



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

ALEX BRUNO LOBATO RODRIGUES

**ESTUDO FITOQUÍMICO E DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, DE
CITOTOXICIDADE E INSETICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE MORFOTIPOS DE
Ayapana triplinervis (VAHL) R. M. KING & H. ROB. (ASTERACEAE)**

MACAPÁ
2015

ALEX BRUNO LOBATO RODRIGUES

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, DE
CITOTOXICIDADE E INSETICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE MORFOTIPOS DA
ESPÉCIE *Ayapana triplinervis* (VAHL) R. M. KING & H. ROB. (ASTERACEAE)**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Biologia Farmacêutica.

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

**MACAPÁ
2015**

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

615.1

R696e Rodrigues, Alex Bruno Lobato.

Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante, de citotoxicidade e inseticida de óleos essenciais de morfotipos de *Ayapana triplinervis* (VAHL) R. M. KING & H. ROB. (ASTERACEAE) / Alex Bruno Lobato Rodrigues; orientador, Sheylla Susan Moreira da Silva de Almeida. – Macapá, 2015.
82 f.

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

1. Famácia – Produtos naturais. 2. Quimiotaxonomia. 3. Controle químico. I. Almeida, Sheylla Susan Moreira da Silva de, orientador. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

ALEX BRUNO LOBATO RODRIGUES

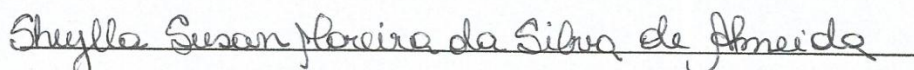
**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, DE
CITOTOXICIDADE E INSETICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE MORFOTIPOS DE
Ayapana triplinervis (VAHL) R. M. KING & H. ROB. (ASTERACEAE)**

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

Área de Concentração: Biologia Farmacêutica.

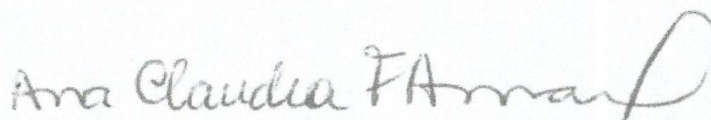
Data da avaliação: 16 de Setembro de 2015.

BANCA EXAMINADORA



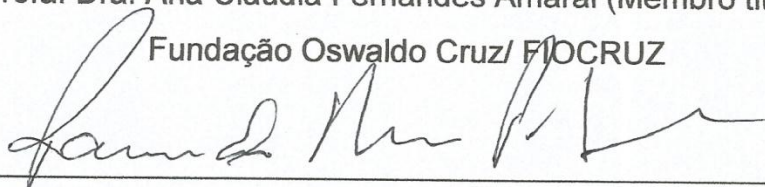
Profa. Dra. Sheylla Susan Moreira da Silva de Almeida (Orientadora)

Universidade Federal do Amapá/ PPGCF



Profa. Dra. Ana Cláudia Fernandes Amaral (Membro titular)

Fundação Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ



Prof. Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto (Membro titular)

Universidade Federal do Amapá/ PPGCF

Prof. Dr. Henrique Duarte da Fonseca Filho (Suplente)

Universidade Federal do Amapá/ PPGCF

O esforço e a dedicação aplicados neste estudo são oferecidos aos meus avós, pais, irmãos, familiares em geral e aos amigos.

AGRADECIMENTOS

Durante essa jornada acadêmica, aprendi a tratar os seres humanos, as outras criaturas e o mundo em geral com amor, honestidade, fidelidade e respeito. Tudo o que me tornei enquanto acadêmico, profissional e ser humano exige meus sinceros agradecimentos:

À Universidade Federal do Amapá e ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela estrutura necessária para o desenvolvimento do estudo;

À minha orientadora, Profa. Dra. Sheylla Almeida, por quem nutro profunda admiração e respeito.

Ao prof. Dr. Raullyan Silva do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Amapá –IEPA, pela indicação da espécie vegetal.

Aos professores Raimundo Souto, Ledayane Barbosa, Ricardo Ferreira e técnica Karen Carmo pelas aprendizagens e o acolhimento no Arthrolab.

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

Aos amigos Glenda Ramos, Leandro Castro, Igor Santos e Robert Matos da turma de PPGCF-2014, pelos diálogos construídos em sala de aula.

Aos companheiros do Laboratório de Farmacognosia e Fitoquímica Ranggel Simões, Rosany Martins, Ana Luzia Farias e Ryan Ramos, verdadeiros irmãos que compartilham o mesmo objetivo de vida.

Aos amigos que a poesia uniu: Thiago Soeiro, David Carvalho, João Carlos Borges, Diogo Moutinho, Janete Lacerda e Aline Monteiro por quando me incentivaram e acreditaram em mim.

Aos amigos da guarnição Bravo Adriane Bastos, Dayane Oliveira, Dayane Chagas, Fane Belo, Meirielle Uhl, Paulo Santos, Selmalavínia Marques e Célia Alves por transformarem os lugares hostis em banquetes com risos intermináveis.

Ao prof. Me. Aldeni Melo e aos “Pequenos Cientistas” que me ensinaram a diversão da pesquisa em sala de aula na educação básica.

À minha mãe, Rosinete Borges, ao meu pai e sua esposa, Nazareno Rodrigues e Sylvia Meireles, e aos meus irmãos Breno, Vinícius, Izabel, Fernanda e João Victor, por quem levanto e vou à guerra ainda que ferido.

Ao meu avô, Abel Chaves, e muito especialmente à minha avó, Sebastiana Nogueira, a primeira orientadora que desdobrou em mim o amor pelas plantas medicinais, a qual tenho toda a gratidão do mundo.

*Quando foi que minha alma saiu daqui,
pousou em tua voz
e me espalhou por aí?
(Aline Monteiro)*

RESUMO

O objetivo do estudo foi investigar a composição fitoquímica dos óleos essenciais dos morfotipos A e B de *A. triplinervis* e avaliar a atividade antioxidante, citotóxica e inseticida em imaturos e adultos de *A. aegypti*. Os óleos foram extraídos das folhas por hidrodestilação e identificados através de GC-MS, a atividade antioxidante foi avaliada a partir do sequestro de DPPH, a atividade citotóxica foi avaliada em *A. salina*, e a atividade inseticida seguiu o protocolo padrão indicado pela WHO (1984) para a atividade larvicida e o protocolo da WHO (1998) para a atividade adulticida. O perfil fitoquímico identificou 12 compostos no morfotipo A e 8 compostos no morfotipo B, em que o α -pineno (17,39%), sabineno (18,69%) e o *trans*- α -bergamoteno (19,56%) foram majoritários em A, e *cis*-ocimeno (16,26%), benzaldeído (22,50%) e α -felandreno (23,73%) os majoritários de B. Os resultados demonstraram um baixo percentual de atividade antioxidante, com $CL_{50} = 11.928 \text{ mg.mL}^{-1}$ para o morfotipo A, e $9,249 \text{ mg.mL}^{-1}$ para o morfotipo B e a atividade citotóxica demonstrou alta toxicidade frente a *A. salina*. Em relação à atividade inseticida em imaturos, a CL_{50} estimada para o morfotipo A em 24 horas foi equivalente a $126,277 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $98,251 \text{ mg.mL}^{-1}$ para 48 horas, em relação ao morfotipo B as CL_{50} estimadas foram $340,470 \text{ mg.mL}^{-1}$ em 24 horas e de $118,439 \text{ mg.mL}^{-1}$ para 48 horas de exposição. Para a atividade inseticida em adultos, o valor da CL_{50} do óleo essencial do morfotipo A para 24 horas foi equivalente a $63.848 \text{ mg.mL}^{-1}$ e para 48 horas igual a $40.111 \text{ mg.mL}^{-1}$, enquanto que o morfotipo B apresentou $CL_{50} = 39,894 \text{ mg.mL}^{-1}$ em 24 horas e $34,306 \text{ mg.mL}^{-1}$ para 48 horas. Os resultados indicam um potencial larvicida para o óleo essencial do morfotipo A em 48 horas e eventual potencial larvicida em B em 48 horas de exposição, assim como a susceptibilidade de adultos de *A. aegypti* em ambos os óleos nos dois períodos de exposição avaliados. Deste modo, os óleos essenciais de *A. triplinervis* podem ser utilizados no controle químico de *A. aegypti* e auxiliar no combate às doenças infectocontagiosas transmitida por esse vetor.

Palavras-chave: Produtos Naturais, Quimiotaxonomia, Controle Químico.

ABSTRACT

The aim of the study was to investigate the phytochemical composition of the essential oil of the morphotypes A and B of *A. triplinervis* and evaluate the antioxidant activity, cytotoxic and insecticide in immature and adult on *A. aegypti*. The oils were extracted from the leaves by hydrodistillation and identified by GC-MS, the antioxidant activity was evaluated using the DPPH sequestration, the cytotoxic activity was evaluated in *A. salina*, and the insecticidal activity followed the standard protocol indicated by WHO (1984) for the larvicidal activity and protocols the WHO (1998) for adulticide activity. The phytochemical profile identified 12 compounds in A morphotype and 8 compound in B morphotypes, wherein the α -pinene (17.39%), sabinene (18.69%) and *trans*- α -bergamotene (19.56%) were majority in A, and *cis*-ocimene (16.26%), benzaldehyde (22.50%) and α -phellandrene (23.73%) the majority of B. The results showed a low percentage of antioxidant activity with $LC_{50} = 11,928 \text{ mg.mL}^{-1}$ to A morphotype, and 9.249 mg.mL^{-1} to B morphotype and cytotoxic activity demonstrated high toxicity against *A. salina*. In relation to the insecticidal activity in immature, the estimated LC_{50} for 24 hours for A morphotype was equivalent to $126.277 \text{ mg.mL}^{-1}$ and $98.251 \text{ mg.mL}^{-1}$ for 48 hours, relative to the B morphotype, were estimated LC_{50} $340.470 \text{ mg.mL}^{-1}$ in 24 hours and $118.439 \text{ mg.mL}^{-1}$ for 48 hours of exposure. For insecticidal activity in adults, the LC_{50} value of essential oil for 24hrs of A morphotype was equivalent to $63\,848 \text{ mg.mL}^{-1}$ and for 48 hours equals $40,111 \text{ mg.mL}^{-1}$, while LC_{50} of morfotype B showed $39.894 \text{ mg.mL}^{-1}$ in 24 hours and $34.306 \text{ mg.mL}^{-1}$ for 48 hours. The results indicate a potential larvicide for essential oil of A morphotype of 48 hours and possible potential larvicidal at B in 48 hours of exposure, as well as the susceptibility of adults *A. aegypti* in both oils during both periods of exposure evaluated. Thus, the essential oils of *A. triplinervis* can be used in chemical control of *A. aegypti* and assist in fighting infectious diseases transmitted by this vector.

Keywords: Natural products, Chemotaxonomy, Chemical Control.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

(3R)-MVA – Ácido meváldico hemiacetal

μL – Microlitro

AChE – Anticolinesterásico

ATP – Adenosina trifosfato

CG – Cromatografia Gasosa

CG-EM – Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massa

CL₅₀ – Concentração letal para a morte de 50% dos indivíduos

cm² – Centímetros quadrado

DAHP – 3-deoxi-*D*-arabino-7-fosfato

DDT – Dicloro-difenil-tricloroetano

DMAPP – Dimetilalil difosfato

EPSP – Ácido 3-fosfato-3-enolpiruvilchicamato sintase

eV – Eletrón-volt

FPP – Famesil difosfato

GGPP – Geranilgeranil difosfato

GPP – Geranil difosfato

HMG-CoA - β-hidroxi-β-metilglutaril coenzima A

IK – Índice de Kovalts

IPP – Isopentenil difosfato

ISO – International Standard Organization

KPa – Quilopascal

L-Fen – L-Fenilalanina

L-Tir – L-Tirosina

m – Metro

m/z – Razão carga/massa

mg - Micrograma

MHz – Megahertz

min. – Minuto

mL – Mililitro

mm – Milímetro

MMA – Ministério do Meio Ambiente

mmol – Milimole

MS – Ministério da Saúde

MVA – Ácido mevalônico

n – Normal

nm – Nanômetro

o - orto

°C – Graus Celsius

OE's – Óleos Essenciais

OMS – Organização Mundial da Saúde

p - para

PAHO – Pan American Health Organization

PEP - Fosfoenolpiruvato

ppm – Parte por milhão

PROBIT – Unidade de probabilidade

R\$ - Valores monetários em reais

s/d – Sem data

s/n – Sem número

SPSS – Statical Package for the Social Science

t_R – Tempo de retenção

U\$ - Valores monetários em dólares

USAID – United State Agengy For International Development

WHO – World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diferenças morfoanatômicas entre os tipos A e B de <i>A. triplinervis</i>	22
Figura 2 - Principais rotas biossintética dos metabólitos secundários.....	24
Figura 3 - Biossíntese do IPP e DMAPP para formação das unidades isoprênicas.....	27
Figura 4 - Dimerização de IPP para formação de Terpenos.....	28
Figura 5 - Reação entre PEP e DAHP para formação do Ácido Chiquímico.....	29
Figura 6 - Reação entre o ácido chiquímico e PEP para formação do ácido corísmico.....	30
Figura 7: Formação dos aminoácidos <i>L</i> -Fen e <i>L</i> -Tir via ácido prefênico.....	31
Figura 8 - Formação do ácido cinâmico através dos aminoácidos <i>L</i> -Fen e <i>L</i> - Tir.....	32
Figura 9 - Fórmulas estrutural do eugenol e anetol.....	32
Figura 10 - Representação esquemática de um Espectrômetro de Massas.....	34
Figura 11: Ciclo de desenvolvimento do <i>A. aegypti</i>	39
Figura 12: Cromatograma obtido por CG do óleo essencial do morfotipo A de <i>A. triplinervis</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.....	47
Figura 13 - Espectros de massas do óleo essencial do morfotipo A de <i>A. triplinervis</i> obtidos por GC-MS em comparação com espectros da biblioteca do equipamento.....	48
Figura 14 - Cromatograma obtido por CG do óleo essencial do morfotipo B de <i>A. triplinervis</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.....	55
Figura 15 - Espectros de massas do óleo essencial do morfotipo B de <i>A. triplinervis</i> obtidos por GC-MS em comparação com a biblioteca do equipamento.....	56
Figura 16 - Concentração em função do percentual de atividade antioxidante do óleo essencial do morfotipo A de <i>A. triplinervis</i>	62
Figura 17 - Concentração em função do percentual de atividade antioxidante do óleo essencial do morfotipo B de <i>A. triplinervis</i>	63
Figura 18 - Mortalidade de larvas de <i>A. aegypti</i> em diferentes concentrações de solução de óleos essenciais do morfotipo A de <i>A. triplinervis</i>	66

Figura 19 - Mortalidade de larvas de <i>A. aegypti</i> em diferentes concentrações de solução de óleos essenciais do morfotipo B de <i>A. triplinervis</i>	67
Figura 20 - Percentual de mortalidade de adultos de <i>A. aegypti</i> em função da concentração de óleo essencial do morfotipo A de <i>A. triplinervis</i>	69
Figura 21 – Percentual de mortalidade de adultos de <i>A. aegypti</i> em função da concentração de óleo essencial do morfotipo B de <i>A. triplinervis</i>	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Substância identificadas, tempo de retenção, percentual relativo e índice de Kovats calculado e da literatura do óleo essencial do morfotipo A de <i>A. triplinervis</i> por GC-MS.....	54
Tabela 2 - Substâncias identificadas, tempo de retenção, percentual relativo e índice de Kovats calculado e da literatura do óleo essencial do morfotipo B de <i>A. triplinervis</i> por GC-MS.....	60
Tabela 3 - Média e desvio padrão do percentual de atividade antioxidante do óleo essencial do morfotipo A de <i>A. triplinervis</i> em diferentes concentrações.....	61
Tabela 4 - Média e desvio do percentual de atividade antioxidante do óleo essencial do morfotipo A de <i>A. triplinervis</i> em diferentes concentrações.....	62
Tabela 5 - Percentual de mortalidade dos óleos essenciais dos morfotipos A e B de <i>A. triplinervis</i> em diferentes concentrações frente a <i>A. salina</i>	64
Tabela 6 - Percentual de atividade larvicida do morfotipo A de <i>A. triplinervis</i> em diferentes concentrações durante dois intervalos de tempo.....	65
Tabela 7 - Percentual de atividade larvicida do morfotipo B de <i>A. triplinervis</i> em diferentes concentrações durante dois intervalos de tempo.....	67
Tabela 8 - Mortalidade de adultos de <i>A. aegypti</i> em percentual, frente a diversas concentrações de óleos essenciais do morfotipo A de <i>A. triplinervis</i> em dois períodos.....	68
Tabela 9 - Mortalidade de adultos de <i>A. aegypti</i> em percentual, frente a diversas concentrações de óleos essenciais do morfotipo B de <i>A. triplinervis</i> em dois períodos.....	70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
3.1 O USO DE PLANTAS MEDICINAIS	19
3.2 ESPÉCIE DE INTERESSE MEDICINAL DA FAMÍLIA ASTERACEAE.....	20
3.2.1 <i>Ayapana triplinervis</i> (Vahl) R.M. King & H. Rob.....	21
3.3 ROTAS DE BIOSÍNTESE DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NOS VEGETAIS.....	23
3.4 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA E BIOSÍNTESE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS (ÓLEOS VOLÁTEIS).....	25
3.4.1 Mecanismo de Biossíntese dos Terpenos.....	26
3.4.2 Mecanismo de Biossíntese dos Fenilpropanóides.....	28
3.5 A ESPECTROSCOPIA DE MASSAS NA IDENTIFICAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	33
3.6 BIOATIVIDADE MAIS OCORRENTES NOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	36
3.7 CONTROLE FITOQUÍMICO DO <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (LINAEUS, 1972) (DIPTERA:CULICIDAE).....	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 COLETA DA ESPÉCIE E IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA	42
4.2 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	42
4.3 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS.....	42
4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	43
4.5 TESTE DE CITOTOXICIDADE	44
4.6 ATIVIDADE LARVICIDA	45
4.7 ATIVIDADE ADULTICIDA	45
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	47
5.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS POR GC-MS.....	47

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	60
5.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	64
5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	64
5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ADULTICIDA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	68
6 CONCLUSÕES	72
 REFERÊNCIAS.....	 73

1 INTRODUÇÃO

O uso crescente dos produtos naturais, especialmente os metabólitos secundários, como matéria-prima indispensável à indústria na busca de compostos biologicamente ativos, anticancerígenos, antimaláricos, pesticidas naturais biodegradáveis que contribuem para o sucesso evolutivo nos vegetais, levou ao estudo pluridisciplinar de numerosas espécies vegetais, dentre as famílias de interesse medicinal está a Asteraceae (ASCENSÃO, 2007).

Bremer (1994) afirma que a família Asteraceae se desenvolveu na América do Sul e o Brasil desponta como origem do centro dos gêneros mais primitivos. Entretanto, as informações filogenéticas, taxonômicas e quimiosistemáticas são incipientes, refletindo a presença de gêneros pouco conhecidos (REIS, 2013). Estudos etnobotânicos e etnofarmacêuticos indicam o interesse terapêutico de espécies dessa família por meio do uso medicinal que as comunidades tradicionais dispõem em suas práticas sociais, entre elas a espécie *Ayapana triplinervis* (Vahl) R. M. King e H. Rob. (RAGGI, 2013).

Plantas com atividade inseticida são ricas em monoterpenos, compostos tipicamente lipofílicos capazes de interferir em processos bioquímicos básicos com consequências fisiológicas e comportamentais em insetos, entretanto, a escassez de informações químicas e da atividade biológica associada os morfotipos de *A. triplinervis*, desde sua composição química até sua atividade farmacológica, orientam o seguinte questionamento norteador desse estudo: os óleos essenciais extraídos dos morfotipos A e B da espécie vegetal *Ayapana triplinervis* apresentam atividade inseticida frente a imaturos e adultos de *Aedes aegypti* que justificam seu uso na medicinal tradicional?

O crescimento da população mundial, a competição entre homem e inseto por alimentos, a transmissão de doenças infectocontagiosas através de vetores e a resistência naturalmente desenvolvida pelos insetos levam a necessidade de uma busca contínua de novos produtos inseticidas que representem gastos na ordem bilhões de dólares para garantir o controle de químico (SIMÕES; et al., 2010). Diante da necessidade de produção de conhecimento cientificamente embasado, o objetivo é realizar estudo fitoquímico e avaliar a atividade antioxidante, citotóxica e inseticida dos óleos essenciais encontrados nos morfotipos A e B de *A. triplinervis*, Possibilitando agregar valor à biodiversidade da região Amazônica, compreender o

etnoconhecimento das comunidades tradicionais frente a um modelo de desenvolvimento sustentável para garantir qualidade de vida à população.

Embora se tratando da mesma espécie, as plantas podem responder de modo muito diferente a um dado grau de tensão ambiental, sendo esta resposta inerente ao seu genótipo, fato que justificaria as diferenças externas entre os tipos de *A. triplinervis*, uma vez que a variação que ocorre em populações naturais de plantas é a base da sua resistência perante as pressões do ambiente, representando a matéria prima da seleção natural (NERY, et al., 2014). Como hipótese alternativa, os óleos essenciais dos morfotipos A e B de *A. triplinervis* apresentarão atividade antioxidante, citotóxica e biológica no controle químico de imaturos e adultos de *Aedes aegypti*. Na hipótese de nulidade, os óleos essenciais dos morfotipos A e B de *A. triplinervis* não apresentarão atividade antioxidante, citotóxica e biológica no controle químico de imaturos e adultos de *Aedes aegypti*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Realizar estudo químico e biológico de amostras de óleos essenciais dos morfotipos A e B da espécie *Ayapana triplinervis* (Vahl) R. M. King e H. Rob. (Asteraceae).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Obter os óleos essenciais dos morfotipos A e B da espécie *A. triplinervis* por hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger;
- ✓ Analisar a composição química dos óleos essenciais dos morfotipos obtido das espécies *A. triplinervis* por cromatografia a Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas;
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante dos óleos essenciais dos morfotipos obtido de *A. triplinervis* frente ao sequestro de DDPH;
- ✓ Avaliar bioensaios citotóxicos dos óleos essenciais dos morfotipos obtido de *A. triplinervis* frente a *A. salina* L.;
- ✓ Avaliar o potencial larvicida dos óleos essenciais dos morfotipos obtido das *A. triplinervis* em *A. aegypti*.;
- ✓ Avaliar o potencial aduicida dos óleos essenciais dos morfotipos obtido da *A. triplinervis* (Vahl) em *A. aegypti*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 O USO DE PLANTAS MEDICINAIS

No ano de 2011, o mercado global de medicamentos sintéticos e naturais alcançou U\$ 800 bilhões de dólares. Em sua distribuição percentual, a América do Norte se destacou ao movimentar 38,2% desse valor, a Europa 28%, Japão 11,3%, América Latina 6,6% e Ásia, África e Austrália 15,9% juntas. O mercado de fitoterápicos atingiu o valor de U\$ 26 bilhões, em que, a Europa movimentou 30% desse valor, Ásia 29%, América do Norte 18%, Japão 11% e a América Latina 5%, e os 7% restantes foram distribuídos nas demais regiões mundiais não citadas. No Brasil, a receita total do setor farmacêutico movimentou R\$ 43 bilhões em 2011, o mercado de fitoterápicos teve um acréscimo de 13% em relação ao ano de 2010, movimentando cerca de R\$ 1,1 bilhão (ALVES, 2013).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam que 80% da população mundial faz uso de medicamentos derivados de plantas medicinais. No Brasil, 91,9% fizeram uso de alguma planta medicinal em algum momento e, destes, 46% mantêm cultivo caseiro de alguma espécie útil à saúde (ETHUR et al., 2011).

Comparando proporcionalmente o desempenho do Brasil neste setor, observa-se que o país não acompanha o potencial de recursos naturais que dispõe. Dados do Ministério do Meio Ambiente indicam que possuímos de 15% a 20% das 1,5 milhão de espécies descritas na Terra graças a extensão, diversidade geográfica e climática do Brasil. A maior cobertura de florestas tropicais do mundo é composta por cerca de 55 mil espécies de plantas superiores, algo em torno de 22% do total mundial, destas, 21 mil espécies fanerogâmicas estão distribuídas na Amazônia Legal (BRASIL, 2002).

Da população mundial, 80% não têm acesso ao atendimento primário de saúde por estarem distantes dos centros ou indisponem de recursos para adquiri-los (VIEIGAS JÚNIOR, 2008). Para essas pessoas a terapia alternativa se apresenta como a principal forma de tratamento, procurando a cura de suas moléstias através das plantas medicinais. A OMS define plantas medicinais como qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursoras de fármacos semissintéticos (VIEIGA JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

O surgimento de uma nova racionalidade Newtoniana-Cartesiana separou o homem da natureza através de reduções e compartimentações, provocou mudanças na estrutura social do mundo por meio da produção capitalista e orientou prática de saúde atual baseada em uma concepção mecanicista da vida e estruturada em um complexo médico-industrial de medicina científicista (BARBOSA; SILVA; SOLER, 2011). Em oposição a concepção mecanicista, o cultivo de plantas medicinais está baseado no conhecimento popular transmitido entre gerações que possibilitam entender a influência da cultura indígena, ribeirinha, africana nessa prática (LACERDA et al., 2013). São resultados de uma concepção orgânica da vida compostas por seus elementos mágico-religiosos que se adequavam ao conjunto do processo social historicamente determinado, sua identidade cultural e o sentido do mundo real (BARBOSA; SILVA; SOLER, 2011).

3.2 ESPÉCIE DE INTERESSE MEDICINAL DA FAMÍLIA ASTERACEAE

A família Asteraceae (Compositae) compreende 1535 gêneros, destes 180 encontrados no Brasil, com, aproximadamente, cerca de 23.000 espécies monofiléticas descritas e botanicamente aceitas. Conhecidas como família dos girassóis ou margarida, a Asteraceae dispõe de um capítulo constituído por flores pequenas, chamado de flósculos, e anteras fundidas em um anel com pólen empurrado por estilos ou cipselas, espécie de frutos seco com aspectos variados, 98% dos gêneros são de pequeno porte, como ervas e arbustos e, raramente, árvores. São encontradas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, sendo mais abundante na região árida do que nas florestas tropicais úmidas. (SOUZA et al., 2003; VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005; CORREIA, 2010).

Os metabólitos secundários produzidos pelo seu sistema químico de defesa contribuiu para o sucesso evolutivo, tornando o principal responsável pela importância dessa família na medicina tradicional, com emprego significativo na alimentação, na cosmética e como planta ornamental e inseticida (CORREIA, 2010; REIS, 2013).

A família é conhecida por produzir poliacetilenos, seisquiterpenóides, diterpenóides, triterpenóides, flavonóides, cumarinas, benzofuranos e benzopiranos (EMERENCIANO et al., 1998). No Amapá, estudo de Silva (2002), Costa E. (2013) e Costa J. (2013) apontam o uso terapêutico de espécies desta família pelas

comunidades tradicionais com significativo destaque contra malária, gripe, diarreia, gastrite, pressão alta, entre outras. É considerada uma importante família de interesse terapêutico em decorrência da diversidade de espécies utilizadas pela medicina tradicional, com especial destaque para a *A. triplinervis*.

