



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Caracterização química, atividade larvicida e deterrente de oviposição
do óleo essencial da inflorescência do Bastão do Imperador (*Etlingera
elator*) frente à *Aedes aegypti***

Patrícia Cristina Bezerra da Silva

Orientador (a): **Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro**

Recife – PE

Novembro – 2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Caracterização química, atividade larvícida e deterrente de oviposição
do óleo essencial da inflorescência do Bastão do Imperador (*Etlingera
elatior*) frente à *Aedes aegypti***

Patrícia Cristina Bezerra da Silva*

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Pernambuco
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Química.

Orientador (a): **Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro**

* bolsista CAPES

Recife – PE

Novembro – 2012

Catálogo na fonte
Bibliotecária Joana D'Arc L. Salvador, CRB 4-572

Bezerra-Silva, Patrícia Cristina.

Caracterização química, atividade larvívica e deterrente de oviposição do óleo essencial da inflorescência do Bastão do Imperador (*Etlingera elatior*) frente à *Aedes aegypti* / Patrícia Cristina Bezerra da Silva. – Recife: O Autor, 2012.

103 f.: fig., tab.

Orientador: Daniela M. do Amaral Ferraz Navarro.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química Fundamental, 2012.
Inclui referências bibliográficas.

1. Essências e óleos essenciais. 2. Compostos bioativos. 3. *Aedes aegypti*. 4. Plantas ornamentais.
I. Navarro, Daniela M. do Amaral Ferraz (orientadora).
II. Título.

547.71

(22. ed.)

FQ 2013-45

Dissertação submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovada:

Prof^a Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro
(Orientadora)

Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Ruth Rufino do Nascimento
Instituto de Química e Biotecnologia
Universidade Federal de Alagoas

Prof. Paulo Milet-Pinheiro
Departamento de Botânica

Universidade Federal de Pernambuco

**Caracterização química e atividade larvica do óleo essencial da inflorescência
do bastão do imperador (*Etlingera elatior*)**

frente à *Aedes aegypti* Linn

Por

Patrícia Cristina Bezerra da Silva

Departamento de Química Fundamental
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Universidade Federal de Pernambuco
Recife-PE-Brasil
19 de Dezembro de 2012

AGRADECIMENTOS

É impossível chegar ao final de uma jornada como essa sem a ajuda de ninguém e eu certamente tenho que agradecer a muitas pessoas. Seria muito difícil citar aqui todos os nomes que fizeram parte da minha formação acadêmica que me trouxeram para esse mestrado e me acompanharam durante ele. Mas, abrindo mão da precisão e esperando que todos se sintam completamente agraciados com minha gratidão, venho trazer alguns dos muitos nomes que foram importantes para a realização desse trabalho.

Ao Lucas Andrade, namorado, físico, amigo e editor amador por me aguentar durante esse período estressante e ainda ter estímulo para discutir aspectos de Ecologia Química, que definitivamente não é o seu forte, antes de dormir.

A minha família, pais, irmãos, primos e tias, que compreenderam minha ausência constante durante o período do mestrado e me apoiarem na busca por essa conquista do início ao fim.

A professora Daniela Navarro por ser desde o 1º período do curso de graduação, há seis anos atrás, minha bússola científica além de amiga, orientadora, professora e por ter a habilidade de transformar o laboratório em nossa segunda casa, nossa segunda família.

A todos os integrantes do Laboratório de Ecologia Química: Alyne Oliveira, Artur Maia, Bheatriz Nunes, Camila Soledade, Clara Vitória, Estela Oliveiras, Geanne Santos, Jessica Nascimento, Hans Santos, Lilian Lima, Marcelo Rodrigues, Maria de Jesus, Mirela Araújo, Paloma Barreto, Paulo Milet-Pinheiro, Rayane Santos, Suyana Karolyne e especialmente Kamilla Dutra, pelo apoio emocional e acadêmico durante a obtenção dos meus resultados e eventuais momentos de estresse.

Ao Paulo Milet-Pinheiro, que pacientemente me treinou para obtenção dos resultados das análises em GC-EAD e também por ter supervisionado os resultados obtidos.

Ao Artur Maia, pós-doutorando na UFPE que além de me ensinar a utilizar o GC-MS, me auxiliou na identificação dos voláteis e sempre instigou a todos os integrantes do laboratório a obterem dados sempre mais precisos e confiáveis.

Ao Ricardo Oliveira, guru em análises químicas, pelos conhecimentos e consequentemente aumento exponencial de meu conhecimento sobre análises químicas e ainda por ser uma pessoa e pesquisador maravilhoso.

A Central Analítica do Departamento de Química Fundamental nas pessoas dos técnicos Eliete Barros, Ricardo Oliveira, “Seu” Lúcio e Conceição Pereira.

A todos os professores das disciplinas da pós-graduação cujo empenho em nos tornar melhores profissionais e especialmente a professora Ivani Malvestiti por ter tornado minha formação mais completa ao me convidar para participar, por quatro vezes, do mini-curso oferecido pelo DQF e por sempre demonstrar o quanto acredita nos alunos.

A CAPES, CNPq e FACEPE pelo apoio financeiro.

*Cada planta tem centenas de substâncias e uma delas
pode ser mais importante do que uma galáxia.*

Otto R. Gottlieb

*O mundo e o Universo são lugares extremamente belos,
e quanto mais os compreendemos mais belos eles parecem.*

Richard Dawkins

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Caracterização química, atividade larvicida e deterrente de oviposição do óleo essencial da inflorescência do Bastão do Imperador (*Etlingera elatior*) frente à *Aedes aegypti*

RESUMO

A dengue é uma doença causada por vírus, transmitido por mosquitos. Não existindo vacina que confira imunidade permanente ao vírus, a principal medida de controle da doença é por meio do combate ao mosquito transmissor, o *Aedes aegypti*. Como alternativa adicional ao uso dos compostos empregados no combate ao mosquito, óleos essenciais e extratos de plantas são testados quanto à sua atividade. Levando isso em consideração, o objetivo desse trabalho foi verificar a atividade larvicida e deterrente de oviposição dos óleos essenciais das variedades vermelha, rosa e porcelana do Bastão do Imperador (*Etlingera elatior*) frente ao mosquito *A. aegypti*. As inflorescências foram submetidas a um processo de hidrodestilação, através do qual foram obtidos três subprodutos: o óleo essencial, o extrato aquoso e o hidrolato. Os mesmos foram submetidos à testes larvicidas, sendo que o hidrolato não apresentou atividade. O resultado mostrou: CL₅₀ de 1,26; 7,68 e 0,97% (v/v) para os extratos e 33,47; 42,22 e 26,62 ppm para os óleos essenciais das variedades vermelha, rosa e porcelana, respectivamente. Os óleos também apresentaram atividade deterrente em 100 ppm. A análise química dos óleos mostrou que os majoritários dos óleos são os mesmos para as três variedades estudadas, sendo eles dodecanal, dodecanol e α -pineno. Testes posteriores mostraram que o dodecanal e dodecanol são larvicidas com CL₅₀ de 50,88 e 7,76 ppm respectivamente. Testes de detecção eletroantenográfica mostraram que os compostos n-decanol, 2-undecanona, n-undecanal, n-dodecanal, (E)-cariofileno, β -(E)-Farneseno, α -Humuleno, n-dodecanol, isodauceno e ácido dodecanoico são ativos frente às antenas de fêmeas do mosquito. Dois desses ativos: dodecanol e dodecanal foram testados quanto à atividade deterrente e mostraram-se ativos em 50 ppm.

Palavras-chave: óleo essencial, atividade larvicida, atividade deterrente, *Etlingera elatior*, *Aedes aegypti*

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Chemical composition, larvicidal and deterrent activity of the essential oil from the inflorescence of the Torch Ginger (*Etlingera elatior*) against *Aedes aegypti*

ABSTRACT

Dengue is a disease caused by a virus transmitted by mosquitoes. In the absence of vaccine that confers lifelong immunity to the virus, the main measure to oppose the disease is by controlling the mosquito, *Aedes aegypti*. As an additional alternative to the use of the compounds employed in the fight against mosquitoes, essential oils and plant extracts are tested for their activity. Taking this into consideration, the aim of this study was to assess the larvicidal and oviposition deterrent activity of essential oils of red, pink and porcelain varieties of Torch Ginger (*Etlingera elatior*) against the mosquito *A. aegypti*. The inflorescences were subjected to hydrodistillation process which led to the obtained of three by-products: essential oil, aqueous extract and hydrolate. They underwent testing larvicides, and the hydrolate was inactive. The result showed: LC₅₀ of 1.26, 7.68 and 0.97% (v/v) for the aqueous extracts and 33.47, 42.22 and 26.62 ppm for the essential oils of red, pink porcelain varieties, respectively. The oils also showed deterrent activity at 100 ppm. The chemical analysis of the oil showed that the major compounds of the oil are the same for all three varieties studied: dodecanal, dodecanol and α -pinene. Further tests showed that dodecanal and dodecanol are larvicides with LC₅₀ of 50.88 and 7.76 ppm respectively. Electroantennographic detection tests showed that the compounds n-decanol, 2-undecanone, n-undecanal, n-dodecanal, (E)-caryophyllene, β -(E)-farnesene, α -Humulene, n-dodecanol, and dodecanoic acid isodaucene are active to the antennae of female mosquitoes. Two of these assets: dodecanol and dodecanal were tested for deterrent activity and were active at 50 ppm.

Keywords: essential oil, larvicidal activity, deterrent activity, *Etlingera elatior*, *Aedes aegypti*

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

CL₅₀: Concentração letal que ocasiona 50% de mortalidade dos organismos alvo

DMSO: Dimetilsulfóxido

Embrapa: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

eV: elétron-volt

FDA: Food and Drug Administration

GC/EAD: Cromatografia gasosa acoplada à detecção eletroantenográfica

GC/FID: Cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chamas

GC/MS: Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

IPCS: International Programme on Chemical Safety

OMS: Organização Mundial de Saúde

P.A.: para análise

PE: Ponto de ebulição

PF: Ponto de fusão

pH: Potencial hidrogeniônico

ppm: partes por milhão

Tween[®] 80: Monooleato de Sorbitan Etoxilado 20 EO

UFPE: Universidade Federal de Pernambuco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Ciclo de vida do <i>A. aegypti</i> ¹	19
Figura 1.2 Ovos do mosquito <i>A. aegypti</i> ²	20
Figura 1.3 Estágio larval do <i>A. aegypti</i> ³	21
Figura 1.4 Estágio de pupa do <i>A. aegypti</i> ⁴	22
Figura 1.5 <i>A. aegypti</i> adulto (Fotografia obtida no insetário do Laboratório de Ecologia Química – DQF)	23
Figura 1.6 Inflorescências de espécies do gênero <i>Etlingera</i> : (A) <i>E. venusta</i> (B) <i>E. corneri</i> (C) <i>E. pyramidosphaera</i> (D) <i>E. hemisphaerica</i> (E) <i>E. megalocheilos</i> (F) <i>E. nasuta</i> (G) <i>E. brevilabrum</i> (H) <i>E. velutina</i> (I) <i>E. fimbriobracteata</i> (J) <i>E. fenzlii</i> (K) <i>E. elatior</i> Thai Queen (L) <i>E. littoralis</i> ⁵	28
Figura 1.7 Inflorescências das variedades vermelha (A), rosa (B), porcelana (C) e tulipa (D) da espécie <i>E. elatior</i> ⁶	31
Figura 1.8 Etapas de desenvolvimento das hastes florais de <i>E. elatior</i> (LOGES et al, 2008a). 32	
Figura 1.9 Biossíntese dos terpenos (TAIZ; ZEIGER, 2004)	34
Figura 1.10 Esquema de um sistema de GC-EAD (JHUMUR, 2007)	39
Figura 3.1 Inflorescências da espécie <i>Etlingera elatior</i> . (A) Parte superior da inflorescência das variedades: vermelha, rosa e porcelana. (B) Parte lateral da inflorescência das variedades: vermelha, rosa e porcelana	45
Figura 3.2 (A) Esquema com extrator de Clevenger modificado utilizado na hidrodestilação. (B) Configuração do óleo essencial no extrator, seta representa o óleo flutuando sobre hidrolato	46
Figura 3.3 Esquema da análise eletrofisiológica. (A) eletrodos, (B) saída do GC, (C) montagem da antena e (D) antena montada (ampliação pelo microscópio)	49
Figura 4.1 Óleos essenciais em temperatura ambiente (A) e resfriados (B), das três variedades da <i>E. elatior</i> : vermelha, rosa e porcelana	56
Figura 4.2 Extratos aquosos das variedades vermelha (A), rosa (B) e porcelana (C) da <i>E. elatior</i>	57
Figura 4.3. Cromatograma do óleo essencial da <i>E. elatior</i> (A) vermelha, (B) rosa e (C) porcelana obtido por GC-MS	59
Figura 4.4 Espectro de massa do α -pinene, retirado da análise do óleo essencial da variedade vermelha da <i>E. elatior</i> (A) e retirado da biblioteca (B)	66
Figura 4.5 Espectro de massa do β -pinene, retirado da análise do óleo essencial da variedade vermelha da <i>E. elatior</i> (A) e retirado da biblioteca (B)	67

