



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ROSANY LOPES MARTINS

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE,
MICROBIOLÓGICA, DE CITOTOXICIDADE E INSETICIDA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng (LAMIACEAE)**

**Macapá
2016**

ROSANY LOPES MARTINS

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE,
MICROBIOLÓGICA, DE CITOTOXICIDADE E INSETICIDA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng (LAMIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá - UNIFAP, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Biologia Farmacêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Sheylla Susan Moreira da Silva de Almeida.

**Macapá
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

615.1

M378e Martins, Rosany Lopes.

Estudo químico e avaliação das atividades antioxidante, microbiológica, de citotoxicidade e inseticida do óleo essencial de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng (Lamiaceae) / Rosany Lopes Martins; orientador, Sheylla Susan Moreira da Silva de Almeida. – Macapá, 2016.

70 f.

Dissertação (mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Farmácia – Produtos naturais. 2. *Aedes aegypti*. 3. Hidrodestilação. I. Almeida, Sheylla Susan Moreira da Silva de, orientador. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

ROSANY LOPES MARTINS

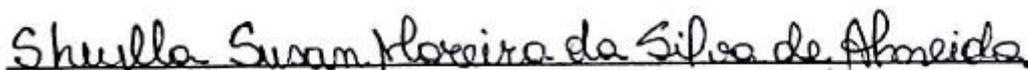
**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE,
MICROBIOLÓGICA, DE CITOTOXICIDADE E INSETICIDA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng (LAMIACEAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá-UNIFAP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

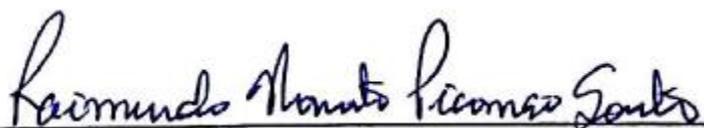
Área de Concentração: Biologia Farmacêutica.

Data da Avaliação: 16 de setembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Sheylla Susan Moreira da Silva de Almeida (Orientadora)
Universidade Federal do Amapá/PPGCF



Prof. Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto (Membro titular)
Universidade Federal do Amapá/PPGCF



Profa. Dra. Clarissa Silva Lima (Membro titular)
Universidade Federal do Amapá/PPGCF

*Dedico este trabalho aos meus pais, ao meu esposo,
e aos meus irmãos, por todo amor, carinho e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado saúde e força para superar todas as dificuldades. Ele que ilumina minha vida, me protege e abençoa cada um dos meus passos.

Ao meu esposo, Renato Glauber de Almeida, que em todos os momentos esteve me ajudando e apoiando com palavras de incentivo e de carinho. E por todo amor, respeito e cumplicidade que construímos e compartilhamos.

Aos meus pais (Ana Rosa e José Luiz) e meus irmãos (Denise, Alderlane e Denis), que mesmo distantes não deixaram de me apoiar e de acreditar em mim. Saibam que a saudade nos momentos de maiores dificuldades, somente valorizou ainda mais essa minha conquista.

À minha orientadora, Profa. Dra. Sheylla Susan Moreira da Silva de Almeida, pela oportunidade de compartilhar seus conhecimentos, pelo apoio e incentivo. Todo meu respeito e admiração.

Aos professores Raimundo Souto, Ricardo Ferreira e ao técnico Rodrigo por todo suporte e aprendizagens no laboratório de Arthrolab.

Ao Prof^o Aldo Aparecido Proietti Junior, do laboratório de Microbiologia aplicada (LEMA) pelo aprendizado e ajuda.

Ao perito criminal, Me. Carlos Henrique da Polícia Técnico-Científica do Amapá – Politec, pelo suporte técnico.

Aos amigos do Laboratório de Farmacognosia e Fitoquímica, Alex Rodrigues, Érica Rabelo, Rangel Simões, Ana Luzia Farias, Mayara Tânia e Ryan Ramos, a ajuda de vocês foi indispensável para realização desse trabalho. Meus irmãos de coração que espero levar por toda vida.

À todos os professores, que ao longo do curso, contribuiriam com a minha formação.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de realizar mais um sonho e por toda infraestrutura concedida para o desenvolvimento deste trabalho.

À Capes pela concessão da bolsa de mestrado.

A toda minha família e amigos que por muitas vezes estiveram distantes, mas sempre torceram por este momento.

Aos meus colegas da turma de mestrado, por toda amizade e ajuda que compartilhamos ao longo desta caminhada.

A todos que direta ou indiretamente, acreditaram e contribuíram para realização deste trabalho.

“Nada é tão nosso, quanto os nossos sonhos”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

A espécie *Aeollanthus suaveolens* conhecida popularmente como catinga de mulata pertence à família Lamiaceae (Labiatae). Na região amazônica esta espécie é utilizada na medicina popular para o tratamento de gastrite, convulsão de origem epiléptica, dor no estômago e diarreia, sendo a folha a parte mais utilizada, na forma de chá e sumo. Os óleos essenciais desta espécie apresentam atividade antimicrobiana, analgésica e anti-inflamatória. O presente trabalho avaliou a composição química do óleo essencial de *A. suaveolens*, atividade antioxidante, citotóxica frente à *Artemia salina* Leach, antimicrobiana e inseticida em imaturos e adultos de *Aedes aegypti*. A espécie vegetal foi coletada no distrito da fazendinha na cidade de Macapá-Amapá. O processo de obtenção do óleo essencial foi realizado por hidrodestilação e a identificação dos componentes por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrômetro de Massas. A atividade antioxidante foi avaliada pelo método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, enquanto a atividade citotóxica foi avaliada utilizando *A. salina*, a atividade microbiológica foi realizada pelo método de microdiluição com bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus*, o bioensaio do potencial larvicida foi realizado com larvas no terceiro estágio de desenvolvimento do mosquito *A. aegypti* e a atividade adulticida foi realizada de acordo com o protocolo da World Health Organization. Nas análises cromatográficas, os constituintes majoritários encontrados no óleo essencial de *A. suaveolens* foram (E)- β -Farneseno (37,615%), Linalol (33,375%), α -Santaleno (3,255%) e Acetato de linalila (3,222%). Os resultados mostraram que as bactérias *E. coli* e *Salmonella* sp. apresentaram mais suscetibilidade com CIM de 50 mg.mL⁻¹, quando comparadas com a bactéria *S. aureus* com CIM de 100 mg.mL⁻¹. Com relação à CBM, a concentração de 100 mg.mL⁻¹ foi suficiente para inibir o crescimento de *E. coli*. O óleo essencial não apresentou atividade antioxidante com IC₅₀ de 6,26 mg.mL⁻¹, no entanto, apresentou elevada atividade citotóxica frente à *A. salina*, com CL₅₀ de 8,90 μ g.mL⁻¹. O óleo essencial da *A. suaveolens* apresentou potente atividade larvicida com CL₅₀ de 0,072 mg.mL⁻¹ após 24h e CL₅₀ de 0,052 mg.mL⁻¹ após 48h de teste. Em relação à atividade inseticida em adultos, o óleo essencial da espécie apresentou CL₅₀ de 6, 25 mg.mL⁻¹ e 5, 35 mg.mL⁻¹ em 24 e 48h, respectivamente. Deste modo, o óleo essencial obtido das folhas de *Aeollanthus suaveolens* apresenta potencial para o desenvolvimento de inseticidas naturais.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, atividade biológica, hidrodestilação, produtos naturais.

ABSTRACT

The *Aeollanthus suaveolens* species is popularly known as catinga de mulata and belongs to the Lamiaceae family (Labiatae). In the Amazon region, this species is used in folk medicine for the treatment of gastritis, convulsions of epileptic origin, stomach pain and diarrhea, and the sheet the most used part, in the form of tea and juice. The essential oils of this species have antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activity. This study evaluated the essential oil chemical composition of *A. suaveolens*, antioxidant activity, cytotoxic on *Artemia salina* Leach, antimicrobial and insecticide in immature and adult *Aedes aegypti*. The plant species was collected in small farm district in the city of Macapá, Amapá. The essential oil obtained from the process was performed by hydrodistillation and identifying the components by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometer. The antioxidant activity was evaluated by the method of sequestering radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, while cytotoxic activity was evaluated using *A. salina*, the microbial activity was carried out by microdilution method with *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Staphylococcus aureus*. The larvicidal potential bioassay was conducted using larvae in the third stage of development mosquito *A. aegypti* and adulticidal activity was performed according to the World Health Organization. In the chromatographic analysis, the major constituents found in the essential oil of *A. suaveolens* were (E) - β -farnesene (37.615%), Linalool (33.375%), α -Santalene (3.255%) and linalyl acetate (3.222%). The results showed that the bacteria *E. coli* and *Salmonella* sp. were more susceptible to MIC 50 mg.mL⁻¹, when compared with the bacterium *S. aureus* MIC 100 mg.mL⁻¹. Regarding to the MBC concentration of 100 mg.mL⁻¹, it was sufficient to inhibit the growth of *E. coli*. The essential oil showed no antioxidant activity with IC₅₀ of 6.26 mg.mL⁻¹, however, it showed high activity against the cytotoxic *A. salina* with CL₅₀ 8.90 μ g.mL⁻¹. The essential oil of *A. suaveolens* showed potent larvicidal activity with LC₅₀ 0.072 mg.mL⁻¹ after 24 hours and LC₅₀ 0.052 mg.mL⁻¹ of the test, after 48 hours. In relation to the insecticidal activity in adults, the essential oil of the species presented LC₅₀ 6.25 mg.mL⁻¹ and 5.35 mg.mL⁻¹ 24h and 48h, respectively. Thus, the essential oil obtained from the leaves of *A. suaveolens* shows potential for the development of natural insecticides.

Keywords: *Aedes aegypti*, biological activity, hydrodistillation, natural products.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μL – Microlitro

% AA – Porcentagem de atividade antioxidante

ATCC – American Type Culture Collection

BM – Biomassa do vegetal

BU – Base úmida

CBM – Concentração bactericida mínima

CIM – Concentração inibitória mínima

CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas

CI₅₀ – Concentração Inibitória 50%

CL₅₀ – Concentração Letal que causa mortalidade de 50% dos indivíduos

CLSI – Manual Clinical and Laboratory Standards Institute

cm – Centímetro

CO₂ – Dióxido de carbono

DMSO – Dimetilsufóxido

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

HAMAP – Herbário Amapaense

IEPA – Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá

IK – Índices de Kolvats

ISO – International Standart Organization

KPa – Quilopascal

mg – Miligrama

CMH – Caldo Müeller-Hinton

mL – Mililitro

mm – Milímetro

OE – Óleos Essenciais

OMS – Organização Mundial da Saúde

ppm – partes por milhão

SPSS – Statical Package for the Social Science

tR – Tempo de retenção

WHO – World Health Organization

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.....	18
Figura 2 - Espécie vegetal estudada (<i>A. suaveolens</i>).....	22
Figura 3 - Sistema de extração do óleo essencial com o aparelho de Clevenger modificado.....	28
Figura 4 - Esquema para determinação da CIM pelo método de microdiluição.....	32
Figura 5 - Atividade larvicida do óleo essencial de <i>A. suaveolens</i> frente à <i>A. aegypti</i>	33
Figura 6 - Atividade adulticida do óleo essencial de <i>A. suaveolens</i> frente à <i>A. aegypti</i>	34
Figura 7 - Cromatograma obtido por CG-EM do óleo essencial de <i>A. suaveolens</i> Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 60 °C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 3 °C/min. até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 30,0 min.....	35
Figura 8 - Estrutura dos principais compostos do OE de <i>A. suaveolens</i>	36
Figura 9 - Espectros de massas do óleo essencial da <i>A. suaveolens</i> obtidos por CG-EM em comparação com espectros da biblioteca do equipamento.....	37
Figura 10 - Concentração bactericida mínima (CBM) do óleo essencial de <i>A. suaveolens</i> frente às cepas de <i>Salmonella sp.</i> (A), <i>E. coli</i> (B) e <i>S. aureus</i> (C) nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 mg.mL ⁻¹ em 24 h de incubação a 37° C.....	54
Quadro 1 - Características físico-químicas dos óleos essenciais.....	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Microrganismos testados nos ensaios de atividade antimicrobiana.....	31
Tabela 2 - Substâncias identificadas, tempo de retenção, percentual relativo e índice de Kovats da literatura do óleo essencial de <i>A. suaveolens</i> por CG-EM.....	50
Tabela 3 - Média e desvio padrão do percentual de atividade antioxidante do óleo essencial de <i>A. suaveolens</i> em diferentes concentrações.....	51
Tabela 4 - Percentual de mortalidade de larvas de <i>A. salina</i> em diferentes concentrações de óleo essencial de <i>A. suaveolens</i>	52
Tabela 5 - Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do óleo essencial de <i>A. suaveolens</i>	53
Tabela 6 - Porcentagem de mortalidade (%) das larvas de <i>A. aegypti</i> em diferentes concentrações do óleo essencial de <i>A. suaveolens</i> em dois períodos.....	55
Tabela 7 - Porcentagem de mortalidade (%) de <i>A. aegypti</i> adultos em diferentes concentrações do óleo essencial de <i>A. suaveolens</i> durante dois intervalos de tempo.....	56

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
3.1 PLANTAS MEDICINAIS.....	16
3.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	17
3.3 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	18
3.4 FAMÍLIA LAMIACEAE.....	20
3.5 <i>Aeollanthus suaveolens</i> Mart. ex Spreng.....	21
3.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	22
3.7 <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE).....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 MATERIAL VEGETAL.....	27
4.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	27
4.3 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS.....	28
4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	29
4.5 ATIVIDADE CITOTÓXICA COM <i>Artemia salina</i> Leach.....	30
4.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	30
4.6.1. Microrganismos.....	30
4.6.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM).....	31
4.7 ATIVIDADE LARVICIDA.....	32
4.8 ATIVIDADE ADULTICIDA.....	33
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1 RENDIMENTO.....	35
5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES QUÍMICOS POR CG-EM.....	35
5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>A. suaveolens</i> PELO MÉTODO DE CAPTURA DO RADICAL DPPH.....	50
5.4 TOXICIDADE FRENTE À <i>A. salina</i> DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>A. suaveolens</i>	52
5.5 ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>A. suaveolens</i>	53
5.6 ATIVIDADE LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>A. suaveolens</i>	55
5.7 ATIVIDADE ADULTICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>A. suaveolens</i>	56
6 CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

A família Lamiaceae (Labiatae) apresenta grande importância na medicina popular com muitas espécies que apresentam substâncias biologicamente ativas. Tradicionalmente, são usadas como estimulantes do aparelho digestivo, no combate a cólicas, gases, gastrite, dor de cabeça e febre. Os óleos essenciais (OEs) de suas espécies se destacam por possuir amplo valor econômico, uma vez que são usados, principalmente, na indústria farmacêutica, para produção de medicamentos; na indústria alimentícia, para conferir sabor aos alimentos; na indústria química, como aromatizante e na indústria cosmética, para composição de perfumes.

Dentre as espécies da família Lamiaceae, a *Aeollanthus suaveolens* (catunga de mulata), apresenta destaque na região amazônica por ser usada na medicina popular para tratamento de gastrite, convulsão de origem epiléptica, dor no estômago e diarreia, para compor fragrâncias regionais e como planta ornamental, sendo a folha a parte mais utilizada, na forma de chá e sumo. Os óleos essenciais desta espécie apresentam atividade antimicrobiana, analgésica e anti-inflamatória.

Particularmente, no estado do Amapá, as plantas com propriedades terapêuticas são utilizadas pelos moradores locais no tratamento de enfermidades em geral. No entanto, pouco se conhece sobre suas potencialidades e especificidades terapêuticas, principalmente de espécies da família Lamiaceae, que são importantes produtoras de óleos essenciais com grande potencial econômico. Por possuir capacidade citotóxica, os óleos essenciais podem atuar como antissépticos e antimicrobianos para uso pessoal, como purificador de ar, inseticida para preservação de grãos e estoques de alimentos. Além disso, alguns óleos essenciais demonstram clara capacidade antimutagênica, que pode estar ligada a sua atividade anticarcinogênica.

Inseticidas botânicos são definidos como compostos resultantes do metabolismo secundário das plantas. Dentre os metabólitos secundários das plantas estão os óleos essenciais que são considerados misturas de constituintes, formados principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides. Por possuir efeito ovicida, larvicida e adulticida que combatem o mosquito *A. aegypti*, os óleos essenciais vêm despertando amplo interesse em vários grupos de pesquisa.

Tendo em vista a grande diversidade de vegetais existente no Brasil, de um total estimada em 15 a 20% do total mundial (60.000 espécies) e a ampla resistência do *A. aegypti* à inseticidas químicos, estudos a partir de óleos essenciais surgem como expectativa para se

encontrar substâncias com propriedades inseticidas e simultaneamente seletivas para serem usadas em futuras formulações de um produto comercial que seja eficiente, economicamente viável e biodegradável.

Desta forma, o uso de plantas medicinais da flora amazônica para o tratamento e prevenção de doenças, como a dengue, febre de Chikungunya e Zika, continua sendo um campo de pesquisa bastante explorado, uma vez que essas doenças se agravam em países tropicais onde as condições do ambiente associadas à ineficácia das políticas públicas de saúde, favorecem o aumento da população de mosquitos. Porém, antes de sua utilização como fitoterápico é necessário que se tenha conhecimento prévio de seus compostos para conhecer sua toxicidade e assim fazer uma formulação apropriada e uma estratégia adequada para seu uso. Neste contexto, o presente estudo objetivou-se analisar a composição química e o potencial biológico do essencial das folhas de *A. suaveolens*, buscando agregar conhecimento tradicional e científico para um melhor desenvolvimento e conservação da biodiversidade da região amazônica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

✓ Analisar a composição química e atividade biológica do óleo essencial das folhas da espécie vegetal *Aeollanthus suaveolens*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Obter os óleos essenciais das folhas da espécie vegetal *A. suaveolens* por hidrodestilação;

✓ Estimar o rendimento do óleo essencial;

✓ Analisar a composição química do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa;

✓ Avaliar a atividade antioxidante do óleo essencial da *A. suaveolens* pelo método de sequestro do radical DPPH;

✓ Realizar bioensaio citotóxico do óleo essencial frente às larvas de *Artemia salina* L.

✓ Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração mínima bactericida (CMB) do óleo essencial;

✓ Avaliar o potencial larvicida do óleo essencial da *A. suaveolens* frente às larvas de *A.aegypti*;

✓ Avaliar o potencial aduicida do óleo essencial da *A. suaveolens* em *A. aegypti*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PLANTAS MEDICINAIS

O uso de produtos naturais como fonte de fármacos, tem sido amplamente relatado ao longo do tempo (BARREIRO; BOLZANI, 2009). Estima-se que aproximadamente 80% da população mundial empregam frequentemente as medicinas indígenas ou tradicionais em suas necessidades primárias de saúde, especialmente àquelas que se utiliza de terapias que envolvem o uso de fitoterápicos. Essa crescente demanda na utilização de produtos naturais em todo o mundo ocorre, especialmente, devido aos problemas que são atribuídos a inúmeros produtos sintéticos tanto para a saúde humana quanto para o meio ambiente (OLIVEIRA, 2013).

No Brasil, o emprego de plantas medicinais está presente desde antes da colonização, quando índios já as utilizavam e, passaram seus conhecimentos para os colonizadores, tornando-as amplamente utilizadas na medicina caseira (LIMA et al., 2012). A história do desenvolvimento dos fármacos registra que, no início, os materiais vegetais eram utilizados da maneira como eram encontrados no meio ambiente, depois, passaram a ser concentrados para melhorar a intensidade e uniformidade de suas ações. À medida que os avanços da química foram surgindo, as substâncias ativas puderam ser identificadas, isoladas e usadas como moléculas sinteticamente elaboradas, com atividade terapêutica ainda maior (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

A utilização de plantas como fonte de novos medicamentos é ainda pouco explorado. De um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies de plantas existentes, apenas 15 a 17% foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (SANTOS, 2015). O Brasil possui uma rica diversidade vegetal, estimada em 15 a 20% do total mundial (60.000 espécies), que associada a uma rica diversidade étnica e cultural, detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais (PAULERT et al., 2014). Nestas condições, seria de se esperar que o Brasil fosse um país privilegiado, considerando sua extensa e diversificada flora. No entanto, nosso país não tem um desempenho destacado como deveria no mercado mundial de fitoterápicos, ficando inclusive atrás de países menos desenvolvidos tecnologicamente (MORENO, 2013).

Existem iniciativas do governo brasileiro para valorização do conhecimento popular e da utilização de produtos naturais pela população em seus cuidados primários de saúde. Como por exemplo, a criação da Política Nacional de Plantas Medicinais e

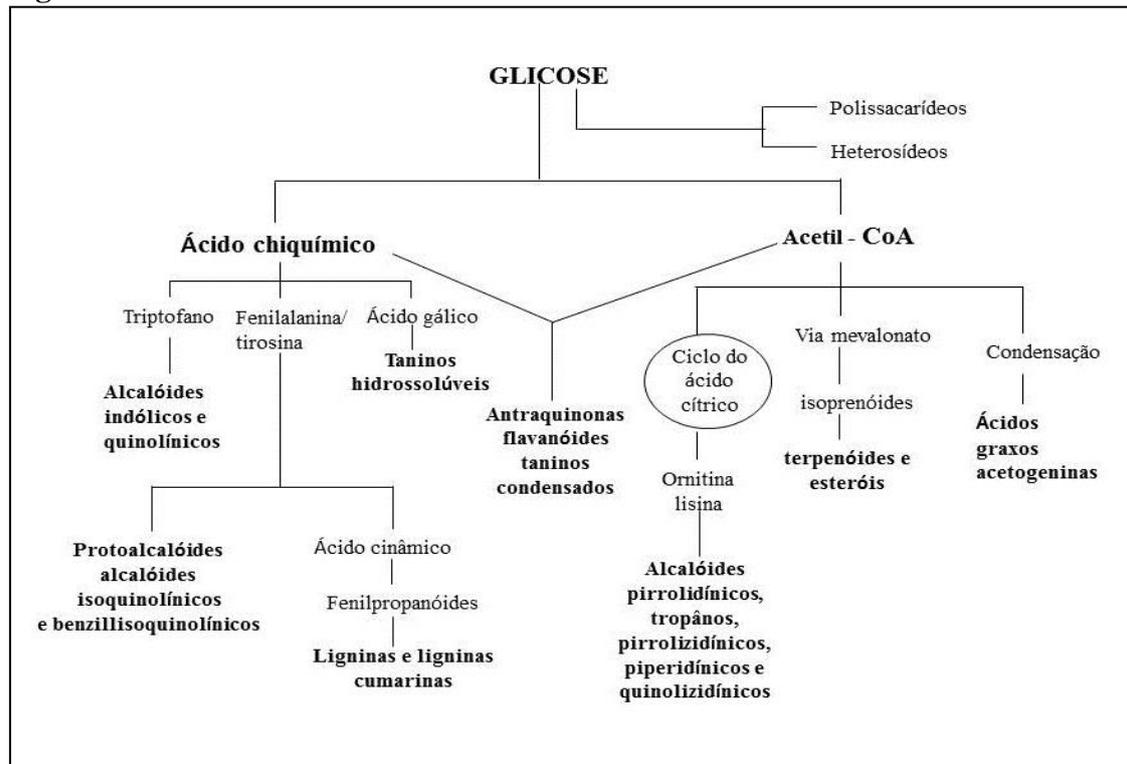
Fitoterápicos, que tem como objetivo garantir à população brasileira o acesso seguro, o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo assim o uso sustentável da biodiversidade associada ao desenvolvimento de cadeia produtiva e da indústria nacional, incentivando pesquisas que comprovem a existência de princípios ativos para a produção de possíveis novos fármacos, a partir de comprovações científicas que justifiquem o uso popular de certas plantas (BRASIL, 2006).