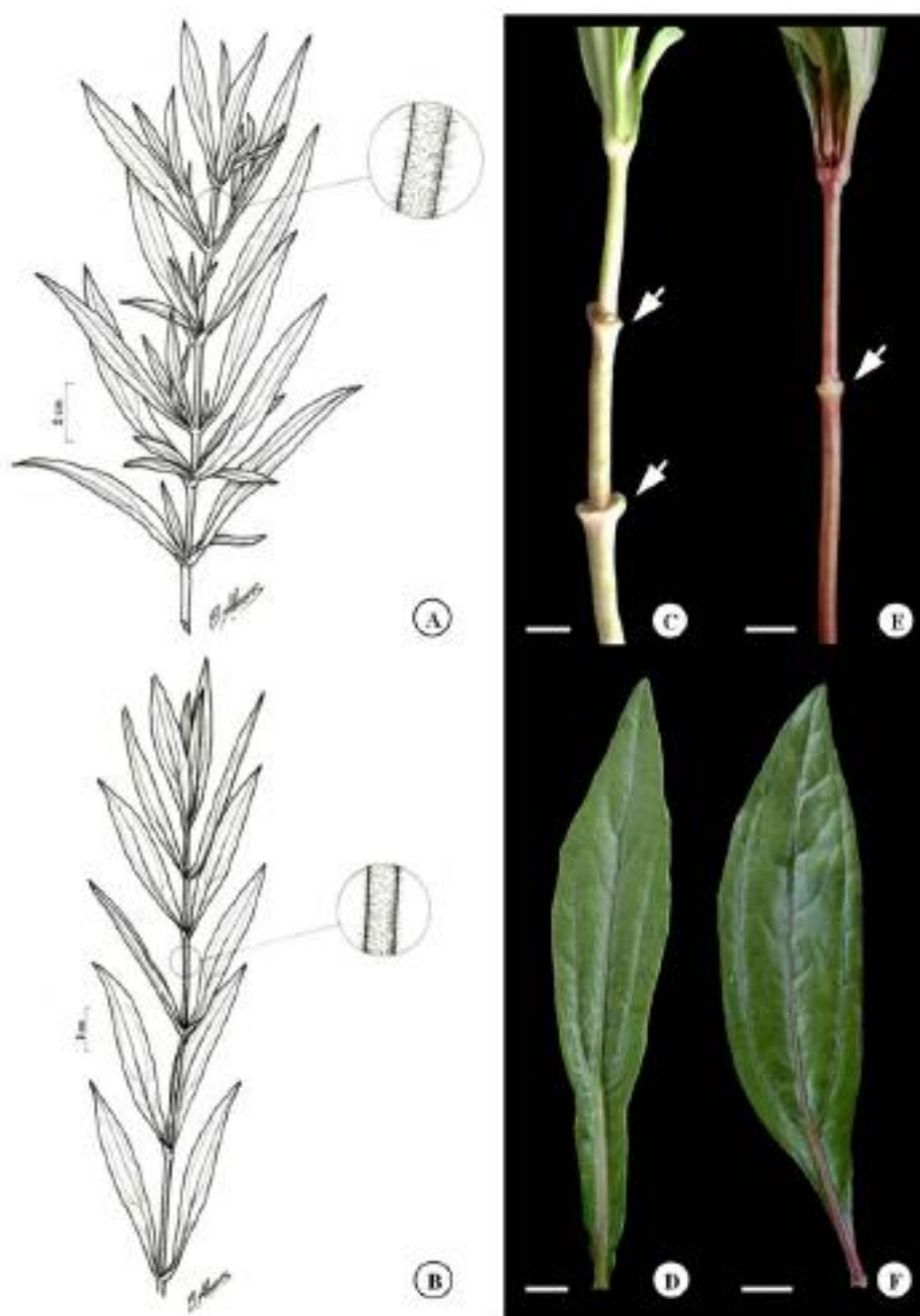
3.2.1 *Ayapana triplinervis* (Vahl) R.M. King & H. Rob.

Espécie conhecida popularmente como Japana-branca ou Japana-roxa, é indicada pela medina tradicional para o tratamento de doenças como cólera, tétano e lepra (MAIA; ANDRADE, 2009). Carmo et al. (2015) identificaram o uso das folhas da espécie contra gripe, constipação, dor de cabeça e afta; Gupta et al. (2002) relataram o uso na Índia das folhas pela medicina tradicional como laxante, estimulante cardíaco e anticoagulante, além de indicarem a presença de cumarinas, esteroides, carotenoides em extratos das folhas.

Originária da América do Sul, a *A. triplinervis* pode ser encontrada no Brasil, Equador, Perú, Porto Rico e Guianas, além de estar adaptada em outros países como Índia e Vietnã (GAUVIN-BIALECKI; MARADON, 2009). De acordo com Nery et al. (2014), a espécie pode ser encontrada em dois morfotipos: Japana-branca (aqui identificada como morfotipo A) e Japana-roxa (morfotipo B) que podem medir entre 40 a 50 cm de altura, ereta ou semiprostrada.

O caule é cilíndrico, piloso em ambos os tipos com coloração verde, maior número de nós e brotos foliares no tipo “branca”. Enquanto que no tipo “roxa”, o caule apresenta-se com coloração roxa e entrenós curtos. As folhas são simples, herbáceas, sésseis, opostas; limbo 10-12 cm de comprimento, 1,5-2,5 cm de largura quando completamente expandido, ovadolanceolado, ápice agudo, margem levemente serrada, base decorrente no tipo branca e atenuada no tipo roxa; nervação acródroma suprabasalbroquidódroma, como demonstra a figura 1 seguinte, comparando as diferenças morfoanatômicas das folhas e do caule dos morfotipos de *A. triplinervis*:

Figura 1 - Diferenças morfoanatômicas entre os tipos A e B de *A. triplinervis*.



Fonte: Nery et al.(2014).

Em um estudo morfoanatômico caular e foliar da espécie, Nery et al. (2014) constataram na coloração do caule e na nervura das folhas, base foliar, distância dos entrenós, ramificação e presença de brotos foliares que estão em maior quantidade no tipo “branca”. Afirmam, ainda, que o caracteres morfoanatômicos encontrados estão de acordo com os descritos em Asteraceae, e concluem que as

as diferenças encontradas entre os espécimes são relevantes para separá-los em morfotipos.

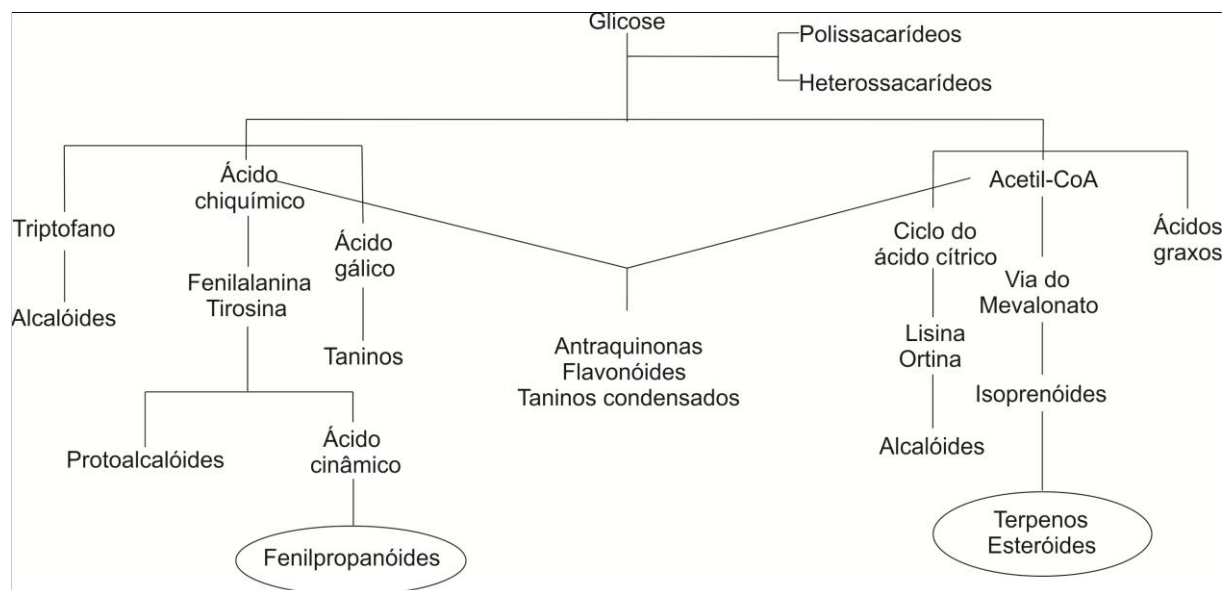
Salvamangai e Bhaskar (2012) caracterizaram fitoquimicamente os extratos metanólicos de folhas de *A. triplinervis* coletadas na Índia através de cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa (GC-MS) e identificaram a predominância de ácido hexadecanóico, ácido tetradecacóico e ácido octadecanóico, capazes de apresentar bioatividade hipocolestêmica, antioxidante, antiproliferativo e anticancerígeno. Estudos de Arung et al. (2012) determinaram uma inibição de 59% de melanomas usando extratos metanólicos de *A. triplinervis* com baixa citotoxicidade. Em outro estudo realizado por Melo et al (2013), foi demonstrado pela primeira vez na literatura que o extrato hidroalcolico da espécie apresenta atividade ansiolítica, sedativa e efeitos comportamentais antidepressivos no sistema nervoso central em modelos animais. Contudo, nenhum estudo citado distinguiu os seus morfotipos.

3.3 ROTAS DE BIOSÍNTESE DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NOS VEGETAIS

Os compostos que têm propriedades medicinais são oriundos do metabolismo vegetal através do processo fotossintético. A partir da glicose são formadas praticamente todas as substâncias do metabolismo primário, ligado ao crescimento e desenvolvimento do vegetal, e fornecedores de matéria prima e energia para a formação dos metabólitos secundários (OOTONI et al., 2013; RAGGI, 2013).

Quando a glicose é convertida em ácido pirúvico, o metabolismo pode seguir duas vias distintas: a rota do ácido chiquímico para formar os metabólitos secundários aromáticos como alcalóides indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos, ligninas e lignanas, cumarinas e taninos hidrossolúveis. Na segunda via o piruvato é oxidado até formação de moléculas de acetil-coenzima A que, por sua vez, poderá seguir três vias diferentes: a via do ácido cítrico formando alcalóides pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piperidínicos e quinolizidínicos; a via do mevalonato que originará os terpenóides e os esteróis; e a condensação de acetato que formará as acetogeninas. A combinação de uma unidade do ácido chiquímico e uma ou mais unidades do acetato ou derivados, poderá resultar na produção de antraquinonas, flavonóides e taninos condensados (OOTONI et al., 2013).

Figura 2 - Principais rotas biossintética dos metabólitos secundários.



Fonte: Ootoni et al.(2013)

A sobrevivência e adaptação são funções biológicas importantes que os metabólitos secundários desempenham nos vegetais. Em virtude de sua polaridade, pequena massa molecular, meia-vida curta, reatividade química, ocorrência esporádica e grande potencial oxidante são, ainda, mensageiros de informação. A diversidade de metabólitos secundários pode ser explicado, em parte, pela necessidade de defesa química contra o meio ambiente e animais que as plantas desenvolveram no seu processo evolutivo (RAGGI, 2013).

Canton e Onofre (2009) consideram que a composição química é mais importante que a morfologia quando cita que a variabilidade de classes de metabólitos secundários pode ajudar na taxonomia dos vegetais. As classes de metabólitos secundários têm distribuição restrita e limitada a certos gêneros e espécies, por exemplo, em relação à Asteraceae, os flavonóides têm se apresentado como um importante marcador taxonômico, permitindo que algumas espécies sejam classificadas sistematicamente pelo flavonóides que produzem (SILVA et al., 2006). Seus sítios de produção e reserva são diferenciados, podem ser acumulados nos vacúolos de forma glicosilada ou em estruturas secretoras especiais tais como dutos, tricomas e canais laticíferos (RAGGI, 2013).

3.4 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA E BIOSÍNTESE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS (ÓLEOS VOLÁTEIS)

As plantas sintetizam e emitem uma grande quantidade de compostos voláteis com a finalidade de defesa em resposta a um ataque patogênico e para atrair seus polinizadores, esses óleos essenciais (OE's) obtidos a partir de extrações possuem uma complexa composição química e são considerados fontes em potencial de substância biologicamente ativa (COSTA et al., 2005).

A *International Standard Organization* (ISO) define óleos voláteis como os produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água, bem como produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos, geralmente substâncias odoríferas e líquidas. Sua composição contém monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides e compostos oxigenados como ésteres, álcoois, aldeídos, cetonas, lactonas, fénois e outras substâncias de baixo peso molecular, sua volatilidade é uma característica importante derivada de seu processo de obtenção (SOUZA et al., 2010).

Os óleos essenciais são sintetizados em todos os órgãos das plantas com grande abundância nas angiospermas dicotiledôneas pertencentes às famílias Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Lauriaceae, Myrtaceae, Piperaceae e Rutaceae. A aplicação varia de lugar para lugar, mostrando-se dependente da disponibilidade, o tipo e a eficácia das plantas adequadas em diferentes localizações geográficas (OOTANI et al., 2013). São encontrados em glândulas secretoras especiais ou em células internas e sua acumulação depende do estágio ou fase de desenvolvimento. A produção está integrada com a fisiologia do vegetal e diretamente relacionada com os ajustes no desenvolvimento e na diferenciação de tecidos, assim como do impacto de estresses abióticos que podem produzir óleos essenciais com propriedades distintas em uma mesma espécie (ADIO, 2005). Entre os fatores abióticos que influenciam na composição química de um vegetal estão: luminosidade, umidade, radiação solar, vento, temperatura, estação do ano em que a planta foi coletada, altitude, ritmo circadiano, poluição atmosférica, entre outros (PURNHAGEN, 2010).

Os óleos essenciais são metabólitos secundários quimicamente constituídos por fenilpropanóides e, preponderantemente, terpenóides, uma classe de

metabólitos originada a partir de unidades isoprênica através da via do mevalonato (SIMÕES, et al.;2010).

3.4.1 Mecanismo de Biossíntese dos Terpenos

Sabe-se desde a antiguidade que os constituintes odoríferos de uma planta podem ser concentrados na forma de um óleo essencial pelo aquecimento brando da matéria vegetal, posteriormente descobriu-se que a destilação a vapor é um método mais eficaz para obtenção desses óleos. Por volta de 1592 já se conhecia cerca de 70 diferentes óleos essenciais. A investigação da composição química desses óleos iniciou-se no século XIX e levou a descoberta de alguns hidrocarbonetos isoméricos de fórmula $C_{10}H_{16}$ a que se chamou de terpenos (ALLINGER et al., 2011)

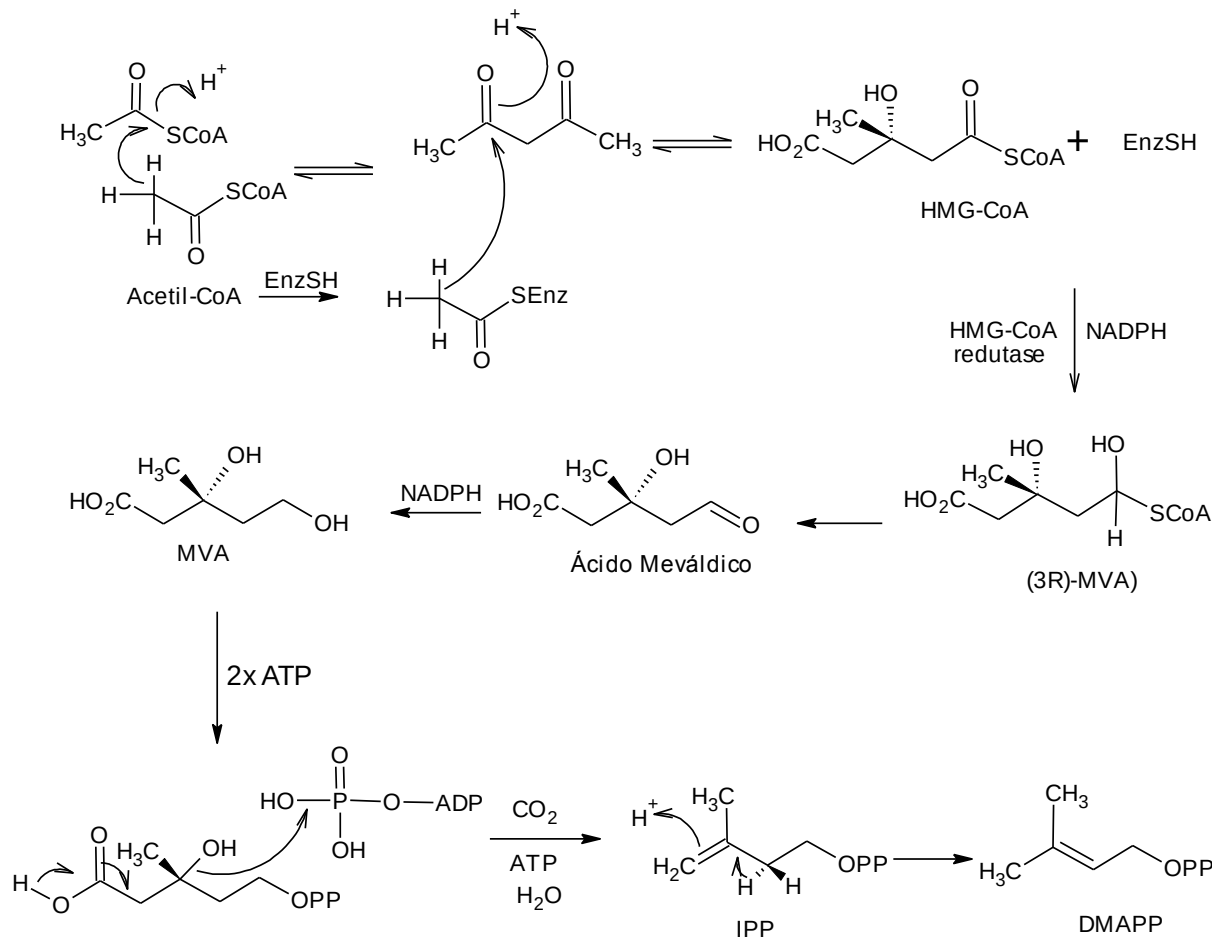
Os terpenos, hidrocarbonetos formalmente divididos em unidades isoprênicas, são um dos maiores grupos de produtos naturais e compreende numerosas substâncias com papéis importantes em processos fisiológicos e patológicos. Para a formação das unidades isoprênicas, inicialmente três moléculas de acetil-coenzima A são usadas para na formação do ácido mevalônico, duas se combinam através de condensação de Claisen para formar a acetoacetil-coenzima A e a terceira molécula é incorporada via adição aldólica estereoespecífica para gerar o éster β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (do inglês, HMG-CoA) (ADAM; et al.;2012) .

Pela ação da enzima HMG-CoA redutase ocorre a redução de tio éster para aldeído por via hemitioacetal, formando o ácido mevalônico hemitioacetal (3R)-MVA, sua conversão envolve a transformação do grupo tio éster para álcool primário através de uma reação irreversível. Os seis carbonos do ácido mevalônico (MVA) são transformados em unidades isoprênicas por uma série de reações de fosforilação no álcool primário por moléculas de ATP, duas diferentes enzimas de ATP são envolvidas para a formação do ácido mevalônico difosfato, e as reações de descarboxilação/desidratação originam o isopentenil difosfato (IPP) (DEWICK, 2002).

De acordo com Dewick (2002), uma quarta molécula de ATP é requerida na última transformação através de fosforilação da hidroxila para uma isomerização alílica estereoespecífica removendo um próton do C-2 e incorporando um próton no

C-4 oriundo das moléculas de H_2O em equilíbrio reversível para a formação do dimetilalil difostato (DMAPP), de acordo com a imagem seguinte:

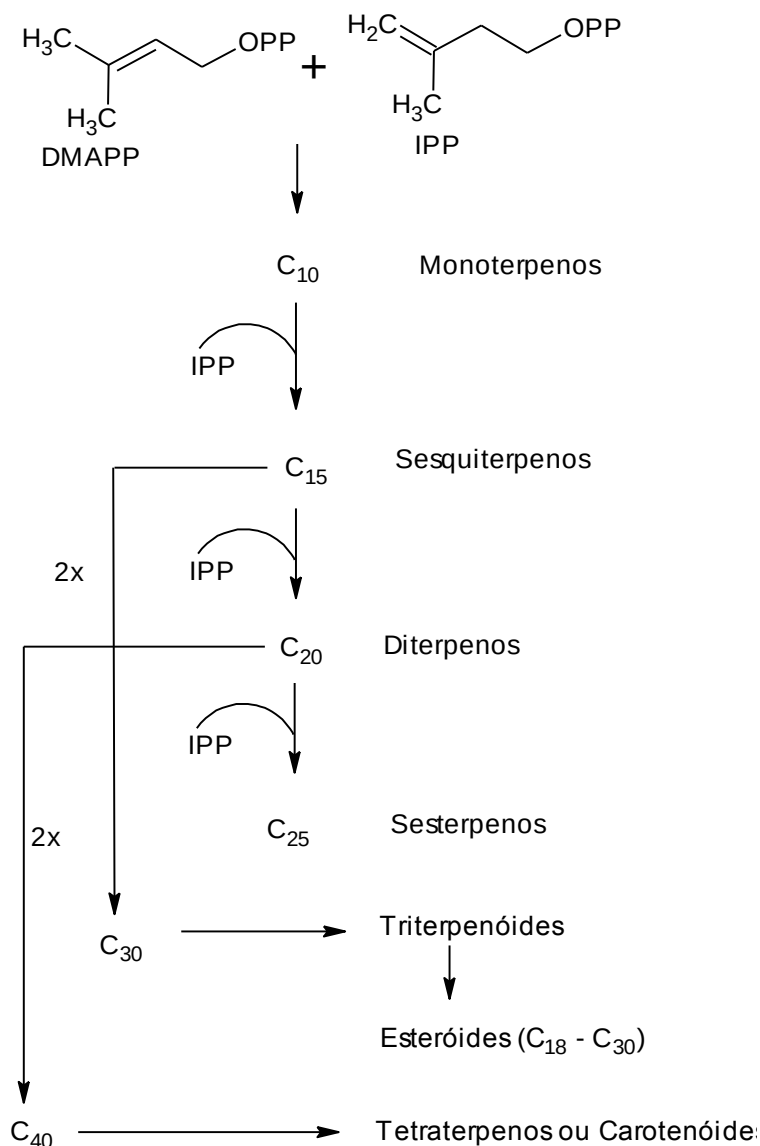
Figura 3 - Biossíntese do IPP e DMAPP para formação das unidades isoprênicas.



Fonte: Dewick (2002)

O isopentenil difosfato e seu isômero, o dimetilalil difosfato (DMAPP) são as unidades pentacarbonadas ativas na biossíntese dos terpenos que se unem para formar moléculas maiores. Inicialmente o IPP e o DMAPP reagem e formam o geranyl difosfato (GPP), uma molécula de 10 carbonos a partir da qual são formados os monoterpenos. O GPP pode, então, ligar-se a outra molécula de IPP formando um composto de 15 carbonos, farnesil difosfato (FPP), precursor da maioria dos sesquiterpenos. A adição de outra molécula de IPP forma o geranylgeranyl difosfato (GGPP), composto de 20 carbonos precursor dos diterpenos. Finalmente, FPP e GGPP podem dimerizar para formar triterpenóides (C30) e tetraterpenos (C40) (DEWICK, 2002).

Figura 4 - Dimerização de IPP para formação de Terpenos.



Fonte: Dewick (2002).

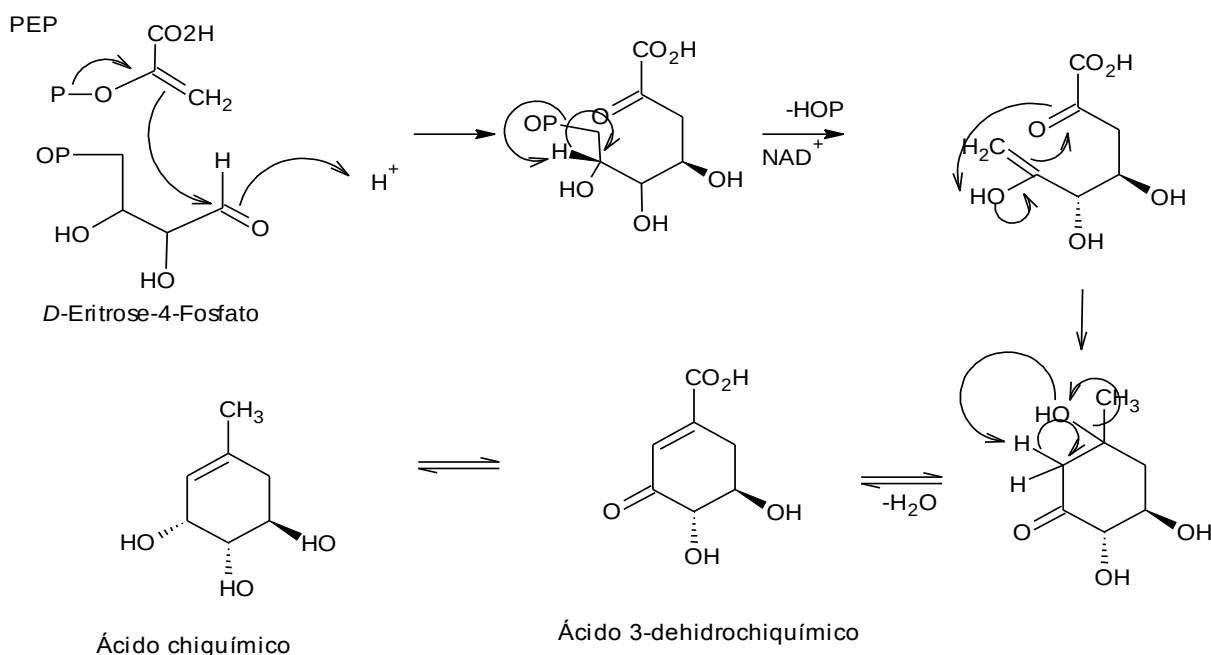
3.4.2 Mecanismo de Biossíntese dos Fenilpropanóides

No geral, os terpenóides são os constituintes predominantes dos óleos essenciais, porém, diversas essências também podem ser compostas de outras substâncias químicas, os fenilpropanóides. Sua biossíntese gera uma grande variedade de metabólitos aromáticos que desempenham importantes funções fisiológicas essenciais para o desenvolvimento, crescimento e adaptação ambiental, alguns desses compostos com alto valor econômico. Além disso, muitos compostos fenólicos solúveis, sintetizados de uma forma específica para a espécie, atuam

como fitoalexinas antipatogênica, antioxidantes ou como absorventes da radiação ultravioleta, que protegem as plantas de estresses bióticos e abióticos ou atuam como pigmentos para atrair polinizadores, ou, ainda, como moléculas sinalizadoras que mediam interações planta-micróbio. A formação é específica no tecido e a acumulação de fenilpropanoides provavelmente representa um dos requisitos mais importantes para a colonização do planeta pelas primeiras espécies vegetais (ZHANG; LIU, 2015).