Figura 4.6 Espectro de massa do n-decanal, retirado da análise do óleo essencial da variedade vermelha da <i>E. elatior</i> (A) e retirado da biblioteca (B)	68
Figura 4.7 Espectro de massa do n-dodecanal, retirado da análise do óleo essencial da variedade vermelha da <i>E. elatior</i> (A) e retirado da biblioteca (B)	69
Figura 4.8 Espectro de massa do n-dodecanol, retirado da análise do óleo essencial da variedade vermelha da <i>E. elatior</i> (A) e retirado da biblioteca (B)	70
Figura 4.9 Espectro de massa do dodecyl acetate, retirado da análise do óleo essencial da variedade vermelha da <i>E. elatior</i> (A) e retirado da biblioteca (B)	70
Figura 4.10 Espectro de massa do tetradecanol, retirado da análise do óleo essencial da variedade vermelha da <i>E. elatior</i> (A) e retirado da biblioteca (B)	71
Figura 4.11 Gráficos Concentração (stimulus) x mortalidade (response) dos dados obtidos dos testes larvicidas para o óleo essencial das variedades vermelha (A), rosa (B) e porcelana (C) e extrato aquoso das variedades vermelha (D), rosa (E) e porcelana (F) da <i>E. elatior</i>	76
Figura 4.12 O cromatograma (CG) do óleo essencial de <i>E. elatior</i> com detecção simultânea por FID (superior) e por EAD (inferior) usando uma antena de <i>A. aegypti</i>	83
Figura 4.13 Compostos voláteis bioativos de <i>E. elatior</i> frente as antenas de fêmeas do mosquito <i>A. aegypti</i>	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Atividade biológica de diferentes espécies do gênero <i>Etlingera</i>	29
Tabela 1.2 Atividade larvicida de óleos essenciais de variadas espécies frente à <i>A. aegypti</i> ...	37
Tabela 3.1 Testes de prospecção fitoquímica de classes químicas de plantas	50
Tabela 3.2 Indicativos da presença de compostos nos extratos aquosos	51
Tabela 4.1 Rendimento dos óleos essenciais	55
Tabela 4.2 Valores de pH dos extratos aquosos	57
Tabela 4.3 Comparação entre rendimento e componentes majoritários de diferentes extrações de óleo essencial da <i>E. elatior</i>	63
Tabela 4.4. Identificação dos constituintes do óleo essencial obtido das variedades vermelha, rosa e porcelana da <i>Etlingera elatior</i> (Jack) R.M. Smith	60
Tabela 4.5 Composição e classes de compostos dos óleos essenciais da <i>E. elatior</i>	61
Tabela 4.6 Presença de constituintes majoritários do óleo essencial da espécie <i>E. elatior</i> em espécies do gênero <i>Etlingera</i>	65
Tabela 4.7 Detecção de classes de substâncias químicas presentes nos derivados da hidrodestilação da inflorescência e folhas de três variedades da <i>Etlingera elatior</i> (Jack) R.M. Smith pelos métodos de prospecção fitoquímica de classes químicas	72
Tabela 4.8 Resultados das mudanças de coloração como indicativos da presença de compostos nos extratos aquosos	72
Tabela 4.9 Mortalidade em teste larvicida preliminar das larvas em estágio L4 de <i>Aedes aegypti</i> de derivados da hidrodestilação da inflorescência e folhas de três variedades da <i>Etlingera elatior</i>	75
Tabela 4.10 Concentrações letais para 50% (CL ₅₀) das larvas em estágio L4 de <i>Aedes aegypti</i> de óleo essencial e extrato aquoso da inflorescência de três variedades da <i>Etlingera elatior</i>	77
Tabela 4.11 Mortalidade em teste larvicida preliminar das larvas em estágio L4 de <i>Aedes aegypti</i> de majoritários dos óleos essenciais: dodecanal e dodecanol	77
Tabela 4.12 Concentrações letais para 50% (CL ₅₀) das larvas em estágio L4 de <i>A. aegypti</i> de de majoritários dos óleos essenciais: dodecanal e dodecanol	77

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 4.1** Relação entre a proporção dos componentes majoritários dodecanal e dodecanol e a atividade larvicida do óleo essencial das três variedades da *E. elatior*78
- Gráfico 4.2** Média de ovos depositados ($\pm$ SE) em % do total de ovos para o controle e teste no bioensaio de oviposição dos óleos essenciais das três variedades da *E. elatior* ... 81
- Gráfico 4.3** Média de ovos depositados ($\pm$ SE) em % do total de ovos para o controle e teste no bioensaio de oviposição dos extratos aquosos das três variedades da *E. elatior*... 81
- Gráfico 4.4** Média de ovos depositados ($\pm$ SE) em % do total de ovos para o controle e teste no teste de oviposição dos componentes majoritários da *E. elatior* 85

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 A Dengue	17
1.2 Considerações sobre o Mosquito <i>Aedes aegypti</i>	19
1.2.1 O ciclo da vida	19
1.2.1.1 O ovo	20
1.2.1.2 A Larva	21
1.2.1.3 A Pulpa	22
1.2.1.4 O Mosquito	23
1.3 Flores ornamentais	25
1.4 Considerações botânicas	26
1.4.1 Sobre a família Zingiberaceae	26
1.4.2 Sobre a tribo Alpinieae	27
1.4.3 Sobre o gênero <i>Etlingera</i>	27
1.4.4 Sobre a espécie <i>Etlingera elatior</i> (Jack) R.M. Smith	30
1.5 Óleos essenciais	33
1.5.1 Definições e características	33
1.5.2 Processos de extração	34
1.5.2.1 Extração por hidrodestilação	35
1.5.3 Atividades biológicas	35
1.6 O Óleo essencial da espécie <i>Etlingera elatior</i> (Jack) R.M. Smith	38
1.7 Análises eletrofisiológicas	38
1.7.1 Análises eletrofisiológicas em mosquitos	39
2 OBJETIVOS	41
2.1 Objetivos Gerais	42
2.2 Objetivos Específicos	42
3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL	43
3.1 Materiais e Equipamentos	44
3.1.1 Moedor elétrico	44
3.1.2 Extrator de Clevenger	44
3.1.3 Cromatógrafo a Gás acoplado a Espectrômetro de Massas	44

3.2 Metodologia Experimental	44
3.2.1 Origem, Coleta, Preparação e Armazenamento da Amostra Vegetal	45
3.2.2 Extração do Óleo Essencial	45
3.2.3 Características Físicas do Óleo Essencial	46
3.2.3.1 Rendimento do Óleo Essencial	47
3.2.3.2 Cor e aparência	47
3.2.3.3 Solubilidade	47
3.2.3.4 pH dos extratos e hidrolatos	47
3.2.4 Análises Espectrométricas	47
3.2.4.2 Padrões	47
3.2.4.2 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrômetro de Massas	48
3.2.5 Análises eletrofisiológicas	49
3.2.6 Testes fitoquímicos	50
3.2.7 Obtenção e Cultivo das Larvas	51
3.2.8 Bioensaio Larvicida	51
3.2.9 Bioensaio de Oviposição	52
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 Extração do óleo essencial	55
4.1.1 Cinética	55
4.1.2 Rendimento	55
4.2 Características físicas dos produtos da hidrodestilação	56
4.2.1 Óleo essencial	56
4.2.2 Extratos aquosos e hidrolatos	57
4.3 Análises cromatográficas do óleo essencial da espécie <i>Etlingera elatior</i> ..	58
4.4 <i>Screening</i> fitoquímico dos extratos aquosos e hidrolatos	72
4.5 Bioensaio	74
4.5.1 Bioensaio larvicida	74
4.5.2 Bioensaio de oviposição dos óleos essenciais e extratos aquosos	80
4.6 Análise eletrofisiológica	83
4.7 Bioensaio de oviposição dos componentes dos óleos	85
5 CONCLUSÕES	86
6 PERSPECTIVAS	89

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
---	-----------

**Caracterização química, atividade larvicida e deterrente de oviposição
do óleo essencial da inflorescência do Bastão do Imperador (*Etlingera
elator*) frente à *Aedes aegypti***

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 A dengue

Considerada uma das maiores preocupações em Saúde Pública no mundo, a dengue foi endêmica em 112 países.¹ A doença é incidente em países tropicais e subtropicais, onde latitudes e longitudes, assim como as condições do meio, tais como temperatura e umidade, favorecem o desenvolvimento e a proliferação do mosquito vetor.²

A dengue é uma doença com característica sazonal, ou seja, que se concentra em um mesmo período, todos os anos. No Brasil, esse período coincide com o verão, devido ao aumento da incidência de chuvas e da temperatura. Cerca de 70% dos casos de dengue no país são registrados entre Janeiro e Maio, porém em estados no Norte e Nordeste, nos quais as chuvas começam tardiamente em meados de Março e duram até Julho e Agosto, são reportados casos durante um período maior. Além disso, o país possui condições climáticas favoráveis a proliferação do mosquito durante todo o ano.³

Há 15 anos a Organização Mundial de Saúde (OMS) já estimava que cerca de 1,3 milhões de pessoas estariam em risco de serem infectadas pelo vírus da dengue.⁴ Atualmente, estima-se que dois quintos da população mundial, ou seja, mais de 2,5 bilhões de pessoas estão em risco de dengue e a OMS calcula que pode haver 50 milhões de infecções de dengue a cada ano no mundo.⁵

Apesar de o Brasil ter registrado uma queda de 44% no número de casos nos quatro primeiros meses de 2012 em relação ao mesmo período do ano de 2011 tendo drástica queda no número de casos graves e no número de óbitos (87% e 80% a menos que em 2011, respectivamente)³ a dengue continua sendo considerada a doença viral mais alarmante em termos de mortalidade e morbidade transmitida por vetores artrópodes.⁶

A dengue é uma doença febril aguda causada por um vírus de evolução benigna. O agente etiológico da dengue é um arbovirus do gênero *Flavivirus* da família Flaviviridae, do qual existem quatro sorotipos distintos atualmente conhecidos: DEN-1; DEN-2; DEN-3 e DEN-4. A infecção por um deles confere proteção permanente para o mesmo sorotipo e imunidade parcial e temporária contra os outros três.⁷⁻⁹

As infecções pelo vírus da dengue, na sua forma clássica da doença (sintomática ou assintomática) se caracterizam por febre alta, dores de cabeça, dor atrás dos olhos, dores musculares e articulares intensas, além de manchas na pele. A forma hemorrágica

é mais severa, sendo possível a ocorrência de manifestações hemorrágicas, hepatomegalia, insuficiência cardíaca e ocasionalmente choque, podendo levar à morte.³

Pertencentes à Família Culicidae, Subfamília Culicinae, Tribo Aedini e Gênero *Aedes* Meigen, 1818, os vetores que transmitem o vírus da dengue são as espécies *Aedes aegypti*, nas Américas, embora seja oriundo da Europa, e *Aedes albopictus* na Ásia. Normalmente, a infecção do mosquito fêmea com o vírus ocorre através da ingestão de sangue contendo partículas virais. E para este se infectar é preciso ingerir um número elevado destas partículas e iniciar o período de incubação extrínseco.¹⁰ Tal período dura em torno de 8 a 10 dias. Já no homem, o período de incubação intrínseco ocorre em torno de 2 a 7 dias, aproximadamente o mesmo tempo que surge a febre. O ser humano infectado torna-se o principal portador e multiplicador do vírus.⁵

Por outro lado, os sorotipos virais também podem ser transmitidos entre os próprios mosquitos por via vertical, ou seja, quando o vírus infecta o óvulo ou o ovo; ou por via venérea, quando os machos infectados, o transmitem no líquido seminal.¹¹