3.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

As plantas produzem uma grande variedade de compostos químicos, os quais são divididos em dois grupos, metabólitos primários e secundários. O metabolismo primário é considerado como uma série de processos envolvidos nas funções básicas essenciais da vida celular, enquanto os metabólitos secundários possuem atividades biológicas marcantes, com baixas concentrações e em determinados grupos de plantas (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Os metabólitos secundários foram considerados por muito tempo produtos de excreção do vegetal, com estruturas químicas e, algumas vezes, propriedades biológicas interessantes. Atualmente, sabe-se que muitas destas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação do produto ao meio, como por exemplo, na defesa contra herbívoros e microrganismos, na proteção contra os raios ultravioleta, na atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes, bem como sua participação em alelopatias (PINTO, 2015). Alguns metabólitos secundários derivam não apenas de um desses intermediários, mas são resultantes da combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivados destes, como é o caso das antraquinonas, dos flavonóides e dos taninos condensados (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Os metabólitos secundários se originam a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato (SANTOS, 2007). Esse ciclo biossintético dos metabólitos secundários pode ser observado na **figura 1**.

Figura 1 - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários

Fonte: Adaptado de Santos (2007).

Os produtos naturais provenientes do metabolismo secundário de plantas podem variar, consideravelmente, dependendo dos vários fatores abióticos, como por exemplo, sazonalidade, índice pluviométrico, temperatura e altitude, que apresentam correlações entre si, e não atuam isoladamente, além de fatores bióticos como microrganismos, insetos e plantas, (MERCÊS, 2015).

Os metabólitos secundários despertam grande interesse por suas atividades biológicas em resposta aos estímulos do meio ambiente e por possuir diversas atividades farmacológicas. Neste contexto, estudar os processos de síntese destes compostos fornece informações relevantes, tanto para comunidade científica, quanto para a indústria (ALBINO et al., 2015).

3.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

Óleos essenciais são compostos orgânicos de estrutura química heterogênea que apresentam ampla distribuição em vegetais superiores. A *International Standard Organization* (ISO) define óleos essenciais (OE) ou voláteis como produtos obtidos de partes de plantas, extraídos através de destilação por arraste a vapor d'água, bem como produtos

obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. Geralmente são misturas complexas de substâncias voláteis, odoríferas e líquidas (SIMÕES; SPITZER, 2007).

Os óleos recebem esta denominação devido a suas características físico-químicas descritas no **quadro 1**.

Quadro 1 - Características físico-químicas dos óleos essenciais

Óleos essenciais
Aparência oleosa à temperatura ambiente
Aroma agradável e intenso, por isso são chamados de essenciais
Solúveis em solventes orgânicos apolares, como o éter
Em água apresentam solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar os hidrolatos
Sabor geralmente ácido e picante
A maioria possui índice de refração e são opticamente ativos

Fonte: Adaptado de Simões e Spitzer (2007).

A extração dos OEs das plantas, sua preparação e a concentração de suas frações ou compostos são de grande importância. Os métodos de extração mais comuns são: enfloração, arraste por vapor d'água ou hidrodestilação, extração com solventes orgânicos, prensagem (ou expressão) e extração por CO₂ supercrítico. Dentre estes, o método mais usado comercialmente no Brasil é o de hidrodestilação. É um método versátil e antigo, no qual o material vegetal permanece em contato com a água em ebulição e o vapor faz com que as paredes celulares se abram e o óleo que está entre as células evapore junto com a água que vai para o condensador, onde é resfriado e separado por diferença de densidade. No caso das produções em pequena escala, emprega-se o aparelho de Clevenger (SANTIN, 2013; FONTES, 2014).

Os constituintes dos OEs podem pertencer às mais diversas classes de compostos, porém os terpenos e os fenilpropenos são os compostos mais comumente encontrados. Os terpenos encontrados com maior frequência nos óleos essenciais são os monoterpenos e sesquiterpenos, enquanto os diterpenos são considerados constituintes minoritários dos óleos essenciais (OOTANI et al., 2013). A caracterização química dos componentes dos óleos essenciais é realizada normalmente através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), analisando as regiões de pico para definir os constituintes (GUIMARÃES, 2013).

Dependendo da família, os óleos voláteis podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, como pêlos glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae), canais oleíferos (Apiaceae) em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Pinaceae, Rutaceae). Os óleos voláteis também podem acumular nos órgãos de uma planta, no entanto, se obtidos de diferentes órgãos apresentam composição química, caracteres físico-químico e odores bem distintos (SIMÕES; SPITZER, 2007).

O mercado de OEs é próspero para países que dispõem de uma grande biodiversidade, e possuem condições de agregar valor às suas matérias-primas, transformando-as em produtos beneficiados (GOULART, 2015). Exemplo disso é o Brasil que tem lugar de destaque na produção de OE, ao lado da Índia, China e Indonésia, que são considerados os quatro grandes produtores mundiais. A posição do Brasil deve-se aos OEs de cítricos (laranja, limão e lima), que contribuem com 5% do total de óleos importados para União Européia e encontra-se entre os grandes exportadores internacionais (ZULIAN et al., 2013).

Os OEs são utilizados em diversos setores da indústria como, por exemplo, na fabricação de perfumes, que ocupam 14% do mercado de cosméticos no Brasil, produtos de limpeza e pela indústria de alimentos e bebidas. São também utilizados pela indústria química e de medicamentos. O volume de produção e consumo de OEs no Brasil é, em grande parte, devido à eficácia da indústria brasileira de cosméticos (MIRANDA, 2012).

3.4 FAMÍLIA LAMIACEAE

A família Lamiaceae compreende 240 gêneros e aproximadamente 7.200 espécies de distribuição praticamente cosmopolita (MARTIN et al., 2013; ADGABA et al, 2016). No Brasil, ocorrem 46 gêneros nativos e cerca de 524 espécies, com distribuição em regiões tropicais e subtropicais (HARLEY; PASTORE, 2012; PARTIDA et al., 2015).

As Lamiaceae são, geralmente, árvores, (sub) arbustos, ervas perenes ou anuais, raramente trepadeiras, aromáticos ou não. São conhecidas em todo o mundo pelo aroma que suas plantas exalam. Elas produzem essências, e por isso podem ser consideradas aromáticas por excelência, seus componentes são os principais produtos do metabolismo secundário, mas são conhecidas principalmente por seus óleos essenciais, encontrados em tricomas glandulares na superfície das folhas e inflorescências. Estima-se que para obtenção de OEs, sejam cultivados mais de 500 mil hectares. Alguns gêneros como: *Mentha*, *Lavandula*, *Ocimum*, *Rosmarinus*, *Salvia*, *Satureja* e *Thymus* possuem grande importância econômica, uma vez que

óleos essenciais de suas espécies são utilizados a nível aromático e medicinal, em cosméticos e como condimento (SILVA, 2012; MENDES, 2007).

Na medicina popular, a família Lamiaceae ocupa o terceiro lugar em ordem de importância, com muitas espécies apresentando substâncias biologicamente ativas (HARLEY et al., 2004). Algumas espécies desta família são comumente usadas na medicina popular como antimicrobiano, anti-séptico, no tratamento de infecções do trato respiratório, dermatoses e feridas (SANTIN, 2013; SHENOY et al., 2009; AZAD et al., 2014).

Espécies da família Lamiaceae indicam grande diversidade química, sendo que *Mentha piperita* (GERSHENZON et al., 2000), *Ocimum* sp (ZABARAS; WYLLIE, 2001) e *Mentha arvensis* (MATTOS; INNECCO, 2002) apresentaram quantidades expressivas de substâncias voláteis. Óleos voláteis de espécies da família Lamiaceae possuem ação antibactericida (*Rosmarinus officinalis*); espasmolítica (*Metha x piperita* L.); anti-séptica, expectorante, flavorizante (*Thymus vulgaris* L.) e; antioxidante (*Origanum majorana* L) (SIMÕES; SPITZER, 2007).

3.5 *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng

A espécie *A. suaveolens* (**figura 2**), conhecida popularmente como catinga de mulata, pertence à família Lamiaceae. É uma erva com aproximadamente 40 cm de altura, caule circular, ramificado; folhas pecioladas, revestidas de tricomas secretores, com essência aromática; sua pré-floração é valvar. Possui flores do tipo metaclamídeas, bissexuadas, trímeras; o seu androceu apresenta estames didínamos, grãos de pólen esféricos, com carpelos dialicarpelar e unilocular; ovário do tipo ginobásico, súpero, sendo a inflorescência em racemo (OLIVEIRA et al., 2003).

Figura 2 - Espécie vegetal estudada (*A. suaveolens*)



Fonte: Martins (2015).

Na medicina popular *A. suaveolens* é usada no controle de convulsões epiléticas, no combate à febre, dor de cabeça, início de derrame, quebranto; sendo a folha a parte mais utilizada, na forma de chá e sumo (OLIVEIRA et al., 2003). Em comunidades ribeirinhas do rio Solimões no Amazonas, a espécie é usada no tratamento de gastrite, dor no estômago e diarreia. Seus banhos são usados a fim de aliviar sintomas em vítima de “mau-olhado” (AZEVEDO; KRUEL, 2007).

Estudo realizado por Simionatto (2007) mostraram atividade antimicrobiana do óleo essencial da *A. suaveolens*, sendo a massoia lactona fortemente ativa contra os microrganismos *Salmonella setubal* e *Bacillus subtilis*. Extrato hidroalcolico de *A. suaveolens* apresentaram forte atividade analgésica e anti-inflamatória em camundongos (COSTA-LOTUFO et al., 2004).

3.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

O uso terapêutico de OEs tem se expandido por todo o mundo, sendo amplamente utilizados contra várias doenças. Até então tem sido estabelecido, cientificamente, que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (ROSA, 2013). Entre suas diversas propriedades, podem ser destacadas:

antioxidante, antiviral, analgésicos, sedativos, anti-inflamatório, antiespasmódico e anestésico local (CALDAS, 2011; PURNHAGEN, 2010).

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis. A oxidação é um processo natural dos organismos para a produção de energia, no entanto, uma produção descontrolada de radicais livres pode causar o aparecimento de muitas doenças, como artrite, aterosclerose, câncer e Parkinson. Como forma de amenizar as patologias geradas por meio de uma produção excessiva e descontrolada de radicais livres, observa-se uma busca crescente por novas fontes de antioxidantes obtidos a partir de produtos naturais (SOUSA, 2013; DUARTE et al., 2014).

Outra atividade biológica que tem sido bastante utilizada para determinar a toxicidade dos óleos essenciais é o bioensaio com *Artemia salina*. Este ensaio se caracteriza como um teste preliminar, de baixo custo, rápido e que não exige técnicas assépticas. Vários estudos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades antifúngica, antiviral, antimicrobiana, antiparasitária, tripanossomicida, inseticida e antitumoral (AMARANTE et al., 2011; POMPILHO et al., 2014; MEYER et al., 1982; MCLAUGHLIN et al., 1995) para as substâncias com $CL_{50} < 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Estudos antimicrobianos são de grande relevância, uma vez que, um dos principais desafios na área médica é a busca de agentes antimicrobianos mais eficazes (ORLANDO, 2011). Óleos essenciais extraídos de vegetais têm sido avaliados como inibidores de crescimento de patógenos em alimentos como *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus*, *Salmonella*, dentre outros (BUSSATA et al., 2007). Pelissari et al. (2010) relataram atividade antibacteriana *in vitro* de óleo essencial de *Melampodium divaricatum* (Rich) DC., com total inibição do crescimento de cepas Gram positivas, como *S. aureus* e *Bacillus subtilis*. Uma das técnicas mais utilizada para triagem antimicrobiana é a microdiluição, uma vez que esta é barata, 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura, requer pequena quantidade de amostra, pode ser usado para grande número de amostras e deixa um registro permanente (PERAZZO et al., 2012).

Os óleos essenciais vêm despertando amplo interesse em vários grupos de pesquisa devido à seus efeitos ovicida, larvicida, adulticida que combatem o mosquito *A. aegypti*, além de contribuírem com o desenvolvimento de produtos inseticidas menos agressivos ao meio (LAVOR et al., 2012; SIRIPORN; MAYURA, 2012). De acordo com Jumbo (2013) estes podem atuar sobre os insetos, causando redução do número de ovos, repelência, bem como a inibição da oviposição, desenvolvimento e da alimentação. Sobre o

sistema nervoso central dos insetos, os inseticidas botânicos podem apresentar ação tóxica e consequentemente à morte (SOUZA, 2013).

Muitos dos produtos químicos sintéticos, como os organofosforados e piretróides, podem causar resistência aos mosquitos e impactos negativos ao meio ambiente (ARAÚJO et al., 2013). Dessa forma, a busca por métodos alternativos para serem usados no controle do *A. aegypti*, que sejam eficientes, economicamente viáveis, biodegradáveis e mais seletivos torna-se essencial (SILVA et al., 2014).

Inseticidas botânicos são definidos como compostos resultantes do metabolismo secundário das plantas, que compõem a própria defesa química contra os insetos herbívoros. Estes possuem diversas vantagens como ação e degradação rápidas, toxicidade baixa a moderada para mamíferos, maior seletividade e baixa fitotoxicidade (ALMEIDA-FILHO, 2013).

Os OEs são produtos de extração de uma espécie, sendo, portanto, concentrados e com toxicidade mais elevada que a da planta de origem. Alguns estudos demonstraram que a toxicidade de alguns componentes dos óleos voláteis constitui uma proteção contra predadores e infestantes. Como por exemplo, o mentol e mentona que são inibidores do crescimento de vários tipos de larvas (SANTIN, 2013).

3.7 *Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE)

A. aegypti é um mosquito oriundo da África, originalmente descrito no Egito, encontrado principalmente em países de clima tropical e subtropical (SILVA et al., 2013). Por possuir comportamento sinantrópico e hábito antropogênico, o *A. aegypti* promove sua dispersão em áreas urbanas por todo o mundo (DÍAZ-NIETO et al., 2013). Sua reprodução ocorre, principalmente, em água parada e limpa, acumulada em recipientes abandonados pelo homem, como latas, pneus, vasos, garrafas pet, ou qualquer recipiente que possa ser ocasionalmente preenchido por água das chuvas, bem como por recipientes utilizados para armazenar água doméstica, como caixas d'água, piscinas, aquários abandonados, dentre outros (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998).

O habitat do *A. aegypti* está intimamente ligado às condições domiciliares ofertadas pelo modo de vida das populações humanas (POWELL; TABACHNICK, 2013). Com isso, seu controle pode ser realizado através da eliminação de locais de reprodução das larvas, além do controle biológico e químico com a utilização de inseticidas (SILVA et al., 2013).

O *A. aegypti* pertencente à família Culicidae é um inseto de pequeno porte com corpo delgado, popularmente conhecido como muriçocas, mosquitos ou pernilongos (SANTANA, 2012). Possui hábito alimentar diurno, com maior pico entre 16 h e 18 h (CARDOSO, 2014). Tanto os machos quanto as fêmeas se alimentam de fluídos açucarados como néctar de flores e de outros nectários, no entanto, as fêmeas são hematófagas, uma vez que necessitam de repastos sanguíneos para maturação de ovos (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998).

O desenvolvimento do *A. aegypti* ocorre por metamorfose completa, passando por quatro estágios biológicos distintos: ovo, larva que apresentam quatro instares, pupa e adulto. O ovo mede aproximadamente 1 mm de comprimento e têm uma ampla capacidade de resistir à dessecação, podendo permanecer por mais de ano em ambiente seco sem prejudicar a eclosão da larva, que ocorre caso haja o contato com a água (GADELHA; TODA, 1985; SANTANA, 2012). Seus ovos são depositados próximo à lamina da água, nas paredes dos depósitos que servem de criadouros. No momento da postura os ovos possuem coloração esbranquiçada, mas logo adquirem cor enegrecida brilhante (SILVA, 2012).

A fase larval do *Aedes* é o período de alimentação e crescimento. Alguns fatores como temperatura da água, disponibilidade de alimento e densidade populacional no criadouro influenciam no crescimento e no desenvolvimento das larvas (DUTRA et al., 2016). Após a eclosão as larvas passam por quatro estádios e um período pupal, todos eles aquáticos, para enfim chegarem à fase adulta (FARNESI et al., 2012; LELES, 2009).

O momento de transição do indivíduo do meio aquático para o terrestre ocorre na fase pupal (BOHBOT, 2013). A duração desta fase é de aproximadamente 2 a 3 dias, dependendo das condições de temperatura. É nesta fase em que ocorre a última metamorfose do mosquito até a fase adulta (TELES, 2009). A fase adulta representa a fase reprodutora do mosquito. Os adultos vivem cerca de 35 a 40 dias, medem cerca de 3 a 6 mm de comprimento, no entanto, os indivíduos do sexo masculino são, de maneira geral, menores que as fêmeas. O macho se distingue da fêmea por possuir antenas plumosas e palpos mais longos (SANTOS, 2014).

Os primeiros registros de sua identificação em terras brasileiras foram em 1898, por Lutz, e em 1899, por Ribas (FRANCO, 1969). O *A. aegypti* é considerado um dos principais problemas em saúde pública, por ser o transmissor da dengue, febre amarela, febre Chikungunya, doença Zika (ZARA et al., 2016).

O vírus da dengue é originário do Egito, na África. A primeira epidemia ocorreu no continente americano (Peru) e surtos no Caribe, Estados Unidos, Colômbia e Venezuela.

Sendo que os primeiros casos no Brasil ocorreram no final do século 19, no Rio de Janeiro e Curitiba (DICK et al., 2012). Segundo o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, em 2015 o número de casos de dengue no território nacional aumentou para aproximadamente 1 milhão e 300 mil e 752 óbitos. Até julho de 2016, já foram registrados mais de 1 milhão e 300 mil casos no país, no entanto, quando comparado com o número de óbitos no mesmo período de 2015, houve uma redução de 57,7%. No estado do Amapá, o número de casos de dengue em 2015 foi de 2.578 casos, em 2016 já foram confirmados aproximadamente 1.300 casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

A febre amarela é uma doença infecciosa não contagiosa causada por um arbovírus do gênero *Flavivirus* pertencente à família *Flaviridae* (OLIVEIRA et al., 2014). Sua manifestação é dividida epidemiologicamente em duas modalidades: um ciclo urbano simples do tipo homem-mosquito em que o *A. aegypti* responsabiliza-se pela disseminação da doença e outro silvestre complexo, com várias espécies de mosquitos responsáveis pela transmissão (BRITO et al., 2014).

No Brasil, a primeira epidemia de febre amarela ocorreu em 1685, em Recife, atual capital do Estado de Pernambuco, para onde o vírus teria sido levado em barco procedente de São Tomé, na África, com escala em Santo Domingo, nas Antilhas, onde a enfermidade dizimava a população (LEAL, 2012). As patogenias das infecções urbanas e silvestres da febre amarela podem apresentar-se nas formas assintomática, oligossintomática, moderada ou grave (OLIVEIRA et al., 2014).

Diferente da Febre amarela urbana, que está sob controle no país desde 1929, a febre Chikungunya, uma arbovirose causada pelo vírus *Chikungunya*, da família *Togaviridae* e do gênero *Alphavirus* (BRITO et al., 2014; GUDO et al., 2015), tornou-se uma grande preocupação pra saúde pública brasileira, com epidemias no Oiapoque (Estado do Amapá) e em Feira de Santana na Bahia no ano de 2014. A principal manifestação clínica que difere da dengue são as fortes dores nas articulações. Dados do último Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde apontam que no primeiro semestre de 2016, mais de 137 mil casos de chikungunya foram notificados. Este número é quase dez vezes maior que os registros no país durante todo o ano de 2015, onde aproximadamente 14 mil casos foram notificados. No estado do Amapá até maio de 2016 foram registrados 87 casos prováveis de febre Chikungunya (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

O vírus *Zika* é um flavivírus (família *Flaviviridae*) que foi isolado pela primeira vez em 1947 em Uganda na África (VASCONCELOS, 2015). No Brasil, foi confirmado transmissão autóctone de febre pelo vírus *Zika* a partir de abril de 2015, que fizeram o

Ministério da Saúde e a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarar estado de emergência de saúde pública de importância nacional e internacional, respectivamente (FARIA et al., 2016). Até julho de 2016, foram registrados aproximadamente 166 mil casos prováveis de febre pelo vírus *Zika* no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Apesar de ser uma infecção viral considerada leve e, na maioria dos casos, assintomática, esta doença tem casos mais severos, que podem acometer o sistema nervoso central, sendo associada a síndrome de Guillian-Barré. Além disso, estudos comprovam a relação entre a infecção pelo vírus *Zika* em gestantes com a ocorrência de malformações congênitas, em especial a microcefalia em recém-nascidos (LUZ et al., 2015).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo experimental foi de natureza exploratória e caráter quali-quantitativo.