De acordo com Dewick (2002), a formação do ácido chiquímico inicia por uma reação de condensação do tipo aldólica entre o fosfoenolpiruvato (PEP) e a *D*-eritrose-4-fosfato para formar o ácido 3-deoxi-*D*-arabino-7-fosfato (DAHP). Posteriormente, a eliminação do ácido fosfórico a partir do DAHP, seguido da reação aldólica intramolecular gera o primeiro intermediário carboxílico, o Ácido 3-deidroquinato. A desidratação e a redução do ácido 3-deidroquinato produz o ácido chiquímico, de acordo com a reação seguinte:

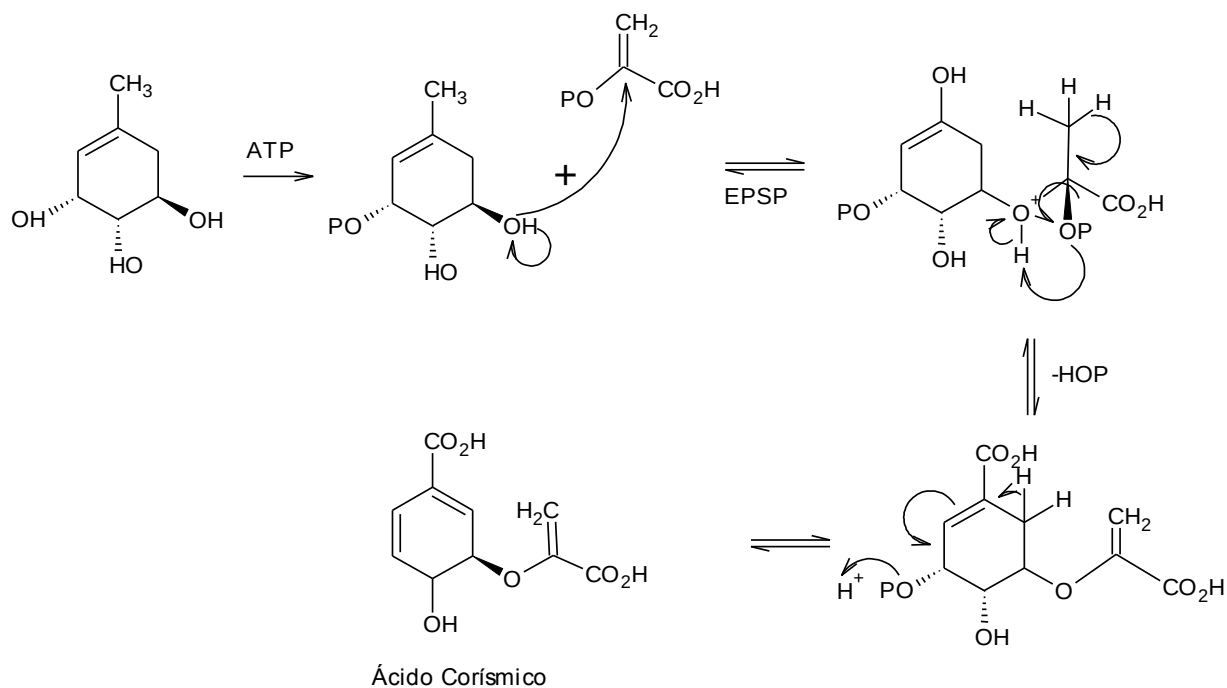
Figura 5 - Reação entre PEP e DAHP para formação do Ácido Chiquímico.



Fonte: Dewick (2002).

Da reação entre o ácido chiquímico e uma molécula de fosfoenolpiruvato (PEP), ocorre a formação do ácido corísmico após a fosforilação de ATP e catálise pela enzima ácido 3-fosfato-3-enolpiruvilchiquimato sintase (EPSP) por meio de uma reação de eliminação não concertada (DEWICK, 2002):

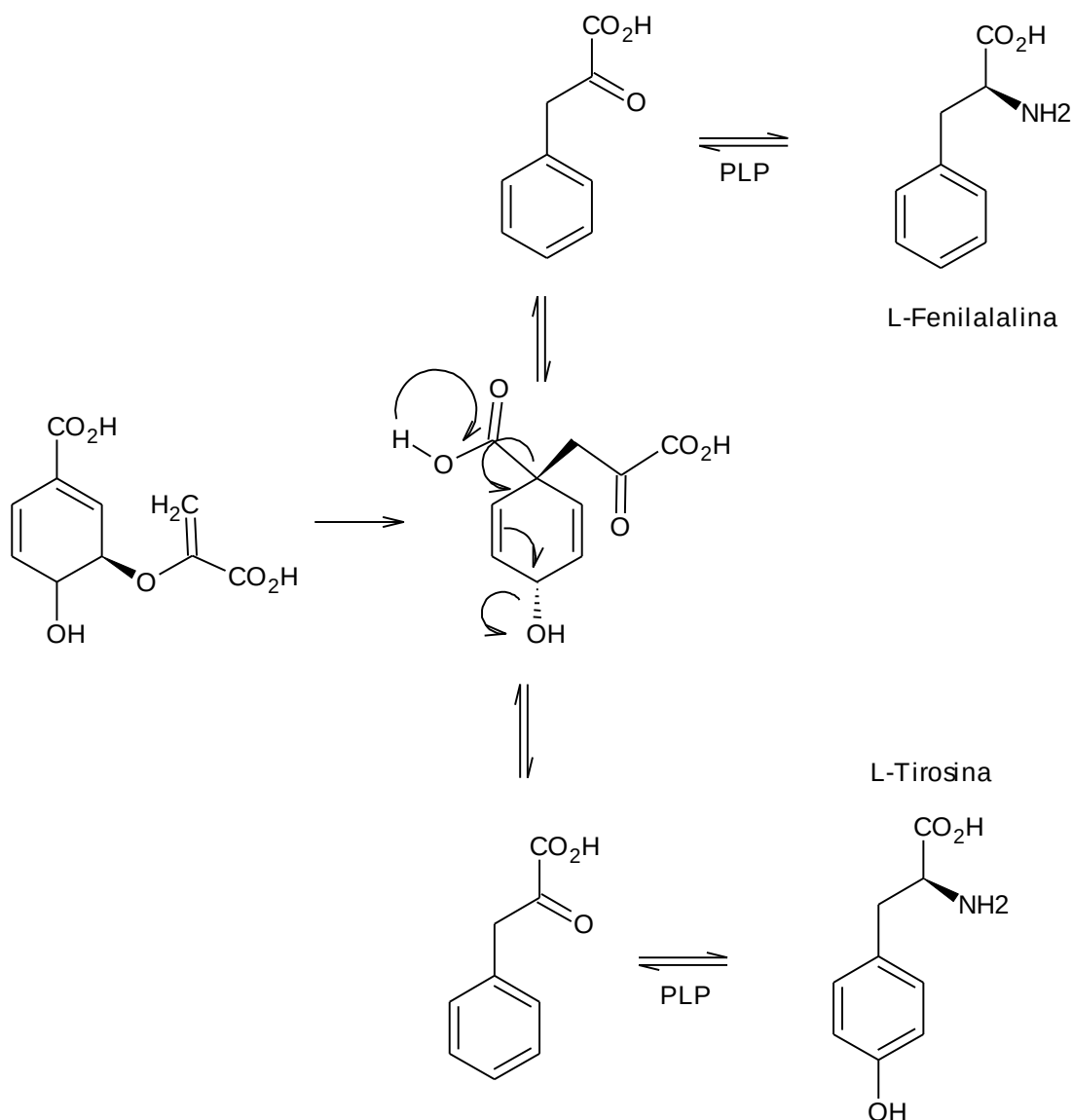
Figura 6 - Reação entre o ácido chiquímico e PEP para formação do ácido corísmico.



Fonte: Dewick (2002).

A partir do ácido corísmico, a formação dos aminoácidos aromáticos L-fenilalanila e L-tirosina via ácido prefênico pode variar de acordo com o organismo e por rotas distintas em função da atividade enzimática disponível. Essencialmente, três reações estão envolvidas: aromatização descarboxilativa, transaminação e uma oxidação para a Tirosina (DEWICK, 2002).

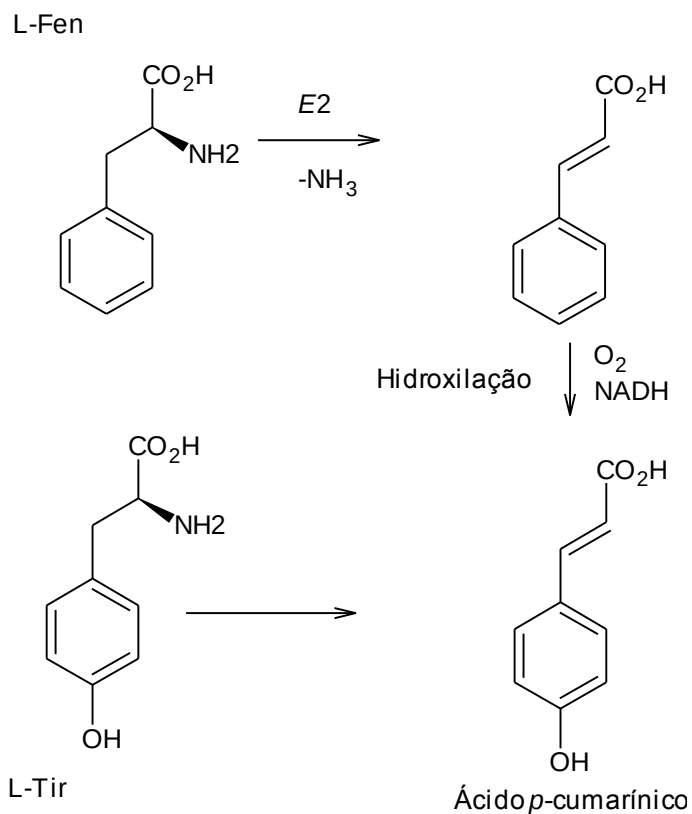
Figura 7 - Formação dos aminoácidos *L*-Fen e *L*-Tir via ácido prefênico.



Fonte: Dewick (2002).

Por fim, os aminoácidos aromáticos *L*-Fen e *L*-Tir. formam o *p*-cumarínico (ácido cinâmico), que originará os compostos fenólicos simples denominados de Fenilpropanoides, através de reação de eliminação de segunda ordem da amina (ZHANG; LIU, 2015).

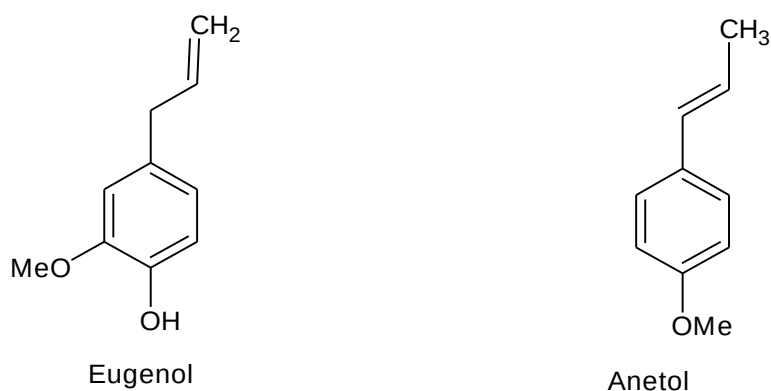
Figura 8 - Formação do ácido cinâmico através dos aminoácidos *L*-Fen e *L*-Tir.



Fonte: Dewick (2002).

A oxidação da cadeia lateral do ácido cinâmico conduz a formação de compostos importantes como o eugenol e o anetol exemplificados na figura seguinte. A perda de átomos de carbono forma compostos fenólicos simples que desempenham papel importante na defesa do vegetal contra insetos herbívoros e fungos. Os fenilpropanóides podem, ainda, servir como unidade formadora de compostos fenólicos mais complexos (SIMÕES, 2010; DEWICK, 2002).

Figura 9 - Fórmulas estrutural do eugenol e anetol.



Fonte: Dewick (2002).

As propriedades físicas comuns dos óleos essenciais são odores característicos, alto índice de refração, atividade opticamente ativa com rotação específica, tornando-se uma propriedade útil para sua caracterização. Eles são imiscíveis com água, mas solúveis em éter, álcool e na maioria dos solventes orgânicos. Não se tornam rançosos, mas quando expostos à luz e ao ar se oxidam e adquirem características resinosas. Não é incomum que um óleo volátil contenha mais de duzentos componentes e muitas vezes os componentes vestigiais são essenciais para o odor e aroma, que pode ser mudado na ausência de apenas um deles (SOUZA et al., 2010). Sua característica volátil permite que os óleos essenciais brutos sejam analisados diretamente por cromatógrafo gasoso (CG) quando diluídos sem preparação prévia da amostra, possibilitando não somente a análise quantitativa dos seus constituintes como também a qualitativa ao ser acoplado a um espectrômetro de massa (GC-MS) (SIMÕES et al., 2010).

3.5 A ESPECTROSCOPIA DE MASSAS NA IDENTIFICAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

O físico britânico Sir John Joseph Thompson (1856-1940) trouxe os elétrons, íons e isótopos para o centro das discussões científicas em 1897. Thompson focou seus estudos nos raios catódicos e foi o pioneiro ao propor que as partículas carregadas negativamente eram cerca de 1000 vezes menores que o átomo, estudo com o qual foi agraciado com o Prêmio Nobel de Física em 1906 pela descoberta do elétron. Dez anos depois, Thompson retornou ao estudo desses corpúsculos e aos raios canal (anódicos ou feixe de íons positivos), em conjunto com seu assistente, o físico britânico Francis William Aston (1877-1945), Thompson orientou neon ionizado através de um campo eletromagnético e mediu os desvios das partículas (WHATSON; SPARKMAN, 2007).

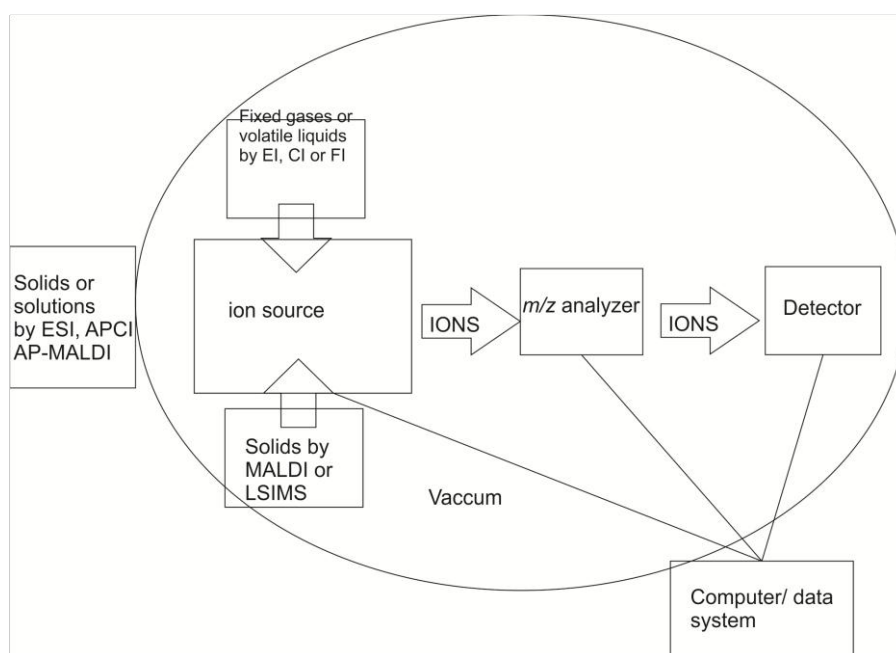
Aston percebeu que algumas partículas eram desviadas de maneira diferente e concluiu que tais desvios resultavam de isótopos do gás, fundamentando a raiz da espectroscopia de massa. Trabalhando em Cambrindge, Inglaterra, Aston melhorou a metodologia de Thompson e criou o primeiro instrumento de massa, o Espectrógrafo, utilizando seu equipamento, Aston pôde identificar 212 dos 278 isótopos naturais. Em 1922, Aston foi laureado com o Prêmio Nobel de Química pelo desenvolvimento do Espectrógrafo de Massa e por mensurar os isótopos dos

elementos químicos. Paralelamente, o Canadense-americano Arthur Jeffery Dempster (1886-1950), trabalhando na Universidade de Chicago, desenvolveu em 1918 o dispositivo que é considerado o primeiro Espectrômetro de Massas moderno (MCLAFFERTY, 2008).

A Espectroscopia de Massa se popularizou durante a II Guerra Mundial (1939-1945) ao responder com precisão qual isótopo de Urânio poderia ser aproveitado para a produção de energia e na preparação de Plutônio de qualidade militar, mostrando-se imprescindível para as pesquisas iniciais do Projeto Manhattan, que tinha como objetivo construir a primeira bomba atômica pelos Estados Unidos, em cooperação com a Inglaterra e o Canadá (MCLAFFERTY, 2008).

De acordo com Skoog et al (2006), os Espectrômetros de Massas basicamente contém uma entrada para a amostra, um analisador m/z que é responsável pela separação dos íons de acordo com seus valores de m/z , um detector que gera os sinais que são registrados com os valores de m/z e a abundância dos íons, um sistema de vácuo que remove as moléculas proporcionando um caminho livre de colisão entre os íons e a fonte de íons no detector e o computador que coordena as funções dos componentes individuais, registra e armazena os dados obtidos, de acordo com a ilustração seguinte:

Figura 10 - Representação esquemática de um Espectrômetro de Massas



Fonte: Whatson; Sparkman (2007)

A Espectroscopia de Massa é uma técnica de microanálise utilizada para detectar seletivamente e determinar a quantidade, sua composição elementar, certos aspectos da estrutura molecular, a extensão e a localização da incorporação de isótopos no analito. Os registros ocorrem quando as moléculas em fase gasosa são bombardeadas por um feixe de elétrons, durante a interação entre a molécula e os elétrons de alta energia há transferência de energia para a molécula, podendo dissipar a energia adicional pela ejeção de um elétron, ficando positivamente carregada e originando o íon molecular. Se o íon molecular formado tiver energia suficiente, poderá haver fragmentação de uma ou mais ligações, resultando em um íon e uma molécula neutra ou em um radical (WHATSON; SPARKMAN, 2007)..

Os instrumentos trabalham em baixa pressão, geralmente 10^{-5} mmHg, podendo ocorrer fragmentações e rearranjo intramoleculares, porém a reações intermoleculares entre íons ou moléculas neutra são pouco prováveis. As concentrações relativas dos íons dependem das velocidades de formação, das fragmentações e dos rearranjos subsequentes de todos os íons (WHATSON; SPARKMAN, 2007).

As fragmentações são essencialmente processos unimoleculares de decomposição, para um íon molecular que contém um número ímpar de elétrons, a fragmentação pode ocorrer por quebra homolítica ou heterolítica de uma ligação sigma. Na quebra homolítica, cada elétron se desloca de forma independente, já na quebra heterolítica, um par de elétrons se desloca em direção à carga positiva (SILVERTEIN; WEBSTER; KIEMLER, 2012).

Para Silverstein, Webster e Kiemler (2012), o uso de conceitos fundamentais de físico-química orgânica permite estabelecer regras gerais de previsão dos picos mais intensos de um espectro obtido por impacto de elétrons, entre elas: o pico do íon molecular tem maior altura relativa nos compostos de cadeia linear e sua intensidade diminuiu a medida que o grau de ramificação aumenta; a intensidade do pico do íon molecular diminuiu com o aumento do peso molecular em uma série homóloga, entretanto os ésteres graxos parecem ser uma exceção; o processo de quebra é favorecido nas ligações de átomos de carbonos ramificados, isso é consequência da maior estabilidade dos carbocátions terciários em relação aos secundários, e dos secundários em relação aos primários; ligações duplas, estruturas cíclicas e anéis aromáticos ou heteroátomos estabilizam o íon molecular; as ligações duplas favorecem ligações alílicas e dão origem ao carbocátion alílico;

anéis saturados tendem a perder cadeias laterais na ligação α , os anéis insaturados podem sofrer uma reação do tipo retro-Diels-Alder; nos compostos aromáticos alquissubstituídos a quebra é mais provável na ligação β em relação ao anel; as ligações C-C próximo à heteroátomo frequentemente se quebram, deixando a carga no fragmento que contém o heteroátomo; e as moléculas frequentemente são associadas à eliminação de moléculas neutras e estáveis como monóxido de carbono, alquenos, água, amônia, sulfeto de hidrogênio, cianeto de hidrogênio, mercaptans, ceteno ou álcoois, muitas vezes com rearranjo.

Os rearranjos que envolvem migração de átomos de hidrogênios na molécula na posição gama e contém heteroátomos em uma ligação pi, são bastantes comuns, como exemplo o McLafferty, que produz picos intensos característicos e são muito úteis na identificação de estruturas. A espectroscopia de Massas tem ampla aplicação na identificação dos constituintes químicos da mistura complexa de compostos encontrados nos óleos essenciais, indicando a massa molecular e o padrão de fragmentação (GRIFFITHS, 2008).

3.6 BIOATIVIDADE MAIS OCORRENTES NOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Dentre as principais atividades farmacológicas dos óleos essenciais, destacam-se: antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, anticolinesterásica, antiparasitária, analgésica, sedativa, antitumoral, entre outras (PURNHAGEN, 2010). Estudos sistematizados têm demonstrado o interesse biológico dos óleos essenciais em relação a sua atividade antioxidante.

Entendem-se como atividade antioxidante as substâncias que em concentração baixa retardam ou inibem a oxidação dos substratos, formando radicais não reativos neutralizados por outro radical. Os compostos fenólicos presentes no metabolismo secundário de espécies vegetais como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas têm recebido atenção por inibirem a peroxidação lipídica e a lipo-oxigenase *in vitro* (SOUZA et al., 2007).

As propriedades redutoras dos compostos fenólicos se dão pela neutralização e sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição ainda na etapa de iniciação e na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela

ação antioxidante são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura dessas substâncias (SOUZA et al., 2007).

Novas fontes de substâncias obtidas de espécies nativas do Brasil que apresentem atividade antimicrobiana e baixa toxicidade são alternativas viáveis, de baixo custo e fácil acesso pelas comunidades carentes da região onde tais espécies são encontrada, os produtos naturais de origem vegetal têm sido o ponto crítico de diversas pesquisas envolvidas em atividade biocidas (COSTA et al., 2008; LIMA et al., 2012).

Outro parâmetro importante em voga é a toxicidade dos óleos essenciais no ecossistema. A *Artemia salina* L. é um crustáceo invertebrado primitivo que pode viver em condições extremas devido as suas habilidades especiais de adaptação aos estresses ambientais (ZIN; PARK; CHOI, 2014). Desse modo, a utilização de cisto em ecotoxicologia é altamente vantajosa sempre que os bioensaios são rotineiramente exigidos para investigar a toxicidade preliminar, assim como a disponibilidade dos organismos para ensaio, o baixo custo e a facilidade de uso, apresentando-se como um método eficiente para avaliar contaminação ambiental, qualidade da água e toxicidade de biocida (SANTOS, et al., 2010). Os bioensaios são amplamente utilizados em produtos farmacêuticos, inseticidas organofosforados, micotoxinas, testes de toxicidade em zona costeira, marítima e estuarinas, avaliação de compostos fenólicos em efluentes industriais, entre outros (NUNES, et al.; 2006)

Como define Viegas Júnior (2003), inseticida são substâncias químicas utilizadas para matar, repelir ou atrair insetos. Sua descoberta, isolamento, síntese, avaliação toxicológica e de impacto ambiental é um vasto tópico de pesquisa no mundo inteiro que se desenvolveu muito nas últimas décadas. Propriedades como eficácia em baixas concentrações, ausência de toxicidade frente a mamíferos e animais superiores, ausência de fitotoxicidade, fácil obtenção, manipulação e aplicação, viabilidade econômica e não acumulação em tecidos adiposo são ideais para uma substância utilizada para esse fim.

Os terpenos encontrados na Asteraceae e sua variação entre espécies da família durante seu crescimento e diferenciação influenciam na repelência e toxicidade. Lactonas sesquiterpênicas têm demonstrados efeito supressor de apetite e inibição de desenvolvimento de insetos, reduzindo a taxa de crescimento, aumentando o número de dias das pupas e reduzindo seu peso (VIEGAS JÚNIOR, 2003).

Pesquisas focadas no uso dos metabólitos secundários de espécies vegetais com potencial para produção de óleos essenciais têm se mostrado profícuas no combate à doenças infectocontagiosas. Estratégias para o controle do mosquito na fase larval se mostram promissoras através de compostos presentes em extratos etanólicos de espécies da família Asteraceae com derivados ativos de tiofenóis, flavonóides e poliacetilenos (MACÊDO et al., 1997; FURTADO et al., 2005).

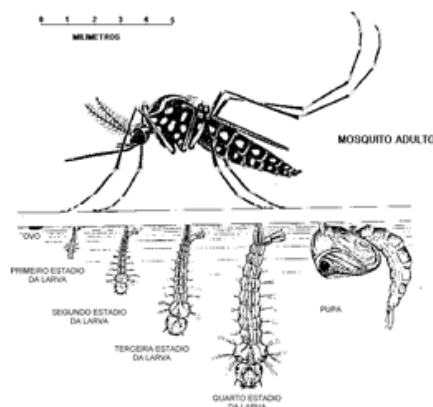
3.7 CONTROLE FITOQUÍMICO DO *Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINAEUS, 1972) (DIPTERA:CULICIDAE)

Ochlerotatus, *Stegomyia*, *Howardina* e *Protomacleaya* são subgêneros de *Aedes*, pertencentes à família Culicidae, existentes no Brasil, contudo, apenas os subgêneros *Stegomyia* e *Ochlerotatus* reúnem espécies de *Aedes* com importância epidemiológica. O *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1972) (DIPTERA:CULICIDAE) é um inseto sinantrópico e antropofílico de origem africana que foi notificado pela primeira vez no Brasil em 1986.

O seu desenvolvimento dura entre 8 e 10 dias e compreende duas fases do ciclo de vida: uma aquática e outra terrestre. A fase aquática possui três estádios de desenvolvimento – ovo, larva e pupa-, enquanto que a fase terrestre equivale ao mosquito adulto. Os ovos são depositados na parede dos recipientes pelas fêmeas, embora eventualmente seja possível depositá-los diretamente na água, preferencialmente, limpa. A eclosão dos ovos ocorre após o desenvolvimento do embrião, com duração entre 2 ou 3 dias em condições favoráveis de umidade e temperatura (CRUZ, 2015; PEDROSA, 2013).