1.2 Considerações sobre o mosquito *Aedes aegypti*

1.2.1 O ciclo da vida

O *A. aegypti* é uma espécie que se adaptou perfeitamente ao ambiente urbano e aos recipientes artificiais dos domicílios. Possui hábitos diurnos, alimenta-se e deposita seus ovos ao amanhecer e à tarde.¹²

Inicialmente foi reconhecido por Carlos Finlay como o transmissor da febre amarela, em 1881 e em 1906 Brancourt o identificou como sendo também o vetor do vírus da dengue.^{13,14}

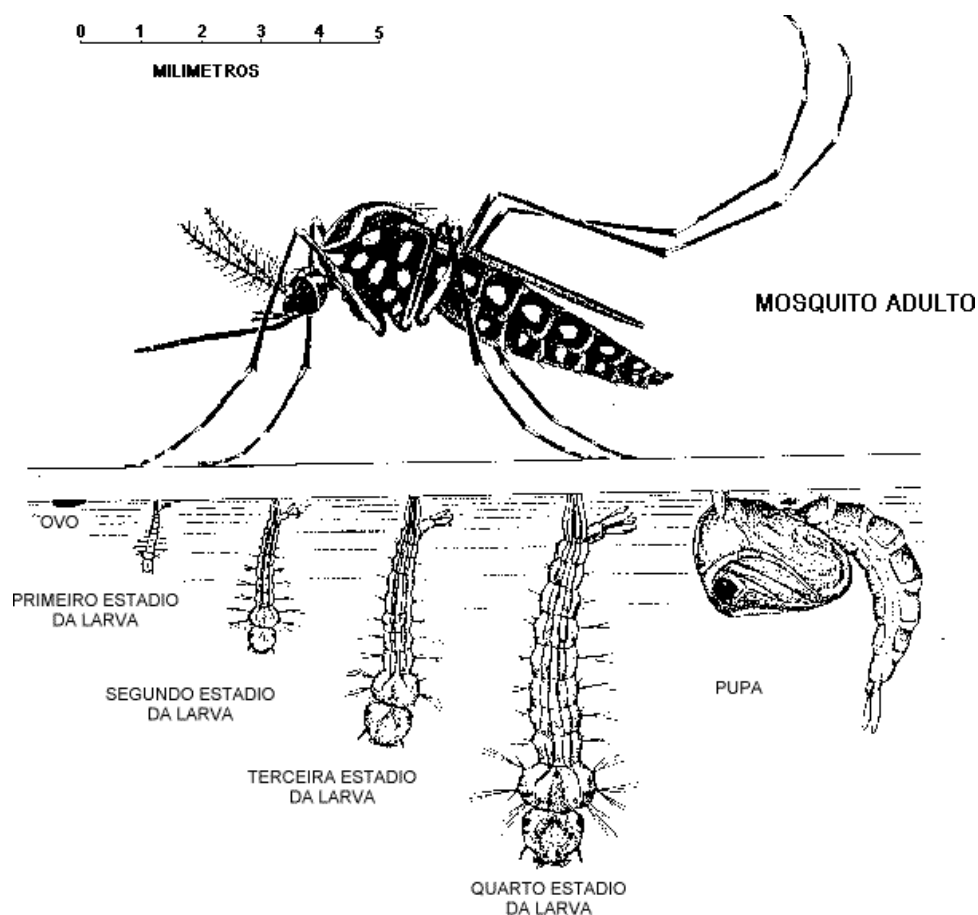


Figura 1.1 Ciclo de vida do *Aedes aegypti*¹

O mosquito *A. aegypti* apresenta desenvolvimento por metamorfose completa e o seu ciclo de vida é holometabólico, compreendendo quatro fases: ovo, larva (1º a 4º instar), pupa e indivíduo adulto (dimorfismo sexual). O ovo, a larva e a pupa são as fases aquáticas do ciclo de vida do mosquito (figura 1.1).

1.2.1.1 O ovo

Morfologicamente, os ovos de *A. aegypti* medem cerca de 1 mm de comprimento, são elípticos, alongados e fusiformes (figura 1.2). No momento da postura são brancos, no entanto, adquirem coloração mais escura e tonalidade brilhante algumas horas após a oviposição.¹⁵

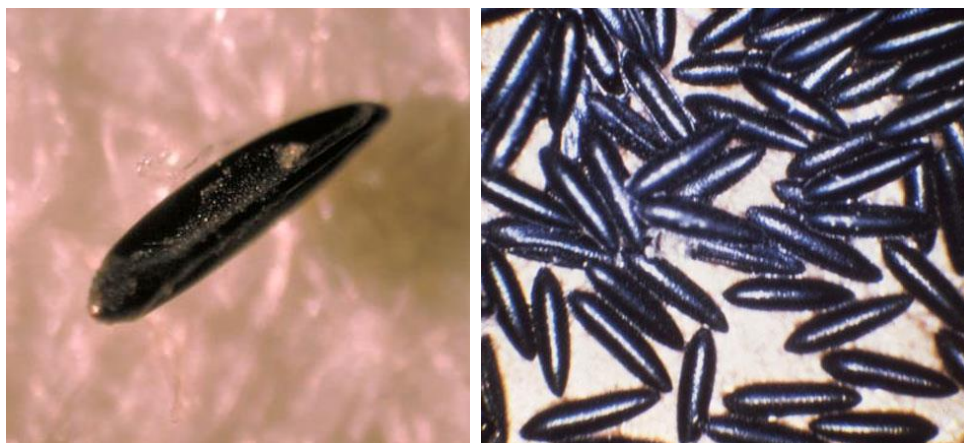


Figura 1.2 Ovos do mosquito *A. aegypti*²

A oviposição é realizada nos mais diferentes substratos, desde as paredes ásperas, umedecidas e escurecidas dos recipientes, em condições naturais, como também pode ser realizada diretamente na água, dependendo do tipo de recipiente, como o vidro, por exemplo, apesar de não ser comum¹² ou também podem as fêmeas ovipositarem em papel sulfite, filtro, manteiga e toalha, em condições laboratoriais¹⁶. O número de ovos depositados está diretamente relacionado com a quantidade de sangue ingerido, onde cerca de 3,5 mg é quantia suficiente para considerar o repasto como completo e ideal para o desenvolvimento ovariano. Sob esse aspecto, uma fêmea oviposita cerca de 120 ovos. Sob condições favoráveis como temperatura e umidade, o embrião está apto a eclodir por volta de 4 a 7 dias.

Estando completamente amadurecido, o ovo pode resistir às situações como ressecamento, baixa de temperatura, insolação, proporcionando a diapausa dentro do ovo, período que o mesmo fica inativo, porém vivo. Assim, o mesmo resiste meses ou anos no ambiente, só eclodindo ao entrar em contato com a água.¹⁷ Essa característica de resistir ao ressecamento, sobreviver por longos períodos, torna o mosquito *A. aegypti* importante epidemiologicamente falando, pois possivelmente estes foram determinantes que fizeram com que se disseminasse às amplas áreas geográficas e se tornasse um obstáculo no que diz respeito a seu controle.³

1.2.1.2 A Larva

São exclusivamente aquáticas e os criadouros preferenciais desses insetos são os recipientes artificiais, tanto os deixados abandonados pelo homem a céu aberto e

preenchidos pelas águas das chuvas (como pneus, garrafas, vasos e pratos de plantas, latas e vasos de cemitérios), como aqueles utilizados para armazenar água no uso doméstico (como caixas d'água, tonéis e cisternas destampados), observando assim a proliferação do mosquito em condições de água limpa, onde as larvas de *A. aegypti* desenvolvem-se melhor. As larvas dos mosquitos se desenvolvem em ambientes naturais como bromélias, buracos em árvores, escavações de rocha e bambu. Alimentam-se de partículas orgânicas presentes na água, alguns tipos de algas e a filtração é a forma mais comum de alimentação, podendo filtrar até dois litros de água por dia.¹⁷⁻¹⁹

As larvas, morfologicamente, são alongadas, vermiformes, esbranquiçadas. O corpo é formado por cabeça, tórax e abdome (figura 1.3). A cabeça possui um par de antenas, olhos compostos e alguns ocelos e aparelho bucal mastigador-raspador. O tórax é globoso, mais largo que a cabeça com segmentos fundidos e revestidos por cerdas. No oitavo e último segmento localiza-se o sifão respiratório (curto, grosso e escuro).²⁰



Figura 1.3 Estágio larval do *A. aegypti*³

Seu ciclo de vida compreende quatro estágios ou instares (L1, L2, L3 e L4). A mudança entre os estádios larvais dura aproximadamente 24 horas, numa temperatura média de 28,5°C. O primeiro instar (L1) rompe o ovo pelo atrito de um “*dente*” formado por quitina situado na cabeça da larva contra a casca do ovo.²¹ A durabilidade dessa fase depende de fatores, tais como temperatura da água, densidade populacional no criadouro e disponibilidade de alimento.

O quarto instar (L4), estando na sua fase final de desenvolvimento, cessa a alimentação, em virtude da sua metamorfose para o próximo estágio de vida, a pupa, o qual não se alimenta mais. O seu completo desenvolvimento leva em torno de 6 a 10 dias

e é influenciado pela temperatura, luminosidade, salinidade, poluentes orgânicos e inorgânicos, entre outros.^{12,17}

1.2.1.3 A Pupa

A mudança entre os estádios larvais dura aproximadamente 24 horas e o pupal tem um tempo médio de 48 h, numa temperatura média de 28,5°C. A pupa não se alimenta e é o estágio de vida que representa a transição do indivíduo do meio aquático para o terrestre.



Figura 1.4 Estágio de pupa do *A. aegypti*⁴

Morfologicamente tem aspecto de “vírgula” em virtude da cabeça unir-se ao tórax, formando o cefalotórax (figura 1.4). Normalmente fica parada na superfície da água. No entanto, quando perturbada move-se com bastante agilidade, ficando na superfície da água para que o mosquito adulto possa emergir de seu interior. Seu corpo tem coloração esbranquiçada semelhantemente à larva, porém, à medida que se aproxima da transformação em adulto, adquire coloração mais escura. Respiram por trombetas localizadas no cefalotórax que atravessam a superfície da água.¹²

1.2.1.4 O Mosquito

Depois de emergir do estágio de pupa, o mosquito leva alguns segundos para que a quitina de seu corpo se enrijeça e permita que este tenha forças para voar e deixar o sítio de oviposição. Os espécimes adultos medem de 3 a 6 mm de comprimento. Apresentam

coloração escura com faixas brancas nas bases dos segmentos no torso e um “desenho em forma de lira” no mesonoto (figura 1.5). Apresentam antenas plumosas com palpos mais longos nos machos e pilosas nas fêmeas, característica que os diferem morfologicamente. As fêmeas adultas são hematófagas, necessitam de sangue para maturação dos ovos. Apresentam aparelho bucal picador, embora também se alimentem de seivas de plantas como os machos, enquanto esses possuam aparelho bucal tipo sifonador-sugador.^{12,22}

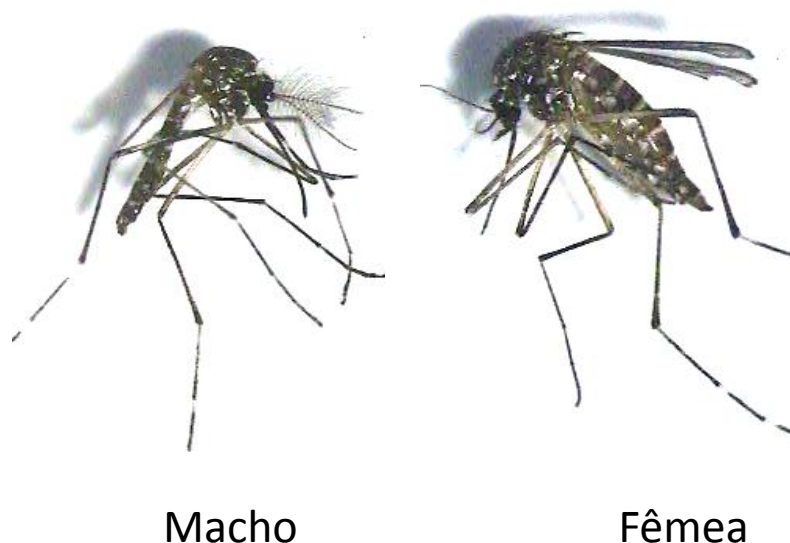


Figura 1.5 Adultos de *A. aegypti* (Fotografia obtida no insetário do Laboratório de Ecologia Química – DQF).