4.1 MATERIAL VEGETAL

A espécie vegetal foi coletada no distrito da Fazendinha (00°02'23"S e 51°06'29"O) no Município de Macapá-Amapá. Duas amostras da espécie foram depositadas no Herbário Amapaense (HAMAB) do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá (IEPA) sob o nº de registro M.R.L.001.

4.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial foi obtido pelo processo de hidrodestilação, utilizando aparelho do tipo Clevenger (**figura 3**), 30 g das folhas secas e trituradas de *A. suaveolens* por um período de 2 h, em temperatura, aproximadamente, de 100°C (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). O óleo essencial foi retirado com auxílio de uma pipeta Pasteur, sendo em seguida, acondicionado em frasco âmbar envolto por papel alumínio e mantido sob refrigeração (4°C) para posterior análise.

Figura 3 - Sistema de extração do óleo essencial com o aparelho de Clevenger modificado.



Fonte: Martins (2015).

O rendimento do óleo essencial de *A. suaveolens* foi calculado com a fórmula de rendimento de óleo em base úmida (BU) (SANTOS et al., 2004):

$$T_o = \frac{V_o}{BM \times 100}$$

Onde:

T_o = Teor de óleo em % (mL de óleo em 100g de biomassa úmida)

V_o = Volume de óleo lido na escala do hidroddestilador

BM = Biomassa do vegetal

100 = Fator de conversão para porcentagem

4.3 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

A identificação dos componentes do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), utilizando-se equipamento da marca Shimadzu, modelo CGMS-QP 5050A. A coluna cromatográfica empregada foi a DB-5HT, da marca J & W Scientific, com 30 m de comprimento, diâmetro de 0,32 mm, espessura do filme

de 0,10 μm , e nitrogênio como gás carreador. As condições de operação do cromatógrafo a gás foram: pressão interna da coluna de 56,7 kPa, razão de split de 1:20, fluxo de gás na coluna de 1,0 mL/min. (210° C), temperatura no injetor de 220° C, temperatura no detector ou na interface (CG-EM) de 240° C. A temperatura inicial da coluna foi de 60° C, seguido de um incremento de 3° C/min. até atingir 240° C, sendo mantida constante por 30 min. O espectrômetro de massas foi programado para realizar leituras em uma faixa de 29 a 400 Da, em intervalos de 0,5 s, com energia de ionização de 70 eV.

Foi injetado 1 μL de cada amostra com concentração de 10.000 ppm dissolvido em hexano. Para realização da identificação dos constituintes foi realizada a comparação dos índices de Kovats (IK) e espectros de massa de cada substância com os dados da literatura. A fórmula usada para calcular o IK foi a seguinte:

$$\text{IK} = 100 \times \text{NCHmn} + 100 \times \left(\frac{\text{TRO} - \text{TRHmn}}{\text{TRHmr} - \text{TRHmn}} \right), \text{ onde:}$$

IK= Índice de Kovats ou índice de retenção de Kovats;

NCHmn= N° de carbono na molécula do hidrocarboneto imediatamente menor;

TRO= Tempo de retenção do componente do óleo essencial;

TRHmn= Tempo de retenção do hidrocarboneto imediatamente menor;

TRHmr= Tempo de retenção do hidrocarboneto imediatamente maior.

4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi baseada na metodologia proposta por Sousa et al. (2007), Lopes-Lutz et al. (2008) e Andrade et al. (2012) diante do consumo de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) com algumas adaptações às condições do laboratório.

Foi preparado uma solução metanólica de DPPH (solução estoque) na concentração de 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a qual foi mantida sob abrigo luz. Os óleos essenciais foram diluídos em metanol nas concentrações 5; 2,5; 1; 0,75, 0,50; e 0,25 mg.mL^{-1} . Para a avaliação, foram adicionados em um tubo de ensaio 2,7 mL da solução estoque de DPPH, seguido da adição de 0,3 mL da solução de óleo essencial. Foi preparado o branco, sendo este uma mistura de 2,7 mL de metanol e 0,3 mL de solução metanólica de cada concentração de OE avaliada. Após 30 minutos foram realizadas leituras em espectrofotômetro (Biospectro SP-22) no comprimento de onda de 517 nm. O ensaio foi realizado em triplicata e o cálculo de

porcentagem da atividade antioxidante (%AA) foi calculado com a seguinte equação (SOUSA et al., 2007):

$$(\%AA) = 100 - \left\{ \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco})100}{Abs_{controle}} \right\}$$

%AA – porcentagem de atividade antioxidante

$Abs_{amostra}$ – Absorbância da amostra

Abs_{branco} – Absorbância do branco

$Abs_{controle}$ – Absorbância do controle

4.5 ATIVIDADE CITOTÓXICA COM *Artemia salina* Leach

O ensaio de citotoxicidade frente a *A. salina* Leach foi baseado na técnica de Araújo et al. (2010) e Lôbo et al. (2010), com adaptações. Foi preparado uma solução aquosa de sal marinho sintético (35,5 g.L⁻¹) para incubação de 25 mg de ovos de *A. salina*, no qual foram colocados em ambiente escuro por 24 h para eclosão das larvas (náuplios), em seguida os náuplios foram expostos a luz artificial em período de 24 h para alcançarem estágio de metanáuplios. A solução mãe foi preparada contendo 54 mg do óleo essencial, adicionados 22,5 mL da solução de sal marinho sintético e 4,5 mL de dimetilsulfóxido a 5% (DMSO) para facilitar a solubilização do mesmo.

Os metanáuplios foram selecionados e divididos em 7 grupos com 10 indivíduos em cada tubo de ensaio, realizado em triplicata. Cada grupo recebeu alíquotas da solução mãe (2500, 1250, 625, 250, 25 e 2,5 µL), que em seguida foi completado o volume para 5 mL com solução de sal marinho sintético, obtendo-se soluções finais com as seguintes concentrações 1000, 500, 250, 100, 10 e 1 µg.mL⁻¹. Para controle do teste foi utilizado solução salina. Após 24 horas foram contados o número de mortos. A concentração letal que causa 50% de mortalidade na população (CL₅₀) foi determinada através da análise Probit utilizando o software SPSS[®] [version 20.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA].

4.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.6.1. Microrganismos

Os microrganismos testados foram cepas padrão ATCC (American Type Culture Collection) recomendadas para testes de suscetibilidade aos antimicrobianos como mostra a **Tabela 1**. Os microrganismos foram fornecidos pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

As bactérias foram inicialmente reativadas, a partir das culturas estoque, mantidas em caldo Müeller-Hinton (MHC), por 18 h, a 37°C.

Tabela 1 - Microrganismos testados nos ensaios de atividade antimicrobiana.

Microrganismos	Características
<i>Escherichia coli</i> (ATCC25922)	Bactéria Gram negativa, agente de infecções gastrintestinal, infecções urinárias e apendicite.
<i>Salmonella sp.</i> (ATCC14028)	Bactérias Gram negativa, causador da febre tifoide, febres entéricas, enterocolites e salmoneloses.
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC6538)	Bactérias Gram positiva, agente responsável por várias infecções.

Fonte: Orlanda (2011).

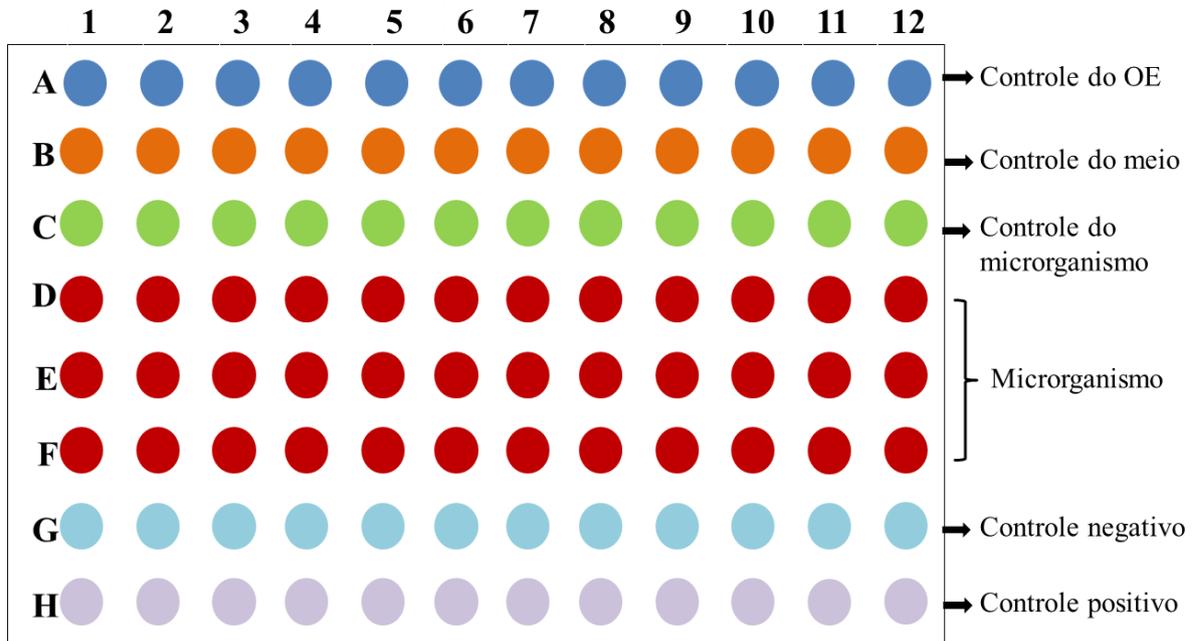
4.6.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM)

A determinação da CIM foi realizada através da técnica de diluição em microplacas (96 poços) de acordo com o protocolo estabelecido pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (2007), com adaptações.

As bactérias foram inicialmente reativadas, a partir das culturas estoque, mantidas em caldo Müeller-Hinton (CMH), por 18 h, a 37°C. Após o crescimento bacteriano, foi preparado um inóculo em solução salina 0,9% para cada colônia, ajustado para a escala 0,5 de McFarland, posteriormente diluído em CMH e testado na concentração $1,5 \times 10^7$ UFC/mL.

Para a determinação da CIM (**figura 4**), o OE foi diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO 4%). Os orifícios das microplacas foram preenchidos com 50 µL de NaCl e 50 µL da solução de OE de *A. suaveolens*. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas de 100 a $0,048 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Adicionalmente, foram distribuídos 50 µL das suspensões de microrganismos em cada poço das microplacas. Como controle positivo foi utilizado amoxicilina ($50 \mu\text{L.mL}^{-1}$). Foram realizados o controle do meio de cultura, o controle do OE e o controle negativo (DMSO 4%). As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24h. Os experimentos foram realizados em triplicatas. A CIM foi considerada a menor concentração de OE no qual não foi visualizado crescimento microbiano. A presença de turvação nos poços indicou crescimento microbiano e, portanto, que não houve atividade antimicrobiana.

Figura 4 - Esquema para determinação da CIM pelo método de microdiluição.



A determinação da CBM foi realizada com base nos resultados obtidos no teste da CIM. Os poços das microplacas com crescimento microbiano foram replicados em ágar Müller-Hinton e incubadas à temperatura de 37°C durante 24h. A CBM foi considerada como a menor concentração de óleo essencial na qual não houve crescimento dos microrganismos nas placas de Petri, ou seja, houve eliminação dos microrganismos.

4.7 ATIVIDADE LARVICIDA

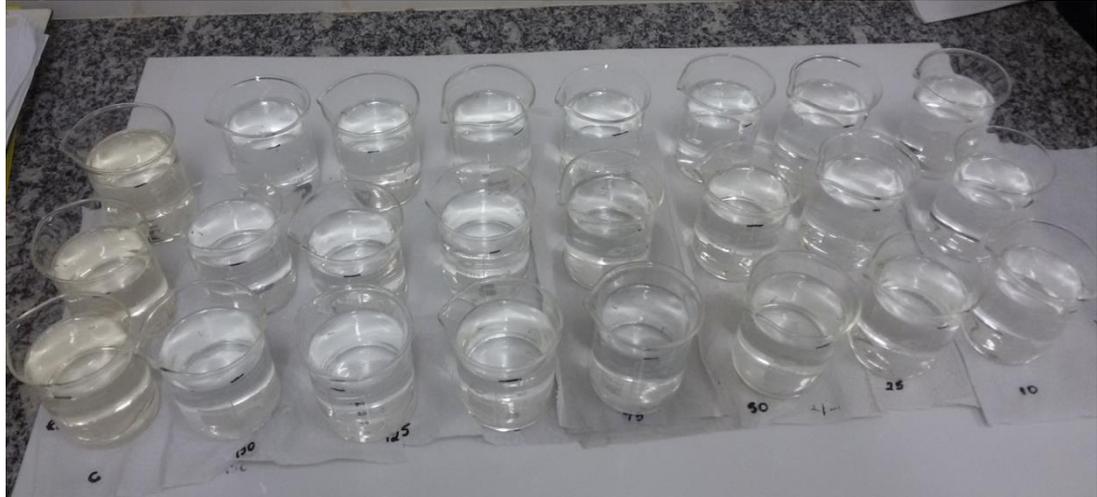
As larvas de *A. aegypti* utilizadas nos bioensaios foram provenientes da colônia mantida no insetário do Laboratório de Arthropoda da Universidade Federal do Amapá, no 3º estágio jovem. Os ensaios biológicos foram conduzidos em uma sala (3m x 4m) com condições climáticas controladas: temperatura de 25±2°C, umidade relativa do ar de 75±5% e fotoperíodo de 12 horas.

A metodologia utilizada seguiu o protocolo padrão da WHO (1984; 2015) com modificação no recipiente teste. Após ensaios preliminares, foram selecionadas as soluções aquosas nas concentrações: 0,15, 0,125, 0,1, 0,075, 0,050, 0,025 e 0,01 mg.mL⁻¹ pré-solubilizadas em Tween 80 a 5%.

Para cada repetição de um tratamento foram utilizadas 10 larvas, pipetadas para um béquer de 100 mL contendo água destilada (**figura 5**). Em seguida, as larvas foram

removidas do béquer para o recipiente-teste, assim minimizando-se o tempo entre o preparo da primeira e última amostra. Foi verificada a inocuidade do solvente na concentração empregada, estando à mesma presente, também nas réplicas do controle. Durante o experimento, a temperatura média da água foi de 25 °C. Após 24 e 48 horas foram contadas as larvas mortas, sendo consideradas como tais todas aquelas incapazes de alcançar a superfície.

Figura 5 - Atividade larvicida do óleo essencial de *A. suaveolens* frente à *A. aegypti*



Fonte: Martins (2016).

4.8 ATIVIDADE ADULTICIDA

A avaliação da atividade adulticida em *A. aegypti* foi realizada de acordo com a metodologia da World Health Organization (WHO, 1998), com adaptações. Em tubos de 44 mm de diâmetro e 125 mm de comprimento (**figura 6**), uma das extremidades foi tampada com uma rede de malha fina e na outra extremidade foi acoplada uma tampa deslizante com um orifício de 20 mm, por onde são introduzidos 15 fêmeas adultas originárias da cepa Rockefeller, com idades entre 2 e 5 dias com o auxílio de um aspirador bucal.

Após ensaio preliminar, soluções etanólicas dos óleos essenciais de *A. suaveolens* foram avaliadas nas concentrações de 50, 25, 12.5 e 6.25 e 3.125 mg.mL⁻¹ previamente solubilizadas com tween 80 a 5% e impregnadas em papeis filtros de 5.500 mm² fixados no interior dos tubos de exposição. Depois de 1 hora de exposição, os mosquitos foram orientados para o tubo de repouso e a mortalidade foi calculada em 24 e 48 horas após o início do experimento com temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa do ar de 75 ± 5%, fotoperíodo de 12 horas e alimentados com solução açucarada a 10%. A partir de então,

contabiliza-se os mosquitos mortos, considerando como tais aqueles incapazes de voar ou andar dentro e que deslizam ao rotacionar no próprio eixo o recipiente utilizado.

Figura 6. Atividade adulticida do óleo essencial de *A. suaveolens* frente à *A. aegypti*



4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos das análises físico-químicas e ensaios biológicos foram expressos através da média \pm DP (desvio-padrão). Os resultados foram representados em tabelas e figuras. A CL50 (concentração letal que causa 50% de mortalidade na população) foi analisada pelo programa SPSS, em gráfico de Probit. As diferenças que apresentaram níveis de probabilidade menores e iguais a 5% ($p \leq 0,05$) foram consideradas estatisticamente significativas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

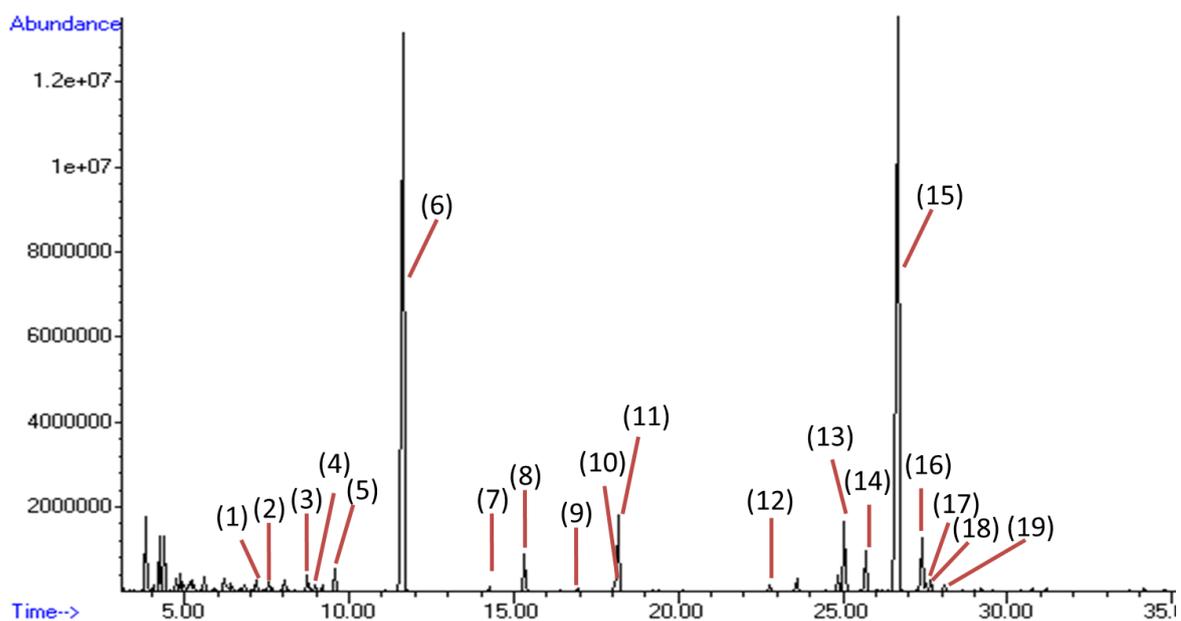
5.1 RENDIMENTO

O óleo essencial das folhas de *A. suaveolens*, obtido através do processo de hidrodestilação, apresentou rendimento de 1.6 %. Estudos realizados por Simionatto et al., (2007) mostraram que a espécie apresentou rendimento de 0,8%, valor inferior ao encontrado neste estudo. Essas variações de rendimento podem estar relacionado a diversos fatores abióticos, como o clima, composição do solo, localização geográfica, variação sazonal, órgão da planta, idade, estágio do ciclo vegetativo e período de colheita (EL- AKHAL et al., 2014).

5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES QUÍMICOS POR CG-EM

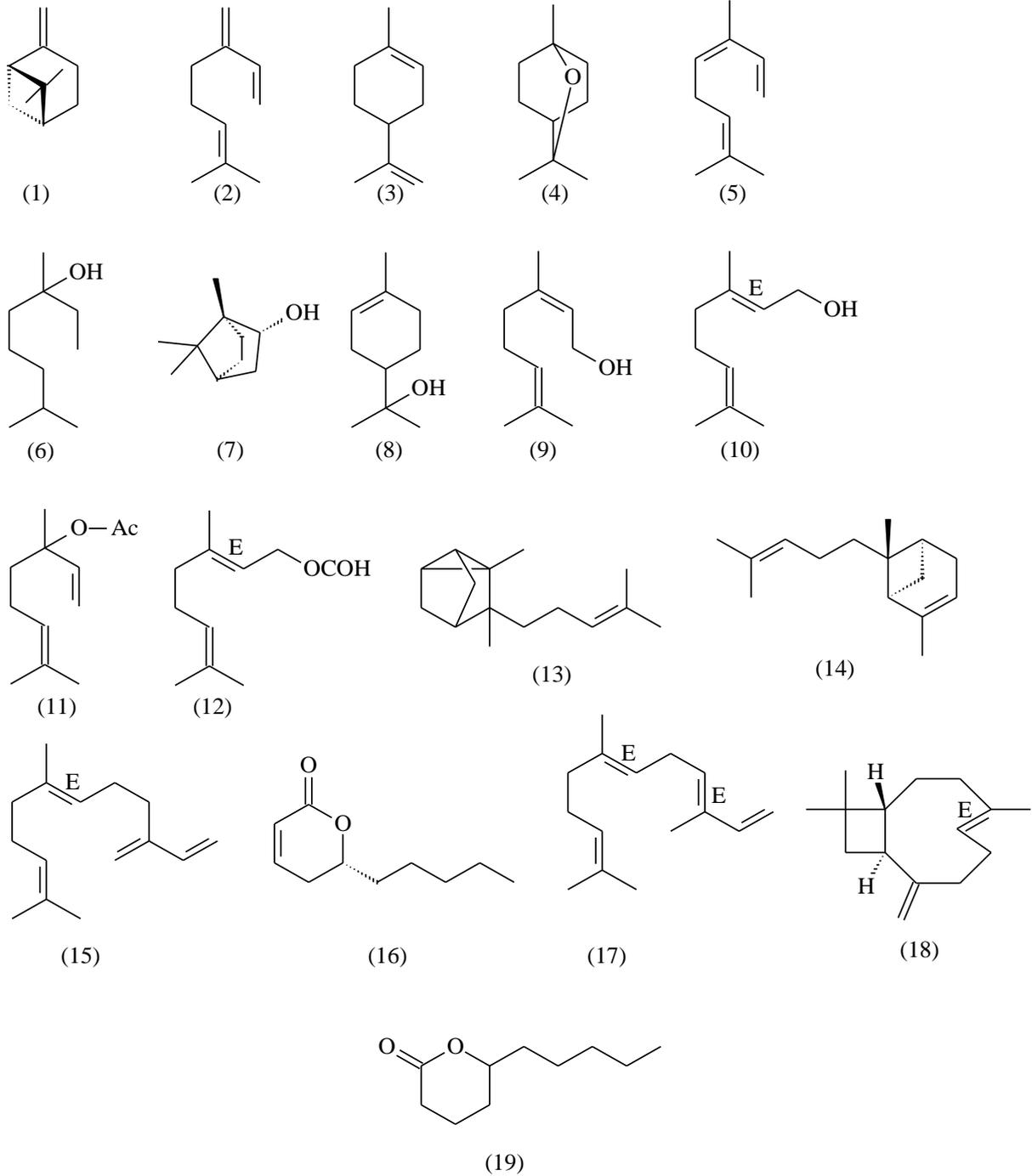
Pela análise de CG-EM (**figura 7**) do óleo essencial de *A. suaveolens* foi possível identificar 19 compostos. Dos constituintes químicos detectados no óleo extraído das folhas 1,57% são monoterpenos hidrocarbonados, 39,65 % são monoterpenos oxigenados, 43,56% são sesquiterpenos hidrocarbonados e 2,87% são lactonas (**tabela 2**).