O período após a eclosão compreende 4 estádios larvais e, por fim, tem-se início ao desenvolvimento da pupa. No período de pupa, os imaturos não se alimentam e o seu desenvolvimento sofre influência da umidade e da temperatura. Os mosquitos emergem entre 1 e 3 dias após a pupa e se alimentam de néctar de fluidos açucarados ou seivas de variadas fontes. A partir do 2º ou 3º dia da emergência da pupa e da cópula, as fêmeas estão vorazes para fazer a hematofagia necessária para maturação de cerca dos seus 1.500 ovos, de acordo com a figura seguinte (CRUZ, 2015; PEDROSA, 2013):

Figura 11 - Ciclo de desenvolvimento do *A. aegypti*.



Fonte: Unicamp (2015).

O *A. aegypti* é o principal vetor de viroses como febre amarela, dengue, chikungunya e zika em todas as áreas tropicais e subtropicais do planeta (LAKWEIRY et al., 2015; DIALLO et al., 2014). De acordo com WHO (2012), a dengue é a doença com maior propagação viral transmitada por mosquitos dos últimos 50 anos e infecta em torno de 50 a 100 milhões de pessoas anualmente, expondo risco de morte a quase metade da população mundial em regiões endêmicas do vírus.

Esforços coordenados pela Pan American Health Organization (PAHO) nas décadas de 1950 e 1960 voltados para erradicação da febre amarela promoveu um declínio acentuado dos mosquitos vetores. Contudo, a redução de esforços no controle dos insetos em 1970 na maioria das regiões da América Latina e América do Norte promoveu epidemias sucessivas de dengues e o aparecimento da variante hemorrágica (JANSEN; BEEBE, 2010).

A dengue é considerada endêmica na maioria dos estados brasileiros. Em 2013 a incidência de casos equivaleu a 731,5/100 mil habitantes (GALLEGO, 2014). De acordo com o Ministério da Saúde (2015), em 2014 o Amapá registrou cerca de 2.190 casos de dengue, se comparado com o ano anterior, houve um aumento de 28,2% de casos registrados. Em 2014, a incidência de casos de Dengue no Amapá foi equivalente a 153,1/100 mil habitantes, até agosto de 2015 a incidência estimada pelo MS já chega em 343,6/100 mil habitantes.

Outro problema de saúde pública é a transmissão do vírus Chikungunya através do mosquito *A. aegypti*. No final do ano de 2013, o chikungunya emergiu na ilha de Saint-Martin, no caribe, e se espalhou levantando mais de 1.000.000 de casos suspeitos por mais de 40 países da América Latina. Em 2014, 126 casos

importados foram confirmados na França, posteriormente, casos autóctones foram identificados na Itália e na França decorrente da adaptação do *A. albopictus* e sua transmissão em temperaturas iguais ou inferiores a 28 °C (VEGA-RÚA et al.; 2015).

No Brasil, o primeiro caso autóctone foi confirmado em Setembro de 2014 no município de Oiapoque, estado do Amapá. Após 7 dias o segundo caso foi confirmado em Feira de Santana, na Bahia (NUNES et al.; 2015). De acordo com dados do Ministério da Saúde (2015), em 2014 foram diagnosticados 1.146 casos de febre chikungunya em Oiapoque e um total de 142.056 casos no Brasil. Apesar de existir uma vacina eficaz contra o vírus da febre amarela, essa doença continua sendo um problema de saúde pública em regiões da Ásia e da África. No ano de 2000 foram identificados alguns casos de febre amarela próximo de Brasília, e em 2001 em Minas Gerais (VASCONCELOS et al.; 2004).

Desde seu isolamento até 2007, foram identificados 40 casos de infecção por Zika vírus na África e na Ásia. A partir então, uma epidemia em grande escala foi identificada na Ilha de Yap, pertencente aos Estados Federados da Micronésia. As autoridades em saúde relataram 187 casos entre abril e agosto de 2007. Outro evento de interesse foi a confirmação de 396 casos confirmados de infecção por Zika vírus na Polinésia Francesa. Houveram, ainda, pequenos relatos no Japão, na França e na Noruega (NHAN; CAO-LORMEU; MUSSO, 2014; IOOS, et al.; 2014).

Um estudo realizado por Monteiro, Carvalho e Souto (2014) demonstrou no município de Macapá infestação vetorial elevada de *A. aegypti* no ano de 2012, com dispersão em todas as zonas da cidade e uma fortemente correlação com variantes climáticas como pluviosidade, umidade do ar e temperatura.

O controle químico tem se apresentado como efetivo, de baixo custo e fácil manejo para combater o *A. aegypti* como vetor de dengue, da febre amarela, do chikungunya e do zika. Garcez et al. (2013) afirmam que o uso do controle químico continua sendo uma das principais táticas utilizadas para o combate dos vetores, entretanto, devido à resistência adquirida pelos culicídeos e às escassas opções de novos inseticidas, a situação torna-se delicada.

As plantas tornaram-se uma alternativa na busca de substâncias bioativas com estruturas química diversas e novas atividades inseticidas, porém a aplicação direta dos extratos brutos se limita ao uso doméstico (SIMÕES et al.; 2010). Produtos orgânicos baseados em espécies vegetais foram amplamente utilizados na década de 1940, entre eles a nicotina, um alcaloide natural isolado de espécies

Nicotiana, foram empregados os piretroides piretrina e aletrina extraído das flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* e o retenoide retona isolado de espécies do gênero *Derris* e *Lonchocarpus* (GARCEZ et al.;2013)

Os organosclorados de origem sintética substituíram os inseticidas de origem natural entre as décadas de 1950 e 1970. O dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) foi o primeiro com efeito prolongado utilizado para o controle de vetores com efeito prolongado quando aplicado nas paredes. O uso indistinto do produto atingiu não apenas os vetores, mas também a fauna e a flora promovendo problemas ambientais imensuráveis. O uso intenso de inseticidas desenvolve resistência ao vetores em decorrência do mecanismo de defesa e sua sobrevivência, o que evidencia a redução da eficácia do produto, como por exemplo no *A. aegypti* que dispõe de uma rápida recuperação após a intervenção de controle SIMÕES et al.; 2010, GARCEZ et al.; 2013)

4 MATERIAL E MÉTODOS

A proposição desse estudo se caracteriza como experimental pela delimitação da forma de manipulação do objeto de estudo e suas variáveis, exploratória ao favorecer familiaridade com e experiência para compreender o problema e quantitativa ao mensurar os dados e relaciona-los à compreensão da natureza no sentido mais intenso (CHEMIM, 2012).

4.1 COLETA DAS ESPÉCIES E IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA

As espécies vegetais foram coletadas em hortas artesanais localizadas no distrito da Fazendinha, município de Macapá-AP. A região é situada entre a latitude 0,036955 e a longitude 51,110377. Amostras foram prensadas e enviadas ao Herbário do Instituto de Estudos Científicos e Tecnológicos do Estado do Amapá para confecção de exsicatas e identificação botânica.

4.2 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

As folhas da espécie vegetal foram desidratadas em estufa com circulação de ar a 36 °C, os Óleos Essenciais foram extraídos por hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger a 100 °C durante duas horas (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010), armazenados em frascos âmbar e refrigerados a -20 °C ao abrigo da luz para análises futuras.

4.3 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

A composição química dos óleos essenciais foi determinada por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-EM) em equipamento da marca Shimadzu, modelo CGMS-QP 5050A, em coluna DB-5HT da marca J & W Scientific, com comprimento de 30 m, diâmetro de 0,32 mm, espessura do filme 0,10 µm e nitrogênio como gás carreador, de acordo com Barbosa et al. (2006).

O aparelho operou sob pressão interna da coluna de 56,7 kPa, razão do split 1:20, fluxo do gás na coluna de 1,0 mL.min.⁻¹ (210 °C), temperatura no injetor de 220 °C, e no detector (GC-MS) de 240 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 60 °C com incremento de 3 °C.min⁻¹, até atingir 240 °C, mantida constante por 30 minutos. O espectrômetro de massas será programado para realizar leituras em uma faixa de 29 a 400 Da, em intervalos de 0,5 segundos, com energia de ionização de 70 eV. Será injetado 1µL de cada amostra com concentração de 10.000 ppm dissolvido em hexano .

Os t_r (tempo de retenção) foram obtidos utilizando a série homóloga dos *n*-alcanos. A quantificação dos componentes foi feita através de cromatografia de gás (GC) em equipamento Shimadzu QP-2010, equipado com detector de ionização de chama (DIC), nas mesmas condições operacionais acima, exceto o gás de arraste que será o hidrogênio.

Constituintes do óleo volátil foram identificados através dos seus índices de retenção (t_r) e seu padrão de fragmentação de espectro de massa com os relatado na literatura (ADAMS, 2001) e os armazenados em Bibliotecas MS (Wiley 7, NIST 02). A quantificação dos componentes foi realizada com base em suas áreas dos picos de GC sobre a coluna de SPB – 5, sem correção do fator de resposta do FID, e o cálculo dos índices de Kovats (IK) com os dados da literatura, de acordo com a seguinte fórmula:

$$IK = 100 \times NCHmm + 100 \times \left(\frac{TRO - TRHmm}{TRHmr - TRHmm} \right)$$

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

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

TRO = Tempo de retenção do componente do óleo essencial;

TRHmm = Tempo de retenção do hidrocarboneto imediatamente menor;

TRHmr = Tempo de retenção do hidrocarboneto imediatamente maior.

4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A avaliação da atividade antioxidante foi baseada na metodologia proposta por Sousa et al. (2007), diante do consumo de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) com algumas modificações nas concentrações avaliadas.

Os óleos essenciais foram diluídos em metanol nas concentrações seguinte: 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 metanólica de DPPH na concentração de 40 µg.mL⁻¹, seguido da adição de 0,3 mL da solução de óleo essencial. Paralelamente, foi preparado o branco com 2,7 mL de metanol e a solução metanólica dos compostos avaliados. Após 30 minutos foram realizadas leituras em espectrofotômetro (Biospectro SP-22) no comprimento de onda de 517 nm. O percentual de atividade antioxidante foi calculada de acordo com Sousa et al. (2007).

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

%AA = porcentagem de atividade antioxidante

Abs_{amostra} = Absorbância da amostra

Abs_{branco} = Absorbância do branco

Abs_{controle} = Absorbância do controle

4.5 TESTE DE CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade dos óleos foi avaliada frente às larvas do microcrustáceo *Artemia salina* Leach baseado em Araújo et al. (2010) e Lôbo et al. (2010). Foi preparado uma solução de sal marinho sintético com concentração de 3,5 g.L⁻¹ para incubação de 25 mg de ovos de *Artemia salina* Leach. Posteriormente a solução foi exposta à luz artificial por 24 horas para eclosão dos metanúpios, em seguida as larvas foram separadas para uma ambiente escuro por mais 24 horas para alcançarem o estágio de náupios.

Os náupios foram divididos em 7 grupos com 10 indivíduos em tubos de ensaios, em cada grupo será adicionadas uma alíquotas de 3125, 2500, 1250, 625, 250, 25 e 2,5 µL da solução mãe de óleo composta de 62,5 mg da amostra vegetal, 28 mL de sal marinho sintético e 2 mL de dimetilsufóxido (DMSO), completando o volume para 5 mL com a solução de sal marinho sintético. O teste foi realizado em triplicata, contabilizando o número de sobreviventes e considerando mortos os indivíduos totalmente imobilizados por um período de 10 segundos para determinação do CL₅₀.

4.6 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, todas da geração F₆, do 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; 1986a; 1986b) com modificação no recipiente teste. Após ensaios preliminares, foram selecionadas as soluções aquosas nas concentrações: 130, 100, 70, 40 e 10 mg.mL⁻¹ pré-solubilizadas em Twen 80 a 5%.

Para cada repetição de um tratamento foram utilizadas 10 larvas, pipetadas para um béquer de 100 mL contendo água destilada. 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. Os dados obtidos da mortalidade (%) x concentração (mg.mL⁻¹) foram analisados pelo programa SPSS, em gráfico de Probit, para determinar a Concentração Letal que causa mortalidade de 50% da população (CL₅₀).

4.7 ATIVIDADE ADULTICIDA

A avaliação da atividade adulticida em *A. aegypti* foi orientada de acordo com a metodologia da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1998). Em tubos de 44 mm de diâmetro e 125 mm de comprimento, 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 do morfotipo A foram avaliadas nas concentrações de 100, 75, 50 e 25 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. Para os óleos essenciais do morfotipo B, seguiu o mesmo procedimento, porém utilizando soluções etanólicas nas concentrações de 75, 50, 25 e 12,5 mg.mL⁻¹ com tween 80 a 5%.

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.

Para os recipientes em que a mortalidade ultrapassava 20%, o bioensaio foi repetido. O que apresentavam mortalidade entre 5 e 20% foram corrigidos através da fórmula de Abbot (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

$$\frac{(\%Mt - \%Mc) \times 100}{100 - \%Mc}$$

Em que:

%Mt = Percentual de Mortalidade no Teste;

%Mc = Percentual de Mortalidade no Controle.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

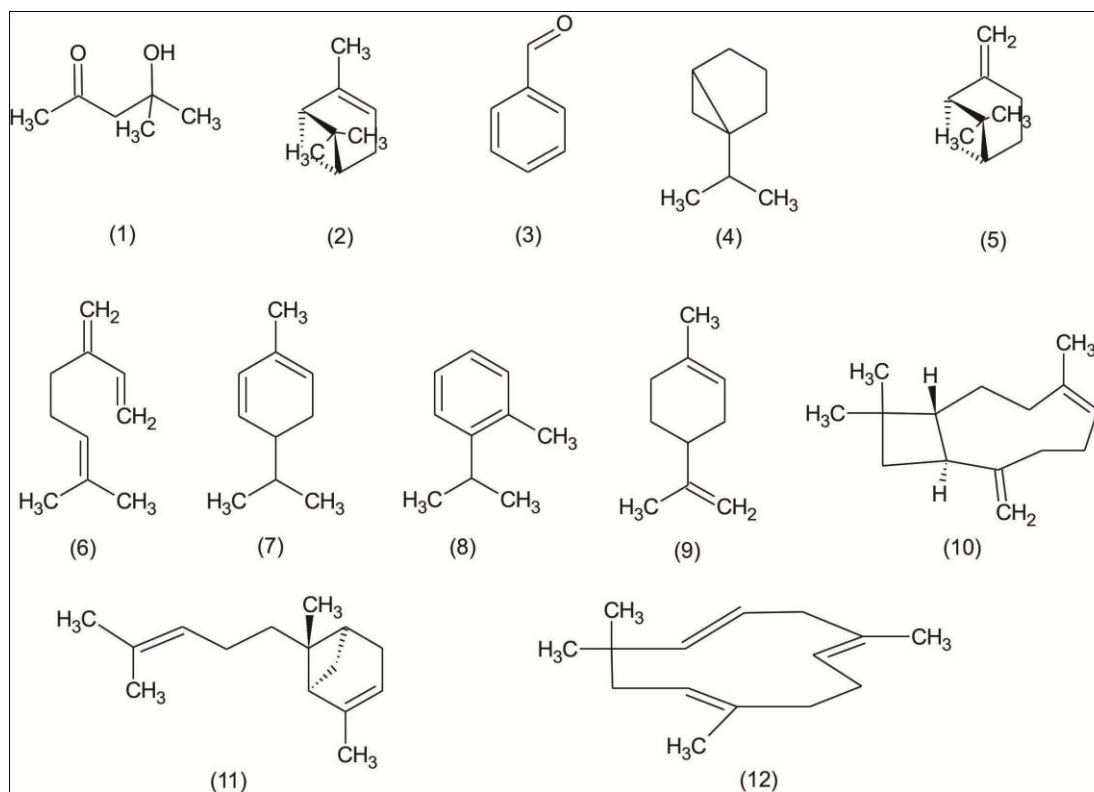
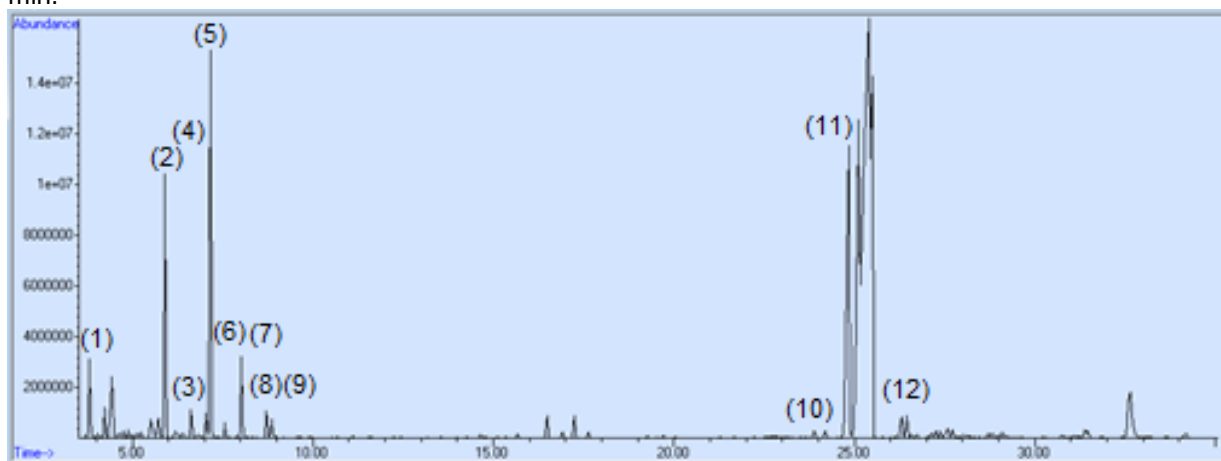
Os resultados obtidos a partir dos bioensaios serão expressos através de Médias e Desvio Padrão, organizados, de acordo com a pertinência, em tabelas, gráficos, quadros e figuras. As diferenças significativas entre os tratamentos foram avaliadas utilizando o teste Anova Um Critério. Os valores de CL₅₀ foram determinados em regressão PROBIT, através do programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) com limite probabilístico de erro igual a 0,05.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAS POR GC-MS

A análise por GC-MS dos óleos essenciais do morfotipo A identificou 12 compostos: 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona (1), α -pineno (2), benzaldeído (3), sabineno (4), β -pineno (5), β -mirceno (6), α -felandreno (7), *o*-cimeno (8), limoneno (9), *trans*-cariofileno (10), *trans*- α -bergamoteno (11) e o α -humuleno (12), de acordo com o cromatograma seguinte:

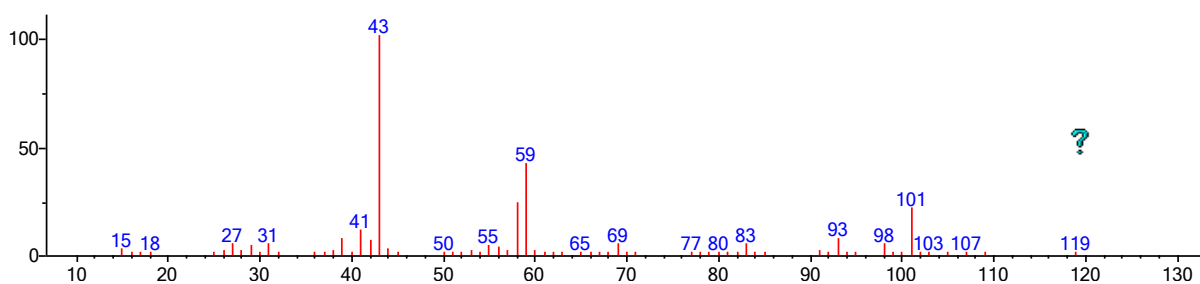
Figura 12 - Cromatograma obtido por CG do óleo essencial do morfotipo A de *A. triplinervis*. Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 60 °C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 3 °C/min. até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 30,0 min.



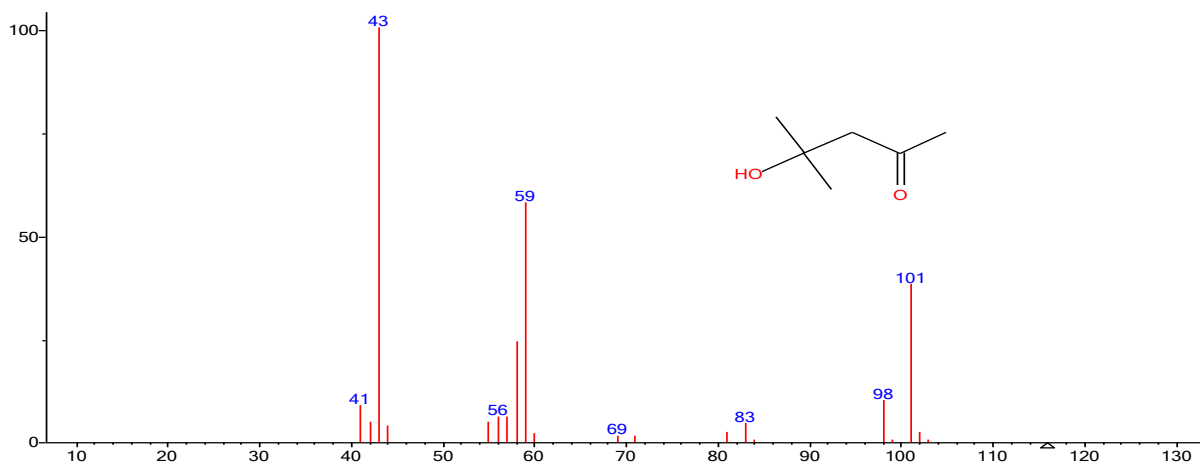
Os espectros de massa foram comparados com o perfil de fragmentação dos espectros de massa da biblioteca Wily/PBM do equipamento e com a literatura (ADAMS, 2012) para identificação dos seus constituintes, de acordo com a figura seguinte:

Figura 13 - Espectros de massas do óleo essencial do morfotipo A de *A. triplinervis* obtidos por GC-MS em comparação com espectros da biblioteca do equipamento.

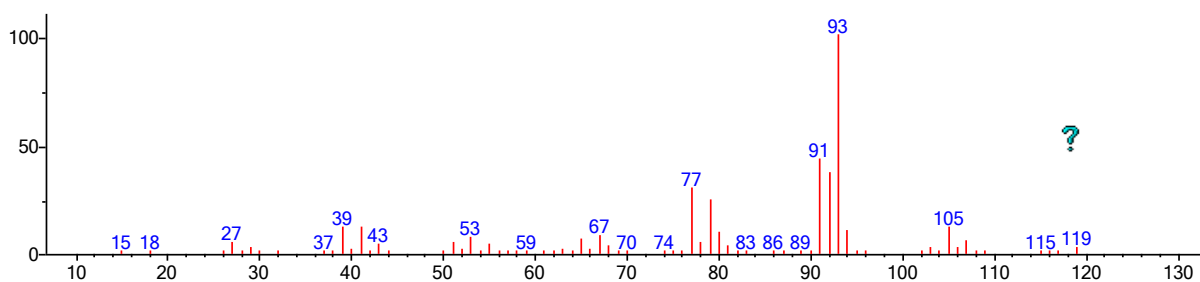
Substância 1 : 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona, tr: 3,81 min.



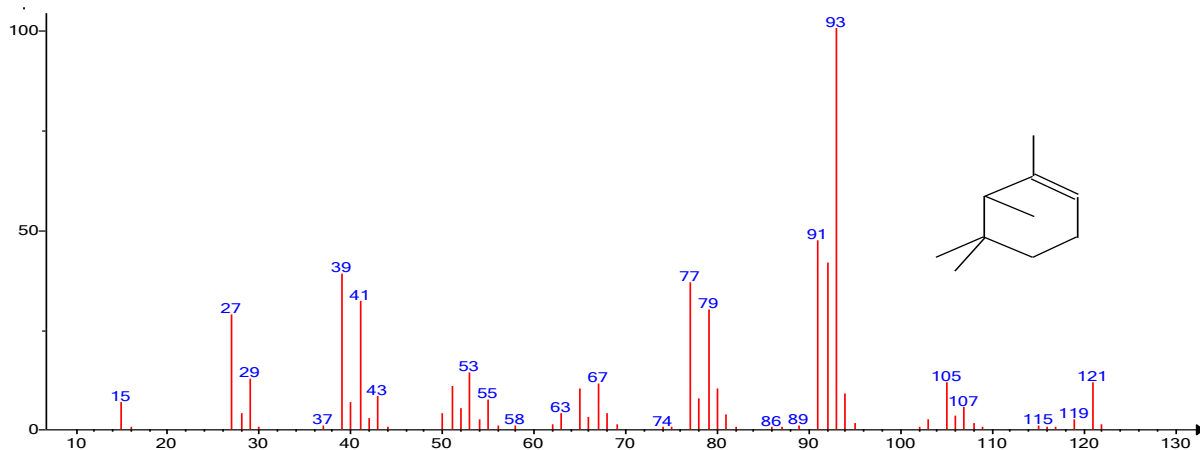
Espectro de massa da biblioteca.



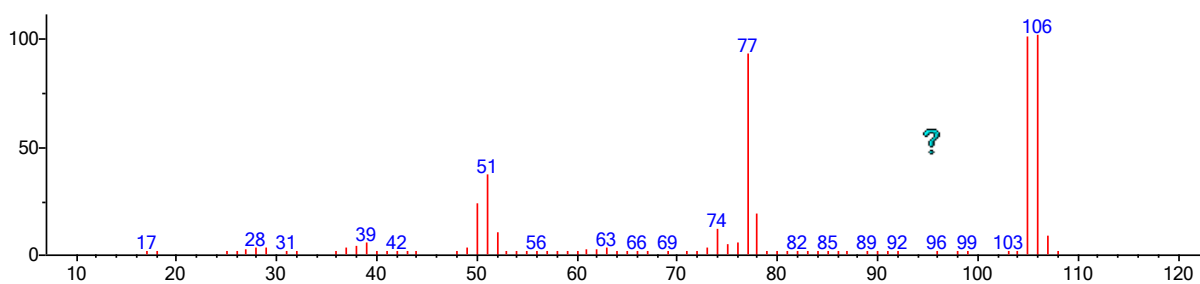
Substância 2: α -pineno, tr: 5,88 min.



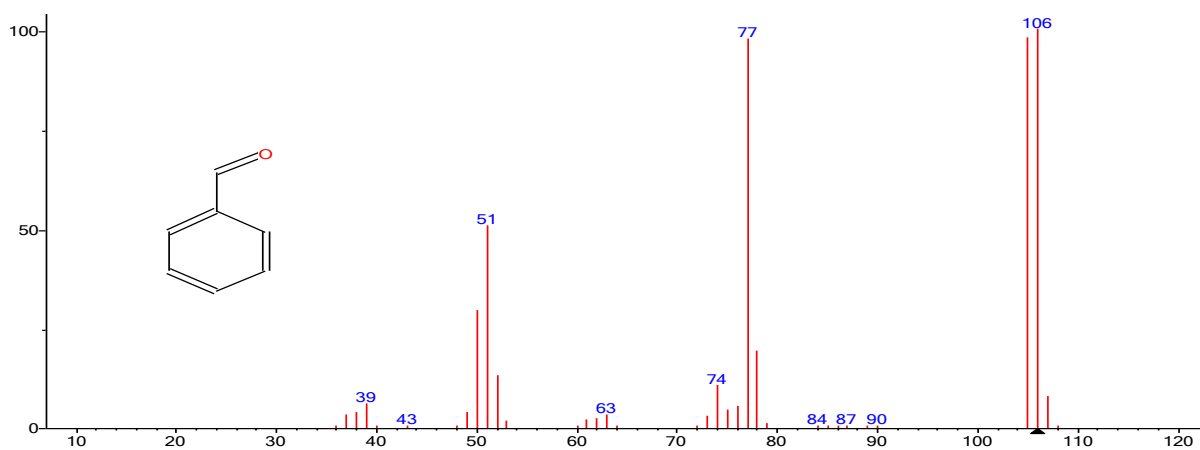
Espectro de massa da biblioteca.