Os mosquitos adultos estão encarregados da fase reprodutora do inseto. Esta espécie alimenta-se de sangue de animais vertebrados, porém o homem é sua principal vítima.¹⁷ As fêmeas de *A. aegypti* costumam picar nas primeiras horas da manhã e nas últimas da tarde, evitando o sol forte e temperatura elevada, embora possam atacar à sombra mesmo nas horas quentes dentro ou fora de casa. Há suspeitas de que alguns ataques ocorram durante a noite. O indivíduo pode não perceber a picada, pois no momento não dói e nem coça.³

O intervalo médio entre o repasto sanguíneo e a oviposição é de três dias, em condições ideais de temperatura e umidade relativa.¹⁷ Em geral a fêmea faz uma postura de ovos após cada repasto sanguíneo. Em cada oviposição são liberados cerca de 50 a 70 ovos, distribuídos aos poucos em diferentes criadouros, a fim de aumentar as chances de sobrevivência dos seus descendentes, garantindo o sucesso reprodutivo e a dispersão do mosquito.²³ Em fêmeas infectadas com o vírus da dengue ocorre a transmissão vertical,

transovariana, do vírus, de forma que uma percentual variável das fêmeas da prole já nasce infectada.^{17,21}

A seleção do sítio de oviposição por fêmeas grávidas envolve respostas visuais, olfativas e sensoriais.²³ Muitos fatores podem influenciar na seleção do sítio de oviposição dos mosquitos entre eles: físicos, químicos e biológicos.²⁴

A capacidade de dispersão do mosquito pelo voo é pequena quando comparada a outras espécies. Normalmente a fêmea reside nas proximidades do local onde eclodiu, podendo deslocar-se por no máximo 100 metros. Porém uma fêmea grávida pode se deslocar por grandes distâncias (até 3000 metros) em busca de um local adequado para a postura dos ovos, quando não há um recipiente adequado na sua área de residência. O principal meio de dispersão da espécie, no entanto é o transporte passivo dos ovos e larvas em recipientes.¹⁵

1.3 Flores ornamentais

O termo *flores tropicais* é utilizado para denominar produtos de Floricultura originários de regiões tropicais.²⁵ As plantas ornamentais dessa categoria, flores e folhagens, destinadas ao corte são perenes e de grande beleza por seu porte e formas exóticas. Estas plantas são apreciadas em arranjos florais e nos jardins devido à rusticidade e ao valor ornamental que apresentam. Enquanto uma flor tradicional possui vida em vaso média de cinco dias, as flores tropicais podem durar até 20 dias. A diversidade de cores, formas e a durabilidade que essas flores apresentam são características positivas para a arte floral, o que tem proporcionado um significativo aumento na demanda destas espécies.²⁶

As espécies tropicais ocorrem naturalmente na faixa tropical úmida da América, Ásia e Pacífico Oeste ou são exploradas em plantios convencionais.²⁷ A produção de flores tropicais no Brasil fechou o ano de 2011 com movimentação financeira em torno de R\$ 4,4 bilhões. Segundo a Câmara Setorial da Cadeia Produtiva de Flores e Plantas Ornamentais, o setor registrou crescimento de cerca 10%, nos últimos cinco anos, e já emprega 194 mil pessoas em todo o país.²⁸

O Brasil apresenta vantagens para se especializar na produção de flores, devido aos microclimas, disponibilidade de terra, água, energia e mão-de-obra. Esse conjunto de fatores reflete diretamente na qualidade do produto e favorece custos mais baixos acarretando preços competitivos com os mercados externos.²⁹

O desenvolvimento da floricultura tropical em Pernambuco foi significativo nos últimos anos em vários municípios da Zona da Mata de Pernambuco e em Petrolina, no sertão do estado. Na maioria das áreas produtoras são cultivadas espécies ou cultivares das famílias Zingiberaceae, Heliconiaceae, Araceae, Orchidaceae, além de vários tipos de folhagens.³⁰ Atualmente, a produção de flores tropicais é conduzida por pequenos produtores, em áreas com média de cinco hectares.³¹

Apesar do crescimento do setor nos últimos anos, o cultivo de algumas espécies como o Bastão-do-Imperador é reduzido entre os produtores de flores tropicais em Pernambuco em virtude da pouca durabilidade pós-colheita, que limita a comercialização apenas para o mercado interno, dificultando a exportação.²⁹

1.4 Considerações botânicas

1.4.1 Sobre a família Zingiberaceae

A palavra "*ginger*" realmente se refere ao gengibre comestível do comércio conhecido na língua malaia como "*Halia*", cujo nome científico é *Zingiber officinale* Roscoe, enquanto o "*gingers*" é um termo geral para os membros da família do gengibre. O nome Zingiber provavelmente se originou da palavra árabe "*zanjabil*" e mais tarde a palavra sânscrita "*singabera*" (que significa chifre de raiz), que deu origem ao nome grego clássico "*zingiberi*" e finalmente "*zingiber*" em latim. Botanicamente, Zingiber dá seu nome à toda a família do gengibre, Zingiberaceae.³²

A família Zingiberaceae é a maior da ordem Zingiberales e uma das maiores do reino. É representada por plantas herbáceas e perenes, aromáticas e geralmente com rizomas dos quais nascem caules aéreos, que transportam folhas com larga bainha na base e que envolve o caule.^{33,34}

É constituída de 53 gêneros e mais de 1.200 espécies nativas de regiões tropicais, especialmente do sul e sudeste da Ásia,^{35,36} expandindo-se através da África tropical até a América do Sul e Central.³⁷ Suas espécies, principalmente da floresta primária, crescem em habitats sombreados ou semi-sombreados, ricos em húmus.³⁸

São comumente conhecidas como ginger e muitas espécies da família têm valor econômico fornecendo alimentos (féculas dos rizomas), perfumes, condimentos de propriedades aromáticas, corantes, fibras e papel.³⁷ As plantas da família Zingiberaceae têm sido usadas como alimento, condimento, medicamento, tintura, perfume e

estética.^{39,40} O *Zingiber officinale* Rosc., vulgarmente conhecido como gengibre, é utilizado para fins medicinais e como condimento.⁴¹ Metabólitos secundários de espécies da família têm sido usados como anti-inflamatórios⁴² e inibitório de HIV-1 protease.^{43,44}

As plantas desta família contêm principalmente óleos essenciais, incluindo terpenos, alcoóis, cetonas, flavonóides, carotenóides e fitoestrogenos.⁴⁵ Os constituintes menos polares incluindo curcuminoides e gíngerois isolados de espécies da família são particularmente importantes e relevantes por suas aplicações, dos quais têm sido relatadas atividades biológicas como antioxidante, antifúngicos, inseticidas, larvicidas e antiinflamatórias.⁴⁶⁻⁴⁸

No aspecto ornamental destacam-se os gêneros *Zingiber*, *Alpinia*, *Nicolaia*, *Hedychium* e *Kaempferia* pela beleza da inflorescência e folhagem.⁴⁹ As diversas espécies da família possuem dupla aptidão no paisagismo no mesmo tempo que são utilizadas nos jardins, suas inflorescências decorativas e duráveis, são bastante empregadas na formação de arranjos florais (*Alpinia purpurata* e *Zingiber spectabilis*). A maioria delas é indicada para regiões tropicais, cultivadas tanto à meia-sombra como em locais ensolarados. Servem para formação de maciços, renque ou grupos isolados, dependendo da espécie.⁵⁰

1.4.2 Sobre a tribo Alpinieae

A classificação aceita atualmente determina a presença de quatro tribos dentro da família *Zingiberaceae* e subfamília *Alpinioideae*: *Hedychieae*, *Alpinieae*, *Zingibereae* e *Globbeae*, que são assim classificadas de acordo com algumas características vegetativas e florais.³⁶ A tribo *Alpinieae* possui 25 gêneros, dentre eles estão *Alpinia* e *Eltingera*, com 225 e 70 espécies, respectivamente.⁴⁵

1.4.3 Sobre o gênero *Eltingera*

As touceiras desse gênero apresentam hastes vegetativas com folhas grandes e vistosas, e hastes florais com inflorescências terminais, emitidas separadamente. No interior das brácteas das inflorescências, surgem flores de coloração vermelha, amarela, rosa, branca e outras numerosas combinações que, ao abrirem, tornam este gênero um dos mais belos da família (Figura 1.6).^{29,51}



Figura 1.6 Inflorescências de algumas espécies do gênero *Etlingera*: (A) *E. venusta* (B) *E. corneri* (C) *E. pyramidosphaera* (D) *E. hemisphaerica* (E) *E. megalocheilos* (F) *E. nasuta* (G) *E. brevibractum* (H) *E. velutina* (I) *E. fimbriobracteata* (J) *E. fenzlii* (K) *E. elatior* Thai Queen (L) *E. littoralis*⁵

A propagação das espécies do gênero pode ser por sementes (sexuada) protegidas por cápsulas arredondadas ou alongadas nas inflorescências, as quais rompem quando estão maduras e prontas para a dispersão.⁵² Apesar da facilidade de propagação por sementes, as espécies do gênero *Etlingera* são propagadas em plantios comerciais, preferencialmente, por divisão de touceira.²⁹

As espécies desse gênero já foram reportadas por possuírem óleo essencial, apresentando rendimentos (m/m) entre 0,02 e 0,9%.^{53,54} As espécies são ricas em mono e sesquiterpenos, porém também são encontrados componentes menos comuns como ácidos graxos e ésteres. Os componentes majoritários de algumas espécies do gênero são 95,73% metil chavicol para o rizoma de *E. punicea*⁵⁵; 37,7 e 58,1% de (Z)-metil isoeugenol nas folhas e rizomas, respectivamente de *E. littoralis*⁵³; 21,6 e 6,01% de dodecyl acetate nas folhas de *E. fulgens*, e *E. rubrostriata*, respectivamente e 44,% de ácido dodecanóico nas folhas de *E. maingayi*⁵⁶; 16,8 e 17,4% de 1,8-cineole para rizoma e caule, 12,3% de α -felandreno para folhas e 12,2% de β -pineno para planta inteira de *E. sphaerocephala*.⁵⁴

Várias espécies do gênero possuem atividades biológicas reportadas na literatura que incluem antibacteriana, antioxidante e repelente, como mostrado na gráfico 1.1.

Tabela 1.1 Atividade biológica de diferentes espécies do gênero *Etlingera*

Espécie	Atividade biológica	Referência
<i>E. littoralis</i>	Antibacteriana, antiplasmódica, antifúngica	57-60
<i>E. punicea</i>	Antimicrobiana	55
<i>E. fulgens</i>	Antibacteriana, antioxidante, inibição da	56,60,61
<i>E. maingayi</i>	tirosinase	
<i>E. rubrostriata</i>	Antibacteriana, antioxidante	
<i>E. pyramidosphaera</i>	Atividade repelente ao gorgulho do arroz	62

O cozimento dos rizomas da espécie *E. littoralis* tem sido utilizado para: o tratamento de dor de estômago; carminativo; tônico para o coração.⁶³ Uma dihidrocalcona, isolada da espécie foi reportada como tendo atividade antibacteriana⁵⁷ e antiplasmódica⁵⁸.

