA, F. A.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; LIMA JR, R. C. P.; SILVA, R. M.; MAIA, J. L.; BRITO, G. A. A. C.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Protective effect of α - and β -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 2, p. 103-108, 2005.

OLIVEIRA MELO, A. S.; et al., Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? **Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**, v. 47, n. 1, p. 6–7, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Dengue control**, 2010. Disponível em: <http://www.who.int/denguecontrol/en/index.html>. Acessado em: 24 out 2017

OTUKI, M. F.; LIMA, F. V.; MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Evaluation of the antinociceptive action caused by ether fraction and a triterpene isolated from resin of *Protium kleinii*. **Life Science**, v. 69, n° 19, p. 2225-2236, 2001.

PERINI, J. A.; ANGELI-GAMBA, T.; ALESSANDRA-PERINI, J.; FERREIRA, L. C.; NASCIUTTI, L. E.; MACHADO, D. E. Topical application of aceflan on rat skin injury accelerates wound healing: a histopathological, immunohistochemical and biochemical study, **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 15, p. 203, 2015.

PLOWDEN, J. C. The Ecology, Management and Marketing of Non-Timber Forest Products in the Alto Rio Guamá Indigenous Reserve (Eastern Brazilian Amazon). **Ecology**, p. 264, 2001.

POLANCZYK, R. A.; GARCIA, M. O.; ALVEZ, S. B.; **Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti***. Revista de Saúde Pública. 6: 813-816, 2003.

PONTES, W.J.T.; OLIVEIRA, J.C.G. DA; CÂMARA, C.A.G. DA; LOPES, A.C.H.R.; GONDIM JÚNIOR; M.G.C.; OLIVEIRA, J.V. DE; BARROS, R.; SCHWARTZ, M.O.E. Chemical composition and acaricidal activity of the leaf and fruit essential oils of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Burseraceae). **Acta Amazonica**, Manaus, v.37, n.1, p.103-110, 2007.

POTIKASIKORN, J.; M. J. BANGS, A. PRABARIPAI, AND T. CHAREONVIRIYAPHAP. Behavioral responses to DDT and pyrethroids between *Anopheles minimus* species A and C, malaria vectors in Thailand. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.73, p. 343-349, 2005.

PRICE, S. **Aromaterapia para doenças comuns**. São Paulo, Manole, 1999.

PURNHAGEM, L. R. P. **Estudo Fitoquímico e Antibacteriano do Óleo essencial de *Baccharisuncinella* DC. do Município de Campo Alegre-SC**. 2010, p. 69 Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2010.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, p. 906, 2001.

RIBAS, J.; CARREÑO, A. M. Avaliação do uso de repelentes contra picada de mosquitos em militares na Bacia Amazônica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, p. 34, 2010.

RIBEIRO, J. E. L. S. et al. **Flora da Reserva Ducke guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. Manaus: INPA, p.816, 1999.

RIBEIRO, ANDRESSA F., et al. **Associação entre incidência de dengue e variáveis climáticas**. Rev Saúde Pública, São Paulo, v. 40, n. 4, p. 671-676, 2006.

ROBLES, J. E.; TORRENEGRA, R. D.; GRAY, A. I.; PIÑEROS, C.; ORTIZ, L.; SIERRA, M. Triterpenosaislados de corteza de *Bursera graveolens* (Burseraceae) y su actividad biológica. **Ver Bras Farmacogn**, v.15, p. 283-286, 2005.

ROEL, A. R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, v. 1, n. 2, p. 43-50, 2001.

ROSS, J. S.; SHAH, J. C. Reduction in skin permeation of N, N-diethyl-m-toluamide (DEET) by altering the skin /vehicle partition coefficient. **J Contr Release.**, v.67, p.211-21, 2000.

RÜDIGER, A. L.; SIANI, A. C.; JUNIOR, V. F. V. The chemistry and pharmacology of the South America genus *Protium* Burm.f. (Burseraceae). **Pharmacognosy Review**, p.93-104, 2007.

RUTLEDGE, L. C. et al., Mathematical models of the effectiveness and persistence of mosquito repellents. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.1, n.1, p.56-62, 1985.