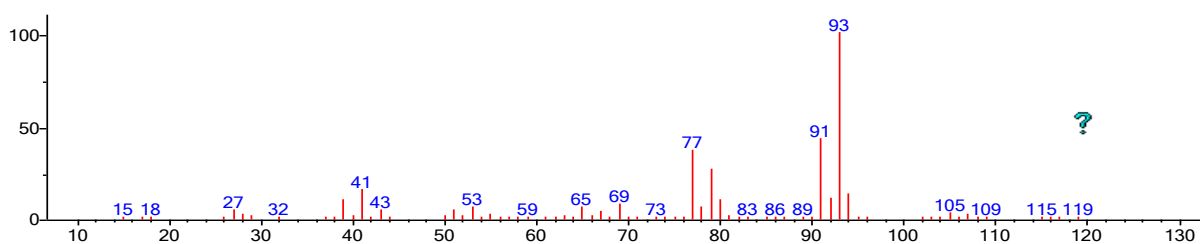
Substância 3: Benzaldeído, tr:6,63 min.



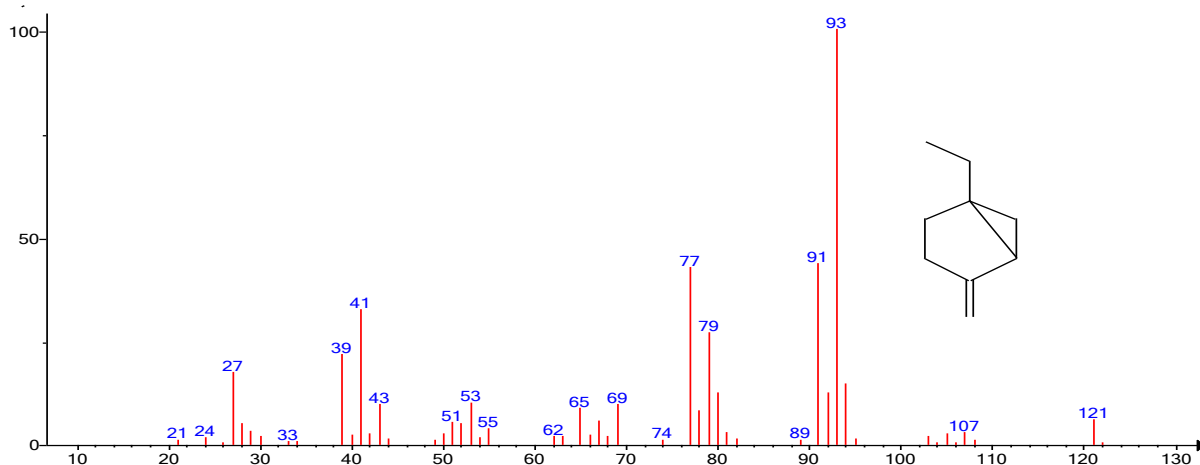
Espectro de massa da biblioteca.



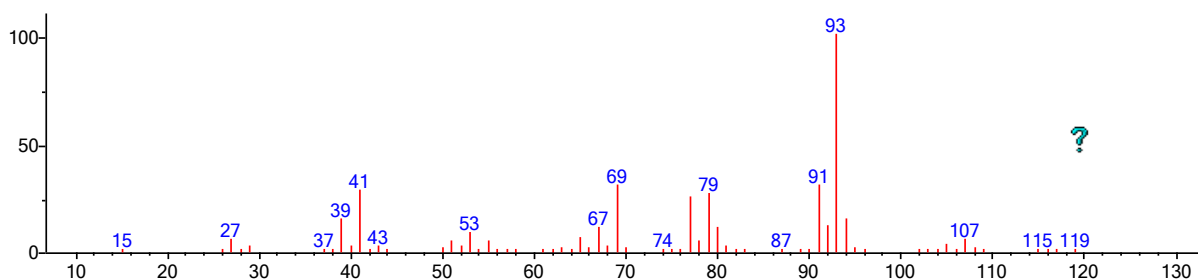
Substância 4: Sabineno, tr: 7,04 min.



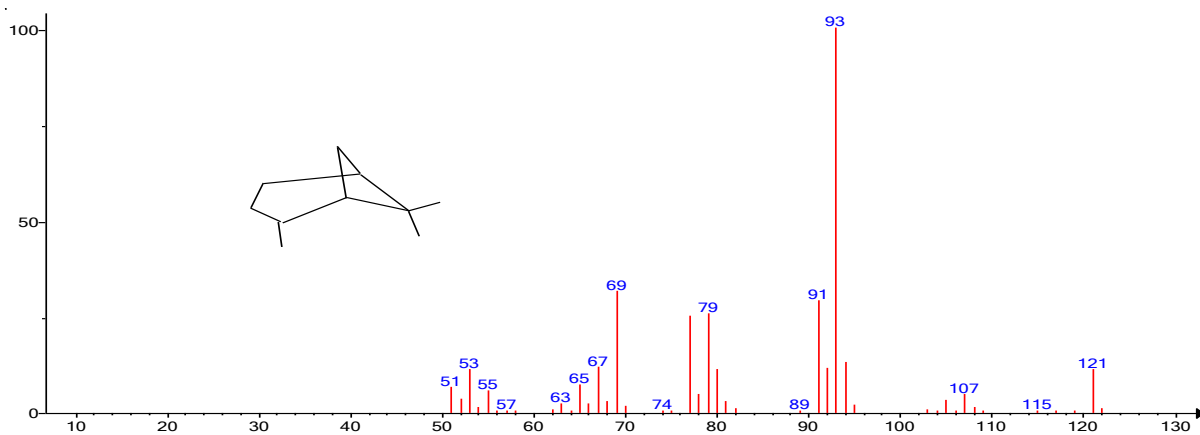
Espectro de massa da biblioteca.



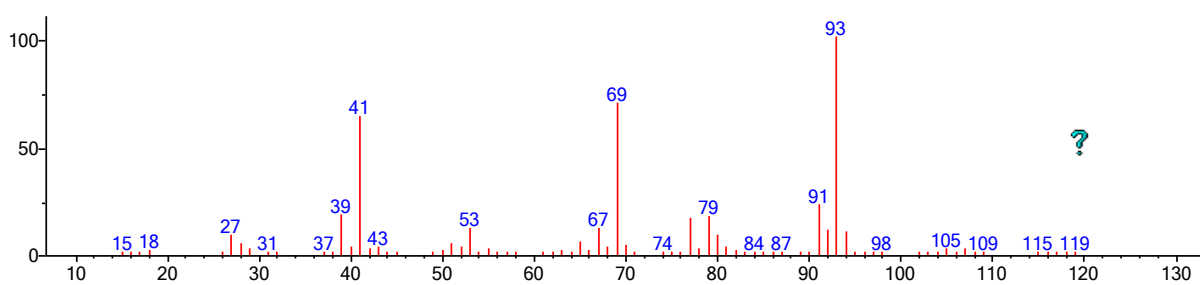
Substância 5: β -pineno, tr: 7,15 min.



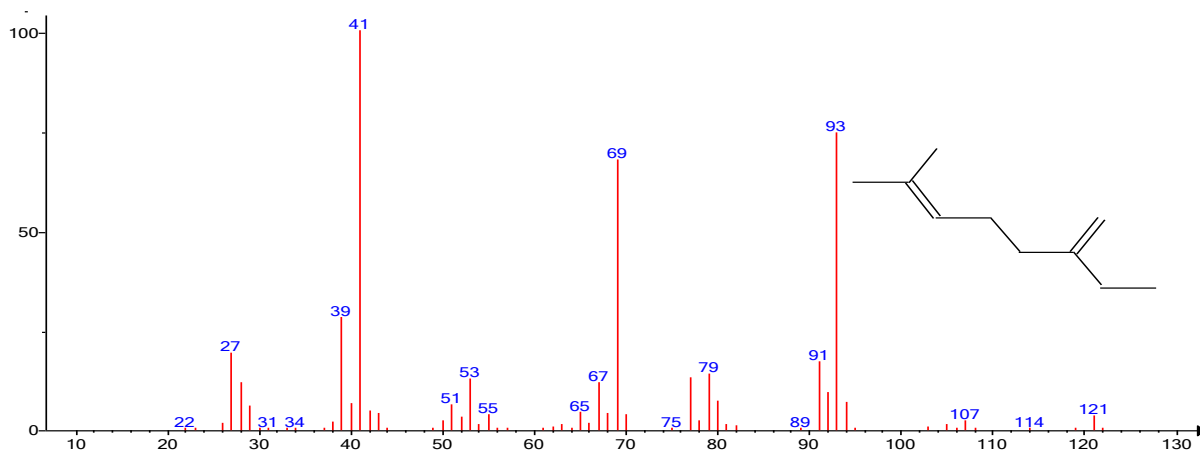
Espectro de massa da biblioteca.



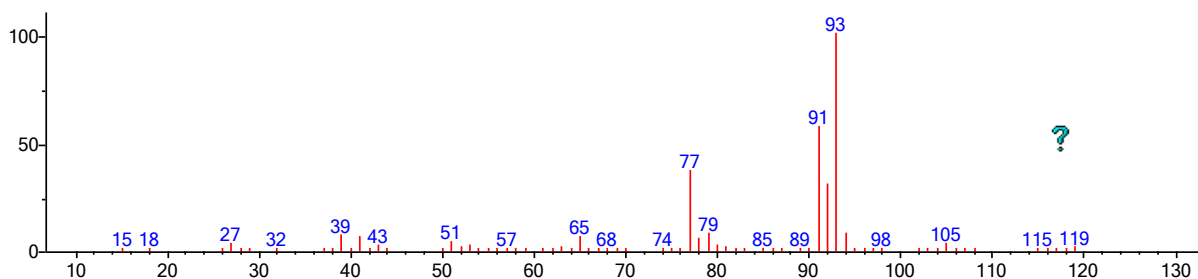
Substância 6: β -mirceno, tr: 7,55 min.



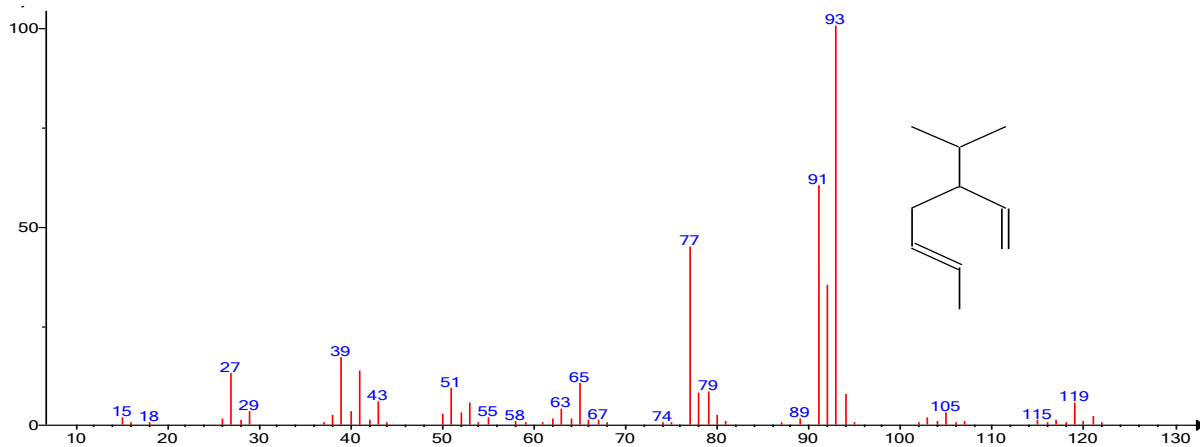
Espectro de massa da biblioteca.



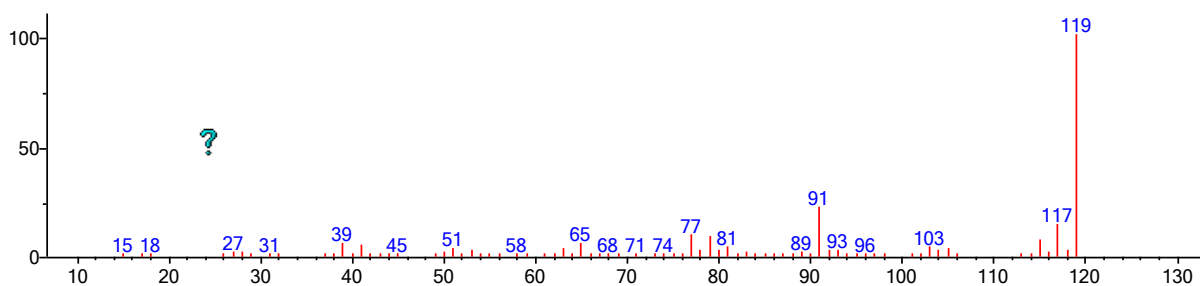
Substância 7: α -felandreno, tr: 8,01 min.



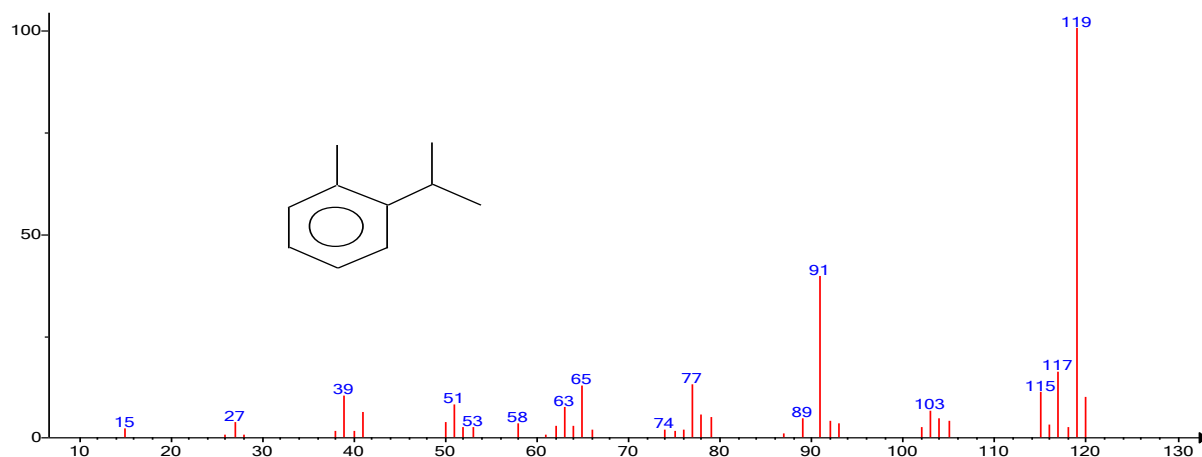
Espectro de massa da biblioteca.



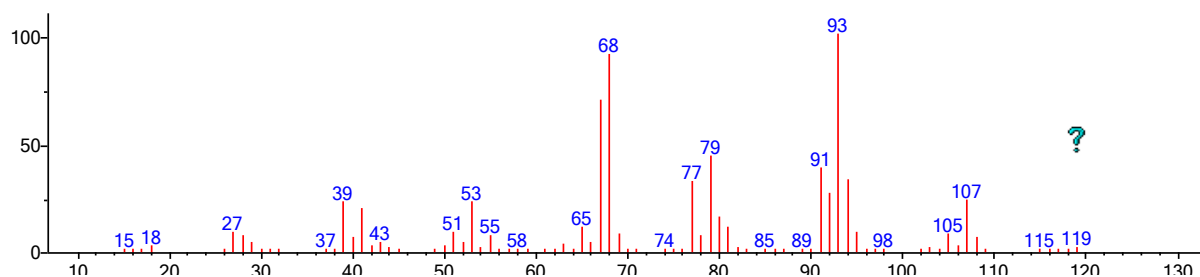
Substância 8: *o*-cimeno, tr: 8,71 min.



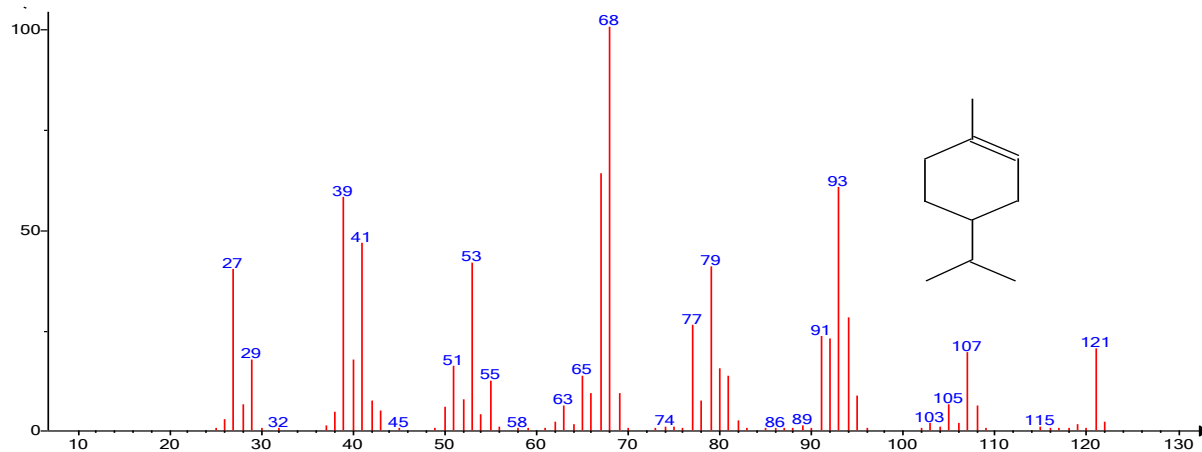
Espectro de massa da biblioteca.



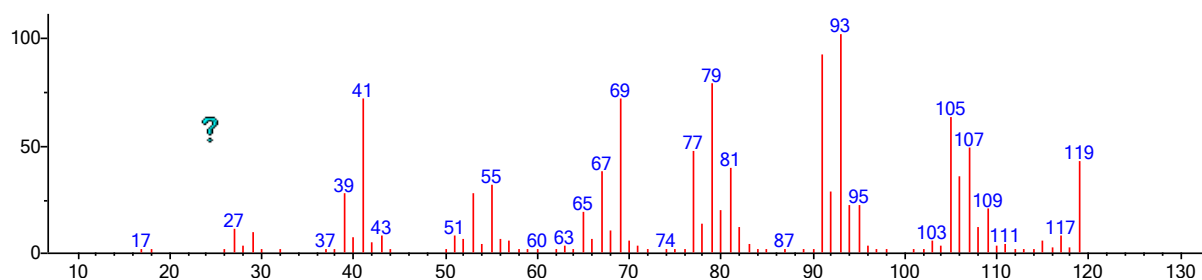
Substância 9: Limoneno, tr: 8,86 min.



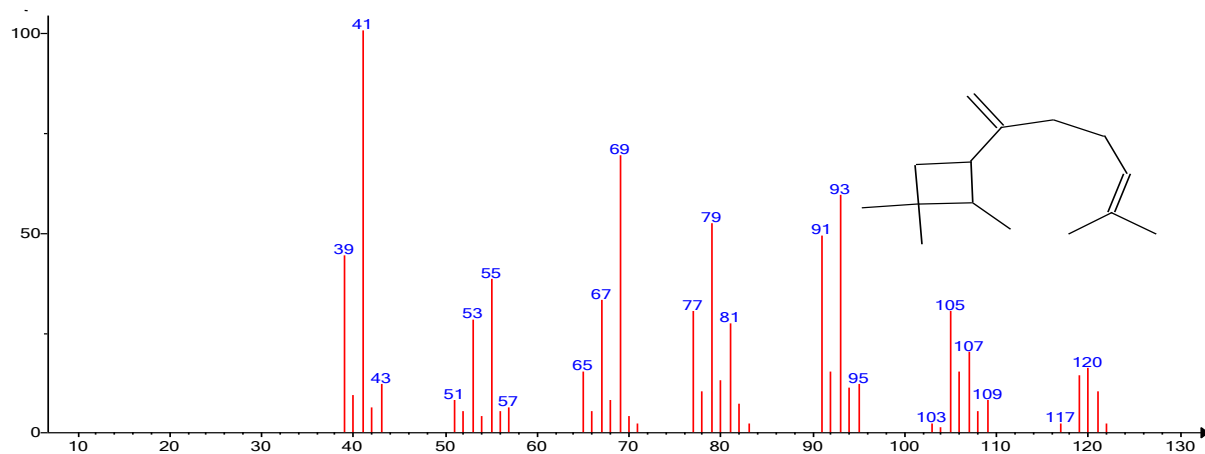
Espectro de massa da biblioteca.



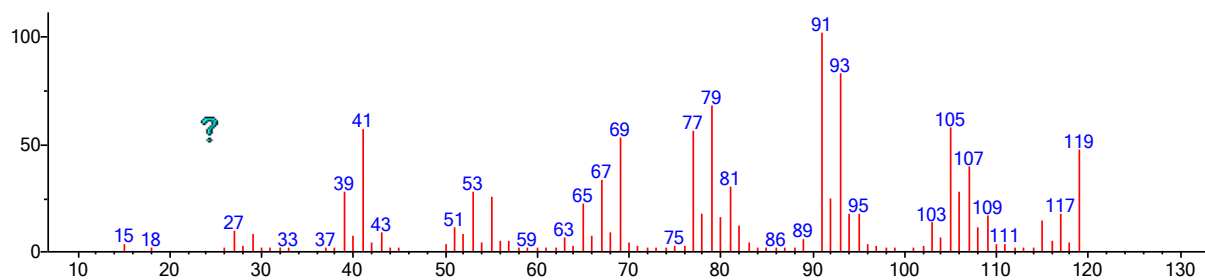
Substância 10: *trans*-cariofileno, tr: 24,79 min.



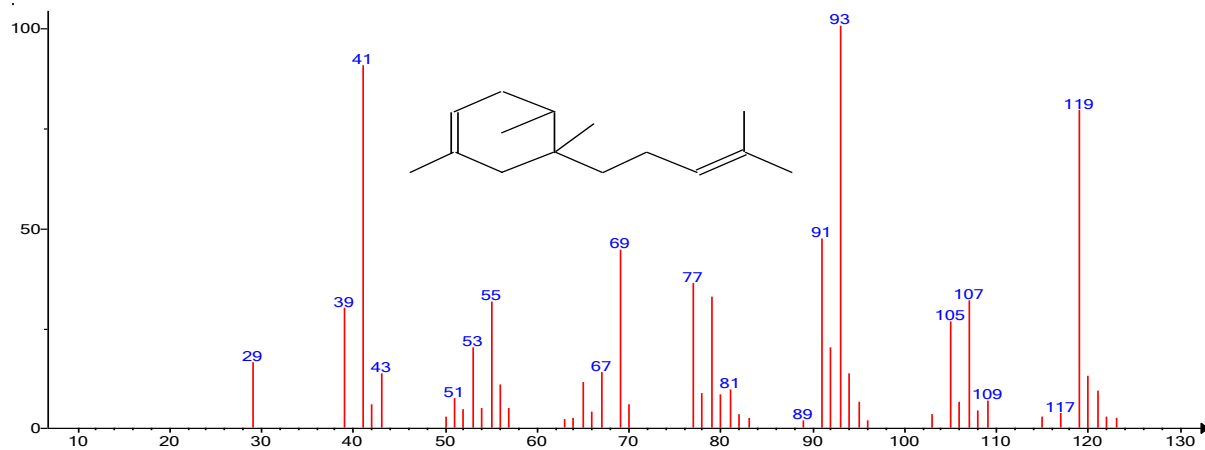
Espectro de massa da biblioteca.



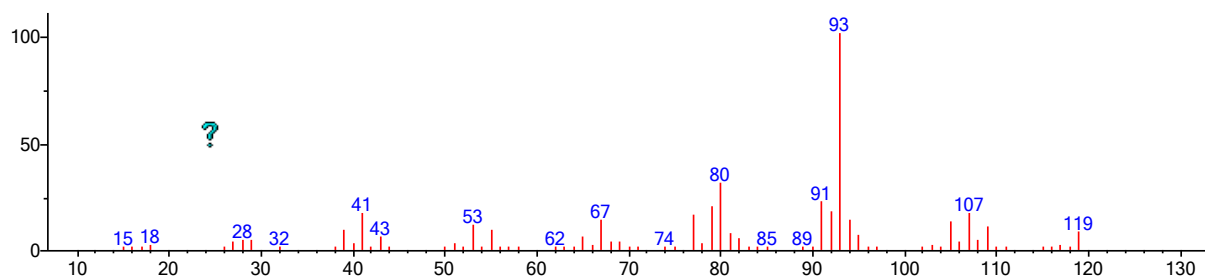
Substância 11: Trans- α -bergamoteno, tr: 25,09 min.



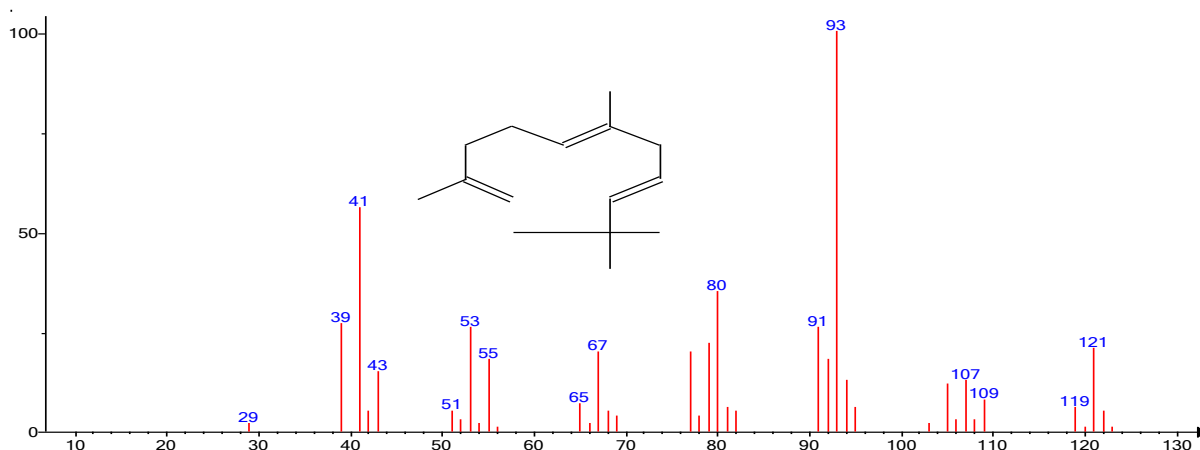
Espectro de massa da biblioteca.