Os extratos metanólicos das folhas das espécies *E. elatior*, *E. fulgens*, *E. maingayi*, *E. littoralis* e *E. rubrostriata* foram reportados como contendo atividades anti-oxidante e antibacteriana como inibidoras das bactérias Gram-positivas *B. cereus*, *M. luteus* e *S. aureus*.⁶⁰

1.4.4 Sobre a espécie *Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith

Conhecida como *bunga kantan*, que significa flor de gengibre em malaio, essa espécie só possuía duas variedades cultivadas comercialmente até a década de 90.²⁹ É conhecida como Bastão-do-Imperador, flor-da-redenção ou gengibre-de-torcha e em inglês como “*torch ginger*” ou “*tuplip ginger*”. É uma herbácea rizomatosa e robusta tendo a Malásia como centro de origem. As inflorescências da planta são cônicas e podem atingir 2,0 m de altura, no chamado eixo de inflorescência. As hastes, que são eretas e lembram cana-de-açúcar, apresentam folhagens com coloração de verde rosado a marrom-avermelhada e podem chegar a 6,0 metros.⁶⁴⁻⁶⁶

É utilizada principalmente para paisagismo, porém além de serem ornamentais, as flores e brotos são também comestíveis, fazendo parte da culinária de diversos países asiáticos. Eles são finamente fatiados e podem ser adicionados a vários pratos, conferindo a eles um sabor picante pungente diferente do gengibre comercial.⁶⁶

No Nordeste do Brasil, são cultivadas com inflorescências de colorações: rosa claro, denominada Porcelana; rosa mais escuro, denominada Rosa (*Pink Torch*) e vermelha denominada Vermelha (*Red Torch*)²⁹, porém em Pernambuco é cultivada uma variedade chamada tupila, ou *tulip torch ginger* em inglês, sendo mais comum, no entanto as três variedades citadas anteriormente (figura 1.7).⁶⁷



Figura 1.7 Inflorescências das variedades vermelha (A), rosa (B), porcelana (C) e tulipa (D) da espécie *E. elaior*⁶

Tem preferência por solos ricos em matéria orgânica, úmidos e o espaçamento entre as touceiras deve ser generoso (no mínimo de 2,5 m entre fileiras e 1,5 m entre covas), uma vez que formam touceiras enormes tanto em altura como em extensão. Yunus e colaboradores⁶⁸ demonstraram que a espécie também se propaga *in vitro*. São plantas que exigem temperaturas elevadas e calor constante para estimular o florescimento, por isso se desenvolvem bem em clima quente como no Nordeste brasileiro.²⁹ As inflorescências se originam diretamente no sistema de rizomas, sendo separadas das hastes vegetativas. Depois de plantada, a nova planta irá florescer no período de um ano e meio a dois anos⁶⁶ e a etapa ideal de corte é aquela no qual a inflorescência apresenta-se com as brácteas semiabertas (figura 1.8e).^{29,30}



Figura 1.8 Etapas de desenvolvimento das hastes florais de *E. elatior*⁶⁹

Várias atividades biológicas são atribuídas à espécie. Os extratos metanólicos de folhas frescas de *E. elatior* possuem atividade antioxidante e antibacteriana e atuam como inibidores das bactérias Gram-positivas *B. cereus*, *M. luteus* e *S. aureus*. A atividade antioxidante mais pronunciada foi constatada nas folhas, seguida pela inflorescência e por fim nos rizomas.^{60,61,70} Além da atividade de inibição da tirosinase alta reportada por Chan e colaboradores⁶¹. A alta atividade antioxidante foi confirmada por Haleagrahara e colaboradores⁷¹ ao testarem o efeito protetor do extrato de *E. elatior* em biomarcadores oxidativos em medulas de ratos.

Também foram reportadas atividade citotóxica e anti-tumoral de extratos de rizomas⁷², anti-fúngica de extratos do fruto e rizoma⁵⁹, propriedade farmacológicas como antifúngica e antibacteriana frente à micro-organismos de importância farmacêutica.⁷³

1.5 Óleos essenciais

1.5.1 Definições e características

O óleo essencial é uma mistura complexa de substâncias voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas, podendo envolver de 10 a 100 componentes.⁷⁴ Apresentam-se em certos gêneros de plantas superiores e inferiores, bem como em microrganismos, e podem ou não exalar odor.^{75,76} Segundo Simões⁷⁴, embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos essenciais, sua composição pode variar conforme a localização. Além disso, fatores como diversidade genética, habitat e os formas de plantio podem influenciar na composição do óleo essencial.⁷⁷

Com relação à função química, os óleos essenciais são compostos por hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos contendo enxofre, apresentando diferentes concentrações. Dentre esses, o grupo com maior representatividade é o dos terpenóides, que conferem suas características organolépticas⁷⁸, e que tem sua origem biossintética pela fusão de unidades isoprênicas de cinco carbonos.⁷⁹ Essas unidades de isopreno podem se ligar formando hemi, mono, sesqui, di, tri e tetra-terpenos.^{74,80,81}

Os terpenos são biossintetizados a partir de metabólitos primários por no mínimo duas rotas diferentes: a rota do metileritritol fosfato (MEP), onde o gliceraldeído 3-fosfato e piruvato levam à formação do isopentenil-pirofosfato (IPP) e a rota do ácido mevalônico, onde três moléculas de acetil-CoA são ligadas, a partir de uma série de etapas da rota, para formar este ácido e posteriormente, o IPP (isopentenil-pirofosfato) o qual originará terpenos maiores.⁷⁹

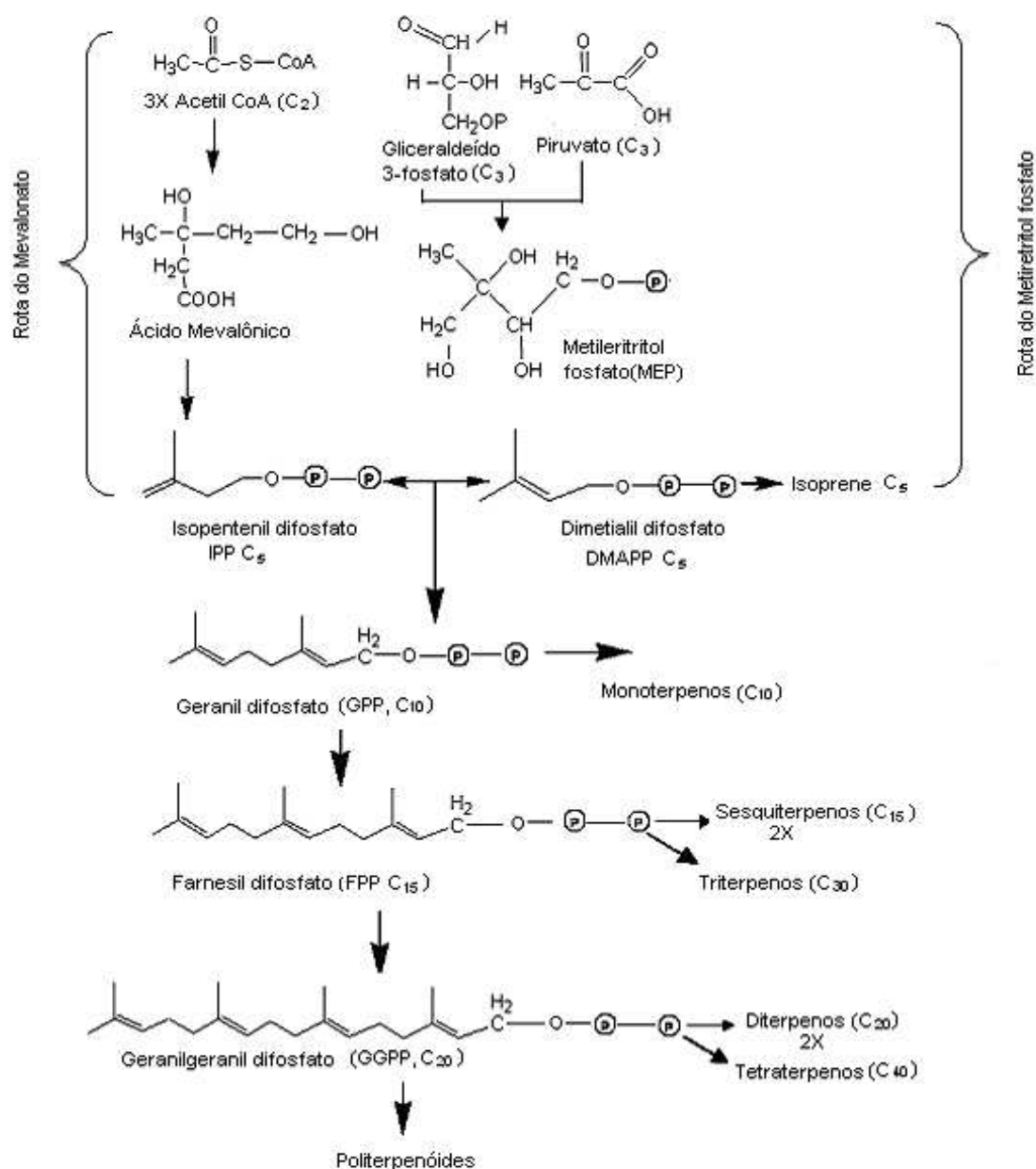


Figura 1.9 Biossíntese dos terpenos⁷⁹

1.5.2 Processos de extração

Os óleos essenciais podem ser obtidos através de diferentes processos, dependendo da localização do óleo na planta, quantidade de óleo e das características requeridas para o produto final. Os processos usuais são: prensagem ou expressão; destilação por arraste a vapor; extração com solventes voláteis e CO₂ supercrítico.⁸²

Dentre essas técnicas, destacam-se a hidrodestilação e extração com solventes voláteis, por serem de pouca complexidade e custo reduzido. Outros métodos podem ser

utilizados para a obtenção desses óleos, como por exemplo: extração por soxhlet; extração por maceração e a extração por ultrassom e microondas.⁸³⁻⁸⁶ Silva e colaboradores⁸⁷ também mostraram que o método de hidrodestilação, quando comparados com outros métodos como por soxhlet e infusão, para a pimenta rosa (*Schinus molle*), apresentou a extração de um maior número de componentes, embora o rendimento tenha sido maior com a extração por Soxhlet.

1.5.2.1 Extração por hidrodestilação

A extração de óleo por hidrodestilação consiste em uma técnica que pode ser utilizada para praticamente todos os tipos de materiais vegetais e abrange uma grande quantidade de casos, dependendo pouco da quantidade de material disponível para obtenção de rendimento satisfatório. A técnica consiste em imergir o material vegetal, seco ou fresco, inteiro ou pulverizado, em água destilada que é aquecida e o vapor d'água, junto com o óleo essencial são recolhidos por um extrato de Clevenger modificado.⁸⁸

1.5.3 Atividades biológicas

Historicamente, a utilização de espécies de plantas produtoras de óleos essenciais tem desempenhado um papel importante para a humanidade. Desde a Idade Média, os óleos essenciais têm sido amplamente utilizados para combater microorganismos, como inseticidas e para aplicações medicinais e cosméticos, especialmente nos dias de hoje nas indústrias farmacêutica, higiene, cosmética, agrícola e alimentar.⁸⁹ Esse uso envolve desde a indústria de perfumes, alimentos e medicina popular⁹⁰, fornecendo substâncias purificadas como limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol.⁷⁸

Estudos anteriores mostram que óleos essenciais de diversas partes de plantas de variados locais mostraram atividade antifúngica, antibacteriana, citotóxica, antioxidante, larvicida, tripanocida, leishmanicida, anti-giardia, anti-gripe, anti-radicaís e espasmolítico.^{89,91-99}

No que se refere ao uso de óleos essenciais no combate a vetores de doenças infecciosas já foram reportados diversos trabalhos que atestam a atividade repelente frente à *A. aegypti*¹⁰⁰ e insetos de outros gêneros como *Culex* e *Anopheles* e até outros artrópodes.¹⁰¹

Além disso, já foram relatadas informações importantes que sugerem que os óleos essenciais podem atuar contra pragas agrícolas como alternativa viável no seu uso como inseticida, fumigante e fungicidas.¹⁰²

Diversos estudos comprovam a atividade de óleos essenciais contra diferentes espécies de mosquitos, com destaque para a espécie *A. aegypti* como é possível observar nos exemplos citados na tabela 1.2.

Tabela 1.2 Atividade larvicida de óleos essenciais de variadas espécies vegetais frente à *A. aegypti*.