SANTANA, A. I.; VILA, R.; ESPINOSA, A.; OLMEDO, D.; GUPTA, M. P.; CAÑIGUERAL, S. **Composition and biological activity of essential oils from *Protium confusum***. *Nat Prod Commun*, v.4, n.10, p.1401-6, 2009.

SALLUM, M. A. M.; BERGO, E. S. FLORES; D. C. FORATTINI; O.P. Systematic study on anopheles *Galvaioicausey*, Deane e Deane from the subgenus *Nyssorrhynchus* blanchard (diftera:culicidea). **Mem inst Oswaldo Cruz**, v. 8 p. 1177-89, 2002.

SANTOS, A. S.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; LUZ, A. I. R.; MAIA, J. G. S. Sesquiterpenes on Amazonian Piper Species. **Acta Amazonica**, v. 28, n. 2, p. 127-130, 1998.

SANTOS, M. R. A. dos; SILVA, A. G.; LIMA, R. A.; LIMA, D. K. S.; SALLET, L. A. P.; TEIXEIRA, C. A. D.; POLLI, A. R.; FACUNDO, V. A. Atividade inseticida do extrato das folhas de *Piper hispidum* (Piperaceae) sobre a broca-docafé (*Hypothenemus hampei*). **Revista Brasileira Botânica**, v.33, p.319- 324, 2010.

SANTOS, R. C. S. D.; SANTOS, E. D. C. D. Malaria: Cobais Humanas no Amapá. **Estação científica UNIFAP-Macapá**, v. 1, n. 2, p. 143-150, 2011.

SERVICE, M. W. **Medical Entomology**. London: Chapman e Hall Press, p. 195, 1996.

SILVA, É. A. S. Estudo dos óleos essenciais extraídos de resinas de espécies *Protium* spp. **Instituto de Química**, Universidade de São Paulo, São Carlos, P. 159, 2006.

SILVA, J. P. L.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; PEREZ, D. V.; FRANCO, B. D. G. M. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella* enteritidis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, Supl. 1, p.136-141, 2010.

SIANI, A. C.; GARRIDO, I. S.; CARVALHO, E. S.; RAMOS, M. F. S. *Protium icicariba* as a source of volatile essences. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 477-489, 2004.

SIANI, A. C.; RAMOS, M. F.; MENEZES-DE-LIMA O. J. R.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; FERNANDEZ-FERREIRA, E.; SOARES, R.O.; ROSAS, E.C.; SUSUNAGA G.S.; GUIMARÃES, A.C.; ZOGHBI, M.G.; HENRIQUES, M. G. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **J Ethnopharmacol**, v.66, n.1, p.57-69, 1999.

SCHULER-FACCINI, L.; RIBEIRO, E. M.; FEITOSA, I. M.; HOROVITZ, D. D.; CAVALCANTI, D. P.; PESSOA, A.; et al., **Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015**. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 65(3): 59-62, 2016.

SOUZA, S. É. A.; **Estudo dos óleos essenciais extraídos de resinas de espécie *Protium* spp.** 2006. 159p. Dissertação (mestrado) – Instituto de química. Universidade de São Paulo (USP), São Carlos. 2006.

SOUZA, J. R. P.; MORAIS, H.; CARAMORI, P. H.; JOJANSSON, L. A. P. S.; MIRANDA, L. V. Desenvolvimento da espinheira-santa sob diferentes intensidades luminosas e níveis de poda. **Horticultura Brasileira** 26: 40-44, 2008

TAYLOR, P. et al. Screening of Venezuelan medicinal plant extracts for cytostatic and cytotoxic activity against tumor cell lines. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 4, p. 530-539, 2013.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle da febre amarela no Brasil. **Rev Saúde Publica**. p. 44 (3): 555-8, 2010

TEIXEIRA, M. G.; et al., Avaliação de impacto de ações de combate ao *Aedes aegypti* na cidade de Salvador, Bahia. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, n. 1, 2002.

TYRREL, M. H. **Evolution of natural flavor development with the assistance of modern technologies**. Fd Tech. P. 68-72, 1990.