Figura 7 - Cromatograma obtido por CG-EM do óleo essencial de *A. suaveolens*. Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 60 °C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 3 °C/min. até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 30,0 min.



Os principais componentes identificados foram β -pineno (1), β -mirceno (2), Limoneno (3), 1,8-Cineol (4), β - Ocimeno (5), Linalol (6), Borneol (7), α -Tepineol (8), Nerol (9), Geraniol (10), Acetato de Linalila (11), Geraniol formate (12), α -Santaleno (13), (*E*)- α -Bergamoteno (14), (*E*)- β -Farneseno (15), Massoia lactona (16), (*Z*), (*E*)- α -farneseno (17), (*E*)-Cariofileno (18) e δ - Decalactona (19), de acordo com **figura 8**.

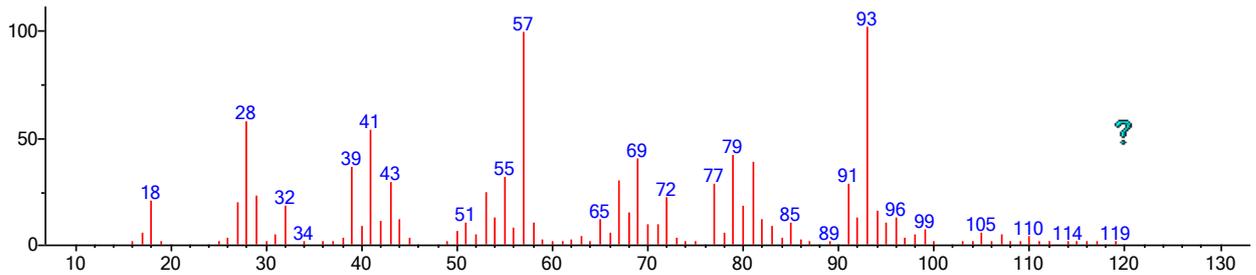
Figura 8 - Estrutura dos principais compostos do OE de *A. suaveolens*



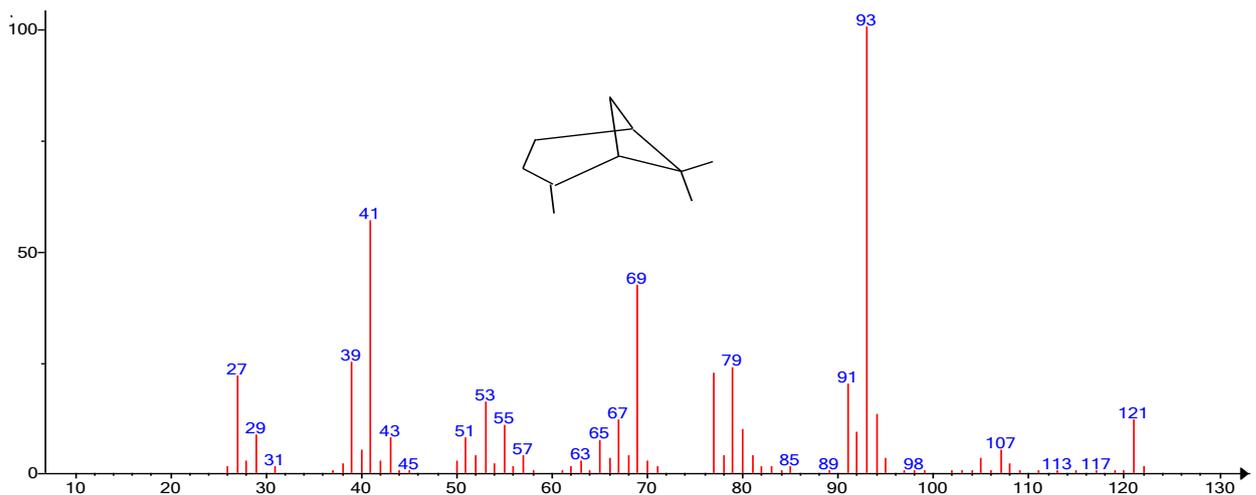
A identificação dos constituintes químicos foi baseada na comparação do espectro de massa da substância (**figura 9**) com o perfil de fragmentação dos espectros de massa da biblioteca Wily/PBM do equipamento e com a literatura (ADAMS, 2012).

Figura 9 - Espectros de massas do óleo essencial da *A. suaveolens* obtidos por CG-EM em comparação com espectros da biblioteca do equipamento.

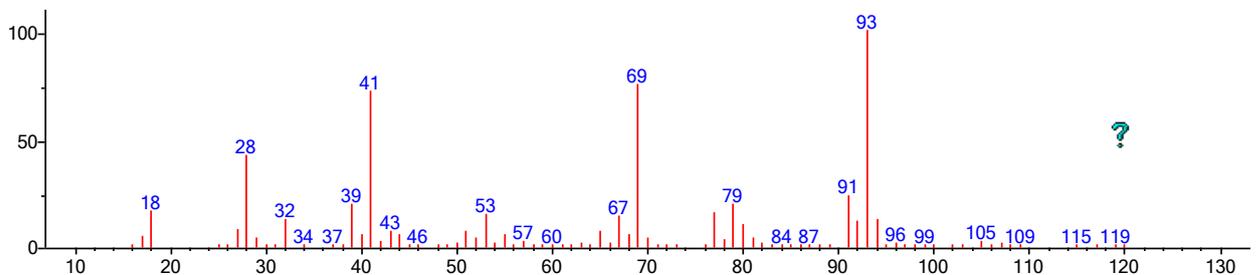
Substância (1) - β -pineno ($t_R=7.163$ min.)



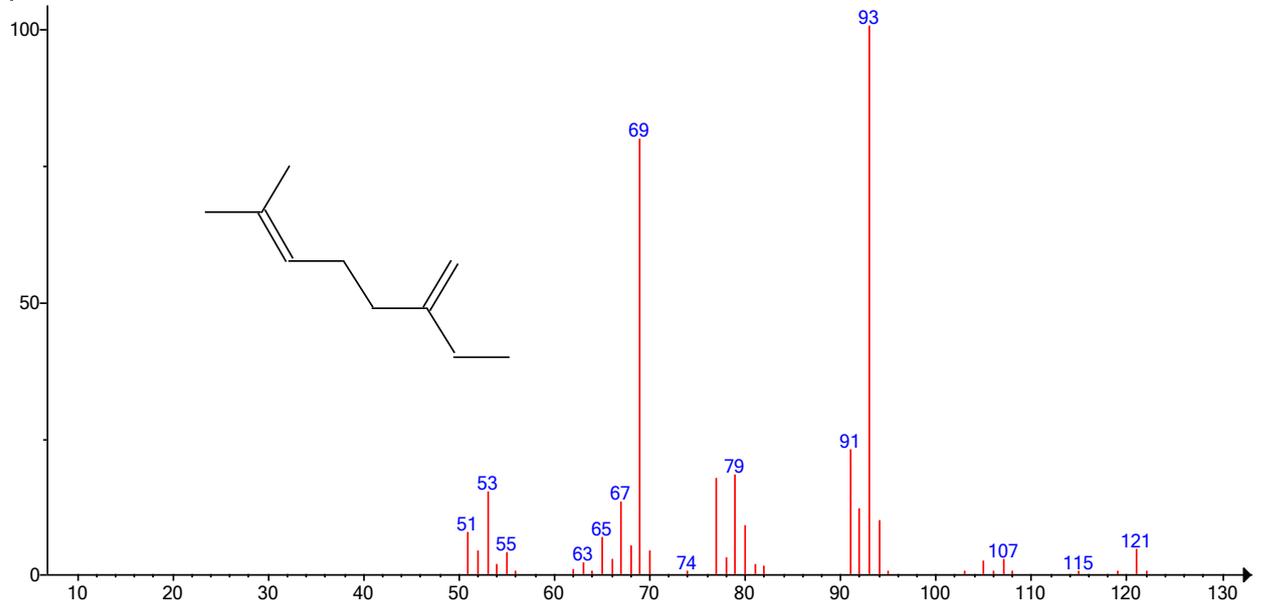
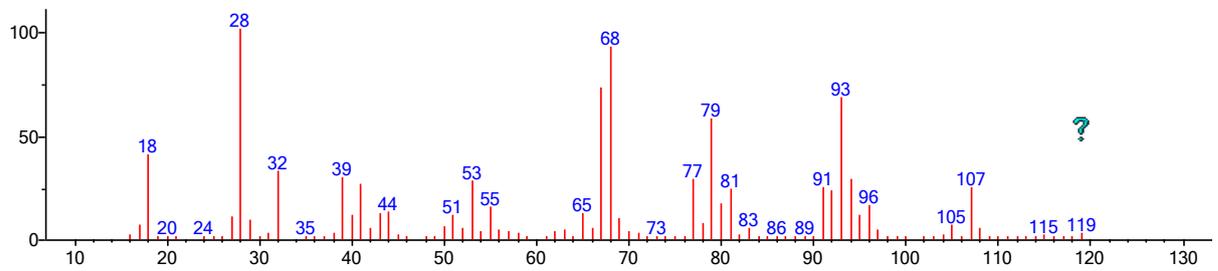
Espectro de massas da biblioteca



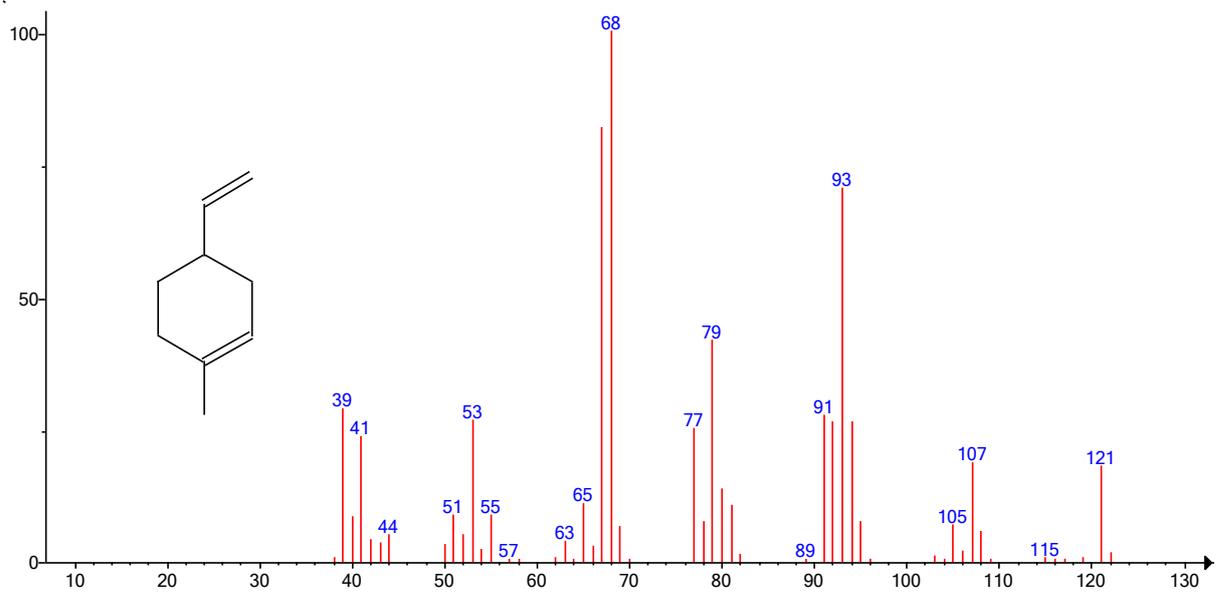
Substância (2) - β -mirceno ($t_R=7.560$ min.)



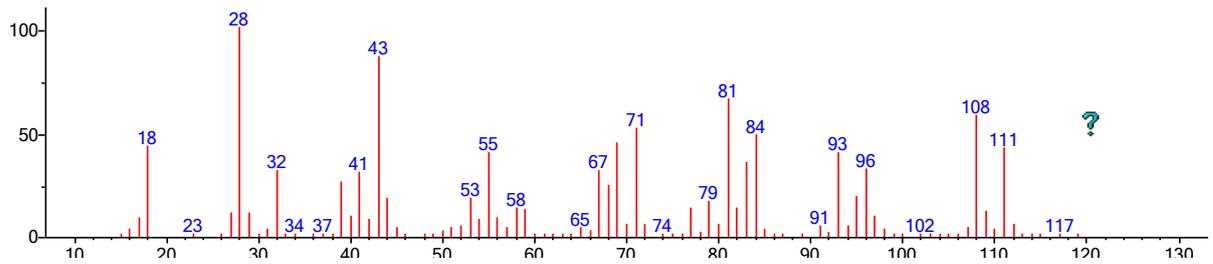
Espectro de massas da biblioteca

Substância (3) - Limoneno ($t_R = 8.857$ min.)

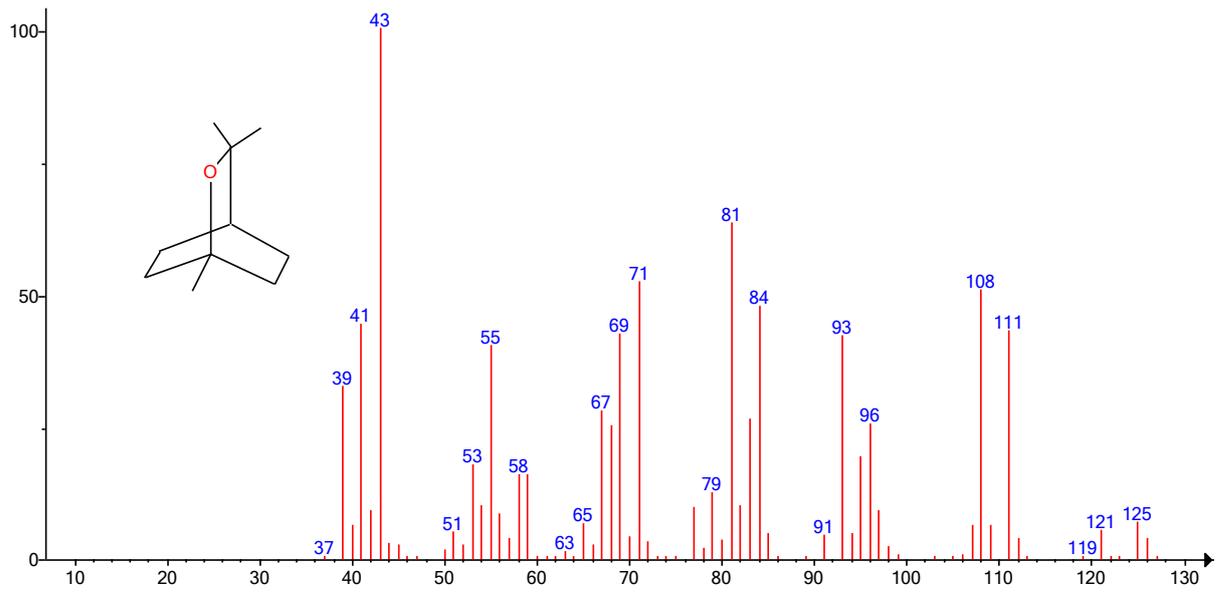
Espectro de massas da biblioteca



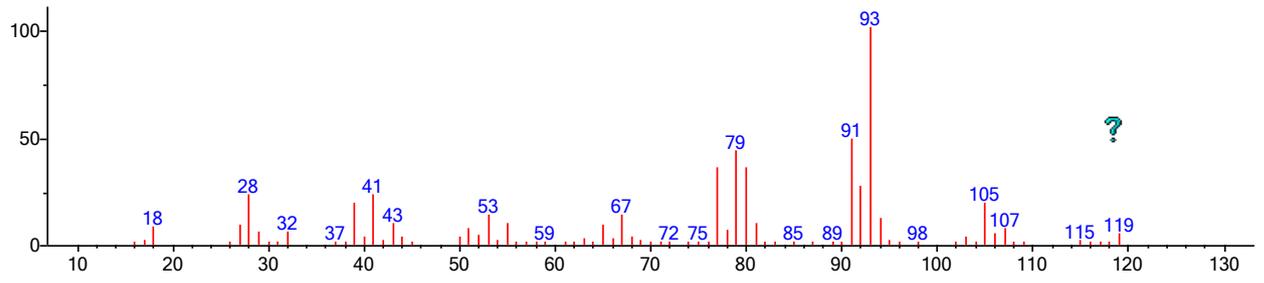
Substância (4) - 1,8-Cineol ($t_R = 8.971$ min.)



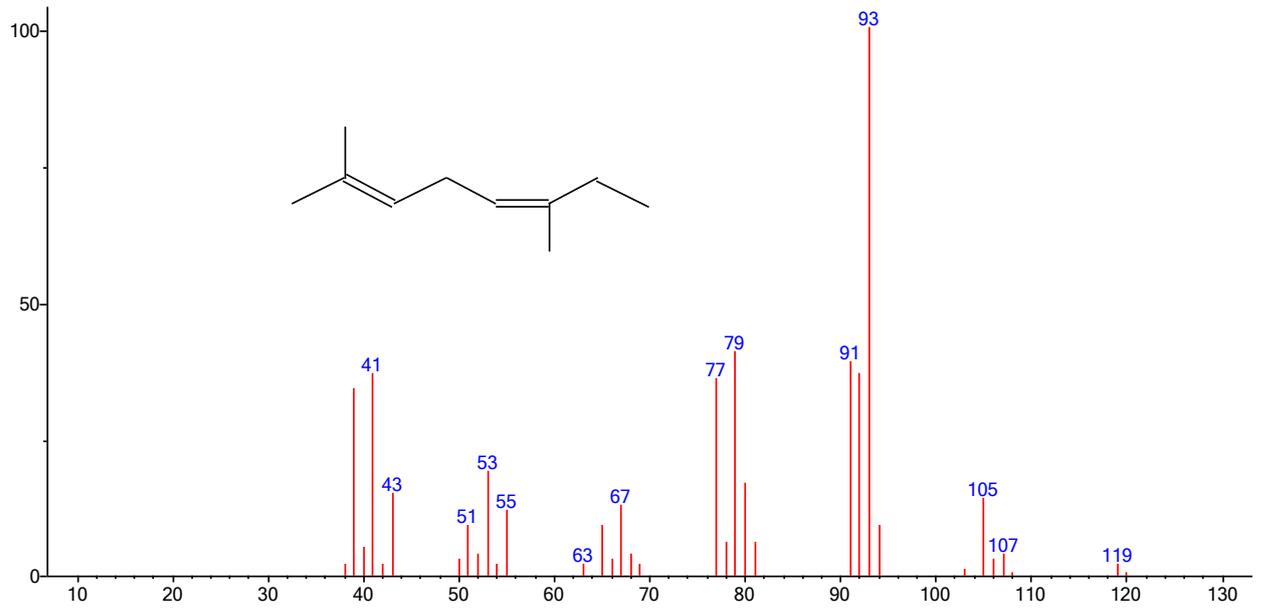
Espectro de massas da biblioteca



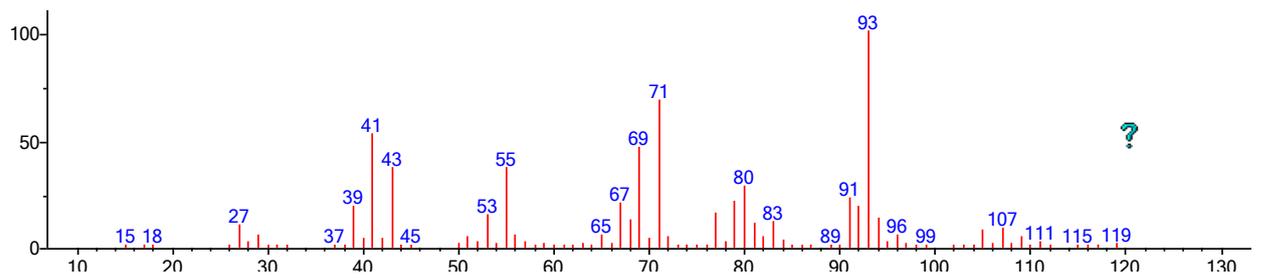
Substância (5) - β - Ocimeno ($t_R = 9.566$ min.)