Espécie	Parte estudada	Atividade larvicida	Majoritários	Referência
<i>Clausena dentata</i>	Folhas	CL ₅₀ : 140,2 mg/L	Sabinene (21,3%), biofloratriene (19,6%), borneol (18,3%)	103
<i>Piper marginatum</i>	Inflorescência	CL ₅₀ : 20,0 ppm	Patchouli alcohol (23,4%), (E)-azarone (22,1%), (E)-Caryophyllene (13,1%)	104
<i>Chloroxylon swietenia</i>	Folhas	CL ₅₀ : 16,5 ppm	Geijerene (26,9%), Limonene (15,2%), Germacrene D (10,7%)	105
	Caule	CL ₅₀ : 20,2 ppm	Geijerene (17,7%), Limonene (12,9%), Pregeijerene (9,9%)	
<i>Piper permucronatum</i>	Folhas	CL ₅₀ : 36,0 ppm	Dillapiol (54,7%), Myristicin (25,6%), Elemicin (9,9%)	106
<i>Piper hostmanianum</i>	Folhas	CL ₅₀ : 54,0 ppm	Asaricin (27,4%), Myristicin (20,3%), Dillapiol (7,7%)	
<i>Alpinia purpurata</i>	Inflorescência (vermelha)	CL ₅₀ : 80,7 ppm	β-caryophyllene (18,3%), β-pinene (13,9%), α-pinene (6,3%)	48
	Inflorescência (rosa)	CL ₅₀ : 71,5 ppm	β-pinene (26,6%), β-caryophyllene (15,6%), α-pinene (13,9%)	
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Folhas	CL ₅₀ : 31,0 ppm	α-pinene (22,5%), p-cymene (21,7%), α-phellandrene (20,1%)	107
<i>Eucalyptus urophylla</i>	Folhas	CL ₅₀ : 95,5 ppm	1,8-cineole (58,3%), α-terpinyl acetate (14,9%) e α-pinene (6,3%)	
<i>Tagetes patula</i>	Folhas	CL ₅₀ : 13,6 ppm	limonene (13,6%), terpinolene (11,2%) e β-caryophyllene (8,0%)	108
<i>Dendropanax morbifera</i>	Flores	CL ₅₀ : 62,3 ppm	γ-elemene (18,6%), Tetramethyltricyclohydrocarbon (10,8%), β-zingiberene (10,5%)	109
<i>Lippia gracillis</i>	Folhas	CL ₅₀ : 98,0 ppm	Carvacrol (44,4%), o-cymene (9,4%), γ-terpinene (9,2%)	110
<i>Lippia sidoides</i>	Folhas e ramos	CL ₅₀ : 63,0 ppm	Thymol (80,8%), p-cymene (8,6%), β-caryophyllene (5,1%)	111
<i>Ocimum americanum</i>	Folhas e ramos	CL ₅₀ : 67,0 ppm	E-Methyl-Cinnamate (70,9%), Z-Methyl-Cinnamate (8,8%), E-Bergamoptene (6,8%)	
<i>Ocimum gratissimum</i>	Folhas e ramos	CL ₅₀ : 60,0 ppm	Eugenol (43,7%), 1,8-cineole (32,7%), Z-ocimene (6,2%)	
<i>Cymbopogon citratus</i>	Folhas e ramos	CL ₅₀ : 69,0 ppm	Geranial (60,3%), Neral (39,7%)	

1.6 O Óleo essencial da espécie *Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith

O óleo essencial dessa espécie, extraídos de diferentes partes vegetais como a inflorescência ou outras partes da planta como o rizoma, as folhas, o eixo da inflorescência e a raiz, já foi estudado previamente. A composição do óleo varia de acordo com a parte vegetal e também com o local de origem do material vegetal, como é possível notar na tabela 4.3 (seção 4.3, pág. 63).

Abdelmageed e colaboradores¹¹² estudaram o efeito do tempo de secagem das folhas, rizomas, inflorescência e eixo de inflorescência de *E. elatior* na composição do óleo essencial e concluíram que de um tempo de 6 a 72 horas, a composição do óleo essencial varia muito para todas as partes da planta. Eles também notaram que o tempo de secagem tem um efeito importante no rendimento do óleo essencial, sendo incrementado para as folhas e inflorescências e diminuído para eixo de inflorescência e rizomas, conforme se aumentava o tempo de secagem.

Ao óleo essencial da planta inteira de *E. elatior* foram atribuídas atividades antioxidante e antibacteriana¹¹³, atividade antibacteriana para o óleo das folhas^{56,114}, atividade antioxidante para o óleo das inflorescências¹¹⁵ e atividade repelente no adulto do gorgulho do arroz *Sitophilus zeamais*.⁶²

1.7 Análises eletrofisiológicas

A cromatografia gasosa acoplada à detecção eletroantenográfica (GC-EAD) é uma ferramenta valiosa para localizar rapidamente componentes detectáveis pela antena do inseto inseridos em misturas complexas de compostos, como é o caso dos óleos essenciais, permitindo a escolha de apenas compostos estimulantes à antena para testes subsequentes de comportamento.¹¹⁶

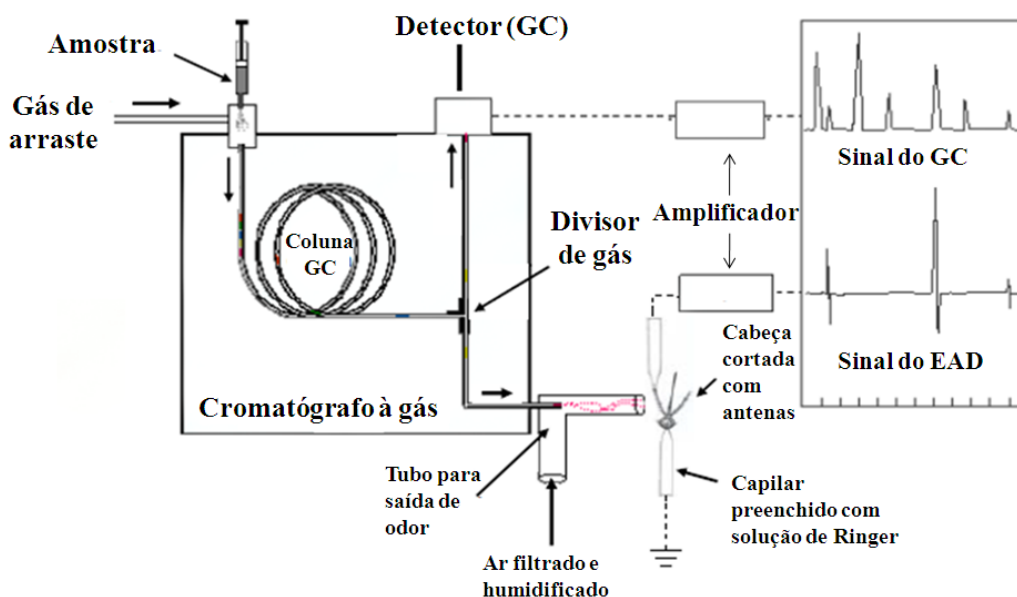


Figura 1.10 Esquema de um sistema de Cromatografia à gas acoplada a detecção eletroanetográfica¹¹⁷

O esquema de um cromatógrafo a gás acoplado a um detector eletroantenográfico (GC-EAD) está representado na figura 1.10. A amostra ao ser injetada irá percorrer toda a coluna para que haja a separação dos componentes da mistura. Ao final da corrida, o efluente da coluna é dividido em duas partes: uma é conduzida ao detector de ionização de chama (FID) e, conseqüentemente, o cromatograma é traçado, e a outra parte vai para o EAD, onde a resposta da antena do inseto é amplificada e registrada. Em função de ambas serem simultâneas, é possível saber se o composto registrado é ativo ou não, isto é, ele causa despolarização ou não na antena, indicando a presença de receptores olfativos para aquele composto.

1.7.1 Análises eletrofisiológicas em mosquitos

A técnica de GC-EAD já foi utilizada para a detecção de compostos ativos, inseridos em óleos essenciais e outras misturas de voláteis, em diversos tipos de insetos.

Para espécies de mosquitos também são reportadas respostas a componentes de óleos essenciais. Leal e Uchida¹¹⁸ utilizaram a técnica para detectar os componentes do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (Família: Poaceae) responsáveis pela atividade repelente de três espécies de mosquitos: *Culex pipiens pallens*, *Culex pipiens quinquefasciatus* e *A. albopictus* e as análises mostraram que os terpenos geranial e neral,

presentes no óleo essencial da espécie, são os responsáveis pela atividade repelente da mesma.

Cooperband e colaboradores¹¹⁹ utilizaram a técnica para testar as respostas das antenas de fêmeas de *C. p. quinquefasciatus* à voláteis, extraídos pela técnica de headspace, de fezes de galinha acidificadas e encontraram oito aldeídos que geraram respostas nas antenas dos mosquitos, sendo eles (*E*)-2-decenal, undecanal, dodecanal, tetradecanal, pentadecanal, hexadecanal, heptadecanal, e octadecanal.

Campbell e colaboradores¹²⁰ estudaram a resposta de sete óleos essenciais encontrando 42 compostos que provocaram estímulo nas antenas do *A. aegypti*, sendo eles, em sua maioria, mono e sesqui-terpenos, sendo os mais comuns β -caryophyllene, linalool, 1,8-cineole, geraniol, e geranial, porém não avaliaram a ação deterrente ou repelente desses compostos identificados por estimularem a antena. Para o autor esse comportamento e seletividade dos mosquitos a estímulos olfatórios provenientes de locais de alimentação ou oviposição podem ser atribuídas a muitas sensilas da antena.

Logan e colaboradores¹²¹ estudaram a atratividade de compostos voláteis derivados de pele humana em mosquitos de *A. aegypti*, encontrando 33 compostos eletrofisiologicamente relevantes, dentre eles cinco mostraram maior resposta sendo eles: 6-methyl-5-hepten-2-one, octanal, nonanal, decanal, geranylacetone. Também mostraram como a mistura entre esses compostos desempenha um papel importante na ação deles sobre o mosquito.

Dekker e colaboradores¹²² avaliaram a atividade de substâncias voláteis, extraídas pela técnica de headspace, da espécie *Ocimum forskolei* frente ao mosquito *A. aegypti*, e os resultados indicaram que oito compostos voláteis que estimularam a antena e foram identificados como sendo (*E*)-ocimene, (*S*)-(+)-1-octen-3-ol, *E*-caryophyllene, naphthalene, (*R*)-(-)- α -copaene, methyl salicylate, methyl cinnamate e (*R*)-(-)-linalool. A atividade repelente dos três últimos compostos foi confirmada em testes com fêmeas da espécie.

**Caracterização química, atividade larvicida e deterrente de oviposição
do óleo essencial da inflorescência do Bastão do Imperador (*Etlingera
elator*) frente à *Aedes aegypti***

OBJETIVOS

OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade larvicide e deterrente de oviposição dos produtos da hidrodestilação da inflorescência de três variedades do Bastão-do-Imperador (*E. elatior*), frente ao mosquito *A. aegypti*.

2.2 Objetivos específicos

- Extrair o óleo essencial da inflorescência de três variedades, vermelha, rosa e porcelana da espécie *E. elatior*, utilizando a técnica de hidrodestilação;
- Avaliar a atividade larvicide dos produtos da hidrodestilação, óleo essencial, extrato aquoso e hidrolato da *E. elatior* frente às larvas em estágio L4 do mosquito *A. aegypti*;
- Avaliar a atividade deterrente de oviposição dos produtos da hidrodestilação, óleo essencial, extrato aquoso e hidrolato dos óleos essenciais da *E. elatior* frente às fêmeas do mosquito *A. aegypti*;
- Analisar a composição química dos óleos essenciais de três variedades da espécie *E. elatior* pela técnica de Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM);
- Identificar, pela técnica de Detecção Eletroantográfica (EAD), os componentes dos óleos essenciais que provocam respostas nas antenas de fêmeas de *A. aegypti*.
- Avaliar a atividade deterrente de oviposição dos componentes dos óleos essenciais da *E. elatior* que provocaram respostas frente às antenas das fêmeas do mosquito *A. aegypti*;

**Caracterização química, atividade larvícida e deterrente de oviposição
do óleo essencial da inflorescência do Bastão do Imperador (*Etlintera
elator*) frente à *Aedes aegypti***

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e Equipamentos

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Ecologia Química, Laboratório de Bioensaio e Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química Fundamental (UFPE).

3.1.1 Moedor elétrico

Utilizou-se o moedor elétrico da marca Oster®, modelo 4655-057, para trituração das amostras vegetais.

3.1.2 Extrator de Clevenger

Para extração do óleo essencial foi utilizado um extrator de Clevenger modificado, acoplado a um balão de fundo redondo de 5L e como fonte de calor, uma manta aquecedora da marca QUIMIC®, modelo Q321A28.

3.1.3 Cromatógrafo a Gás acoplado ao Espectrômetro de Massas

Os óleos essenciais das três variedades da espécie *E. elatior* foram analisados por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas em um sistema quadrupolo Agilent 5975C Series CG-EM (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA), equipado com uma coluna apolar DB-5 (Agilent J&W; 60 m x 0.25 mm d.i., 0.25 µm espessura da película).