TORRES-ESTRADA, J. L.; RODRIGUEZ, M. H. Señales físico químicas involucradas em labúsqueda de hospederos y em lainducción de picadura por mosquitos. **Salud Pública de México**, v.45, Suppl. 6, p.497-505, 2003.

VALLE, D.; PIMENTA, D. N.; CUNHA, R. V. Dengue: teorias e práticas. Rio de Janeiro: **Editora Fiocruz**, 2015.

VENDRAMIM, J. D.; CASTIGLIONI, E. Aleloquímicos, resistência e plantas inseticidas. In: GUEDES, J. C.; COSTA, I. D. da; CASTIGLIONI, E. **Bases e técnicas do manejo de insetos**. Santa Maria: UFSM, p. 113-128, 2000.

VIEIRA JÚNIOR, G. M.; SOUZA, C. M. L.; CHAVES, M. H. Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. **Quim. Nova**, v. 28, n. 2, p. 183-187, 2005.

VIEGAS JÚNIOR, C.; **Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos**. Química Nova, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

VIEIRA JÚNIOR, G. M.; CARVALHO, A. A.; GONZAGA, W. A.; CHAVES, M. H. Cromatografo em coluna com resina de almécega: um projeto para química orgânica experimental. **Quim. Nova**, v.30, n. 2, p.491-493, 2007.

VITOR, C. E.; FIGUEIREDO, C. P.; HARA, D. B.; BENTO, A. F.; MAZZUCO, T. L.; CALIXTO J. B. Therapeutic action and underlying mechanisms of a combination of two pentacyclitriterpenes, alpha- and beta-amyrin, in a mouse model of colitis. **British Journal of Pharmacology**. v. 157, n.6, p. 1034-1044, 2009.

VON POSER, G. L.; et al. Essential oil composition and allelopathic effect of the Brazillian Lamiaceae *Hesperozygisringens* (Benth.) Epling and *Hesperozygisrhododon*Epling.J. Agric. Food Chem., v. 44, p. 1829-1832, 1996 *apud* VON POSER, GilsaneLino; MENTZ, LilianAuler. **Diversidade Biológica e Sistemas**

de Classificação. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; et al. Editora da UFRGS/Editora da UFSC: Porto Alegre/Florianópolis, 5. ed., p. 75-89, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for efficacy testing of mosquito repellents for human skins.** WHO/HTM/NTD/WHOPES/, WHO, Geneva p. 4-18, 2009.

YANG JIANG et al., Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, n. 1, p. 63–68, 2011.

APÊNDICE I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Resolução nº 466/12 – Conselho Nacional de Saúde Sr (a) foi selecionado (a) e está sendo convidado (a) para participar da pesquisa **intitulada: estudo químico e da atividade larvicida e repelente do óleo essencial da resina de *protiumheptaphyllum* frente ao *Aedesaegypti*. Objetivos:** Avaliar a atividade repelente das amostras contendo o óleo da resina de *protiumheptaphyllum*, e comparar a ação de repelente com um repelente comercial contendo DEET. O óleo será extraído da resina, sua participação nesta etapa da pesquisa consistirá na aplicação das amostras em seu antebraço direito e exposição desta área tratada dentro de uma gaiola de tamanho 40 cm³ contendo 50 **fêmeas sadias** do mosquito *Aedes aegypti*, por no máximo 30 segundos. Antes de iniciar o experimento os braços dos voluntários serão lavados com água e sabão, enxugados e depois serão introduzidos na gaiola com o braço tratado, você deverá colocar o braço não tratado na caixa por até 3 minutos ou até que os mosquitos pousem para iniciar a picada. Os mosquitos serão provenientes de uma colônia mantida no insetário do Laboratório de Arthropoda da Universidade Federal do Amapá, e são isentos de doenças, não havendo nenhum risco de transmissão de doenças. Os riscos antecipáveis em decorrência da participação na pesquisa restringem-se ao aparecimento de vermelhidão no local da aplicação e eventuais reações alérgicas devido à sensibilidade ao óleo ou a picada. Neste caso o voluntário que apresentar reações de sensibilidade será afastado do ensaio. A pesquisa terá como benefício descobrir se as amostras com os óleos de *protiumheptaphyllum* possuem ação repelente frente à *Aedes aegypti*, ao mosquito transmissor da dengue e febre amarela, possibilitando o uso das amostras desenvolvidas como medida auxiliar na prevenção destas doenças. Para participação nesta pesquisa os voluntários devem ser maiores de 18 anos, não possuírem histórico de alergia a picadas de insetos, ou a produtos repelentes, sem enfermidades dermatológicas aparentes. As informações obtidas através desta pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Você receberá uma cópia deste termo onde constam os telefones do pesquisador, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação nesta pesquisa pode ser interrompida em qualquer momento. Os **dados coletados** serão utilizados apenas **NESTA** pesquisa e os resultados divulgados em eventos e/ou revistas científicas. Sua participação é **voluntária**, isto é, a qualquer momento você poderá **recusar-se** a responder qualquer pergunta ou desistir de participar e **retirar seu consentimento**. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o(s) pesquisador (a) ou com a instituição que forneceu os seus dados, como também na que trabalha. **Toda pesquisa possui riscos potenciais, maiores ou menores, de acordo com o objeto de pesquisa, seus objetivos e a metodologia escolhida. O pesquisador deverá identificar os riscos, esclarecer e justificá-los aos sujeitos da pesquisa, bem como, as medidas para minimizá-los.**