Substância 12: α -humuleno, tr: 26,29 min.



Espectro de massa da biblioteca.



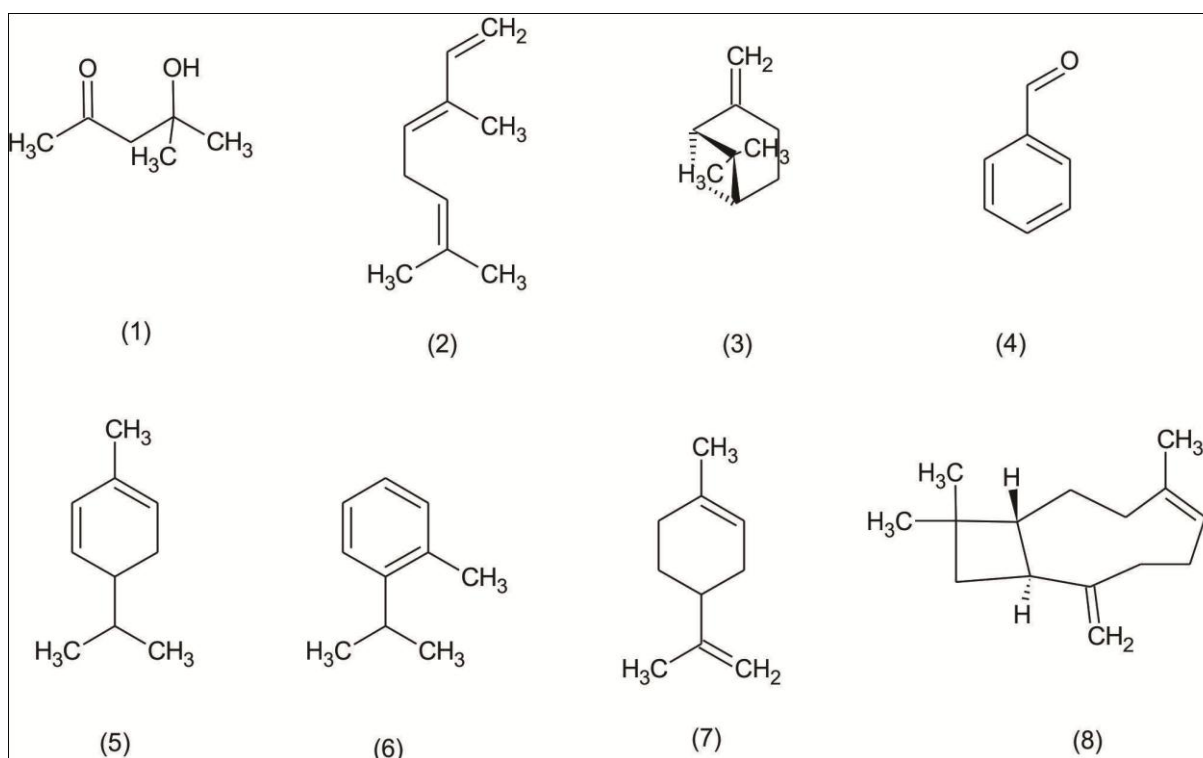
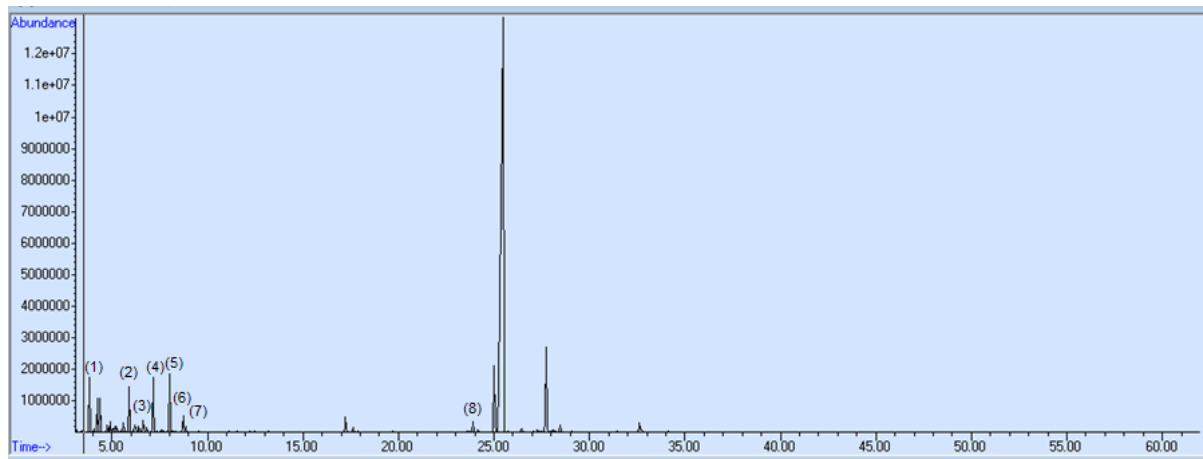
Os compostos que apresentaram maiores percentuais relativos foram o α -pipeno (17,39%), o Sabineno (18,69%) e o *trans*-bergamoteno (19,56%). Seus tempos de retenção, percentual relativo e para os compostos presentes no óleo essencial do morfotipo A estão relacionados na tabela seguinte:

Tabela 1 - Substâncias identificadas, tempo de retenção, percentual relativo e índice de Kovats calculado e da literatura (ADAMS, 2012) do óleo essencial do morfotipo A de *A. triplinervis* por GC-MS.

Composto	t_R (min.)	Porcentagem Relativa (%)	m/z	IK*
4-hidróxi-4-metil-2-pentanona	3,81	5,20	116	839
α -pineno	5,88	17,39	136	939
Benzaldeído	6,63	1,70	106	960
Sabineno	7,04	18,69	136	975
β -pineno	7,15	26,08	136	979
Mirceno	7,55	1,30	136	990
α -felandreno	8,01	5,12	136	1002
o-cimeno	8,71	1,79	134	1026
Limoneno	8,86	1,30	136	1029
Trans-cariofileno	24,79	0,43	204	1408
Trans- α -bergamoteno	25,09	19,56	204	1434
α -humuleno	26,29	1,30	204	1454

A análise por GC-MS dos óleos essenciais do morfotipo B identificou 8 compostos: 4-hidroxi-4-metil-2-propanona (1), *cis*-ocimeno (2), β -pipeno (3), benzaldeído (4), α -felandreno (5), *o*-cimeno (6), limoneno (7) e o *trans*-cariofileno (8), de acordo com o cromatograma seguinte:

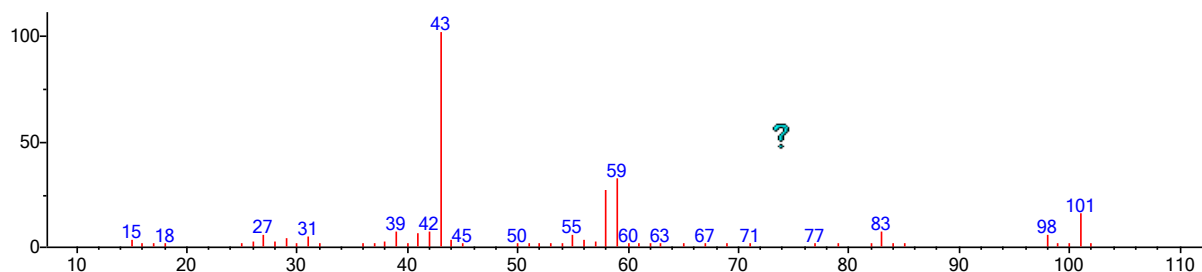
Figura 14 - Cromatograma obtido por CG do óleo essencial do morfotipo B de *A. triplinervis*. Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 60 °C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 3 °C/min. até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 30,0 min.



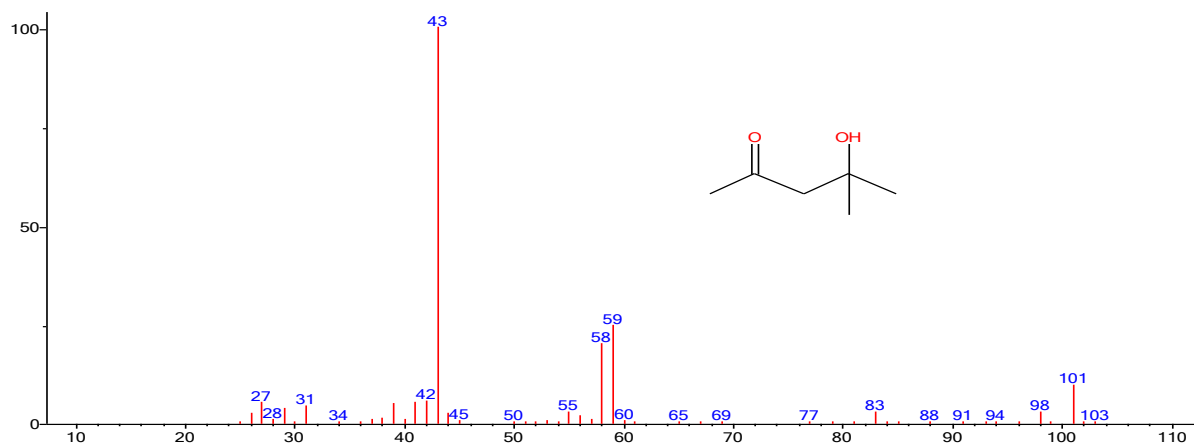
Os espectros de massa foram comparados com o perfil de fragmentação dos espectros de massa da biblioteca Wily/PBM do equipamento e com a literatura (ADAMS, 2012) para identificação dos seus constituintes, de acordo com a figura seguinte:

Figura 15 - Espectros de massas do óleo essencial do morfotipo B de *A. triplinervis* obtidos por GC-MS em comparação com a biblioteca do equipamento.

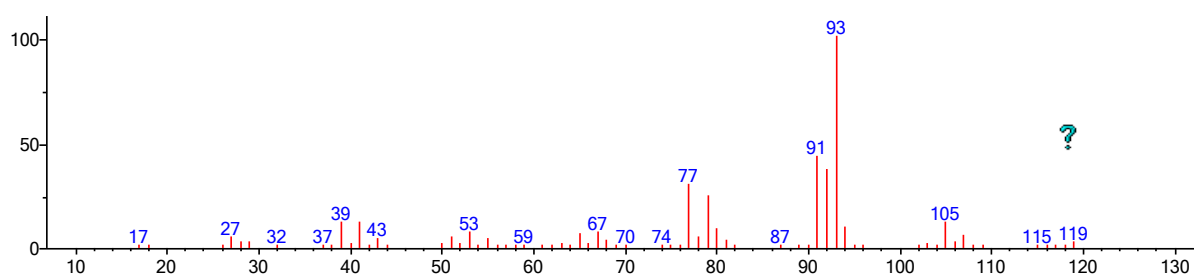
Substância 1 : 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona, tr: 3,80 min.



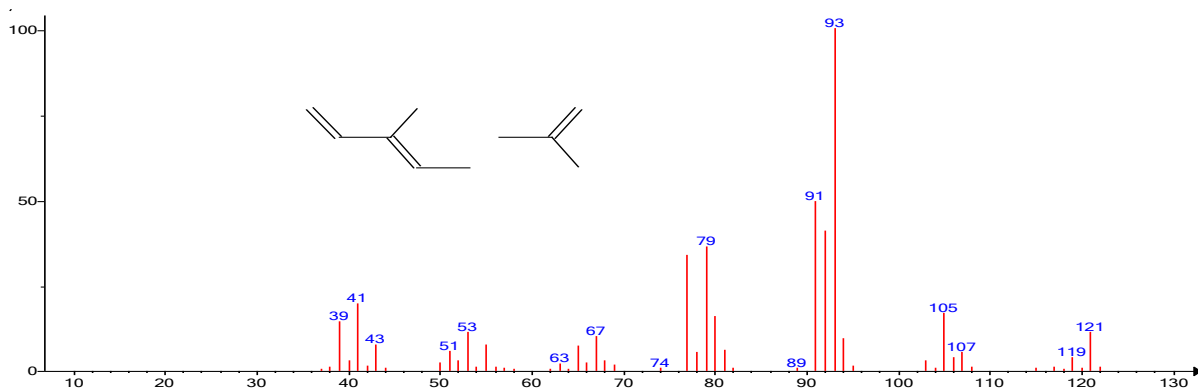
Espectro de massa da biblioteca.



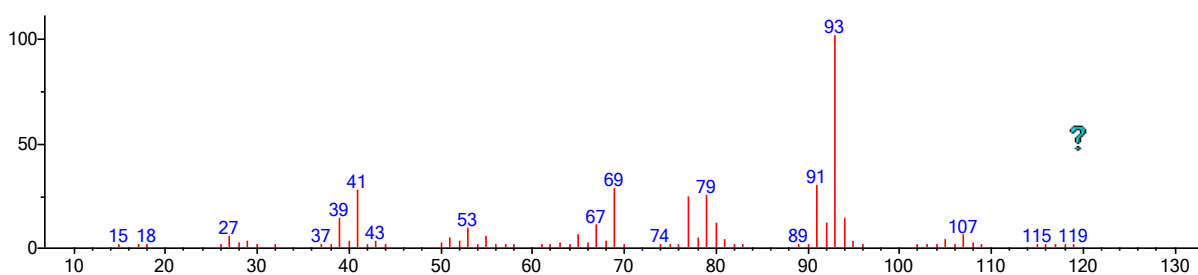
Substância 2: *cis*-ocimeno, tr: 5,90 min.



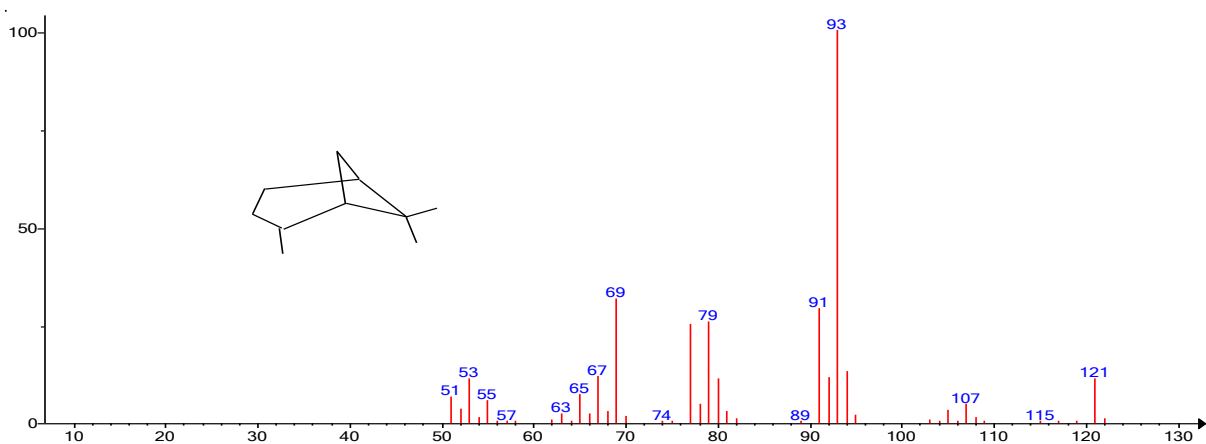
Espectro do massa da biblioteca.



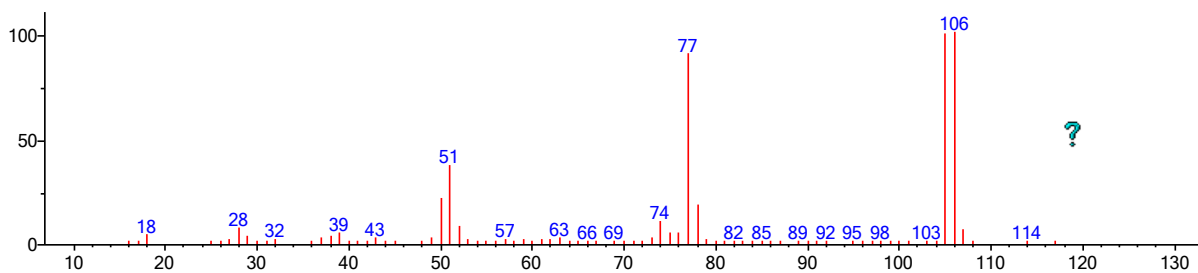
Substância 3: β -pipeno, tr: 7,14 min.



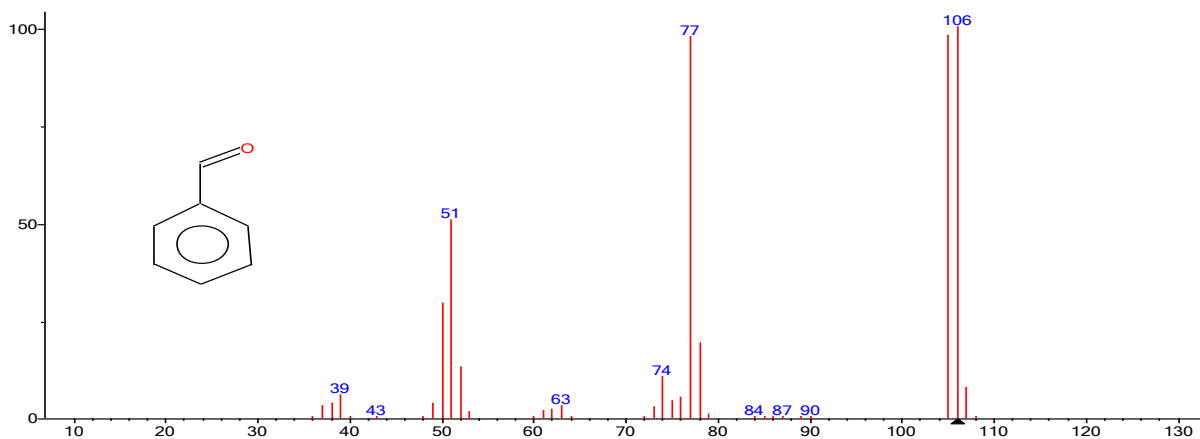
Espectro do massa da biblioteca.



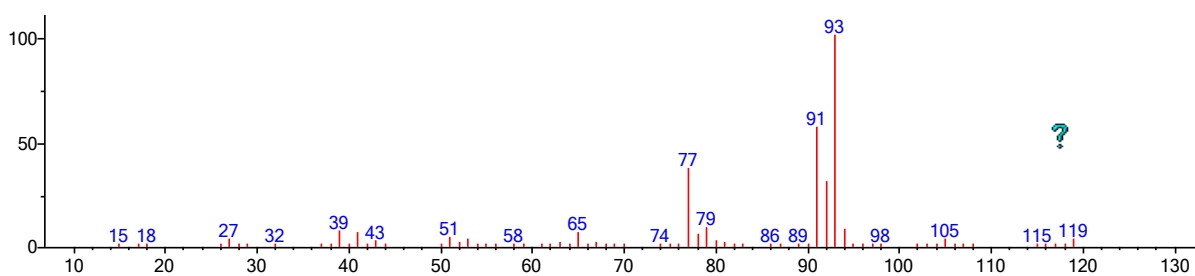
Substância 4: Benzaldeído, tr: 6,63 min.



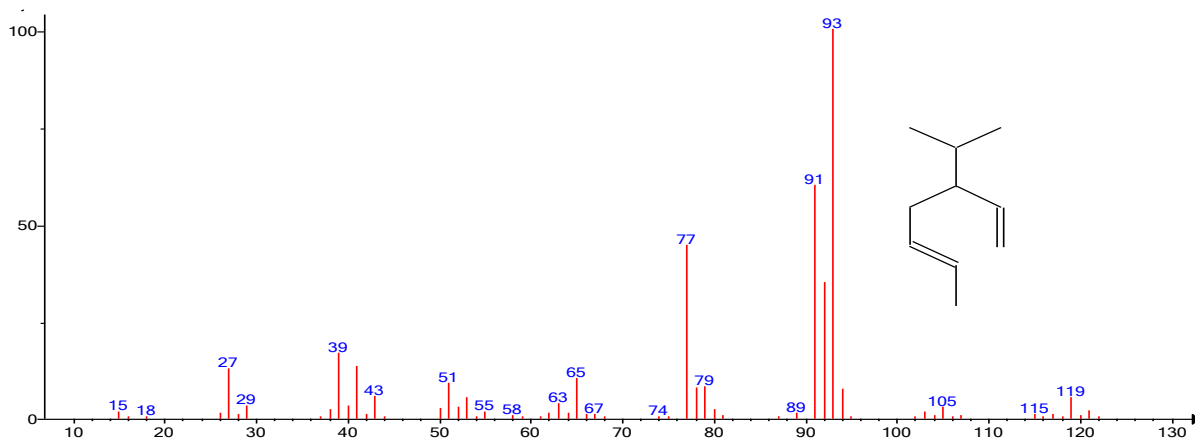
Espectro do massa da biblioteca.



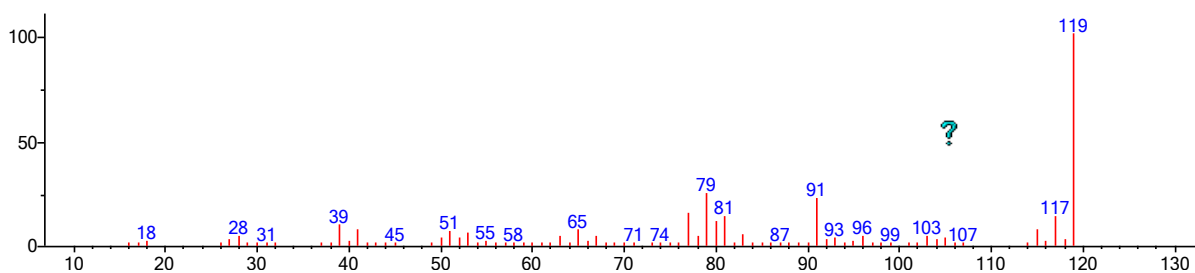
Substância 5: α -felandreno, tr: 8,01 min.



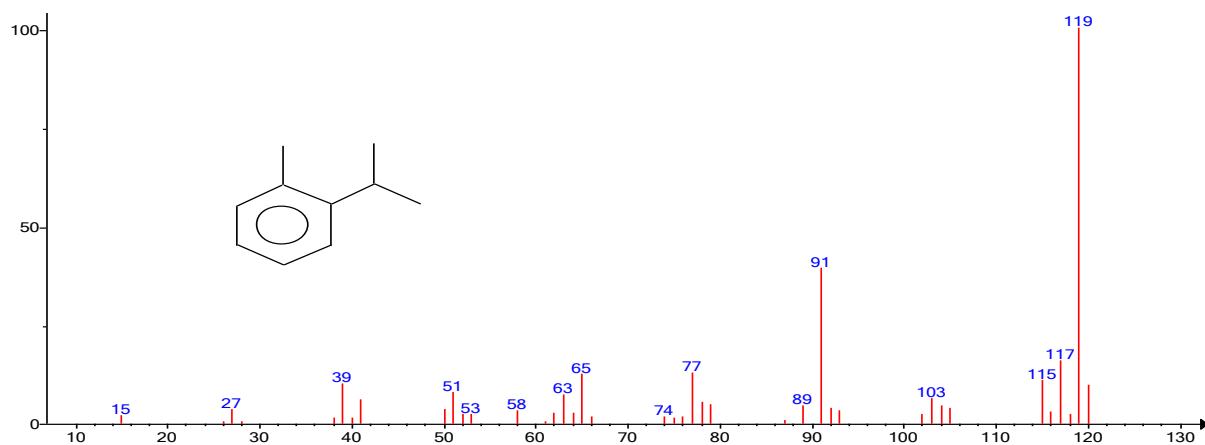
Espectro do massa da biblioteca.



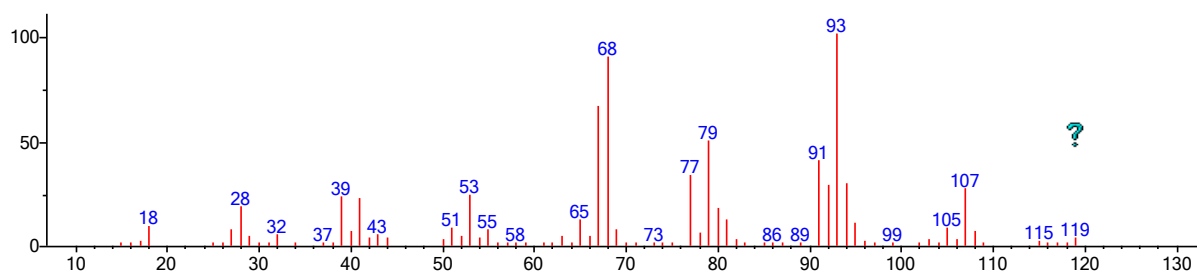
Substância 6: *o*-cimeno, tr: 8,71 min.



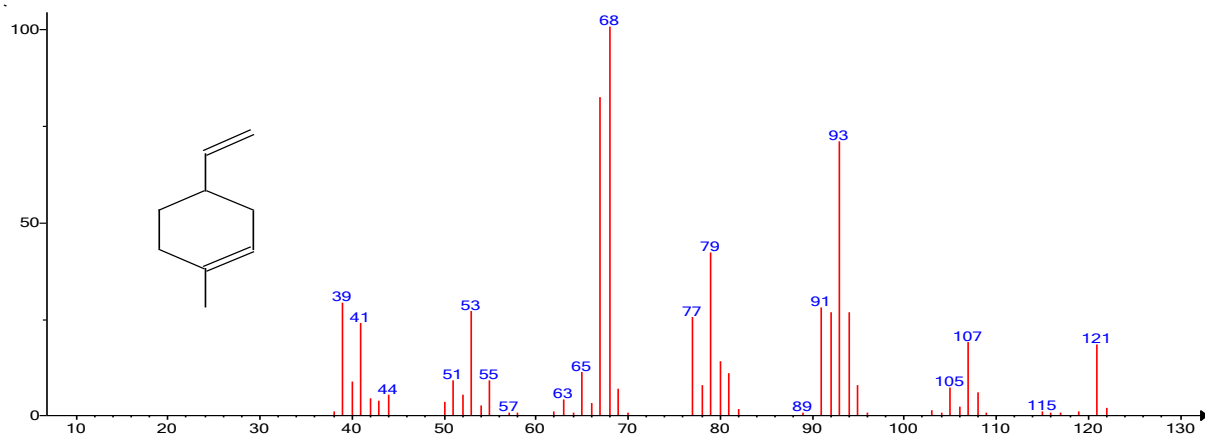
Espectro do massa da biblioteca.