3.2 Metodologia Experimental

A seguir estão descritos os procedimentos efetuados experimentalmente para obtenção dos resultados obtidos no presente trabalho:

3.2.1 Origem, Coleta, Preparação e Armazenamento da Amostra Vegetal

A inflorescência das variedades vermelha, rosa e porcelana da espécie *E. elatior* (figura 3.1) foram compradas da produtora Florix Flora Tropical LTDA, localizada na Estrada de Mumbeca, KM57 – Guabiraba, Recife, Pernambuco. (-7° 56' 9.24" de latitude, -34° 55' 55.88" de longitude).

As plantas são cultivadas em um lote de 22 hectares onde 0,8 hectares são destinados para cada variedade do Bastão. O relevo é 50% plano e 50% acidentado onde 90% do mesmo ficam expostos ao Sol. A umidade do ar varia entre 70 e 90% e a temperatura durante o dia atinge mais que 26°C e à noite menos de 18°C.

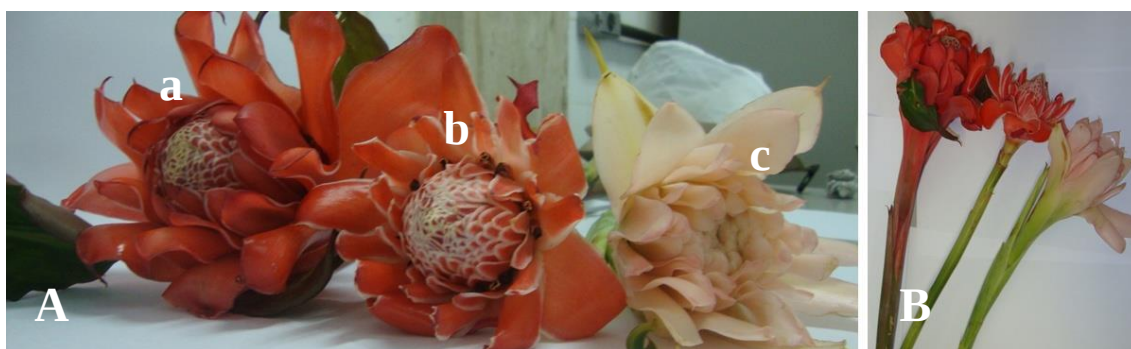


Figura 3.1 Inflorescências da espécie *E. elatior*. (A) Parte superior da inflorescência das variedades: vermelha (a), rosa (b) e porcelana (c). (B) Parte lateral da inflorescência das variedades: vermelha, rosa e porcelana.

O corte das plantas é realizado com a inflorescência semiaberta, sempre pela manhã antes do período de elevação da temperatura. As plantas são lavadas com água e hidratadas antes de serem comercializadas e são mantidas em tanques com água limpa e fresca por um período médio de 24 horas, não ultrapassando 48 horas.

Depois de coletadas, as mesmas foram entregues no mesmo dia à tarde e mantidas em água até o momento da extração por um período máximo de dois dias.

3.2.2 Extração do Óleo Essencial

Para extração dos óleos essenciais da inflorescência das variedades vermelha, rosa e porcelana da espécie *E. elatior*, após coleta, o material vegetal foi encaminhado para o Laboratório de Ecologia Química da UFPE, onde foram pesadas em balança, buscando uma massa média de 500g, aproximadamente 10 inflorescências. Em seguida o material foi processado com 500 ml de água destilada, no moedor elétrico por aproximadamente

2 minutos e então encaminhadas para um balão volumétrico de 5L completando com água destilada até 2,5 litros. O balão foi colocado numa manta de aquecimento e conectado ao aparelho de Clevenger modificado e um condensador. A manta foi aquecida até atingir a temperatura de 160-170 °C. A manta é coberta com papel alumínio para facilitar a manutenção da temperatura constante.

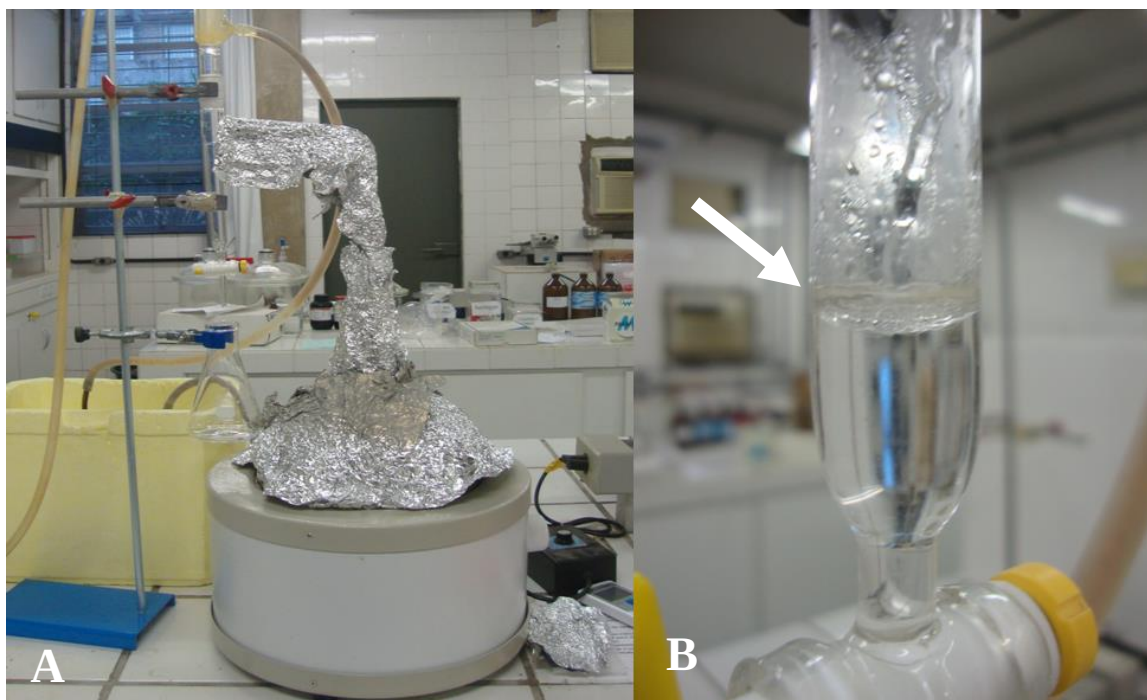


Figura 3.2 (A) Esquema com extrator de Clevenger modificado utilizado na hidrodestilação. (B) Configuração do óleo essencial no extrator, seta representa óleo flutuando sobre hidrolato.

Cada processo de hidrodestilação é acompanhado por um período máximo de 3 horas, coletando-se o óleo em seguida e tratando-o com sulfato de sódio anidro para remoção da água remanescente. Os óleos foram mantidos sob-refrigeração de -24°C até serem submetidos à análise química e/ou teste de atividade biológica.

3.2.3 Características Físicas do Óleo Essencial

Na caracterização das propriedades físicas do óleo da inflorescência da espécie *E. elatior* foram realizadas as análises de rendimento, solubilidade, cor, aparência e pH para os extratos e hidrolatos.

3.2.3.1 Rendimento do Óleo Essencial

Para o cálculo do rendimento da extração de óleo, pesou-se em recipiente de vidro limpo, seco e tarado a 25 °C, determinando-se a massa do óleo em relação à massa da amostra de planta usada.

3.2.3.2 Cor e aparência

A técnica utilizada foi visual, onde, sob um fundo branco, se observou a cor do óleo essencial e para a aparência se fez uma inspeção do óleo no que diz respeito a sua transparência ou limpidez.

3.2.3.3 Solubilidade

Foram testados os seguintes solventes: etanol, acetona, DMSO e Tween[®]80 e verificou-se a limpidez da solução resultante da diluição.

3.2.3.4 pH dos extratos e hidrolatos

Para os extratos aquosos e hidrolatos obtidos como subprodutos da hidrodestilação foram realizados testes de pH utilizando papel indicador universal (pH 0 – 14) da marca Merck[®].

3.2.4 Análises Espectrométricas

3.2.4.1 Padrões

A solução com padrões de hidrocarboneto em hexano foi preparada em laboratório. Todos os hidrocarbonetos foram adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich[®]).

3.2.4.2 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

Para a análise dos óleos essenciais foram injetadas alíquotas de 1µL em split 1:50 do óleo essencial com concentrações variando entre 2000 a 3000 ppm. Posteriormente injetou-se 1µL em split (1:50) da mistura de padrões de hidrocarbonetos: C₉-C₃₄. E finalmente, injetou-se a mistura do óleo essencial e a mistura de padrões de hidrocarbonetos, 1µL (0.2µL de alcanos e 0.8µL de óleo) sob o modo splitless.

A temperatura do CG foi mantida em 60 °C por 3 min, depois foi aumentando de 2,5 °C min⁻¹ até 240 °C e mantida por 10 min nesta temperatura. O fluxo de hélio foi mantido em pressão constante de 100 kPa. A interface do EM foi definida em 200 °C e os espectros de massa registrados em 70 eV (em modo EI) com uma velocidade de escaneamento de 0.5 scan^{-s} de *m/z* 20-350.

A partir da análise dos tempos de retenção dos compostos presentes na amostra do óleo essencial, dos padrões de hidrocarboneto e a combinação do óleo essencial com a mistura de padrões foi calculado o índice de retenção para cada componente do óleo, segundo a equação de Kratz.^{123,124}

$$IR = 100.i. \frac{(trx - trha)}{(trhd - trha)} + 100.N$$

Onde:

IR: Índice de Retenção de Kratz.

i: Diferença do número de carbonos do hidrocarboneto que elui depois do composto com o hidrocarboneto que elui antes.

trx: Tempo de Retenção do composto

trhA: Tempo de Retenção do hidrocarboneto que elui antes do composto.

trhD: Tempo de Retenção do hidrocarboneto que elui depois do composto.

N: Número de carbonos do hidrocarboneto que elui antes do composto.

Os compostos foram identificados a partir de comparação de seus espectros de massa e tempos de retenção àqueles de padrões autênticos disponíveis nas bibliotecas de referência MassFinder 4, NIST08 e Wiley Registry™ 9th Edition, integradas ao software Agilent MSD Productivity ChemStation (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA). As áreas dos picos nos cromatogramas foram integradas para obtenção do sinal iônico total e seus valores utilizados para determinar as proporções relativas de cada composto.

3.2.5 Análises eletrofisiológicas

Análises eletrofisiológicas de cromatografia gasosa acoplada ao detector eletroantenográfico (GC-EAD) (figura 3.3) foram realizadas para testar a reação das antenas de *A. aegypti* aos compostos do óleo essencial de *E. elatior*. Foram realizadas em um cromatógrafo à gas (Trace GC Ultra; Thermo Scientific, Milão, Itália), equipado com um DIC e uma interface de EAD, provida pela Syntech (Kirchzarten, Alemanha). Para as análises foi utilizada uma coluna DB-5 (30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e uma espessura de filme de 0,25 mm). O final da coluna foi conectado a um divisor de duas vias por meio de uma coluna capilar de vidro direcionadas ao EAD e a outra ao FID. Nitrogênio, a um fluxo contínuo de 4 mL/min, foi utilizado como gás de arraste. A saída do EAD foi equipada com um fluxo de ar estéril e umidificado direcionado à antena de fêmeas do mosquito (figura 3.3), seguindo metodologia de Dötter¹²⁵ modificada.