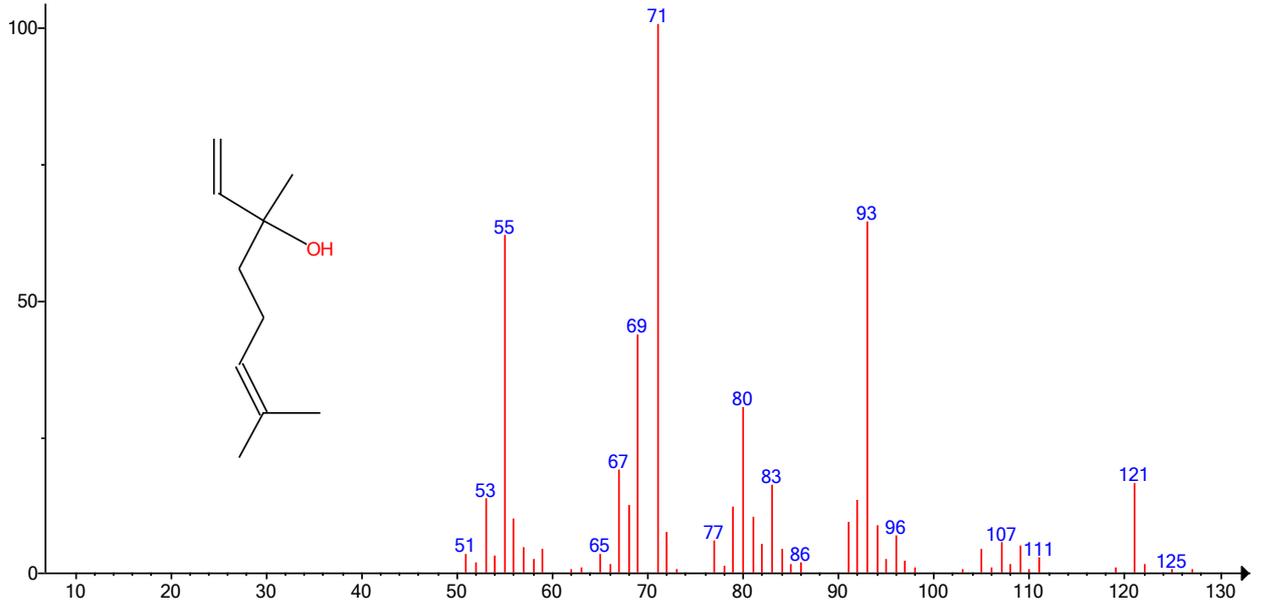
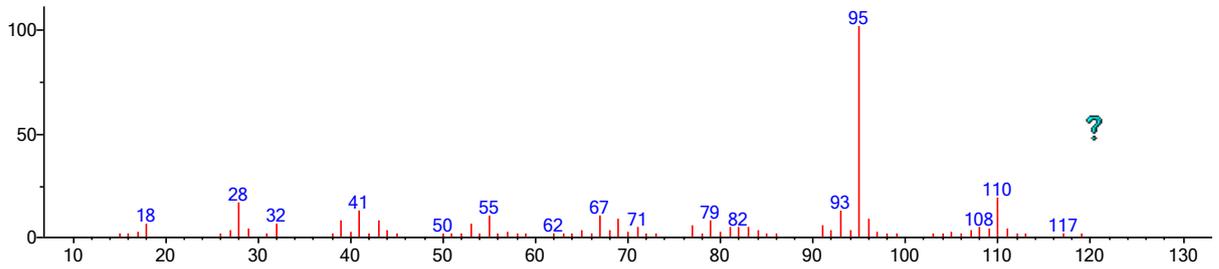
Espectro de massas da biblioteca



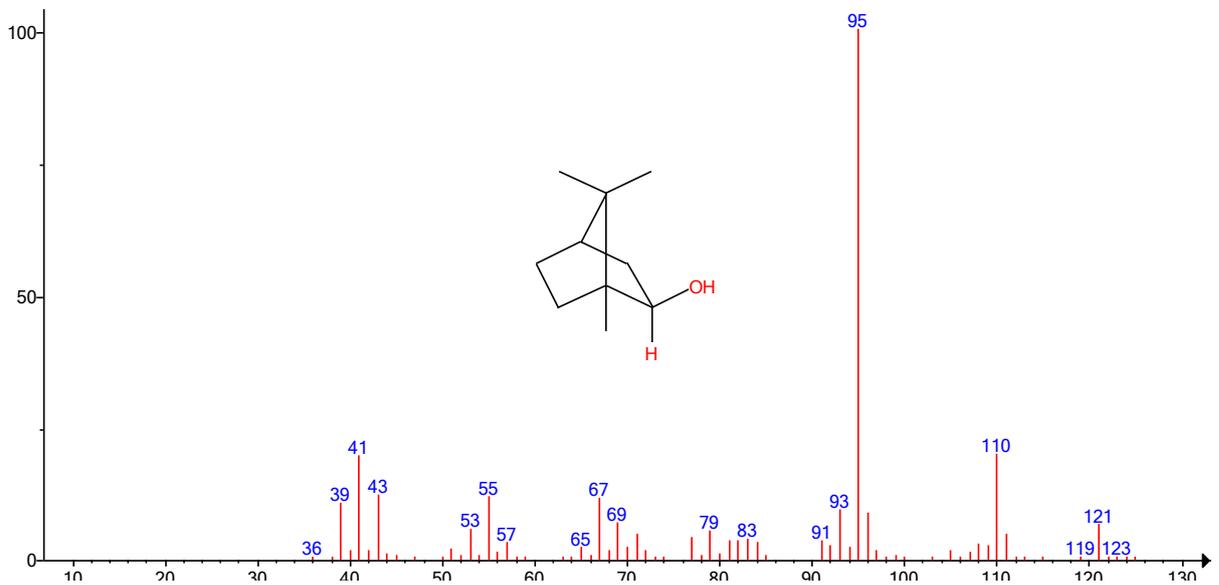
Substância (6) - L-Linalol ($t_R = 11.648$ min.)



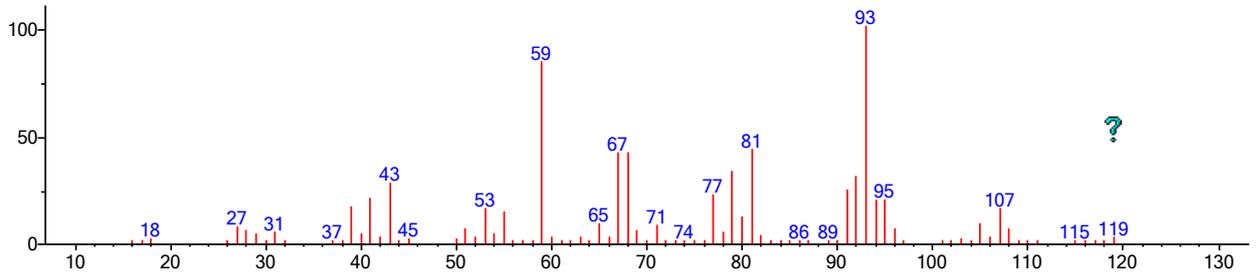
Espectro de massas da biblioteca

Substância (7) - Borneol L ($t_R=14.267\text{min.}$)

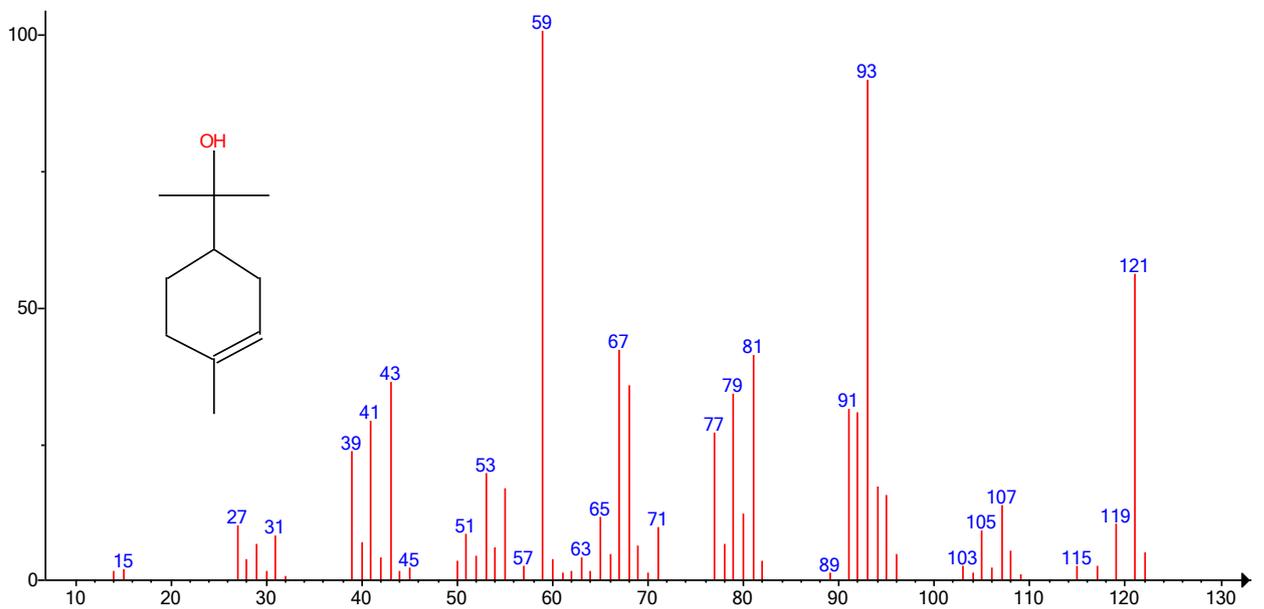
Espectro de massas da biblioteca



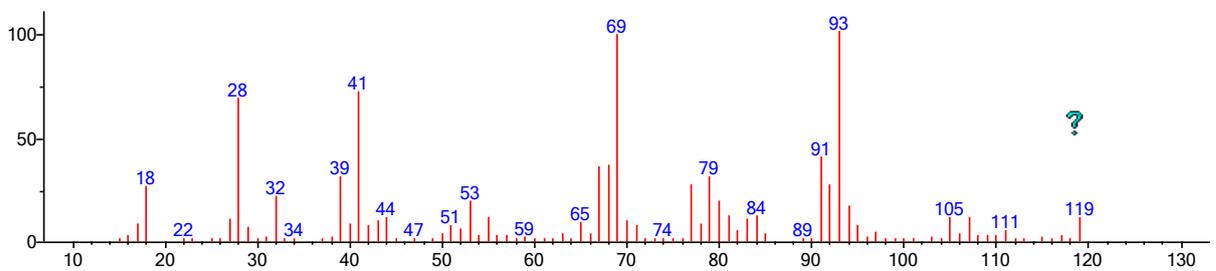
Substância (8) - α - Terpineol ($t_R = 15.327$ min.)



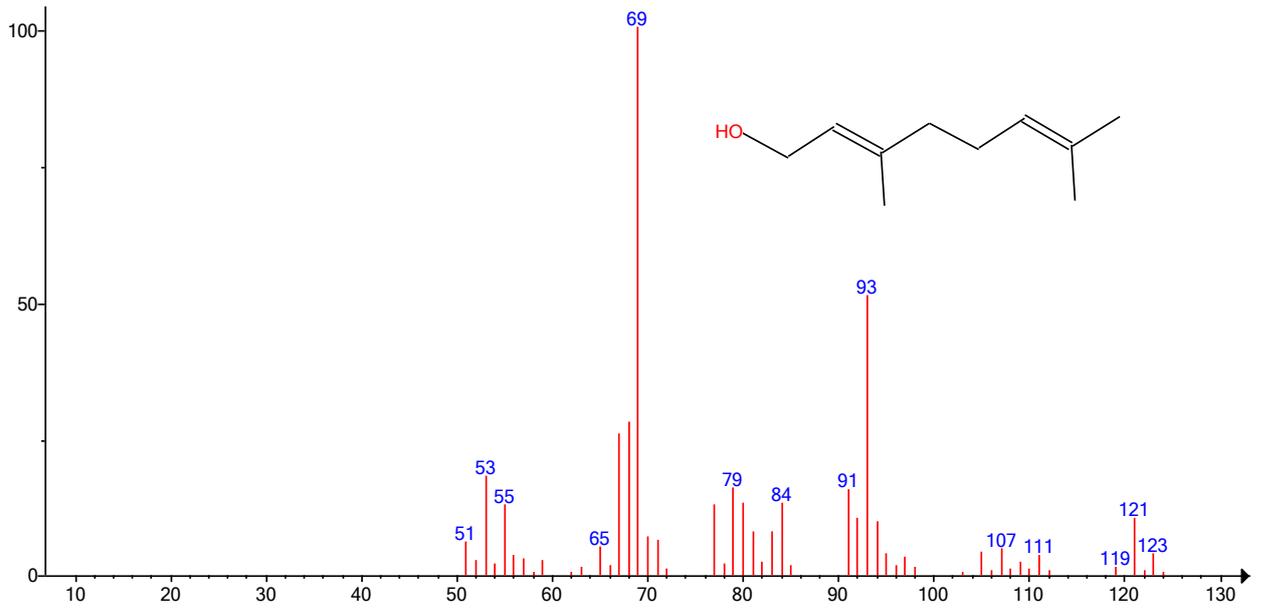
Espectro de massas da biblioteca



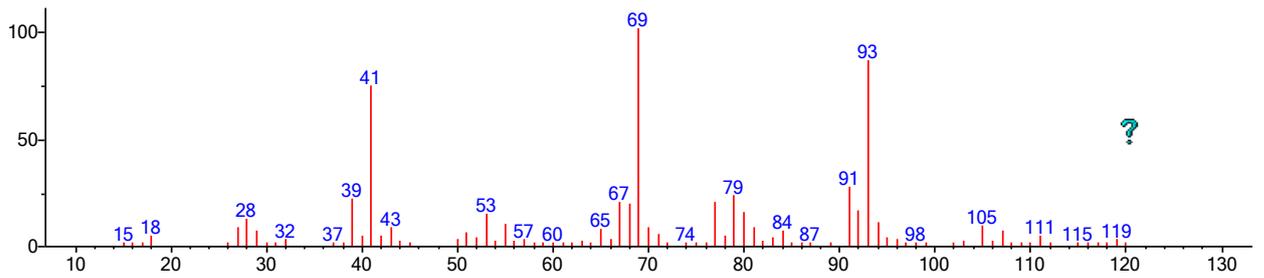
Substância (9) - Nerol ($t_R = 16.949$ min.)



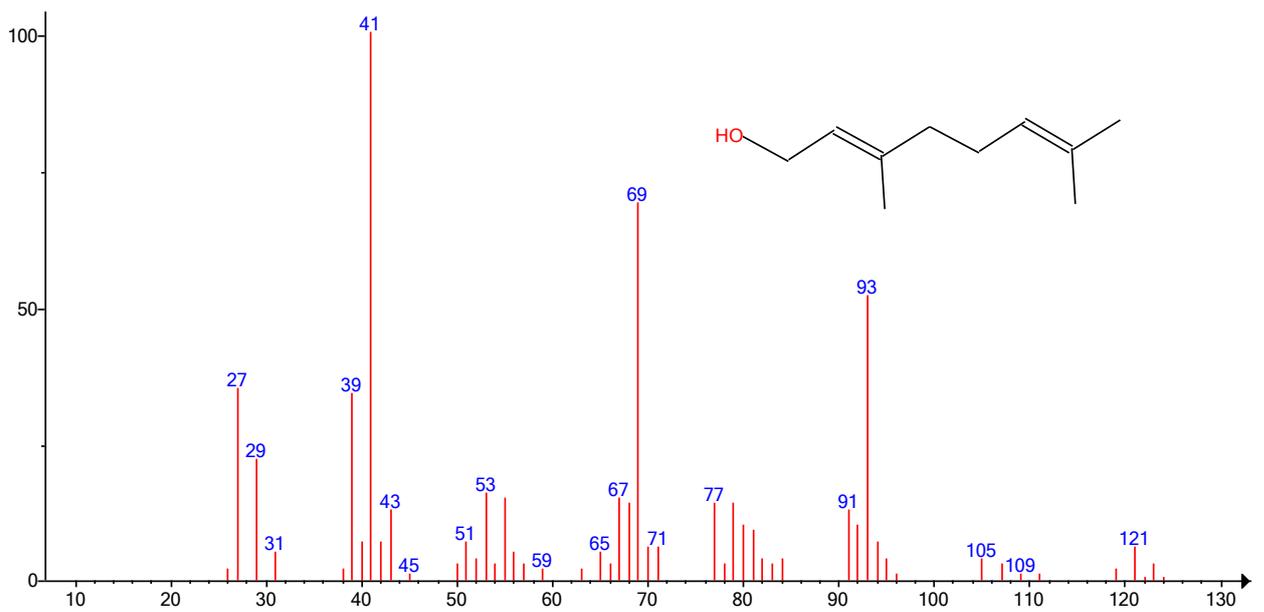
Espectro de massas da biblioteca



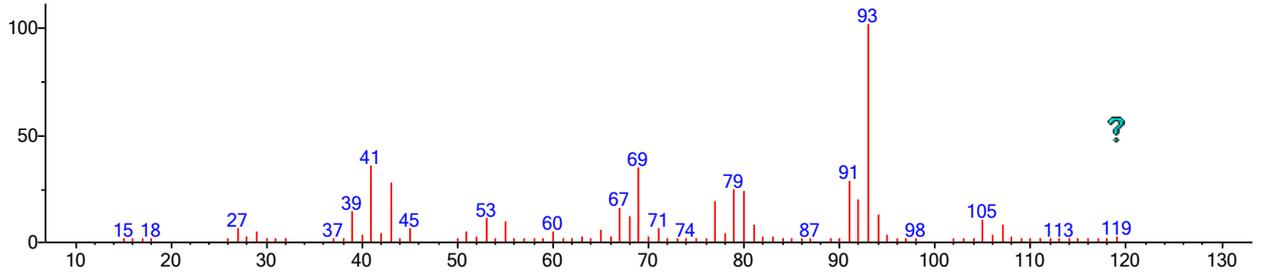
Substância (10) - (E)-Geraniol ($t_R = 18.088$ min.)



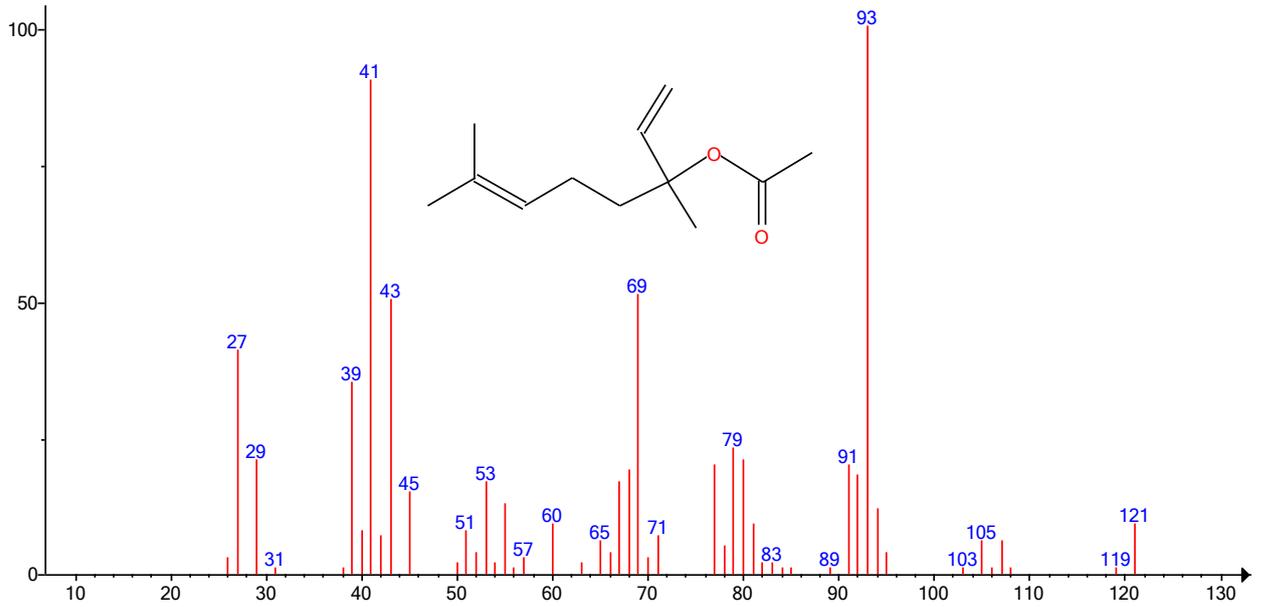
Espectro de massas da biblioteca



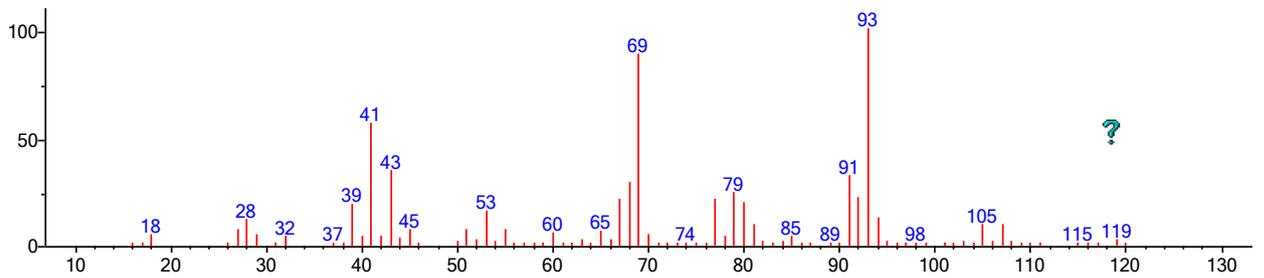
Substância (11) - Acetato de Linalil ($t_R = 18.168$ min.)