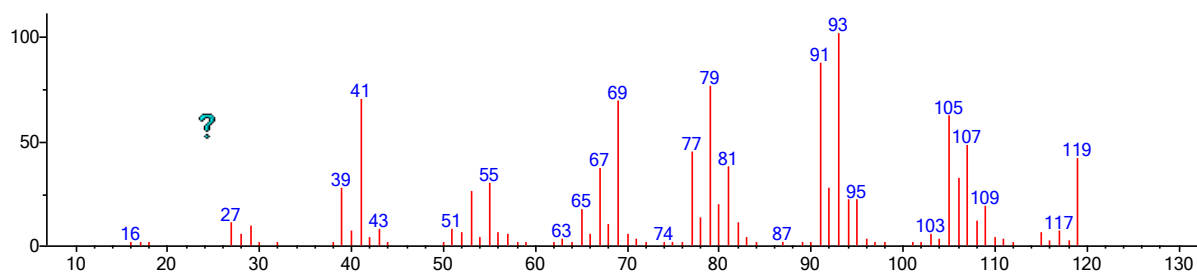
Substância 7: limoneno, tr: 8,86 min.



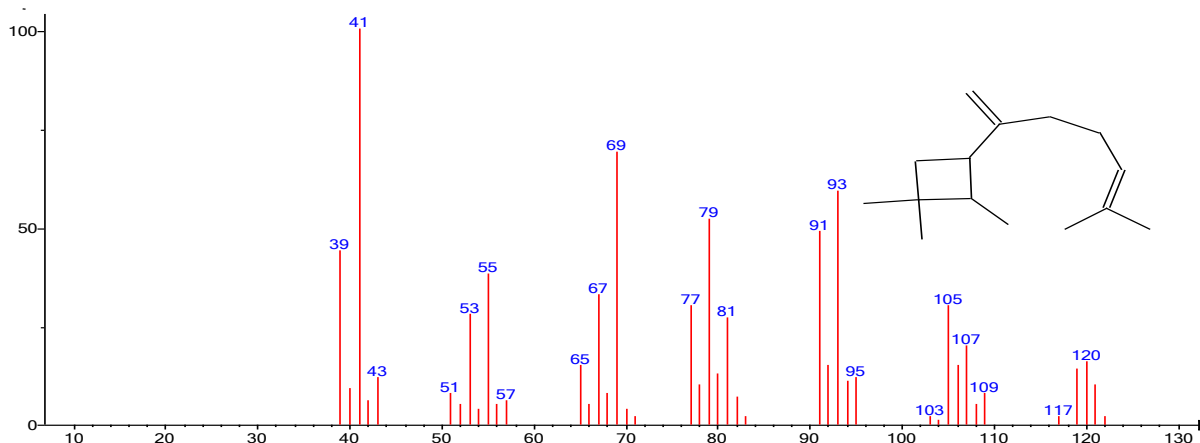
Espectro do massa da biblioteca.



Substância 8: *trans*-cariofileno, tr: 24,99 min.



Espectro do massa da biblioteca.



Os compostos que apresentaram maiores percentuais relativos foram o cis-ocimeno (16,25%), benzaldeído (22,50%) e o α -felandreno (23,73%), seus tempos de retenção, percentual relativo e índice de Kovats da literatura e o calculado para os compostos presentes no óleo essencial do morfotipo B estão relacionados na tabela seguinte:

Tabela 2 - Substâncias identificadas, tempo de retenção, percentual relativo e índice de Kovats calculado e da literatura (ADAMS, 2012) do óleo essencial do morfotipo B de *A. triplinervis* por GC-MS.

Composto	t _R	Percentual Relativo	m/z	IK*
4-hidroxy-4-metil-2-pentanona	3,80	13,5	116	839
Cis-ocimeno	5,90	16, 25	136	1037
β -pineno	7,14	3,75	136	979
Benzaldeído	6,63	22,50	106	960
α -felandreno	8,01	23,73	136	1002
o-cimeno	8,71	5,00	134	1026
Limoneno	8,86	1, 25	136	1029
Trans-cariofileno	24,99	2,50	204	1408

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Antioxidante são compostos capazes de desacelerar ou retardar a oxidação de um material oxidável, mesmo em pequenas concentrações, protegendo as células dos danos do estresse oxidativo e agindo como quimiopreventivo (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013). As plantas produzem uma variedade de metabólitos secundários com atividade antioxidante. Em relação aos óleos

essenciais, a atividade antioxidante é atribuída aos terpenoides e aos fenilpropanoides que apresentam uma estrutura fenólica capaz de reagir com radicais ou reduzir o estresse oxidativo (ANTONHY; DEOLUN-SOBOGUN; SALEH, 2012).

O DPPH é frequentemente utilizado como radical livre com atividade sequestradora baseado na transferência de elétrons e representa um importante mecanismo de ação antioxidante (LI; et al., 2012). Na tabela seguinte é apresentado o percentual de atividade antioxidante para o morfotipo A de *A. triplinervis*:

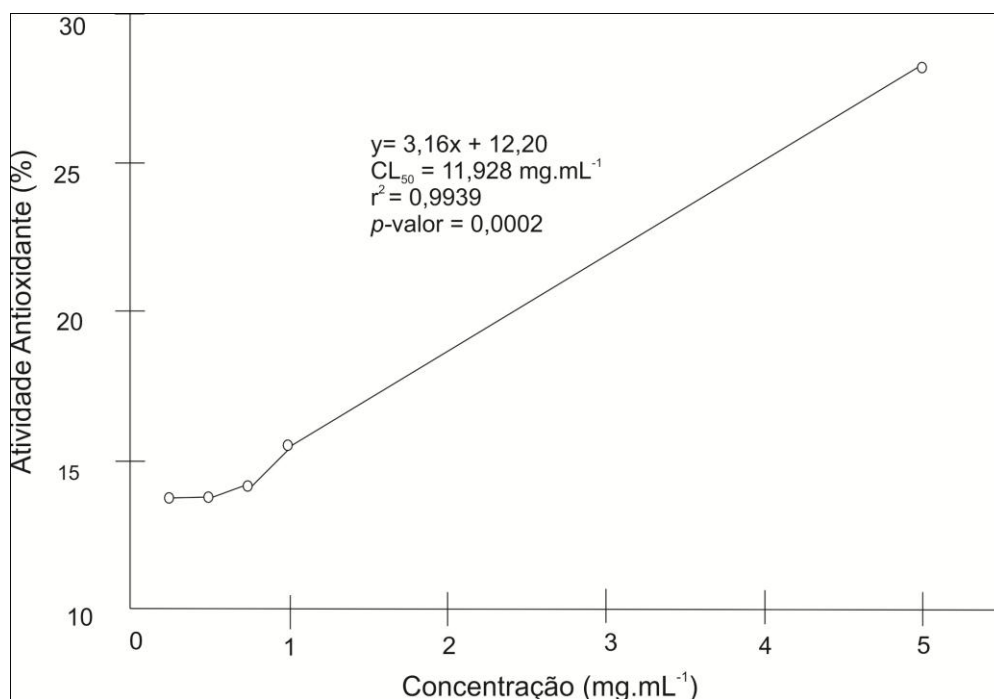
Tabela 3 - Média e desvio padrão do percentual de atividade antioxidante do óleo essencial do morfotipo A de *A. triplinervis* em diferentes concentrações.

Concentração (mg.mL ⁻¹)	Atividade Antioxidante (%)
5	28,166 ± 1,27 ^a
1	15,496 ± 0,45 ^{bc}
0.75	14,120 ± 0,97 ^{cf}
0.5	13,732 ± 0.39 ^{df}
0.25	13,708 ± 0,82 ^{ef}

Na vertical, valores de (%AA) seguidos da mesma letra não apresentam diferenças significativas para Anova ($p < 0.05$).

Como demonstrou o perfil fitoquímico, o α -pineno é uma substância capaz de promover auto-oxidação na presença de agentes oxidantes e proteger o substrato de interesse (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013). Contudo, sua abundância relativa explica o percentual de atividade antioxidante equivalente a $28,166 \pm 1,27$ (%) para concentração de 5 mg.mL⁻¹. Deste modo, foi possível inferir um CL₅₀ equivalente a 11.924 mg.mL⁻¹ com elevada significância estatística (p -valor = 0.0002), como demonstra a figura seguinte:

Figura 16 - Concentração em função do percentual de atividade antioxidante do óleo essencial do morfotipo A de *A. triplinervis*.



Em relação ao morfotipo B, a tabela seguinte relaciona o percentual de atividade antioxidante com a concentração avaliada:

Tabela 4 - Média e desvio do percentual de atividade antioxidante do óleo essencial do morfotipo A de *A. triplinervis* em diferentes concentrações.

Concentração (mg.mL ⁻¹)	Atividade Antioxidante (%)
5	33,000 ± 1,16 ^a
1	16,247 ± 2,80 ^{bf}
0.75	15,932 ± 1,67 ^{cf}
0.5	15,394 ± 4,84 ^{df}
0.25	13,830 ± 0,15 ^{ef}

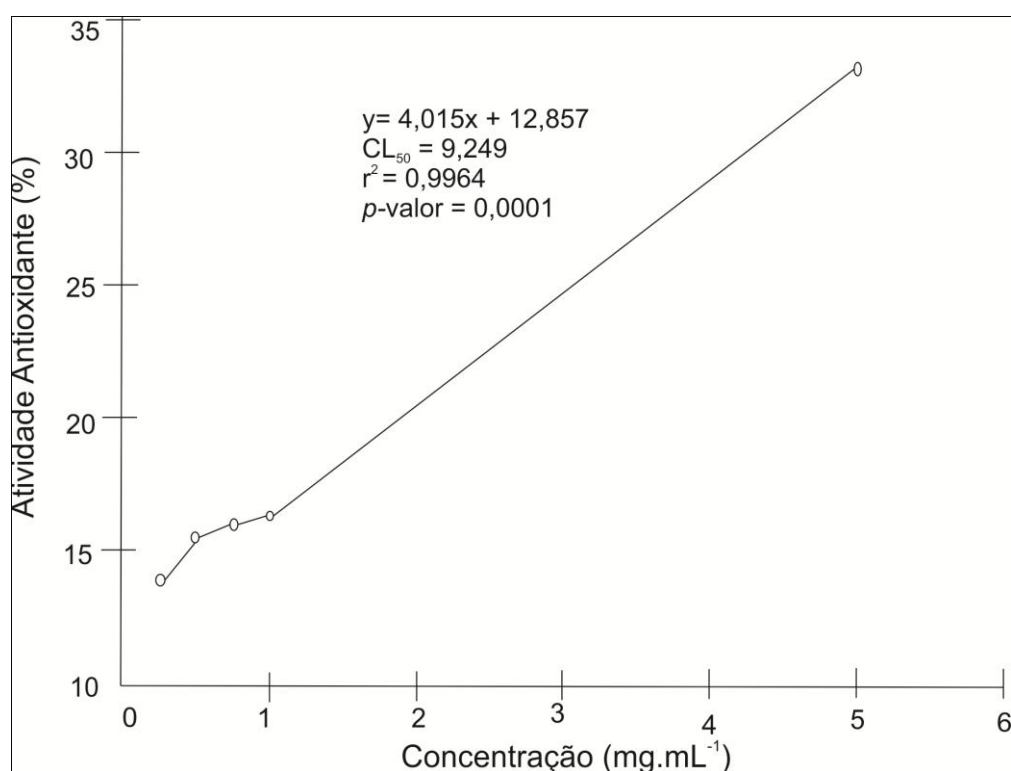
Na vertical, valores de (%AA) seguidos da mesma letra não apresentam diferenças significativas para Anova ($p < 0.05$).

. A atividade antioxidante é atribuída ao perfil fitoquímico dos compostos que constituem os óleos essenciais, porém, levando em consideração a complexidade de substâncias distintas em diferentes quantidades, torna-se difícil fazer uma correlação entre atividade antioxidante e substâncias presentes. Para tentar explicar essa atividade antioxidante, muitas pesquisas sugerem o conceito de sinergismo, antagonismo e aditividade (MIRANDA, 2010). Contudo, Li et al. (2012) afirmam que

substâncias cetônicas ou fenólicas presentes em óleos essenciais influenciam na atividade antioxidante.

No morfotipo B foi detectado a presença do benzaldeído, composto supostamente relacionado ao maior percentual de atividade antioxidante quando comparado com o morfotipo A. Na concentração equivalente a 5 mg.mL^{-1} , o percentual de atividade antioxidante equivaleu a $33,00 \pm 1,16\%$, a CL_{50} estimada foi de $9,249 \text{ mg.mL}^{-1}$ com elevada significância estatística dos dados ($p\text{-valor} = 0,0001$), como demonstra o gráfico da figura seguinte, que relaciona o percentual de atividade antioxidante com a concentração:

Figura 17 - Concentração em função do percentual de atividade antioxidante do óleo essencial do morfotipo B de *A. triplinervis*.



Os óleos essenciais dos morfotipos A e B de *A. triplinervis* podem indicar resultados significativos de atividade antioxidante *in vivo* em decorrência de apresentarem CL_{50} igual a 11,928 e 9,249 (mg.mL^{-1}), considerando as investigações de Melo et al. (2013) que avaliaram a atividade antioxidante *in vivo* de extratos hidroetanólico de folhas de *A. triplinervis* coletadas no vilarejo de Acará (PA) e demonstraram uma diminuição no nível de óxido nítrico em dose entre 100 e 600

mg.Kg⁻¹. Além disso, um estudo realizado por Bose et al. (2007), relataram o efeito antioxidante de extratos metanólicos de folhas proveniente do Irã em roedores submetidos à danos no fígado em dose a partir de 100 mg.Kg⁻¹,

5.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

As análises toxicológicas em *A. salina* é um bioensaio preliminar que avalia a toxicidade das substâncias em face aos organismos marinhos (RAMOS; RODRIGUES; ALMEIDA, 2014). Nguta et al. (2011) classificaram os extratos vegetais, em graus de toxicidade contra larvas de *A. salina*, conforme intervalo, no qual são considerados com valores de CL₅₀ menores que 100 µg.mL⁻¹ apresentam alta toxicidade, entre 100 e 500 µg.mL⁻¹ toxicidade moderada, CL₅₀ entre de 500 e 1000 µg.mL⁻¹ fraca toxicidade e CL₅₀ acima de 1000 µg.mL⁻¹ são considerados atóxicos. Os dados da tabela 4 demonstram 100% de percentual de mortalidade em todas as concentrações avaliadas durante 24 horas de exposição, demonstrando elevada toxicidade.

Tabela 5 - Percentual de mortalidade dos óleos essenciais dos morfotipos A e B de *A. triplinervis* em diferentes concentrações frente a *A. salina*.

Mortalidade (%)							
Morfotipo	1250	100	500	250	100	10	1
A	100	100	100	100	100	100	100
B	100	100	100	100	100	100	100

Dados semelhantes foram encontrados por Ramos (2014), que avaliou a citotoxicidade de óleo essencial de *H. crenata* coletadas na cidade de Macapá, demonstrou elevada citotoxicidade, com CL₅₀ igual a 8,8 µg.mL⁻¹.

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

O percentual de atividade larvicida em diferentes concentrações foi avaliado em 24 e 48 horas após o início do ensaio biológico, os resultados estão expressos na tabela seguinte:

Tabela 6 - Percentual de atividade larvica do morfotipo A de *A. triplinervis* em diferentes concentrações durante dois intervalos de tempo.

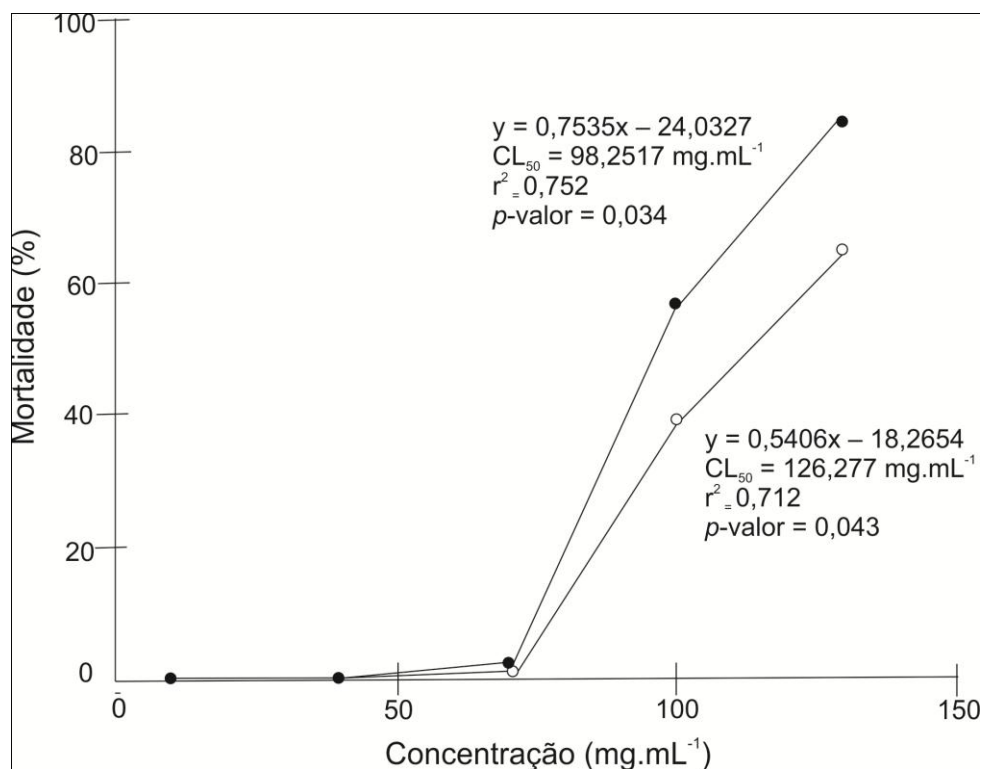
Concentração (mg.mL ⁻¹)	Atividade Larvica (%)	
	24 horas	48 horas
130	65,89	84,59
100	30,39	56,86
70	1,59	2,10
40	0	0
10	0	0

Os resultados não demonstram mortalidade de imaturos em 10 e 40 mg.mL⁻¹ nos dois períodos de avaliação, a mortalidade de 65,89% e 84,59% para os períodos de 24 e 48, respectivamente, foi estimada na concentração equivalente a 130 mg.mL⁻¹. De acordo com Kumar et al. (2011), os óleos essenciais afetam os processos bioquímicos e perturbam o sistema endócrino dos insetos. Como os óleos essenciais se apresentam como uma mistura complexa de composto, definir com exatidão quais atuam diretamente no controle químico dos imaturos é uma tarefa complexa, pois o efeito biológico pode refletir a ação do componente majoritário ou é resultado da ação sinérgica dos constituintes. Contudo, há relatos na literatura que indicam que os monoterpenos apresentam atividade inseticida frente a larvas de *A. aegypti* (LIMA; et al., 2013).

Outro possível composto com atividade larvica em imaturos presentes no óleo essencial do morfotipo A de *A. triplinervis* é o benzaldeído. De acordo com Kumar et al. (2011), os terpenoides oxigenados apresentam melhores atividades que os não oxigenados em decorrência da diferenciação de seus grupos químicos e insaturações. A ação possivelmente está ligada ao bloqueio da síntese da acetilcolinesterase (AChE) pelo óleos essenciais, que desempenham papel colinérgico nas sinapses de insetos e animais superiores para a condução nervosa.

O gráfico seguinte relaciona concentração (mg.mL⁻¹) em função do percentual de mortalidade. Para a avaliação em 24 horas, a CL₅₀ estimada foi equivalente a 126.27 mg.mL⁻¹ e para 48 horas o valor foi igual a 98. 251 mg.mL⁻¹, ambos inferiores ao limite probabilístico de erro.

Figura 18 - Mortalidade de larvas de *A. aegypti* em diferentes concentrações de solução de óleos essenciais do morfotipo A de *A. triplinervis*.



Um estudo realizado por Zhun e Tian (2011) que avaliava a atividade larvicida de óleos essenciais de *B. densiflora* (Asteraceae) oriunda de uma província da China demonstrou a presença nos compostos majoritário de α -pineno, β -pineno, β -cariofileno e α -bergamoteno com mortalidade de $100 \pm 00\%$ em 100 mg.mL^{-1} no período de 24 horas, e mortalidade de $97 \pm 4.5\%$ em 30 horas contra larvas de *A. anthropophagus*. Em outro estudo utilizando óleos essenciais de *Artemisia gilvenscens* (Asteraceae), foram encontrados como compostos majoritários o α -pineno, β -pineno, α -bergamoteno, limoneno e o cariofileno demonstrou mortalidade de 100% na concentração de 150 mg.L^{-1} contra larva de *A. anthropophagus*, $8 \pm 2,23\%$ mortalidade em 12 mg.L^{-1} e um CL_{50} equivalente a $49,95 \text{ mg.L}^{-1}$ em 12 horas de exposição (ZHUN; TIAN, 2013). Portanto, de acordo com a definição de Cheng (2003), os óleos essenciais do morfotipo A podem ser considerado como larvicida em potencial, pois seu valor de CL_{50} ficou abaixo de 100 ppm no período de 48 horas.

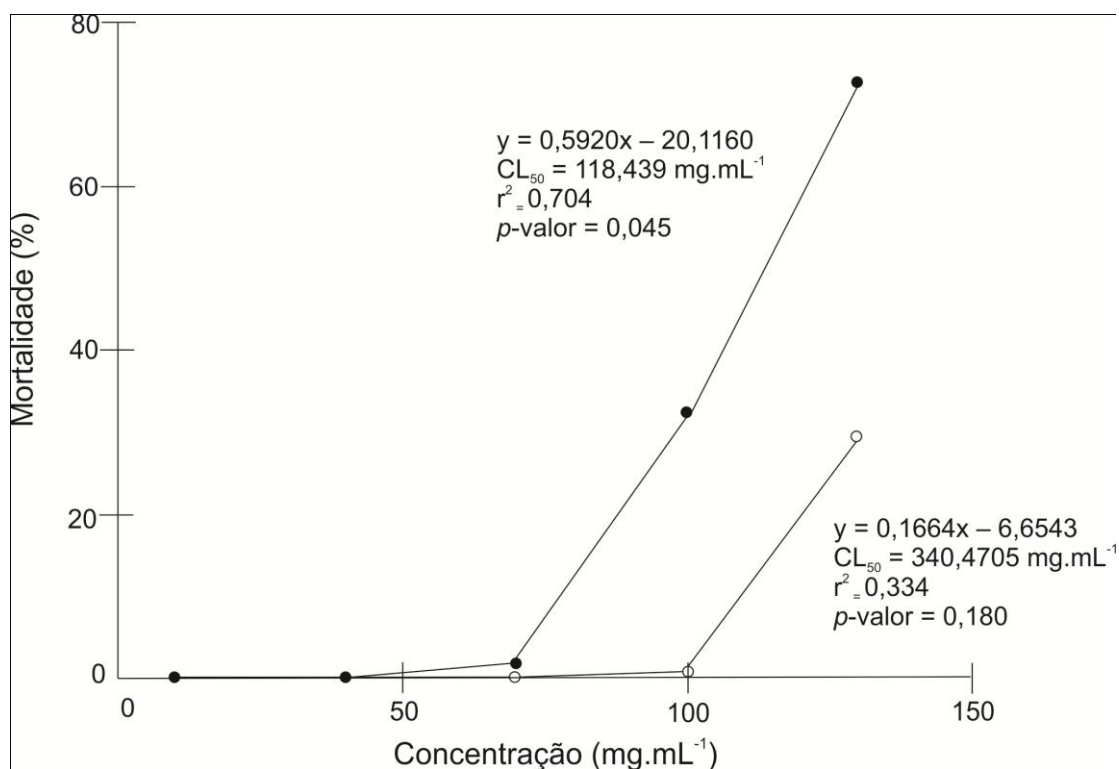
Em relação ao óleos essenciais do morfotipo B de *A. triplinervis*, os dados de mortalidade em função da concentração estão expressos na tabela seguinte:

Tabela 7 - Percentual de atividade larvica do morfotipo B de *A. triplinervis* em diferentes concentrações durante dois intervalos de tempo.

Concentração (mg.mL ⁻¹)	Atividade Larvica (%)	
	24 horas	48 horas
130	24,95	72,65
100	0,03	32,30
70	0	1,67
40	0	0
10	0	0

Para o período de 12 horas não foi constada mortalidade entre 10 e 70 mg.mL⁻¹, e na concentração equivalente a 130 mg.mL⁻¹ o percentual de mortalidade equivaleu a 24,95%. No período de 48 horas a mortalidade nas concentrações entre 10 e 40 mg.mL⁻¹ foi nula, em 70 mg.mL⁻¹ foi de 1,67%, na maior concentração avaliada, 130 mg.mL⁻¹ a mortalidade apontada foi de 72,65% em imaturos de *A. aegypti*, de acordo com a figura seguinte:

Figura 19 - Mortalidade de larvas de *A. aegypti* em diferentes concentrações de solução de óleos essenciais do morfotipo B de *A. triplinervis*.



A CL_{50} estimada para o período de 24 horas foi equivalente a 340,470 mg.mL⁻¹, indicando um p -valor superior ao limite probabilístico de erro (0.05), portanto, sem

significância estatística dos dados. Em relação ao período de 48 horas, a CL_{50} foi igual a $118,439 \text{ mg.mL}^{-1}$ e significância estatística dos dados. Contudo, o morfotipo B indicas dados superiores de CL_{50} se comparado com o morfotipo A de *A. triplinervis*. Esses resultados são semelhantes ao estudo realizado por Ali et al. (2014) que avaliou a atividade larvicida contra *A. aegypti* de óleos essenciais das subespécies *Tanacetum argenteum* (Lam.) Willd. subsp. *argenteum* (Lam.) e *T. argenteum* (Lam.) Willd. subsp. *canum* (C. Koch) (Asteraceae) oriundas da Turquia, o seu dados demostraram CL_{50} equivalente a $93,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ para a subespécie *argenteum* e uma mortalidade equivalente a 40% na maior concentração avaliada para a subespécie *canum*, ambas apresentando compostos como compostos majoritário o α -pineno com 67,9 e 53,6%, respectivamente. No entanto, os mesmo autores determinaram CL_{50} da atividade larvicida individual do β -pineno, uma das substâncias majoritárias encontradas no morfotipo B, equivalente a $56,50 \text{ mg.mL}^{-1}$.

De acordo com a classificação de Cheng et al. (2003), é possível classificar o óleo essencial do morfotipo A como reativo à imaturos de *A. aegypti*, pois apresentou CL_{50} inferior a 100 ppm no tempo de exposição igual a 48 horas.

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ADULTICIDA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A toxicidade do óleo essencial do morfotipo A de *A. triplinervis* foi avaliada em relação à mortalidade de adultos de *A. aegypti* em período de 24 e 48 horas em diferentes concentrações, os resultados estão expressos na tabela seguinte:

Tabela 8 - Mortalidade de adultos de *A. aegypti* em percentual, frente a diversas concentrações de óleos essenciais do morfotipo A de *A. triplinervis* em dois períodos.