Desde já agradecemos!

Nome do (a) Orientador (a): Prof. Dr. Fernando Antônio de Medeiros

Pesquisador Principal: Cleidjane Gomes Faustino. Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde PPGCS da Universidade Federal do Amapá UNIFAP

E-mail: cgfenfermagem@gmail.com.br Cel: 04196 – 981272268.

“O Comitê de Ética é o setor responsável pela permissão da pesquisa e avaliação dos seus aspectos éticos. Caso você tenha dificuldade em entrar em contato com o pesquisador responsável, comunique-se com o Comitê de Ética da Escola pelo telefone supracitado.”

Declaro estar ciente do inteiro teor deste TERMO DE CONSENTIMENTO e estou de acordo em participar do estudo proposto, sabendo que dele poderei desistir a qualquer momento, sem sofrer qualquer punição ou constrangimento. Recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

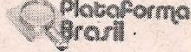
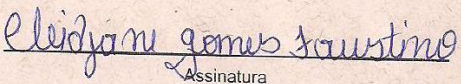
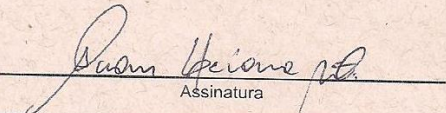
_____ de _____ 2017.

Participante da Pesquisa: _____
(Assinatura)



ANEXOS

ANEXO-I FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

 MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS			
1. Projeto de Pesquisa: ESTUDO QUÍMICO E DA ATIVIDADE LARVICIDA E REPELENTE DO ÓLEO ESSENCIAL DA RESINA DE Protium heptaphyllum FRENTE AO Aedes E Anopheles			
2. Número de Participantes da Pesquisa: 20			
3. Área Temática:			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 4. Ciências da Saúde			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
5. Nome: CLEIDJANE GOMES FAUSTINO			
6. CPF: 072.424.934-63		7. Endereço (Rua, n.º): PEDRO LAZARINO 1/152 SANTA INES MACAPA AMAPA 68901541	
8. Nacionalidade: BRASILEIRO		9. Telefone: 96981272268	10. Outro Telefone:
11. Email: cgfermagem@gmail.com			
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.			
Data: 24, 10, 2016		 Assinatura	
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
12. Nome: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPA		13. CNPJ: 34.868.257/0001-81	
14. Unidade/Órgão:			
15. Telefone: (96) 3312-1740		16. Outro Telefone:	
Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.			
Responsável: <u>Alaan Ubaiara Brito</u>		CPF: <u>522 794 892-49</u>	
Cargo/Função: <u>Diretor do Departamento de Pesquisa</u> <u>Portaria N° 1583/2014</u>			
Data: 24, 10, 2016		 Assinatura	
PATROCINADOR PRINCIPAL			
Não se aplica.			

ANEXO-II CROMATOGRAFIA DO ÓLEO ESSENCIAL DA RESINA DE *PROTIUM HEPTAPHYLLUM*