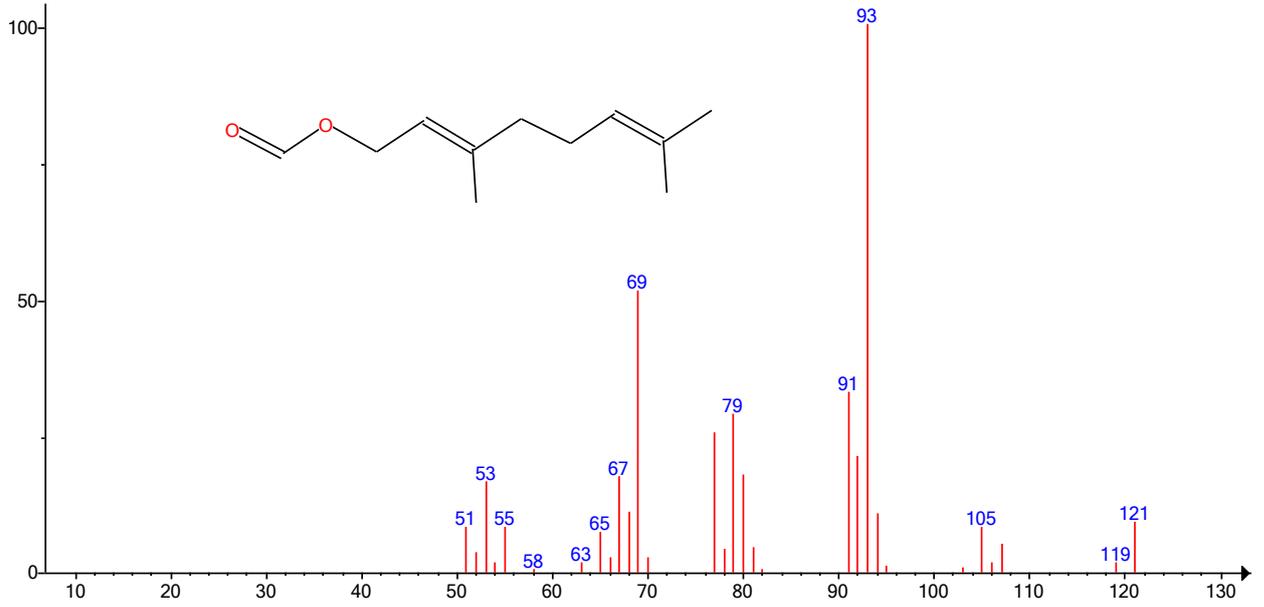
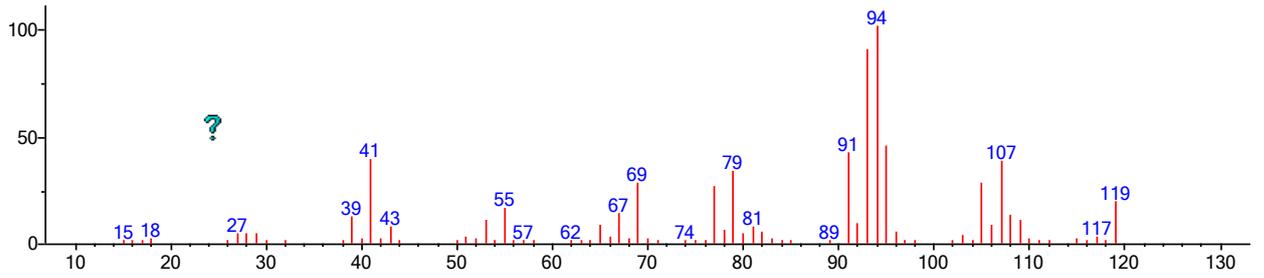
Espectro de massas da biblioteca



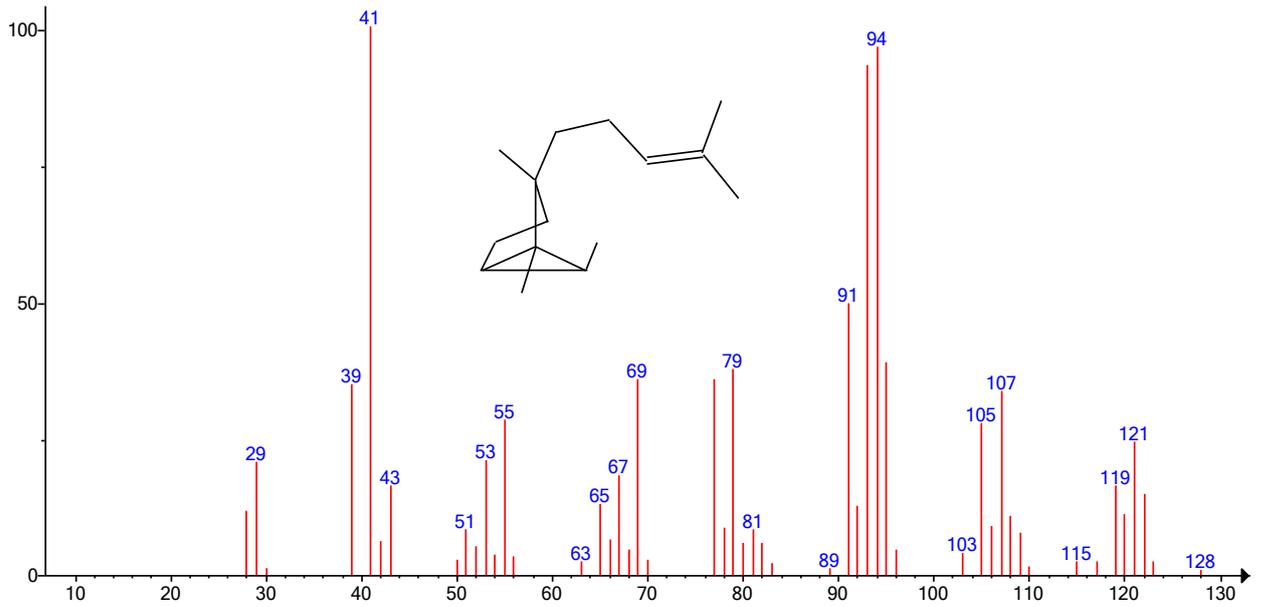
Substância (12) - Geraniol formate (CAS) ($t_R = 23.595$ min.)



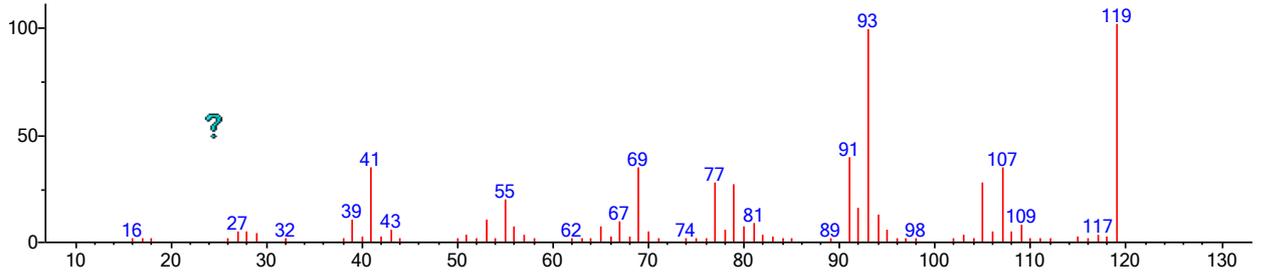
Espectro de massas da biblioteca

Substância (13) - α -Santaleno (tR = 25.049 min.)

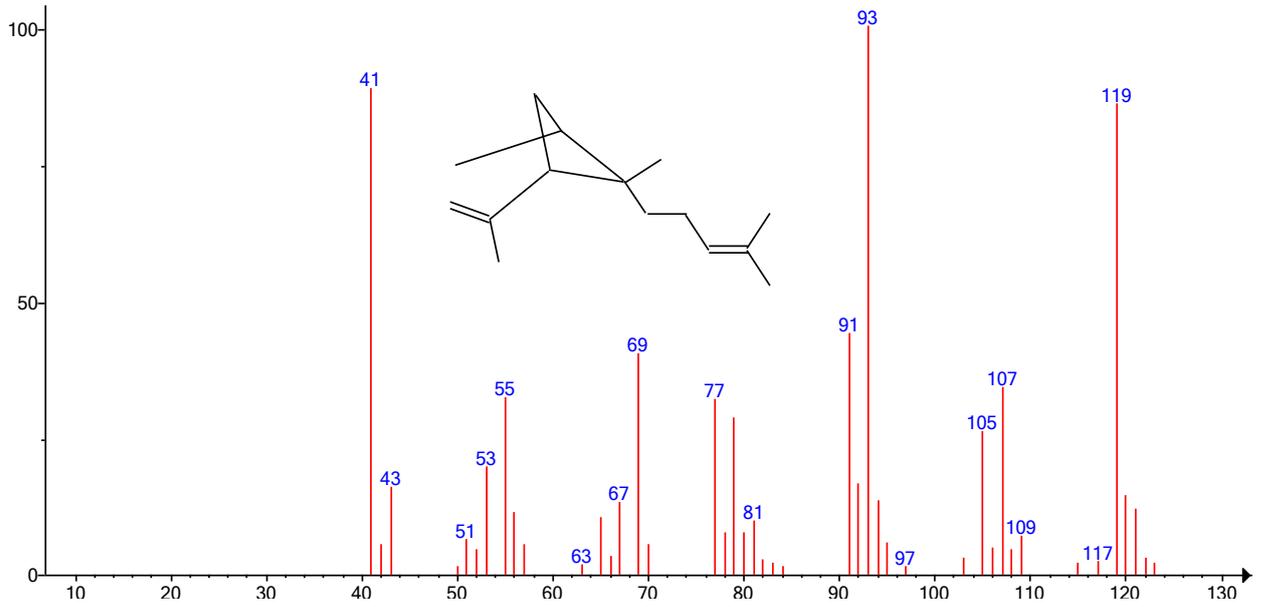
Espectro de massas da biblioteca



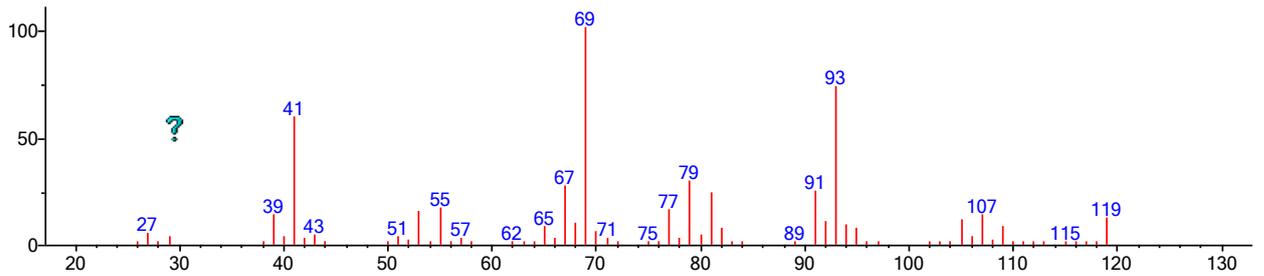
Substância (14) - (*E*)- α -Bergamoteno ($t_R = 25.691$ min.)



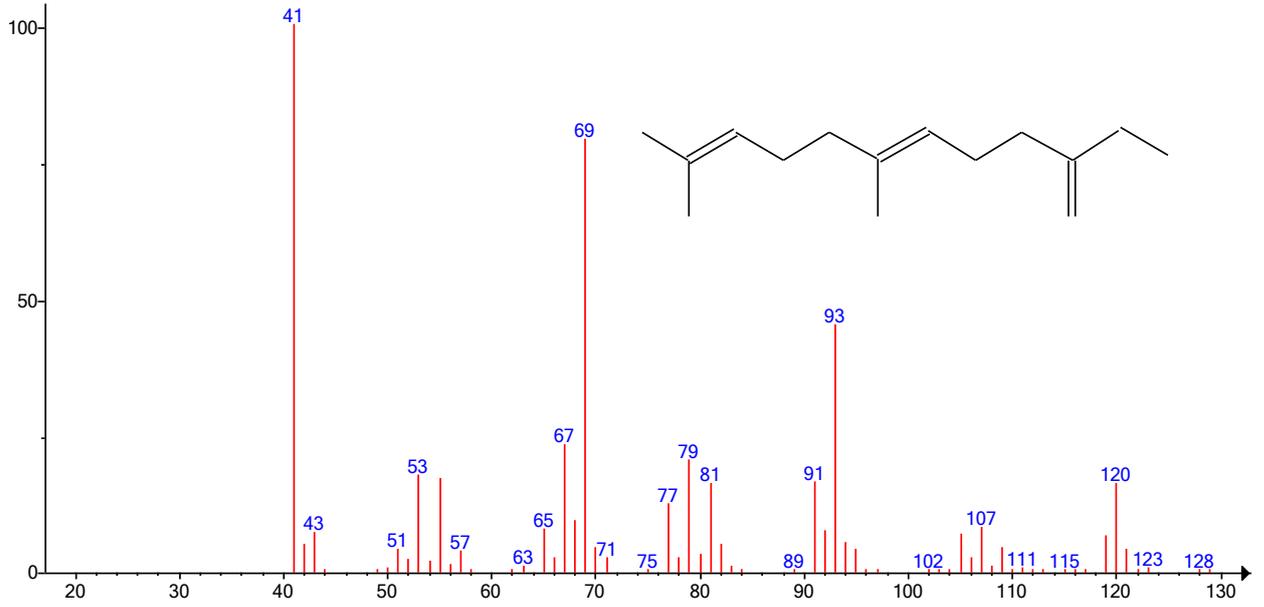
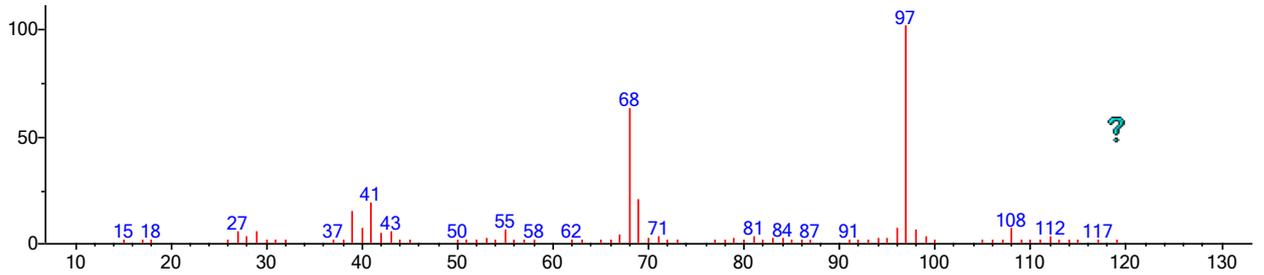
Espectro de massas da biblioteca



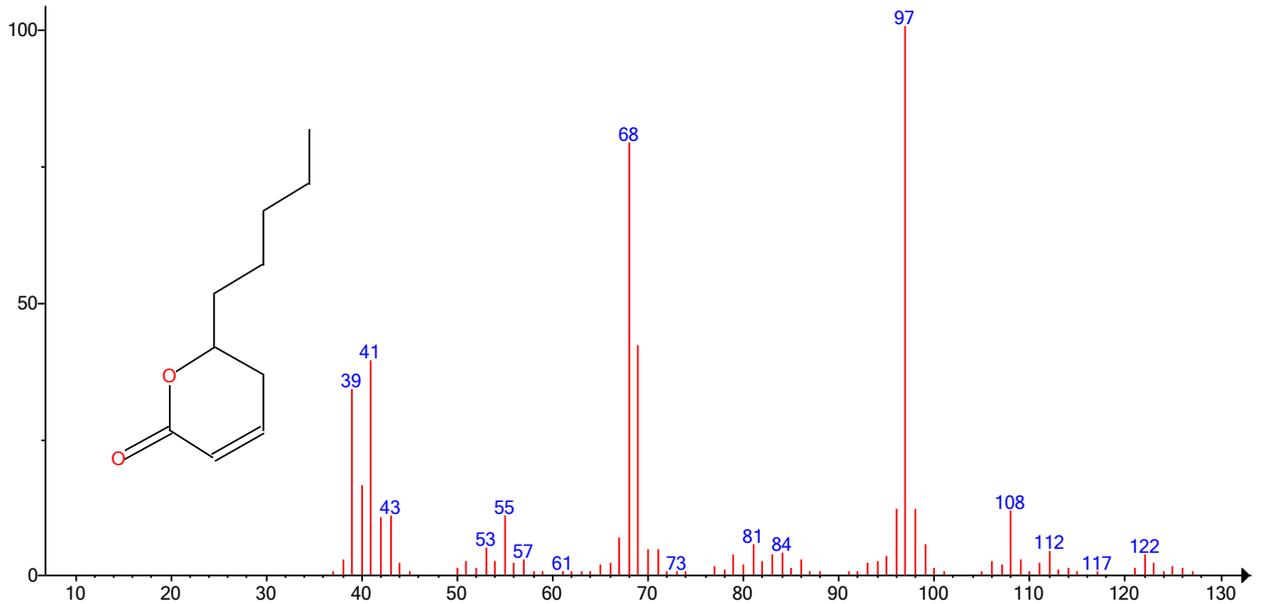
Substância (15) - (*E*)- β -Farneseno ($t_R = 26.680$ min.)



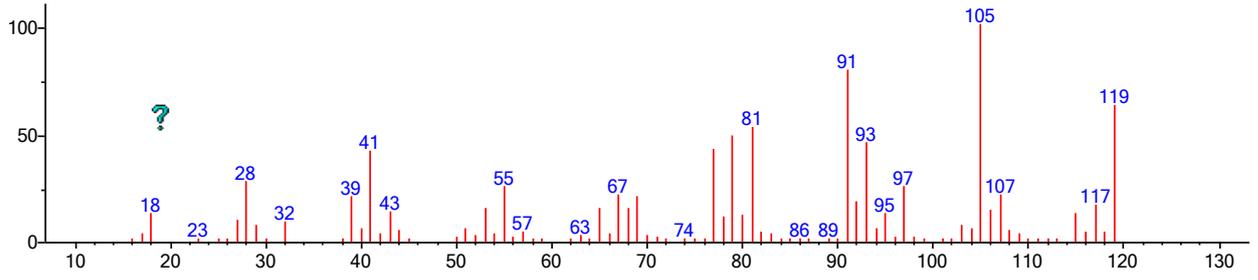
Espectro de massas da biblioteca

Substância (16) - Massoia lactona ($t_R = 27.399$ min.)

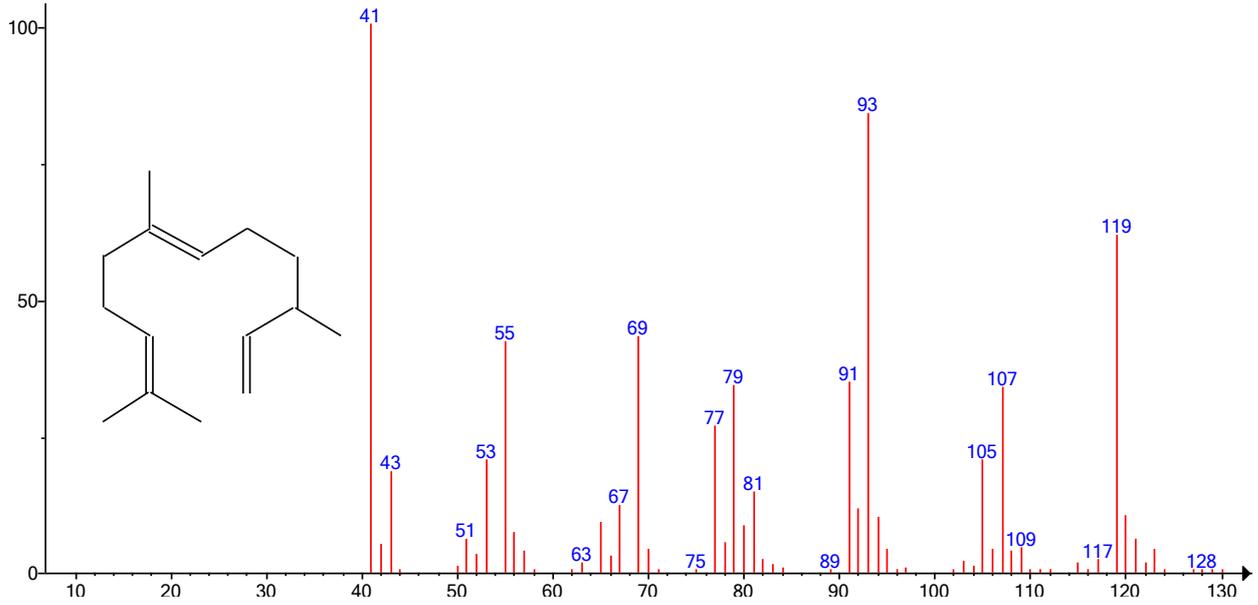
Espectro de massas da biblioteca



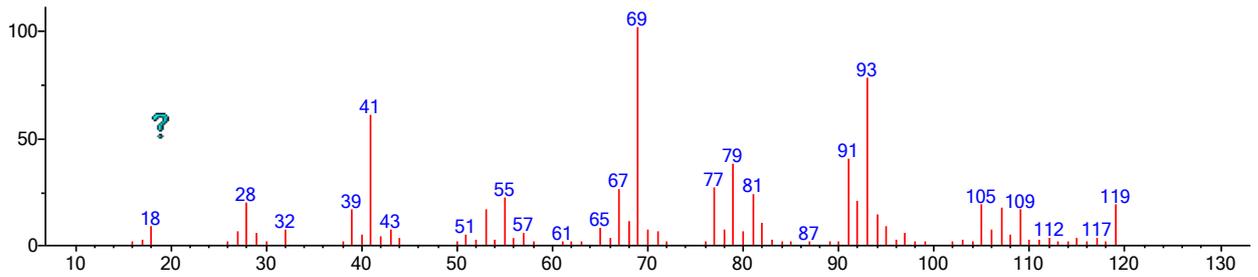
Substância (17) - (Z), (E)- α -farneseno (t_R = 27.522 min.)