Concentração (mg.mL^{-1})	Atividade Adulticida (%)	
	24 horas	48 horas
100	90,62	95,31
75	70,82	89,15
50	24,29	59,47
25	7,90	33,32

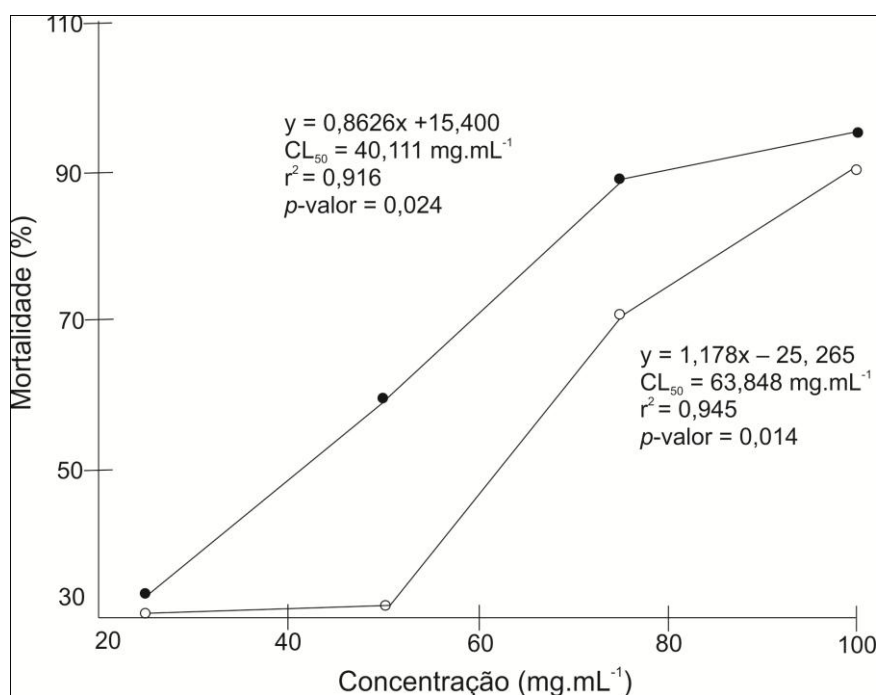
Em relação a 25 mg.mL^{-1} , a mortalidade foi cerca de 78% superior no período de 48 horas do que em relação ao período de 24 horas. Em ambos os períodos, a mortalidade de adultos aumentou progressivamente chegando a 90,62% para 24

horas na maior concentração avaliada, equivalente a 100 mg.mL^{-1} , e 95,31% para o período de 48 horas em concentração equivalente.

Em relação à toxicidade dos óleos essenciais em adultos de *A. aegypti*, o principal canal de entrada para o organismo é a inalação através da traquéia, onde entram na circulação da hemolinfa, são absorvidos pelas proteínas e transportados pelo corpo até chegar ao seu local de ação (LUCIA; ZERBA; MASUH, 2013). Entre os terpenos com reconhecida atividade inseticida encontrados no morfotipo A da espécie, estão o α -pineno (29,05%). Em um estudo efetuado por Lucia, Zerba e Masuh (2013) foi relatada a ação do efeito tóxico do monoterpeneo α -pineno em *A. aegypti* através da ação neurotóxica no sistema nervoso dos insetos, determinando uma CL_{50} equivalente a $15,87 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Em um estudo realizado por Cárdenas, Rojas e Rondón (2012) que avaliou a atividade adulticida de óleos essenciais de *Monticalia greenmaniana* (Asteraceae) frente ao mosquito *Lutzomyia migonei*, determinou um DL_{50} equivalente a $0,0051 \text{ mg.mL}^{-1}$. Após o ensaio adulticida, a CL_{50} determinada foi equivalente a $63.848 \text{ mg.mL}^{-1}$ para o período de 24 horas (p -valor = 0.014) e $40.111 \text{ mg.mL}^{-1}$ para 48 horas (p -valor = 0,024), ambos com elevada significância estatísticas dos dados, de acordo com o gráfico da figura seguinte:

Figura 20 - Percentual de mortalidade de adultos de *A. aegypti* em função da concentração de óleo essencial do morfotipo A de *A. triplinervis*.



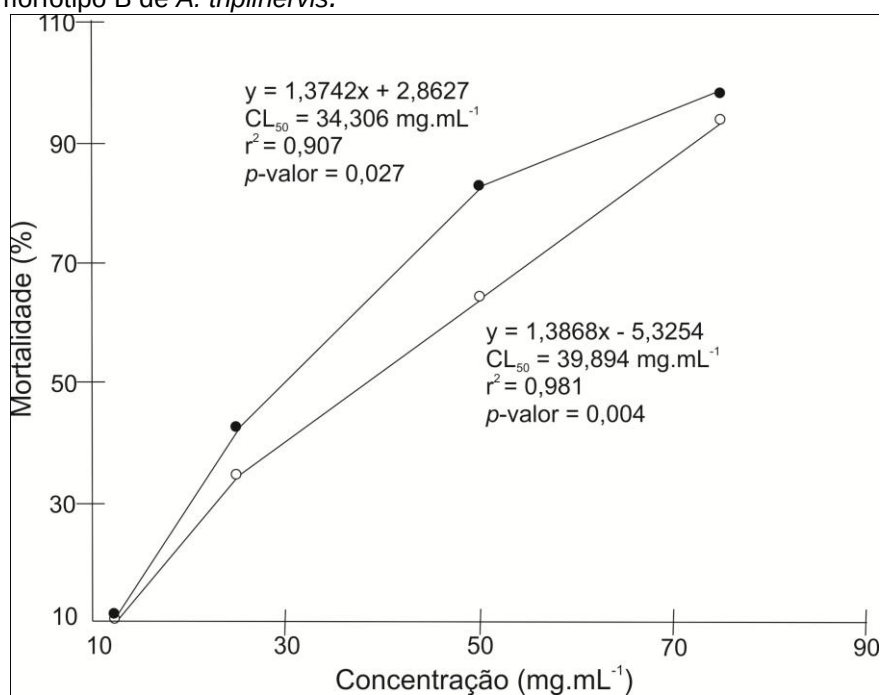
O ensaio preliminar de toxicidade em adultos de *A. aegypti* orientou a realização do bioensaio utilizando concentrações dos óleos essenciais do morfotipo B de *A. triplinervi* equivalentes a 75, 50, 25 e 12,5 mg.mL⁻¹, de acordo com a tabela seguinte:

Tabela 9 - Mortalidade de adultos de *A. aegypti* em percentual, frente a diversas concentrações de óleos essenciais do morfotipo B de *A. triplinervis* em dois períodos.

Concentração (mg.mL ⁻¹)	Atividade Adulticida (%)	
	24 horas	48 horas
70	96,80	98, 20
50	65,41	82,70
25	34,57	42,48
12,5	7, 27	11,38

Na menor concentração avaliada, 12,5 mg.mL⁻¹, a mortalidade no período de 12 horas foi equivalente a 7, 27%, enquanto que no período de 48 horas foi igual a 11,38%. Nas concentrações superiores o percentual de mortalidade subiu significativamente chegando a 96,80% em 12 horas de exposição até 98,20% em 48 na concentração equivalente a 70 mg.mL⁻¹. Como indica Kumar et al. (2011), a natureza lipofílica dos óleos essenciais de plantas interfere basicamente no metabolismo bioquímico, fisiológico e funções comportamentais dos insetos. Deste modo, CL₅₀ de óleos essenciais do morfotipo A de *A. triplinervis* frente mosquitos adultos de *A. aegypti* foi equivalente a 39,894 mg.mL⁻¹ para o período de 24 horas de exposição, e para 48 horas a CL₅₀ estimada foi de 34,306 mg.mL⁻¹ com elevada significância estatística dos dados, como demonstra o a figura seguinte:

Figura 21 -Percentual de mortalidade de adultos de *A. aegypti* em função da concentração de óleo essencial do morfotipo B de *A. triplinervis*.



De acordo com a classificação da USAID (2012) -United State Agency for International Desenvolepment- é possível afirmar que os adultos de *A. Aegypti* são susceptíveis os óleos essenciais do morfotipo A e B de *A. triplinervis*.

6 CONCLUSÕES

A composição fitoquímica indicou 12 substâncias para o morfotipo A e 8 para o morfotipo B. Os compostos β -pipeno, sabineno, Mirceno, *trans*- α -bergamoteno e α -humuleno foram exclusivamente encontrados no morfotipo A, enquanto que no morfotipo B foi detectado o *cis*-ocimeno. As substâncias 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona, benzaldeído, β -pipeno, α -felandreno, *o*-cimeno, limoneno e *trans*-cariofileno mostraram-se presentes nos óleos essenciais dos dois morfotipos analisados. Os dados indicam uma distinção na constituição fitoquímica dos óleos essenciais de *Ayapana triplinervis* com o disponível na literatura, tais variações podem ser decorrente dos fatores abióticos em relação ao quimiotipo melhor adaptado da espécie vegetal.

A avaliação da atividade antioxidante indicou uma CL_{50} menor para o morfotipo B em comparação ao A, equivalente a $9,249 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $11,928 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente. Tais resultados contribuem para o enriquecimento das informações científicas que buscam alternativas naturais de novas substâncias antioxidantes em detrimento das industrializadas suspeitas de provocar danos à saúde humana.

O bioensaio de atividade inseticida em imaturos de *A. aegypti* demonstrou potencial atividade larvicida do óleo essencial do morfotipo A no período de 48 horas de exposição, cuja $CL_{50} = 98,251 \text{ mg.mL}^{-1}$, e um valor aproximado para o morfotipo B no mesmo período com $CL_{50} = 118,439 \text{ mg.mL}^{-1}$. Em relação a avaliação da atividade inseticida, foi observado a susceptibilidade de adultos de *A. aegypti* a ambos os óleos essenciais, indicando $CL_{50} = 63,498 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $40,111 \text{ mg.mL}^{-1}$ para os períodos de avaliação em 24 e 48 horas do morfotipo A, e um resultado mais sensível para o morfotipo e $CL_{50} = 39,894 \text{ mg.mL}^{-1}$ no período de 24 horas e $34,306 \text{ mg.mL}^{-1}$ para o período de 48 horas, demonstrando que os óleos essenciais do morfotipo A de *A. triplinervis* portanto, uma fonte promissora de potenciais agentes eficientes para o controle químico de imaturos e adultos de *A. aegypti*, ajudando na quimiosistemática da espécie com importantes contribuições para um eventual reclassificação botânica.

REFERÊNCIAS

ADAM, P.; et al. Biosynthesis of Terpenes: Studies on 1-Hydroxi-2-Methyl-2-(E)-Butenyl-4-Disphosphate Reductase. **PNAS**, v. 99, n. 19, p. 12108-12113, 2002.

ADAMS, R. **Identification Of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry**. 4th ed. Carol Stream: Allured Business Media, p. 804, 2012.

ADIO, A. M. **Isolation and Structure Elucidation of Sesquiterpenoids from ther Essential Oils of Some Liverworts (Hepaticae)**. 2005, 266 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica) University of Hamburg, Hamburg, 2005.

ALCÂNTARA, J. M.; et al. Composição Química e Atividade Biológica dos Óleos Essenciais das Folhas e Caules de *Rhodostemonodaphne parvifolia* Madriñán (Lauraceae). **Acta Amazônica**, v. 40, n. 3, p. 567-572, 2010.

ALLINGER, N.; et al. **Química Orgânica**. 2 ed. Rio de Janeiro: LTC, p. 961, 2011.

ALI, A.; et al. Chemical Composition, Larvicidal, and Biting Deterrent Activity of Essential Oils of Two Subspecies of *Tanacetum argenteum* (Asterales: Asteraceae) and Individual Constituents Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 4, p. 824-830, 2014.

ALVES, L. F. Produção de Fitoterápicos no Brasil: história, problemas e perspectivas. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 450-513, 2013.

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.

ARUNG, E. T.; et al. Validation of *Eupatorium triplinerve* (Vahl) Leaves, a Skin Care Herb from East Kalimantan, Using a Melanin Biosynthesis Assay. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 5, n. 2, p. 87-92, 2012.

ASCENSÃO, L. Estrutura Secretoras em Plantas: uma abordagem morfoanatômica. In: FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G. **Potencialidades e Aplicações de Plantas Aromáticas Medicinais**. 3 ed. Lisboa: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2007, p. 19-28.

BARBOSA, F. F.; et al. Influência da Temperatura do Ar de Secagem Sobre o Teor e a Composição Química do Óleo Essencial de *Lippia alba* (Mill) N. E. BROWN. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1221-1225, 2006.

BARBOSA, W. L. R.; SILVA, W. B.; SOLER, O. Etnofarmácia: Uma abordagem das plantas medicinais na perspectiva das ciências farmacêuticas. In: BARBOSA, W. L. R. (Org.). **Etnofarmácia: fitoterapia popular e ciência farmacêutica**. Curitiba: CRV, 2011.

BOSE, P.; et al. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Eupatorium ayapana* against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. **Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics**, v. 6, n.1, p. 27–33, 2007.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade Brasileira**: avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade dos biomas brasileiro. Brasília: MMA/SBF, 2002, p. 404.

BREMER, K. **Asteraceae**: cladistic and classifications. Portland: Timber, 1994, p. 752.

BURGER, M. E.; et al. Action of the Extracts of *Pluchea sagittalis* on the Absorptive Characteristics of the Gastrointestinal Tract. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, n. 1, p. 262-270, 2000.

CANTON, M.; ONOFRE, S. B. A Interferências de Extratos *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae, Sobre Atividade de Antibióticos Usados na Clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 348-354, 2010.

CÁRDENAS, J.; ROJAS, J.; RONDÓN, M. Adulticide Effect of *Monticalia greenmaniana* (Asteraceae) Against *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). **Parasitol Resourch**, v. 111, n. 3, p. 787–794, 2012.

CARMO, T. N.; et al. Plantas Comerciais e Ritualística Comercializadas na Feira da 25 de Setembro, Belém, Pará. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 21, p. 3440-3467, 2015.

CHEMIN, B. F. **Manual da Univates para Trabalhos Acadêmicos**: planejamento, elaboração e apresentação. 2 ed. São Paulo: Casa do Psicólogo, 2010, p.315.

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.

CONSOLI, A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 228 p. 1994.

CORREIA, M. V. **Redes Neurais e Algoritmos Genéticos no Estudo Quimiossistemático da Família Asteraceae**, 2010, p.191. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

COSTA, E. V. M. **Estudo Etnobotânico sobre Plantas Utilizadas como Antimaláricas no Estado do Amapá e Avaliação da Atividade Antimalárica e Toxicidade Aguda da *Amasonia capestris* (Aubl) Moldenke**. 2013, p. 142. Tese (Doutorado em Biodiversidade Tropical) – Fundação Universidade Federal do Amapá, 2013.

COSTA, J. G. M.; et al. Composição Química e Avaliação da Atividade Antibacteriana e Toxicidade do Óleo Essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 583-586, 2008.

COSTA, J. G. M.; et al. Estudo Químico-Biológico dos Óleos Essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* Frente às Larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 304-309, 2005.

COSTA, R. A. A Identidade e o Conhecimento Etnobotânico dos Moradores da Floresta Nacional do Amapá. 2013, p. 104. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2013.

CRUZ, D. L. **Avaliação da Atractividade de Substâncias Testadas em Ovitampas Usadas na Monitorização de *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (Díptera: Culicidae) na Cidade da Praia, Cabo Verde**. 2015, 100 p. Monografia (Licenciatura em Análises Clínicas e Saúde Pública) – Universidade Jean Piaget do Cabo Verde, Santiago, 2015.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 2nd ed. Englewood: John Wiley & Sons Ltd., p. 515, 2002.

DIALLO, D.; et al. Zika Virus Emergence in Mosquitoes in Southeastern Senegal, 2011. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 1-9, 2014.

DUQUE, M. M. M. M. ***Tagetes erecta* L. Uma Planta de Muitos Propósitos: antibacteriana, larvicida e antiviral.** 2006, 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual do Ceará, 2006.

EMERENCIANO, V. P.; et al. Um Novo Método para Agrupar Parâmetros Quimiotaxonômicos. **Química Nova**, v. 21, n. 2, p.125-129, 1998.

ETHUR, L. Z.; et al. Comércio Formal e Perfil de Consumidores de Plantas Medicinas e Fitoterápicos no Município de Itaqui-RS. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 2, p.121-128, 2011.

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

FURTADO, R. F.; et al. Atividade Larvicida dos Óleos Essencias Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 843-847, 2005.

GALLEGO, V.; et al. The 2014 FIFA World Cup: Communicable Disease Risks and Advice for Visitors to Brazil - A review from the Latin American Society for Travel Medicine (SLAMVI). **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 12, p. 208-218, 2014.

GARCEZ, W. S.; et al. Substâncias de Origem Vegetal com Atividade Larvicida Contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual Química**, v. 5, n. 3, p. 363-393, 2013.

GAUVIAN-BIALECKI, A.; MARONDON, C. Essential Oil of *Ayapana triplinervis* from Reunion Island: A God Natural Source of Trymohydroquinone Dymethyl Ether. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 853–858, 2009.

GERBER, E.; et al. Prospects for Biological Control of *Ambrosia artemisiifolia* in Europe: learning from the past. **Weed Research**, v. s/v, n. s/n, United Kingdom, 2011.

GRIFFITHS, J. A Brief History of Mass Spectrometry. **Analitical Chemistry**, v. 80, p. 5678–5683, 2008.

GUPTA, M. et al. Antimicrobial Activiti of *Eupatorium ayapana*. **Fitoterapia**, v. 73, n. s/n, p. 168-170, 2002.

IOOS, S.; et al. Infections par le Virus Zika et Épidémies Récentes. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 7, p. 302–307, 2014.

JANSEN, C. C.; BEEBE, N. W. The dengue Vector *Aedes aegypti*: What Comes Next. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 1, p. 272-279, 2010.

KIEHLBAUCH, J. A.; et al. Use of the National Committee for Clinical Laboratory Standards Guidelines for Disk Diffusion Susceptibility Testing in New York State Laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3341-3348, 2000.

LACERDA, J. R.C.; et al. Conhecimento Popular sobre Plantas Medicinais e sua Aplicabilidade em Três Segmentos da Sociedade no Município de Pombal-PB. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 9, n. 1, p. 14- 23, 2013.

LEKWEIRY, K. M.; et al. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Mauritania: First Report on the Presence of the Arbovirus Mosquito Vector in Nouakchott. **Journal Medical Entomology**, v. 52, n. 4, p. 730–733, 2015.

LI, X.; et al. Solvent-free Microwave Extraction of Essential Oil from *Dryopteris* Fragrans and Evaluation of Antioxidant Activity. **Food Chemistry**, v. 133, n. 2, p. 437–444, 2012.

LIMA, J. P.; et al. Avaliação do Potencial Antiepipimastigota e Citotoxicidade do Citronelol. **Caderno de Cultura e Ciência**, v. 11, n. 1, p. 01-04, 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 Medicinais**, v. 12, n. 2, p. 227-233, 2010.

LORENZI, H. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. 2º ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

MACÊDO, M. E.; et al. Screening of Asteraceae (Compositae) Plant Extracts for Larvicidal Activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 4, p. 565-570, 1997.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A. Database of the Amazon Aromatic Plants and their Essential Oils. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 595-622, 2009.

MCLAFFERTY, F. W. Mass Spectrometry Across the Sciences. **PNAS**, v. 105, n. 47, p. 18088-18089, 2008.

MELO, A. S.; et al. Antinociceptive, Neurobehavioral and Antioxidant Effects of *Eupatorium triplinerve* Vahl on Rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, p. 293–301, 2013.

MENSOR, L. L.; et al. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. **Phytotherapy Research**, v. 15, s/n., p. 127-130, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Monitoramento dos Casos de Dengue e Febre de Chikungunya até a Semana Epidemiológica (SE) 53 de 2014**. Brasília: v. 46, p. 7, 2015.

MIRANDA, C. A. S. F. **Atividade Antioxidante de Óleos Essenciais de Folhas de Diversas Plantas**. 2010, 125 p. Dissertação (mestrado em Agroquímica)-Universidade Federal de Lavras, 125 p., 2010.

MONTEIRO, F. J. C.; CARVALHO, J. C. T.; SOUTO, R. N. P. Distribuição dos casos notificados de dengue e dispersão do *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) entre os anos de 2011-2012 em Macapá, Amapá, Brasil. **Entomotropica**, v. 29, n. 2, p. 95-103, 2014.

NERY, M. I. S.; et al. Morfoanatomia do Eixo Aéreo de *Ayapana triplinervis* (Vahl) R. M. King & Rob. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n.1, p.62-70, 2014.

NHAN, T.; CAO-LOURMEAU, C.; MOSSO, D. Zika virus infections. **Revue Francophone des Laboratoires**, v. 2014, n. 467, p. 45–52, 2014.

NUNES, B. S.; et al. Use of the Genus *Artemia* in Ecotoxicity Testing. *Environmental Pollution*, v. 144, n. 2, p. 453–462, 2006.

NUNES, M. R. T.; et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 3, n. 102, p. 2-10, 2015.

NGUTA, J. M. et al. Biological screening of key medicinal plants using *Artemia salina* L. (ARTEMIIDAE). **Pharmacologyonline**, v. 2, p. 458-478, 2011.

OOTONI, M. K., et al. Use Of Oils in Agriculture. **Journal Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 2, p. 162-175, 2013.

PEDROSA, M. C. **Aspectos Ecológicos da Ocorrência de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus,1762) e *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1984) (DIPTERA:CULICIDAE) em Áreas Verdes urbanas e Residenciais**. 2013, 84 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Biomas Tropicais) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

PURNHAGEM, 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.

RAGGI, L. **Teor, Composição Química e Atividade Biológica de Óleos Voláteis de *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski e *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. (Asteraceae)**. 2013, 147 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Botânica da Secretaria de Estado de Meio Ambiente, São Paulo, 2013.

RAMOS, R. S. **Estudo Fitoquímico e Atividade Microbiológica, de Citotoxicidade e Larvicida dos Óleos Essenciais de Espécies da Família Lamiaceae (Lamiales)**. 2014, 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2014.

RAMOS, R. S.; RODRIGUES, A. B. L.; ALMEIDA, S; S; M; S. Preliminary Study of the Extract of the Barks of *Licania macrophylla* Benth: Phytochemicals and Toxicological Aspects. **Biota Amazônia**, v. 4, n. 1, p. 94-99, 2014.

RASTELLO, R. M.; MENEGATT, C.; MOSSI, A. J. Efeito do Óleo Essencial de *Tagetes patula* L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, n. 53, v. 2, p. 304–307, 2009.

REIS, G. H. **Avaliação da Diversidade de Asteraceae dos Campos e Cerrados Rupestres da Serra da Bocaina e de Carrancas, Minas Gerais, Brasil**. 2013, 95 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

RONDÓN, M. et al. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) Collected from the Venezuela, Andes. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 34, n. 1, p. 32-37, 2006.

SALVAMANGAI, G.; BHASKAR, A. GC-MS Analysis of Phytochemicals in the Methanolic Extract of *Eupatorium triplinerve*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 1329-1332, 2012.

SANTOS, A. F.; et al. Toxicity of Some Glucose/Mannose-Binding Lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 794–798, 2010.

SILVA, F. G.; et al. Teor de Flavonóides em Populações Silvestre e Cultivada de Carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] Coletadas nas Estações Seca e Úmida. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 8, n. 2, p. 19-25, 2006.

SILVA, R. B. L. **A Etnobotânica de Plantas Medicinais da Comunidade Quilombola do Curiaú, Macapá-AP, Brasil**. 2002, p. 172. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2002.

SILVA, W. C.; et al. Atividade Inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) Sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera: Aetalionidae), Praga de Importância Econômica no Amazonas. **Acta Amazônica**, v. 37, n. 2, p. 293-298, 2007.

SILVERSTEIN, R.; WEBSTER, F.; KIMLE, D. **Identificação Espectroscópica de Compostos Orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, p. 490, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora UFRGS, p. 1257, 2008.

SKOOG, D. A.; et al. **Fundamentos da Química Analítica**. 8 ed. São Paulo: Cengage Learning, p. 999, 2006.

SOUZA, C. A. S.; AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M. Atividade Antimicrobiana de *Tagetes minuta* L. - Compositae (Chinchilho) Frente a Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, v. 37, n. 6, p. 320-336, 2000.

SOUZA, O. V. S.; et al. Estudo Farmacognóstico de Galhos de *Vanillosmopsis erythropappa* Schult. Bip. –Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 50-53, 2003.

SOUZA, S. A. M.; et al. Óleos Essenciais: aspectos econômicos e sustentáveis. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, n. 10, p. 01-11, 2010.

SOUZA, T. M. et al. Avaliação da Atividade Antisséptica de Extrato Seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de Preparação Cosmética Contendo este Extrato. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n.1, p. 71-75, 2007.

STIEVEN, A. C.; MOREIRA, J. J. S.; SILVA, C. F. Óleos Essenciais de Uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): avaliação das atividades microbiana e antioxidante. **Eclética Química**, v. 34, n. 3, p. 7-13, 2009.

TAVARES, L. A.; FERREIRA, A. G. Análises Quali e Quantitativa de Cafés Comerciais via Ressonância Magnética Nuclear. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 911-915, 2006.

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

VALGAS, C.; et al. Screening Methods to Determine Antibacterial Activity of Natural Products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, s/n., p. 369-380, 2007.

VANDERLINE, F. A.; et al. Anti-inflammatory and Opioid Like Activities in Methanol Extract of *Mikania lindleyana*, Sucuriju. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 150-156, 2012.

VASCONCELO, P. F. C.; et al. Genetic Divergence and Dispersal of Yellow Fever Virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 9, p. 1578-1584, 2004.

VEGA-RÚA, A.; et al. Chikungunya Virus Transmission Potential by Local Aedes Mosquitoes in the Americas and Europe. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 5, p. 1-18, 2015.

VERDI, L. G.; BRIGHENTI, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

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

VIEGAS JÚNIOR, V. F. Estudo do Consumo de Plantas Medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais da saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 308-313, 2008.

VIEGAS JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas Medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

WHATSON, J.; SPARKMAN, O. **Introduction To Mass Spectrometry: instrumentation, application and Strategies for Data Interpretation**. 4th ed. England: Wiley, p. 860, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Health Organization Technical Reports Series, n. 443, 1970.

WORLD HEALTH ORGANIZATIONS. **Global Strategy for Dengue Prevention and Control 2012-2020**. France: p. 43, 2012.

YASUKAWA, K.; KASAHARA, Y. Effects of Flavonoids from French Marigold (Florets of *Tagetes patula* L.) on Acute Inflammation Model. **International Journal of Inflammation**, v. s/n, n. s/s. p. 1-5, 2013.

ZHANG, X.; LIU, C. Multifaceted Regulations of Gateway Enzyme Phenylalanine Ammonia-Lyase in the Biosynthesis of Phenylpropanoids. **Molecular Plant**, v. 8, p. 17–27, 2015.

ZHUN, L.; TIAN, J. Chemical Composition and Larvicidal Effects of Essential Oil of *Blumea martiniana* Against *Anopheles anthropophagus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.4, n. 5, p. 371-374, 2011.

ZIN, H. W.; PARK, K.; CHOI, T. J. Purification and Characterization of a Carboxymethyl Cellulase from *Artemia salina*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 443, n. 1, p. 194–199, 2014.