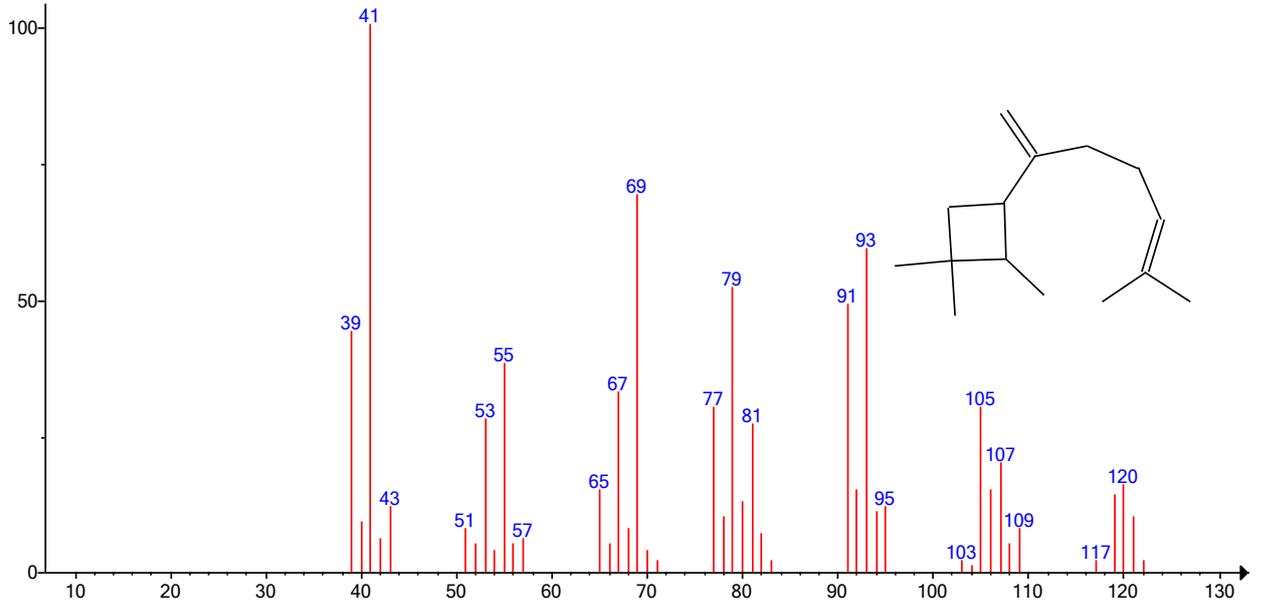
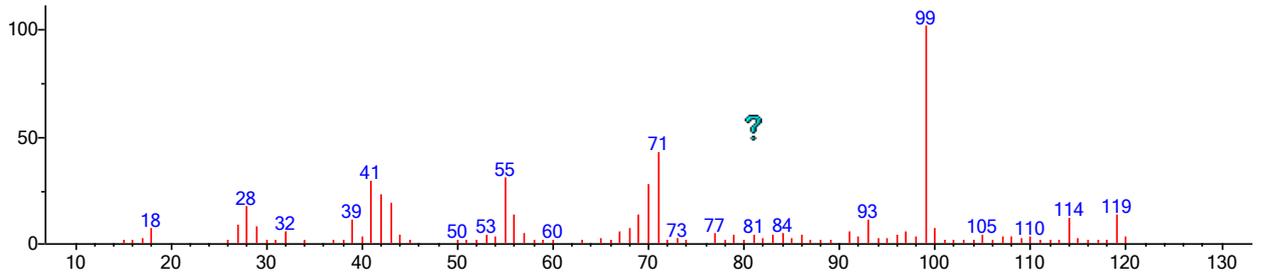
Espectro de massas da biblioteca



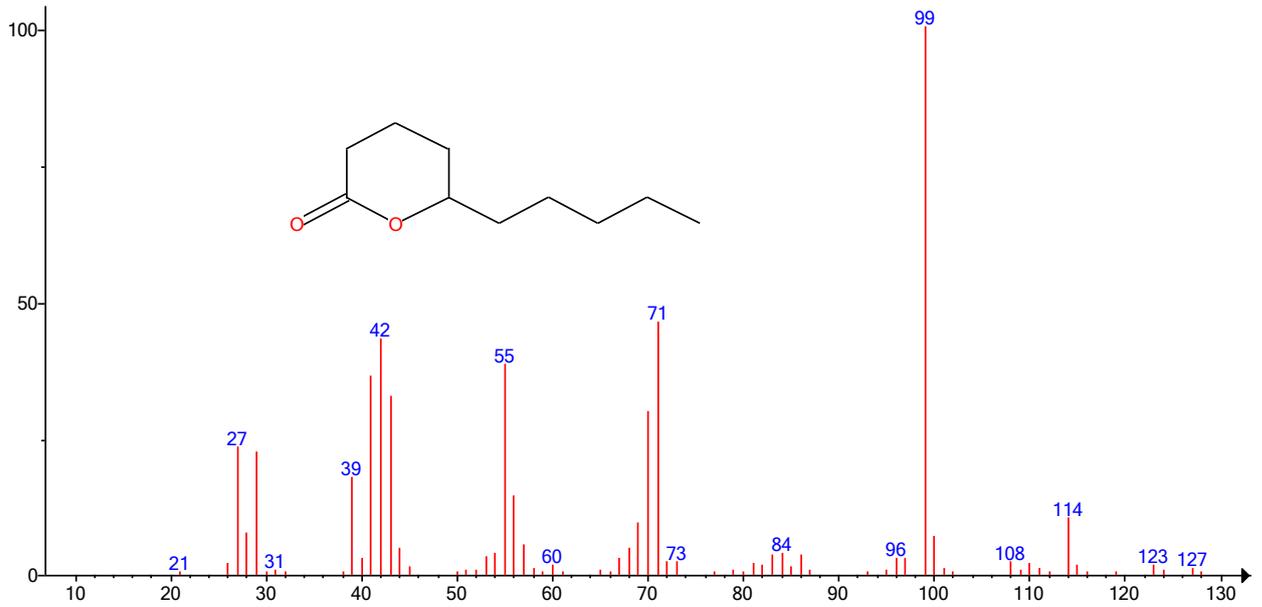
Substância (18) - (E)-Cariofileno (t_R = 27.678 min.)



Espectro de massas da biblioteca

Substância (19) - δ -Decalactona ($t_R = 28.095$ min.)

Espectro de massas da biblioteca



Os componentes majoritários do OE de *A. suaveolens* foram (*E*)- β -Farneseno (37,615%), o Linalol (33,375%), α -Santaleno (3,255%) e Acetato de Linalila (3,222%). Esses resultados corroboram com os de Tucker et al. (2001) que apontam estes compostos como os principais componentes majoritários do óleo essencial de *A. suaveolens*.

Tabela 2 - Substâncias identificadas, tempo de retenção, percentual relativo e índice de Kovats da literatura do óleo essencial de *A. suaveolens* por CG-EM.

Nº	t _R (min)	IK*	Compostos	Porcentagem relativa (%)
1	7.163	979	β -pineno	0,411%
2	7.560	990	β -mirceno	0,263%
3	8.857	1029	Limoneno	0,127%
4	8.971	1031	1,8-Cineol	0,223%
5	9.566	1037	β - Ocimeno	0,768%
6	11.648	1098	Linalol	33,275%
7	14.267	1169	Borneol	0,178%
8	15.327	1188	α - Terpineol	1,569%
9	16.949	1229	Nerol	0,180%
10	18.088	1252	Geraniol	0,464%
11	18.168	1257	Acetato de Linalila	3,222%
12	23.595	1298	Geraniol formate (CAS)	0,544%
13	25.049	1417	α -Santaleno	3,255%
14	25.691	1434	(<i>E</i>)- α -Bergamoteno	1,805%
15	26.680	1456	(<i>E</i>)-β-Farneseno	37,615%
16	27.399	1472	Massoia lactona	2,496%
17	27.522	1505	(<i>Z</i>), (<i>E</i>)- α -farneseno	0,408%
18	27.678	1419	(<i>E</i>)-Cariofileno	0,475%
19	28.095	1494	δ - Decalactona	0,375%
			Monoterpenos	1,57%
			hidrocarbonados	
			Monoterpenos oxigenados	39,65%
			Sesquiterpenos	43,56%
			hidrocarbonados	
			Lactona	2,87%
			Total	87,65

tR: Tempo de retenção; IK*: Índice de Kovats (ADAMS, 2012).

5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *A. suaveolens* PELO MÉTODO DE CAPTURA DO RADICAL DPPH

A capacidade antioxidante de produtos naturais está relacionada com a composição de compostos fenólicos e a ação desses é interromper a cadeia de radicais livres na etapa de iniciação do processo oxidativo (FREITAS et al., 2014).

O DPPH é um radical livre, que tem sido usado para avaliar a capacidade antioxidante de compostos fenólicos durante a transferência de átomos de H lábeis aos radicais. A intensidade da coloração é proporcional à concentração da substância com potencial antioxidante, como é o caso dos compostos fenólicos que devido às suas propriedades redox são considerados agentes redutores, doadores de hidrogênio e oxigênio singlete (CHEN et al., 2013; GODÓI et al., 2011).

O óleo essencial de *A. suaveolens* apresentou aumento significativo da atividade antioxidante de acordo com o aumento da concentração, atingindo o valor máximo de 43,5% de atividade antioxidante na concentração de 5 mg.mL⁻¹ (tabela 3).

Tabela 3 - Média e desvio padrão do percentual de atividade antioxidante do óleo essencial de *A. suaveolens* em diferentes concentrações.

Concentrações do OE (mg.mL ⁻¹)	% AA
0,25	19,5±0,38 ^a
0,50	21,5±0,09 ^b
0,75	22,8±0,05 ^c
1	24,1±0,44 ^d
2,5	31,5±0,50 ^e
5	43,5±0,33 ^f

Letras diferentes indicam que houve diferença significativa (p<0,05). Equação da atividade antioxidante Y= 4,96x + 18,92.

A correlação entre atividade antioxidante (%) e a concentração do OE apresentou alto valor de CI₅₀ de 6,26 mg.mL⁻¹, quando comparado com os padrões, vitamina C e o flavonóide rutina, com CI₅₀ de 6,13 µg.mL⁻¹ e 6,71 µg.mL⁻¹ respectivamente (GODÓI et al., 2011). De acordo com Nascimento et al. (2011), quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CI₅₀ e maior a sua atividade antioxidante.

Para Beatović et al. (2015), a capacidade antioxidante de OE está relacionada com seus compostos majoritários, no entanto neste estudo, não foi observado atividade antioxidante. Estudos realizados com a espécie *Ocimum basilicum*, tendo o linalol como composto majoritário, mostrou forte capacidade antioxidante (TREVISAN et al., 2006). Por outro lado, Lu e Foo (2001) acreditam que a maioria dos compostos, atuam sinergicamente entre si produzindo um amplo espectro de propriedades antioxidantes e assim, criam um eficaz sistema de defesa contra os radicais livres. Estudo realizado por Choi et al. (2000) com os compostos α-pineno, β-pineno e 1, 8-cineol também não apresentaram capacidade antioxidante significativa pelo método de captura do radical DPPH, corroborando com os resultados deste estudo.

5.4 TOXICIDADE FRENTE À *A. salina* DO ÓLEO ESSENCIAL DE *A. suaveolens*

O teste de toxicidade sobre *A. salina* para extratos orgânicos e extratos aquosos é considerados atóxicos se a CL_{50} for acima de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, os com baixa toxicidade se a CL_{50} for superior a $500\mu\text{g.mL}^{-1}$, com toxicidade moderada se a CL_{50} for entre 100 a $500\mu\text{g.mL}^{-1}$ e os muito tóxico se a CL_{50} for inferior a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Amarante et al., 2011).

A **tabela 4** mostra às leituras de mortalidade média realizada no período de 24 h da atividade citotóxica do óleo essencial da folha de *A. suaveolens*. Os resultados mostraram que o óleo essencial de *A. suaveolens* apresentou elevada toxicidade frente à *A. salina*, com CL_{50} de $8,90 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e coeficiente de correlação de (R^2 0,93), $p < 0.0000$.

Tabela 4 – Percentual de mortalidade de larvas de *A. salina* em diferentes concentrações de óleo essencial de *A. suaveolens*.

Concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Mortalidade %
Controle	0 ^a
1	0 ^{b,a}
10	76,76 ^b
50	100 ^b
100	100 ^b
250	100 ^b
500	100 ^b
1000	100 ^b

Caracteres minúsculos diferentes representam diferenças significativas na mortalidade entre as concentrações dos óleos.

Não foi reportado na literatura atividade citotóxica do óleo essencial de *A. suaveolens* frente à *A. salina*. No entanto, a elevada toxicidade encontrada ($8,90 \mu\text{g.mL}^{-1}$) pode estar relacionada com o sinergismo entre monoterpenos e sesquiterpenos presentes no óleo essencial da *A. suaveolens*. Estudos realizados por Boscardin et al. (2012) sobre atividade citotóxica de óleos voláteis de *Eucalyptus benthamii* em quatro linhas tumorais, mostraram que o óleo essencial apresentou melhor resultado que os compostos isolados (α -pineno e γ -terpineno) para células Jurkat, HeLa e B16F10.

Burt (2004) acredita que o mecanismo de ação dos compostos monoterpênicos e sesquiterpênicos possa estar relacionado com o deslocamento destes compostos da fase aquosa em direção às estruturas da membrana, causando efeitos tóxicos tanto à estrutura quanto à função da membrana celular.

5.5 ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *A. suaveolens*

A descoberta de novos produtos naturais com potencial antimicrobiano é de considerável interesse devido à crescente resistência de muitas bactérias aos antibióticos utilizados atualmente para o tratamento de infecções (RASHED et al., 2013).

A **tabela 5** refere-se à atividade microbiológica do óleo essencial de *A. suaveolens*. Os resultados mostraram que as bactérias Gram negativas *E. coli* e *Salmonella sp* apresentaram mais suscetibilidade ao óleo essencial de *A. suaveolens*, com CIM de 50 mg.mL⁻¹, quando comparadas com a bactéria Gram positiva *S. aureus* com CIM de 100 mg.mL⁻¹. Com relação à CBM, a concentração do OE de *A. suaveolens* equivalente a 100 mg.mL⁻¹ foi suficiente para inibir o crescimento de *E. coli*.

Tabela 5 - Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do óleo essencial de *A. suaveolens*

Microrganismo	CIM (mg.mL ⁻¹)	CBM ((mg.mL ⁻¹)
<i>Escherichia coli</i>	50	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	100	ND
<i>Salmonella sp</i>	50	ND
Amoxicilina (Controle positivo)	0,048	0,048
DMSO (Controle negativo)	-	-

ND: Não detectado

Estudos realizados por Simionatto et al. (2007) com compostos isolados de *A. suaveolens* analisados por bioautografia mostraram que a lactona monoterpênica massoiolactona apresentou uma excelente propriedade antibacteriana para os microrganismos *Salmonella setubal* e *Bacillus subtilis*, sendo ativa na mínima concentração em que foi testada (3,125 µg.mL⁻¹). Estes mesmos autores ao analisarem a propriedade antibacteriana pelo método de CIM, mostraram que o OE apresentou uma boa atividade contra a bactéria Gram negativa *E. coli*. Neste estudo, o OE da *A. suaveolens* também apresentou melhor atividade bacteriostática (50 mg.mL⁻¹) para as bactérias Gram negativas, *E. coli* e *Salmonella sp.*, e atividade bactericida (100 mg.mL⁻¹) apenas para *E. coli* (**figura 10**).

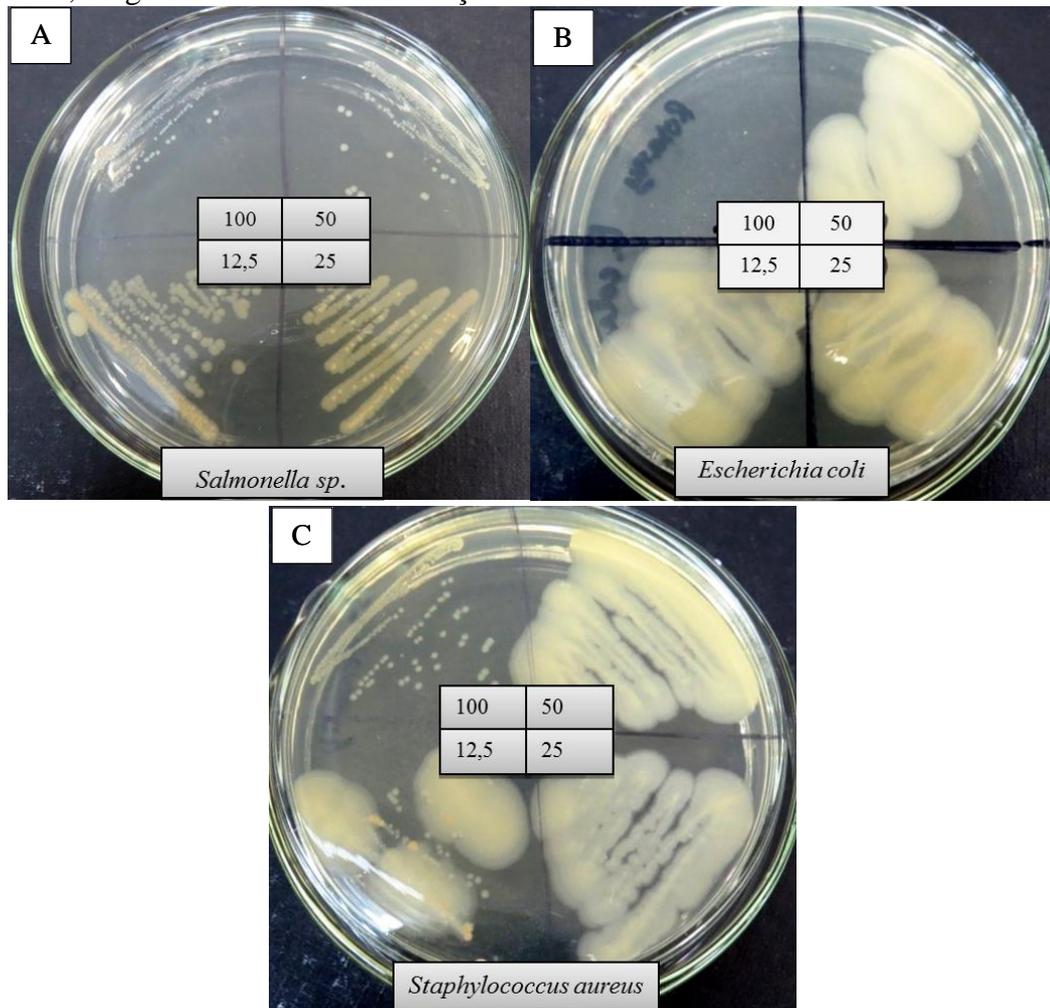
Diversos mecanismos tem sido propostos afim de se explicar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, que são geralmente compostos por monoterpenos, sesquiterpenos e seus derivados oxigenados (RAHMAN; KANG, 2009). Por possuírem caráter lipofílico, os OEs se difundem através da bicamada fosfolipídica, o que posteriormente

afeta a homeostase e o equilíbrio de pH e de íons inorgânicos (SOUZA et al., 2016; SILVEIRA et al., 2014).

A maior atividade do OE frente a *E. coli* e *Salmonella sp.* e a menor atividade frente a *S. aureus*, diferem da maioria dos estudos que relatam que bactérias Gram positivas são mais sensíveis a óleos essenciais do que as Gram negativas (VALERIANO et al., 2012). No entanto, alguns estudos não confirmam estas observações e afirmam que bactérias Gram positivas têm sido menos ou igualmente sensíveis a bactérias Gram negativas (BURT, 2004).

Ao contrário do que se observou na atividade citotóxica do OE de *A. suaveolens*, onde o efeito sinérgico dos compostos monoterpênicos e sesquiterpênicos parece potencializar a toxicidade frente à larvas de *A. salina*, na atividade antimicrobiana os compostos isolados mostraram ser mais ativos isolados (massoialactona) do que todos os componentes do óleo essencial (SIMIONATTO, 2007).

Figura 10 - Concentração bactericida mínima (CBM) do óleo essencial de *A. suaveolens* frente às cepas de *Salmonella sp.* (A), *E. coli* (B) e *S. aureus* (C) nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 mg.mL⁻¹ em 24 h de incubação a 37° C.



5.6 ATIVIDADE LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *A. suaveolens*

A atividade larvicida do óleo essencial de *A. suaveolens* foi testada em sete concentrações diferentes: 0,01, 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,125 e 0,15 mg.mL⁻¹. Os resultados mostraram que a concentração 0,01 mg.mL⁻¹ não apresentou atividade larvicida após 24 h e baixa atividade após 48h com 1,28 % de mortalidade. A partir da concentração 0,075 mg.mL⁻¹ o óleo essencial de *A. suaveolens* apresentou mortalidade maior que 50 % nos períodos de 24 e 48h (**tabela 6**).

Tabela 6 - Porcentagem de mortalidade (%) das larvas de *A. aegypti* em diferentes concentrações do óleo essencial de *A. suaveolens* em dois períodos.

Concentrações (mg.mL ⁻¹)	Atividade larvicida (%)	
	24 h	48 h
Controle	0	0
0,01	0	1,28
0,025	1,43	5,94
0,05	22,44	52,47
0,075	64,02	86,54
0,1	86,59	98,67
0,125	94,46	100
0,15	98,27	100

O bioensaio com óleo essencial obtido das folhas de *A. suaveolens* contra *A. aegypti* apresentou efeito larvicida com CL₅₀ de 0,072, p-valor < 0.05 significativo e coeficiente de determinação (R²) de 0.0998 em 24 horas e CL₅₀ de 0,052 mg.mL⁻¹, p-valor < 0.05 e R² de 0.997 em 48 horas. De acordo com Cheng et al., (2003), óleos essenciais com CL₅₀ < 100ppm (0,1 mg.mL⁻¹) são considerados agentes com bons potenciais larvicidas, corroborando com os resultados de mortalidade do OE de *A. suaveolens* frente a larvas de *A. aegypti*.

Efeitos inseticidas dos óleos essenciais são atribuídos aos seus constituintes químicos (MAGALHÃES et al., 2015). Estudo realizado por Simas et al. (2004) o composto majoritário (linalol) da espécie *Myroxylon balsamum* apresentou atividade larvicida (CL₅₀ de 100 ppm) maior do que a encontrada neste estudo (CL₅₀ de 0,072 mg.mL⁻¹ em 24 h e 0,052 mg.mL⁻¹ em 48h), isso sugere a possibilidade de que outros compostos sejam responsáveis pela atividade larvicida do óleo essencial ou até mesmo que possa existir um sinergismo entre o linalol e outros compostos do óleo. Para Silva (2006), a atividade larvicida pode estar relacionada com a inibição da enzima acetilcolinesterase pelos óleos essenciais.

Óleo essencial das folhas de *Foeniculum vulgare* dos países Cabo Verde e Portugal, apresentaram forte potencial larvicida contra o *A. aegypti* com CL_{50} de 37,1 e 52,4 $\mu\text{L.L}^{-1}$, respectivamente. Sendo que o principal componente majoritário da espécie foi o (-)-limoneno (ROCHA et al., 2015).

Estudo realizado por Leite et al. (2009) mostrou que o óleo essencial de espécies da família Lamiaceae apresentaram atividade de embriotoxicidade sobre larvas de *A. aegypti* mostrando uma variação de inibição de viabilidade entre 40 e 100%.

5.7 ATIVIDADE ADULTICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *A. suaveolens*

Os resultados da atividade adulticida do óleo essencial de *A. suaveolens* frente ao *A. aegypti* estão apresentados na **tabela 7**. A menor concentração avaliada, 3,125 mg.mL^{-1} , apresentou mortalidade de 7,02% em 24 h e 9,68% em 48 h. As duas maiores concentrações testadas 25 e 50 mg.mL^{-1} apresentaram 100% de mortalidade para *A. aegypti* adulto após 24 e 48 h, respectivamente. De acordo com a *United State Agency for International Development* (USAID, 2012), existe suscetibilidade dos adultos de *A. aegypti* quando a mortalidade deste vetor for de 98 à 100%, corroborando com os resultados de mortalidade do OE de *A. suaveolens*.

Tabela 7 - Porcentagem de mortalidade (%) de *A. aegypti* adultos em diferentes concentrações do óleo essencial de *A. suaveolens* durante dois intervalos de tempo.

Concentrações (mg.mL^{-1})	Atividade Adulticida (%)	
	24 h	48 h
Controle	0	0
3,125	7,02	9,68
6,25	57,38	69,66
12,5	86,26	94,07
25	100	100
50	100	100

A CL_{50} do óleo essencial de *A. suaveolens* frente ao *A. aegypti* adulto para o período de 24 horas foi equivalente a 6,25 mg.mL^{-1} , p-valor < 0,05 significativo e R^2 de 1 e para 48 horas foi de 5,351 mg.mL^{-1} , p-valor < 0,025 significativo e R^2 de 1.

Não há relatos na literatura sobre a atividade larvicida e adulticida do óleo essencial de *A. suaveolens* frente ao *A. aegypti*. Neste estudo, verificou-se que diferente do que foi constatado para as larvas, foram necessárias concentrações mais elevadas para que o óleo essencial da *A. suaveolens* apresentasse eficiência na atividade adulticida com *A. aegypti*.

Alguns autores consideram que para avaliar as propriedades de produtos de origem vegetal sobre o *A. aegypti* seja necessário observar o método de aplicação, a concentração, o tempo de exposição e a fase de desenvolvimento do inseto que pode conferir diferentes graus de tolerância do produto (MACIEL et al., 2010).

Para Coutinho et al. (2011), a toxicidade de OE para insetos, pode ocorrer por contato, ingestão ou fumigação. Apesar dos mecanismos de ação de OEs em insetos ainda serem pouco conhecidos, estudos apontam que a inalação pelos espiráculos seja uma das formas de ação (MELLO et al., 2014). Por outro lado, sugere-se que os monoterpenos estejam envolvidos através da inibição da enzima acetilcolestirenase (MIYAZAWA et al., 1997).

Kim et al. (2003) acredita que existe uma relação importante entre a estrutura química e a atividade biológica dos compostos, uma vez que quanto maior a lipoficidade, maior a penetração no tegumento do inseto. A ação inseticida por contato direto raramente é avaliada, merecendo assim, uma maior investigação, visto que se apresenta como mais uma alternativa viável ao controle de insetos.

A utilização de OEs no controle do vetor *A. aegypti* pode ser considerado como um método alternativo para reduzir os efeitos colaterais de inseticidas sintéticos ao meio ambiente. Assim, este estudo sugere que o óleo essencial da folha de *A. suaveolens* tem potencial larvicida e adulticida. No entanto, se faz necessário conduzir mais pesquisas nesta área, a fim de isolar os compostos eficazes.

6 CONCLUSÕES

A composição química do óleo essencial da *Acollanthus suaveolens* indicou a presença de 19 substâncias. Sendo que os principais compostos identificados foram (E)- β -Farneseno, Linalol, α -Santaleno e Acetato de linalila. O rendimento do óleo essencial foi satisfatório quando comparado com dados da literatura.

O óleo essencial não apresentou atividade antioxidante pelo método de captura do radical DPPH, quando comparado com o padrão vitamina C e rutina.

O óleo essencial da *A. suaveolens* apresentou elevada atividade citotóxica frente à *Artemia salina*. Os dados mostram a importância de bioensaios preliminares como uma triagem do potencial biológico dos produtos vegetais, bem como à importância destes produtos como fonte de compostos bioativos.

A atividade antimicrobiana mostrou que o óleo essencial da *A. suaveolens* apresentou melhor potencial bacteriostático para bactérias Gram negativas (*E. coli* e *Salmonella sp*) do que para bactéria Gram positiva (*S. aureus*) e potencial bactericida para bactéria Gram negativa (*E. coli*).

O bioensaio com óleo essencial de *A. suaveolens* frente à imaturos de *A. aegypti* demonstrou potencial larvicida. Com relação à avaliação da atividade inseticida, foi observado que adultos de *A. aegypti* são suscetíveis ao óleo essencial. Estes resultados demonstram o potencial desta espécie no desenvolvimento de inseticidas naturais.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. **Identification Of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry**. 4th ed. Carol Stream: Allured Business Media, p. 804, 2012.
- ADGABA, N.; et al. Nectar secretion dynamics and honey production potentials of some major honey plants in Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 3, p. 319-440, 2016.
- ALBINO, M. A.; et al. Phytochemical screening extract of ethanolic inflorescences and leaves of *Amaranthus viridis* L. (AMARANTHACEAE). **Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 2, n. 2, p. 74-83, 2015.
- ALMEIDA-FILHO, P. C. L. **Efeitos de inibidores de tripsina obtidas de sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam) R. de Witt sobre o desenvolvimento de *Aedes aegypti***. 92p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
- AMARANTE, C. B.; et al. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazônica**, v. 41, n. 3, p. 431-434, 2011.
- ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.
- ARAÚJO, M. G. F.; et al. Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (Solanaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p. 205-209, 2010.
- ARAÚJO, P. A.; et al. The susceptibility of *Aedes aegypti* populations displaying temephos resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis*: a basis for management. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 297, p. 2-9, 2013.
- AZAD, K. A. Ethnomedicinal surveys in two mouzas of Kurigram district, Bangladesh. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 10, p. 1607-1620, 2014.

AZEVEDO, M. V.; KRUEL, F. S. V. Plantas medicinais e ritualísticas vendidas em feiras livres no Município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil: estudo de caso nas zonas Norte e Sul. **Acta botânica brasileira**, v. 21, n. 2, p. 263-275. 2007.

BARREIRO, J. E.; BOLZANI, S. V. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BEATOVIĆ, D.; et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of twelve *Ocimum basilicum* L. cultivars grown in Serbia. **Records Natural Products**, v. 9, n. 1, p. 62–75, 2015.

BOHBOT, D. J.; et al. Functional development of the octenol response in *Aedes aegypti*. **Frontiers in Physiology**, v. 4, s/n, p. 1-8, 2013.

BOSCARDIN, D. M. P.; et al. In Vitro Cytotoxic Potential of Essential Oils of *Eucalyptus benthamii* and Its Related Terpenes on Tumor Cell Lines. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Print)**, v. 2012, s/n, p. 1-8, 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Disponível em:** <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portariafito.pdf> Brasília: Diário Oficial da União 2006.

BRITO, M. B. L.; et al. Febre amarela: Uma revisão da literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 8, n.3, p.61-65, 2014.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

BUSSATA, C., et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de óleo essencial de *Origanum vulgare* em linguça. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 610-616, 2007.

CALDAS, L. R. F. **Avaliação das Atividades Antimicrobiana e Antioxidante de Óleos Essenciais de Folhas e Inflorescências de *Ocimum gratissimum* L. (LAMIACEAE)**. 2011. 57p. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato, 2011.

CARDOSO, O. D. **Potencial e caracterização do isolado de namatoide entomopatogênico LPP35 como agente no controle de formas imaturas de *Aedes aegypti***. Dissertação

(Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos de Goyatacazes, 2014.

CHEN, Z.; et al. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH radical dot assay using several statistical programs. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 414–420, 2013.

CHENG, S. S.; et al. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 99-102, 2003.

CHOI, H. S.; Radical scavenging activities of Citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 9, p. 4156-4161, 2000.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2007. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Seventh Informational Supplement CLSI document M100-S17, Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, USA.

COUTINHO, C. B. L. R.. 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.

CONSOLI, R. A. G. B., OLIVEIRA, R. L. (1998). **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1. Ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, Reimpressão. 225p.

COSTA-LOTUFO, L. V.; et al. Analgesic, antiinflammatory and central depressor effects of the hydroalcoholic extract and fractions from *Aeollanthus suaveolens*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 6, p. 821-824, 2004.

DÍAZ-NIETO, M. L.; et al. Geographical Limits of the Southeastern Distribution of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in Argentina. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1, p. 1-6, 2013.

DICK, B. O.; et al. The History of Dengue Outbreaks in the Americas. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 4, p. 584-593, 2012.

DUARTE, S. F. A.; et al. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato etanólico bruto e frações orgânicas obtidas a partir da casca do caule da espécie *Guettarda*

uruguensis Cham. & Scthdl. (Rubiaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 4, p. 607-614, 2014.

DUTRA, C. L. H.; et al. The influence of larval competition on Brazilian Wolbachia-infected *Aedes aegypti* mosquitoes. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 282, p. 1-15, 2016.

EL-AKHAL, F.; et al. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil of *Origanum majorana* (Lamiaceae) cultivated in Morocco against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 6, p. 746-750, 2014.

FARIA, R. N.; et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, v. 352, n. 6283, p. 345–349, 2016.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: **ANVISA**. 2010.

FARNESI, C. L.; et al. Physiological and Morphological Aspects of *Aedes aegypti* Developing Larvae: Effects of the Chitin Synthesis Inhibitor Novaluron. **Plos One**, v. 7, n. 1, p. 2-9, 2012.

FERREIRA, V. K.; et al. Histórico da febre amarela no Brasil e a importância da vacinação anti-amarela. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v.36, n.1, p. 40-47, 2011.

FONTES, N. E. J. **Estudo Fitoquímico e investigação da atividade citotóxica das folhas de Guatteria pogonopus Mart. (Annonaceae)**. 147p. Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade Federal de Sergipe, 2014.

FRANCO, O. Reinfestação do Pará por *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 21, n. 4, p. 729-731, 1969.

FREITAS, C. R.; et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante das espécies *Plectranthus amboinicus* (Lour.) e *Mentha x villosa* (Huds.). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 1, p. 113-118, 2014.

GADELHA, D.P.; TODA, A.T. Biologia e Comportamento do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 37, s/n, p. 29-36, 1985.

GERSHENZON, J.; et al. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. **Plant Physiology**, v.122, s/n, p.205- 13, 2000.

GODÓI, A. A.; et al. Avaliação da atividade antioxidante, antibacteriana e citotóxica de *Urera aurantiaca*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 3, p 198-202, 2011.

GOULART, M. V. **Efeito da hipergravidade simulada sobre a germinação, o crescimento e a produção de óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.)**. 53p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica) - Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

GUIMARÃES, G. D. F. **Avaliação da atividade microbiológica e citotóxica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* JOWITT ex BOR**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

GUDO, S. E.; et al. Serological Evidence of *Chikungunya* Virus among Acute Febrile Patients in Southern Mozambique. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 9, p. 1-11, 2015.

HARLEY, R. M.; PASTORE, J. F. B. A generic revision and new combinations in the Hyptidinae (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence. **Phytotaxa**, v. 58, n. 1, p. 1-55, 2012.

HARLEY, R.; et al. Lamiaceae. In: **lista de Plants, dicotyledones: Lamiales except Acanthaceae including Avicenniaceae**. The families and genera of vascular plants; 7. Springer – Verlag Berlin Heidelberg New York, 2004, 484p.

JUMBO, V. O. L. **Atividade inseticida e de repelência de óleos essenciais De cravo e canela sobre o caruncho *Acanthoscelides obtectus* (Say)**. 57p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

KIM, S. I. et al. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. **Journal of Stored Products Research**, v.39, s/n, p.293-303, 2003.

LAVOR, P. L.; et al. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oils from northeast Brazil. **Natural Product Communications**, v. 7, n. 10, p. 1391-1392, 2012.

LEAL, G. S. **Frequências de lesões histológicas em primatas do gênero *Alouatta* naturalmente infectados pelo vírus da febre amarela no Brasil- 1999 a 2009**. 66p. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

LEITE, M. A.; et al. Preliminary study of the molluscicidal and larvicidal properties of some essential oils and phytochemicals from medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 842-846, 2009.

LELES, N. R. **Efeito de fungos entomopatogênicos na mortalidade de adultos, oviposição e eclosão de larvas de *Aedes aegypti***. 61p. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical)- Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

LIMA, R. K.; et al. Bactericidal and antioxidant activity of essential oils from *Myristica fragrans* Houtt and *Salvia microphylla* H. B. K. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, s/n, p. 523-528, 2012.

LÔBO, K. M. S.; et al. Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. e *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples, do semiárido paraibano. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n. 2, p. 227-233, 2010.

LOPES-LUTZ, D.; et al. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1732-1738, 2008.

LU, F.; FOO, V., Antioxidant activities of polyphenol from sage (*Salvia officinalis*). **Food Chemistry**, v. 75, n. 2, p. 197–202, 2001.

LUZ, G. K.; et al. Febre pelo vírus Zika. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n. 4, p. 785-788, 2015.

MACIEL, M. V.; et al. Extratos vegetais usados no controle de dípteros vetores de zoonoses. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n.1, p. 105-112, 2010.

MAGALHÃES, C.R.I., et al. Potencial inseticida de óleos essenciais sobre *Tribolium castaneum* em milho armazenado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 1150-1158, 2015.

MARTIN, E. Karyomorphological Study in *Nepeta viscida* Boiss. (Lamiaceae) from Turkey. **Journal Of Applied Biological Sciences**, v. 7, n. 3, p. 26–30, 2013.

MATTOS, S.H.; INNECCO, R. Idade ideal de corte de *Mentha arvensis* como produtora de óleo essencial de mentol para o Estado de Ceará, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.5, n.1, p.15-8, 2002.

MCLAUGHLIN, J. L.; et al. Tres bioensayos simples para quimicos de productos naturales. **Revista de la Sociedad Venezolana Química**, v. 18, p. 13 - 18, 1995.

MELLO, B. M.; et al. Atividade inseticida do óleo essencial de *Hyptis marrubiioides* no controle de *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae). **Revista Agrogeoambiental**, v. 6, n. 1, p. 79-86, 2014.

MENDES, S. D. M. **Caracterização química e molecular de espécies das famílias Lamiaceae e Apiaceae da flora aromática de Portugal**. 57p. Mestrado (Biologia Celular e Biotecnologia)- Universidade de Lisboa, Lisboa, 2007.

MERCÊS, P. F. F. **Variação da composição química e da atividade antifitopatogênica dos óleos essenciais das folhas e frutos de *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril* (Fabaceae) coletadas em área de extrema importância biológica para a conservação**. 101p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

MEYER, B. N.; et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, n. 1, p. 31- 34, 1982.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 23, 2016**. Brasília: v. 47, p. 10, 2016.

MIRANDA, C. V. **Influência de Condições de Secagem, Sombreamento, Horário de Colheita E Procedência das Plantas sobre o Teor de Óleo Essencial de *Cymbopogon Citratus* (D.C) Stapf**. 2012. 34p. Dissertação (mestrado) – Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal de Tocantins, Gurupi, 2012.

MIYAZAWA, M.; et al. Inhibition of acetylcholinesterase activity by monoterpenoids with a *p*-menthane skeleton. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 677-679, 1997.

MORENO, V. M. **Atividade Antioxidante in Vitro de Plantas Medicinais da Amazônia Ocidental**. 2013. 97p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) – Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2013.

NASCIMENTO, C. J.; et al. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 4, p. 327-332, 2011.

OLIVEIRA, A. S. C.; et al. Estudo Morfológico da Catinga de Mulata (*Aeollanthus suaveolens* - Mart. ex. K. Spreng). **In: 54º Congresso Nacional de Botânica**, Belém, jul./ 2003.

OLIVEIRA, F. E. M. **Qualidade de luz e doses de fósforo no crescimento de plantas de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.)**. 68p. Dissertação (Mestrado em solos e qualidade de ecossistemas)- Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2013.

OLIVEIRA, V. C. A.; et al. Occurrence of Autoimmune Diseases Related to the Vaccine against Yellow Fever. **Autoimmune Diseases - Hindawi Publishing Corporation**, v. 2014, s/n, p. 8, 2014.

ORLANDA, F. F. J. **Estudo da composição química e atividade biológica do óleo essencial de *Ruta graveolens* Linneau (RUTACEAE)**. 105p. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

OOTANI, A. M.; et al. Use of Essential Oils in Agriculture. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 2, p. 162-175, 2013.

PARTIDA, M. D. S.; et al. Anti-HIV activity of Hyptis Jacq. (Lamiaceae). **Planta Medica**, v. 81, n. 16, p. 88, 2015.

PAULERT, R., et al. Utilização popular de plantas medicinais nos clubes de mães de Palotina-PR. **Revista Ciência em Extensão**, v. 10, n. 2, p. 55-64, 2014.

PELLISSARI, P. G.; et al. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC., Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 70-74, 2010.

PERAZZO, F. M.; et al. Efeito Antimicrobiano do Óleo Essencial do *Cymbopogon citratus* Sobre Bactérias Formadoras do Biofilme Dentário. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 16, n. 4, p. 553-558, 2012.

PEREIRA, J. R.; CARDOSO, G. M. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PINTO, S. F. G. **Fitotoxicidade e análise fitoquímica a partir de folhas de cinco espécies de cerrado**. 67p. Dissertação (Mestrado em Biciências)- Universidade Estadual Paulista, Assis, 2015.

POMPILHO, W. M., et al. Bioatividade de três espécies vegetais nativas da Floresta Atlântica brasileira frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 473-480, 2014.

POWELL, R. J.; TABACHNICK, J. W. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, s/n, p. 11-17, 2013.

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

RASHED, N. K.; et al. Antimicrobial Activity, Growth Inhibition of Human Tumour Cell Lines, and Phytochemical Characterization of the Hydromethanolic Extract Obtained from *Sapindus saponaria* L. Aerial Parts. **BioMed Research International**, v. 2013, s/n, p. 2-9, 2013.

ROCHA, D. K.; et al. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of *Foeniculum vulgare* essential oils from Portugal and Cape Verde. **Natural Product Communications**. v. 10, n. 4, p. 677–682, 2015.

ROSA, M. G. **Teor e Composição de Óleo Essencial de Capim-Limão (*Cymbopogon Citratus* (Dc) Stapf) e Tomilho (*Thymus Vulgaris* L.) Submetidos a Diferentes Temperaturas e Períodos de Secagem.** 2013. 44p. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

SANTANA, H. T. **Estudo fitoquímico de *Piper alatabaccum* Trel & Yunck, 1950 e avaliação da atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: culicidae) em condições de campo simulado.** 90p. Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental)- Universidade Federal de Rondônia. Porto Velho, 2012.

SANTIN, R. **Potencial antifúngico e toxicológico de óleos essenciais da família Lamiaceae.** 2013. 104p. Tese (Doutorado Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2013.

SANTOS, A. S.; et al. Descrição de Sistemas e de Métodos de Extração de óleos essenciais e determinação da Umidade da Biomassa em Laboratório. **Comunicado técnico [do] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Belém, v. 99, s/n, p. 1-7, 2004.

SANTOS, I. R. dos. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O., et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6° ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

SANTOS, L. R. S. **Síntese e atividade de compostos potencialmente larvicidas frente ao *Aedes aegypti*.** 94p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal de Sergipe, 2014.

SANTOS, P. R. **Extração, caracterização e avaliação bioativa do extrato de *Arrabidaea chica***. 89p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

SHENOY, C.; et al. Wound Healing Activity of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae). **International Journal of PharmTech Research**, v.1, n.3, p. 737-744, 2009.

SILVA, C. L. S.; et al. Avaliação da atividade larvicida de extratos obtidos do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Revista Biotemas**, v. 27, n. 2, p. 79-85, 2014.

SILVA, F. A. **Identificação morfoanatómica e código de barras genético de *Hyptis stricta benth.* (Lamiaceae)**. 2012. 48p. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

SILVA, S. O.; et al. Larvicidal and growth-inhibiting activities of extract and benzopyrans from *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 236-239, 2013.

SILVA, W. J. **Atividade Larvicida de Óleos Essenciais de Plantas existentes no Estado de Sergipe contra *Aedes aegypti***. 69 p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2006.

SILVA, B. C. P. **Caracterização química, atividade larvicida e deterrente de oviposição do óleo essencial da inflorescência do Bastão do Imperador (*Etlíngera elatior*) frente à *Aedes aegypti***. 91p. Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

SILVEIRA, M. S.; et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7 °C. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 86–93, 2014.

SIMAS, N.K.; et al. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue - atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 46-49, 2004.

SIMIONATTO, E.; et al.; Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Aeolanthus suaveolens* MART. ex spreng. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1923-1925, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O., et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6° ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

SIRIPORN, P.; MAYURA, S. The effects of herbal essential oils on the oviposition-deterrent and ovicidal activities of *Aedes aegypti* (Linn.), *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison) and *Culex quinquefasciatus* (Say). **Tropical Biomedicine**, v. 29, n. 1, p. 138-50, 2012.

SOUSA, C. M. M.; et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, B. S. M. **Mecanismos de ação antioxidante de extratos de murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth)**. 133p. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

SOUZA, A. A., et al. Composição química e concentração mínima bactericida de dezesseis óleos essenciais sobre *Escherichia coli* enterotoxigênica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 105-112, 2016.

SOUZA, O. H. F. **Efeito abióticos na composição do óleo essencial de *Lippia gracilis*: influência na mortalidade e repelência de *Sitophilus zeamais***. 50p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2013.

TELES, M. R. **Caracterização química, avaliação térmica e atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti* do óleo essencial da *Aniba duckei* Kostermans**. 126p. Tese (Doutorado em Química Orgânica)- Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

TREVISAN, M. T. S.; et al. Characterization of the volatile pattern and antioxidant capacity of essential oils from different species of the genus *Ocimum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 12, p. 4378–4382, 2006.

TUCKER, O. A.; MACIARELLO, J. M. Essential Oil of *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (Lamiaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 13, n. 3, p. 198-199, 2001.

UNITED STATE AGENCY FOR INTERNATIONAL DESENVELPMENT. **Entomology Manual Malaria For Entomology and Technical Control Vectors (Basic Level)**. 1 ed., p. 91, 2012.

VALERIANO, C.; et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 57-67, 2012.

VASCONCELOS, C. F. P. Doença pelo vírus *Zika*: um novo problema emergente nas Américas? **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 2, p. 9-10, 2015.

WHO - World Health Organization 2005. **Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides**. Geneva. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69101/1/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf>. Acesso em: 20/02/2015.

WHO. 1984. Chemical methods for the control of arthropod vectors and pets of public health importance, Geneva, 108p.

ZABARAS, D.; WYLLIE, S.G. The effect of mechanical wounding of the composition essential oil from *Ocimum minimum* L. leaves. **Molecules**, v.6, s/n, p.79- 86, 2001.

ZARA, A. S. L. A. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 391-404, 2016.

ZULIAN, A.; et al. Citricultura e agronegócio cooperativo no Brasil. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 11, n. 11, p. 2290-2306, 2013.