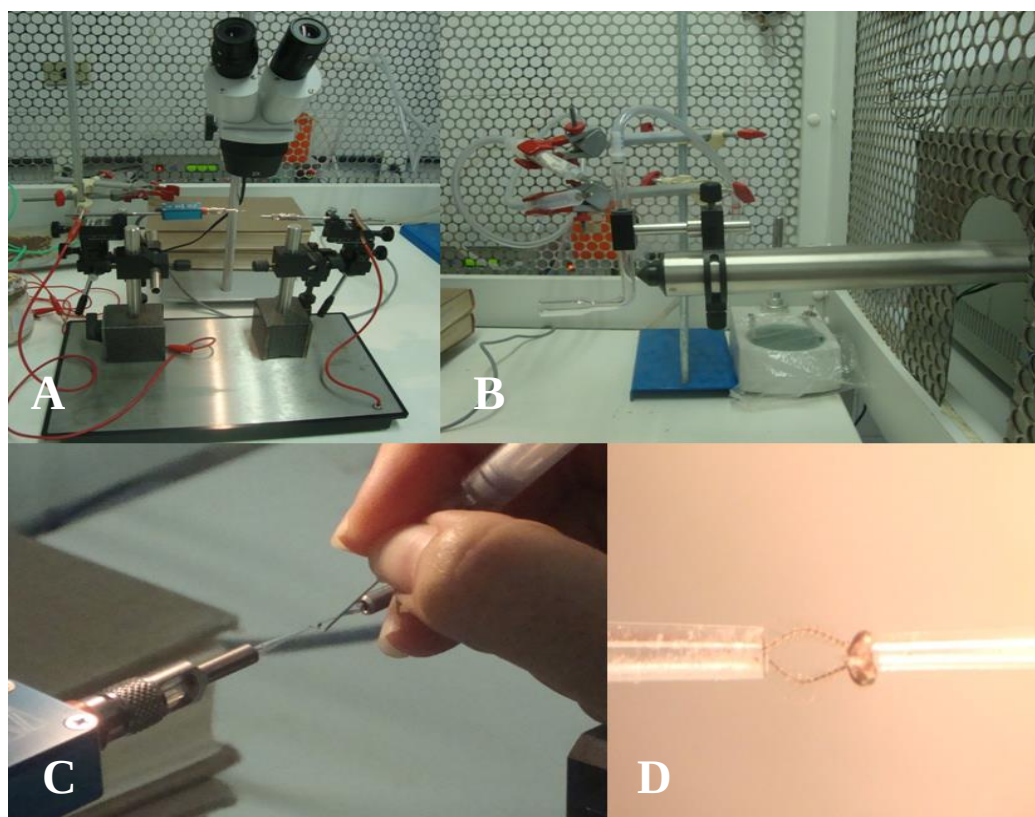


Figura 3.3 Esquema da análise eletrofisiológica. (A) eletrodos, (B) saída do CG, (C) montagem da antena e (D) antena montada (ampliação pelo microscópio).

Foram testadas as antenas de fêmeas da espécie *A. aegypti* com idade de 10 a 17 dias, após três dias de alimentação com repasto sanguíneo. Foi testado um número de 10 antenas para o óleo essencial da variedade vermelha, sendo alterado o número de antenas, dependendo das respostas obtidas. Os sinais foram obtidos cortando-se a cabeça próxima ao tronco do inseto e em ambas as extremidades das antenas e montadas entre dois eletrodos, sendo a cabeça presa em um eletrodo e as extremidades das duas antenas presas ao outro eletrodo (figura 3.3). Os eletrodos foram preenchidos com solução fisiológica (8,0 g/l NaCl, 0,4 g/l KCl, 0,4 g/l CaCl₂) e conectados a fios de prata. Foram obtidos sinais elétricos sincronizados com o cromatograma dos compostos constituintes dos óleos essenciais. Apenas foram considerados ativos os componentes do óleo cujas respostas foram detectadas em dois ou mais testes.

3.2.6 Testes fitoquímicos

Para determinar as classes de compostos presentes nos extratos aquosos e hidrolatos, foram realizados testes fitoquímicos. Estes testes, chamados de *screening* ou prospecção fitoquímica estão descritos no Procedimento Operacional Padrão da Embrapa Amazônia Oriental, aplicado no setor de plantas medicinais do Laboratório de Agroindústria. Este procedimento utiliza técnicas descritas previamente na literatura (Tabela 3.1).^{126–128}

Tabela 3.1 Testes de prospecção fitoquímica de classes químicas de plantas*

Grupo fitoquímico	Teste/reagente	Confirmação
Taninos/polifenóis	Solução aquosa de FeCl ₃ a 1%	Mudança de coloração ou formação de precipitado
Saponinas	Solução hidroalcoólica 80GL: etanol comercial/água destilada.	Camada de espuma estável por mais de 30 minutos.
Flavonóides	HCl concentrado e fita de Mg	Coloração rósea.

Esteróides e triterpenóides	CHCl ₃ , anidrido acético e H ₂ SO ₄ concentrado	Sucessão de cores, de azul evanescente a verde persistente.
------------------------------------	---	---

*Screening fitoquímico do Procedimento Operacional Padrão da Embrapa Amazônia Oriental

Para antocianinas, antocianidinas e flavonóides foi realizado um teste mais específico descrito por Matos¹²⁸, onde foi feita a acidulação de tubos de ensaio contendo os extratos a pH 3 e alcalinizados a pH 8,5 e 11. A presença da classe de compostos foi indicada pelo aparecimento da coloração indicada para cada substância, como mostrado na Tabela 3.2:

Tabela 3.2 Indicativos da presença de compostos nos extratos aquosos

Constituintes	Cor em meio		
	Ácido (pH 3)	Básico (pH 8,5)	Básico (pH 11)
Antocianinas, Antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	-	-	Amarela
Chalconas e Auronas	Vermelha	-	Vermelho púrpura
Flavonóis	-	-	Vermelho laranja

Fonte: Matos, 1997

3.2.7 Obtenção e Cultivo das Larvas

As larvas e os mosquitos utilizados no trabalho são oriundas da colônia do *A. aegypti* Linneaus (cepa Rockefeller) do insetário do Laboratório de Ecologia Química da UFPE. O insetário foi mantido à temperatura constante de 28°C, umidade relativa de 58% e fotoperíodo de 14D:10N. A cepa Rockefeller é cultivada e utilizada em diversos laboratórios de entomologia, pois é referência de suscetibilidade, o que permite o seu emprego em bioensaios para comparação de resistência com populações locais.¹²⁹

3.2.8 Bioensaio Larvicida

A atividade larvicida dos óleos essenciais, extratos aquosos, hidrolatos e compostos isolados foi avaliada utilizando uma adaptação¹⁰⁴ do método recomendado pela Organização Mundial de Saúde¹³⁰. O bioensaio foi realizado no Laboratório de Ecologia Química da UFPE.

Para o teste larvicida preliminar, que determina a faixa de concentração que a substância ativa atua, uma solução estoque (100 ppm) foi preparada diluindo 0,005 g de óleo essencial em 3 gotas de Tween[®]80 e completada a um volume de 50 mL com água destilada. A partir desse estoque, por meio de diluição com água destilada, prepararam-se três soluções com concentrações 10, 50 e 100 ppm.

Os ensaios foram realizados para cada concentração da amostra, e para cada ensaio um controle negativo foi incluído com água destilada, contendo a mesma quantidade de Tween[®]80 como na amostra teste. Vinte larvas do mosquito *A. aegypti* no quarto instar inicial (L-4, cabeça branca), com idade de 3 a 5 dias, foram colocadas em béqueres contendo a solução. O número de larvas mortas bem como alterações morfológicas e comportamentais foi registrado após 24 horas de início do experimento e novamente após um período de 48 horas. As larvas foram consideradas mortas quando não responderam a estímulos ou quando não mantiveram um movimento de descida e subida até a superfície da solução.

De acordo com o resultado obtido nos testes preliminares foram determinadas as concentrações que seriam testadas nos ensaios subsequentes. Os bioensaios seguiram a mesma metodologia utilizada nos testes preliminares e foram realizados em triplicata para garantir a confiabilidade dos resultados. Foram realizados vários testes larvicida com um mesmo composto para a definição dos pontos necessários para a construção da curva concentração/mortalidade para o cálculo da CL₅₀ (concentração que promove a morte de 50% da amostra da população de larvas). Para os testes preliminares larvicidas com os extratos aquosos e hidrolatos – subprodutos da hidrodestilação – as concentrações foram expressas em termos de porcentagem do extrato aquoso/hidrolato, seguindo o mesmo procedimento de exposição das larvas como descrito para o óleo essencial. Para o hidrolato e extrato aquoso, o controle utilizado foi água destilada apenas. A CL₅₀ para os bioensaios larvicidas foi calculada através da análise de sobrevivência Probit¹³¹ com o emprego do software Statplus[®] 2008 for Windows.

3.2.9 Bioensaio de Oviposição

Dez fêmeas grávidas de *A. aegypti* foram colocadas em uma gaiola de bioensaio (33 x 21 x 30 cm). As fêmeas são consideradas grávidas quando apresentam aumento do abdômen e cor escurecida no mesmo que indica a presença de ovos. Cada gaiola contendo dois copinhos plásticos de 50 mL com papéis de filtro quadrados (lado= 7 cm) colocados

sobre a superfície interna de cada copinho para fornecer um suporte para oviposição das fêmeas. Distribuem-se as soluções teste e controle nos copinhos de plástico descartáveis (50 mL). O volume total da solução teste e controle para cada copinho foi de 25 mL. Os copos foram dispostos na diagonal nas gaiolas e de maneira alternada. Os insetos foram mantidos a $27 \pm 0,5$ °C, com $73 \pm 0,4\%$ de umidade relativa e 16 h no escuro. Findo esse tempo, a resposta de oviposição foi determinada a partir do número de ovos postos em cada um dos papéis de filtro. O experimento foi repetido seis vezes e os dados foram analisados utilizando o teste-*t* de Student, no qual valores de $p < 0,05$ foram considerados para representar diferenças significativas entre os valores médios.¹⁰⁴

Para o bioensaio de oviposição dos óleos essenciais da *E. elatior* vermelha, rosa e porcelana, uma solução estoque de 100 mL com concentração de 200 ppm foi preparada, utilizando 3 gotas de Tween[®]80 como cosolvente. Essa solução foi diluída adicionando-se 100 mL de água, obtendo-se uma solução de 200 mL em concentrações de 100 ppm. Para a solução controle, apenas as 3 gotas de Tween[®]80 foram diluídas em 200 mL de água destilada. Para o bioensaio dos extratos aquosos da *E. elatior* vermelha, rosa e porcelana a solução estoque foi preparada adicionando 10 mL de extrato a 190 mL de água destilada, resultando em uma solução de 200 mL de 5% v/v. Como controle utilizou-se água destilada.

Caracterização química, atividade larvicida e deterrente de oviposição do óleo essencial da inflorescência do Bastão do Imperador (*Etlingera elatior*) frente à *Aedes aegypti*

RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Bastão-do-Imperador é uma flor de pouca durabilidade entre as flores ornamentais. Normalmente quando bem irrigadas e bem hidratadas, essas flores podem durar até cinco dias (Informação obtida com a produtora e confirmada em laboratório). Inflorescências sobressalentes de cada variedade foram armazenadas em água limpa e apresentaram sinais de desgaste e apodrecimento após o quinto dia.

4.1 Extração do óleo essencial

4.1.1 Cinética

Excluindo-se os casos excepcionais a extração de óleos essenciais tem um tempo máximo de três horas. Para as inflorescências da *E. elatior* não foi observado um aumento considerável no volume total de óleo essencial após as duas horas iniciais de extração. O

maior aparecimento de óleo foi observado na primeira hora de extração, porém foi mantido o tempo padrão utilizado em outras extrações.

4.1.2 Rendimento

Os rendimentos dos óleos essenciais foram calculados a partir da massa das variedades vegetais e da massa do óleo obtido, conforme apresentado na tabela 4.1.

Tabela 4.1 Rendimento dos óleos essenciais

Variedade	Massa das inflorescências (g)	Massa do óleo essencial (g)	Rendimento (%)
Vermelha	500,7	0,46989	0,094
Rosa	516,8	0,26616	0,052
Porcelana	556,8	0,27397	0,049

Os valores de rendimento da hidrodestilação da inflorescência da *E. elatior* estão condizentes com os encontrados na literatura para esta espécie que vão de 0,003 a 0,1% (dados contidos na tabela 4.3, seção 4.3, pág. 63). Nenhum dado na literatura consta para a comparação entre as três variedades da espécie estudadas no presente trabalho, porém constam os rendimentos de óleo essencial de outras partes da planta. Como é possível observar na tabela 4.3, o rendimento obtido no presente estudo é condizente com o rendimento obtido para extração de óleo da inflorescência da espécie, sendo 0,0334%⁴⁰ e 0,9%¹³² para flores. Nenhum dos trabalhos apresentados na tabela foi específico com relação à variedade da espécie trabalhada.

4.2 Características físicas dos produtos da hidrodestilação

4.2.1 Óleo essencial

De acordo com a verificação sensorial no decorrer das extrações dos óleos essenciais da *E. elatior* variedades vermelha, rosa e porcelana, a fragrância adocicada manteve-se intensa do início até o fim das extrações. Inicialmente, foi observada a transparência dos óleos, porém a cor levemente esbranquiçada e a opacidade foram mostrando-se eminentes ao passar do tempo da hidrodestilação como é possível observar na figura 4.1.

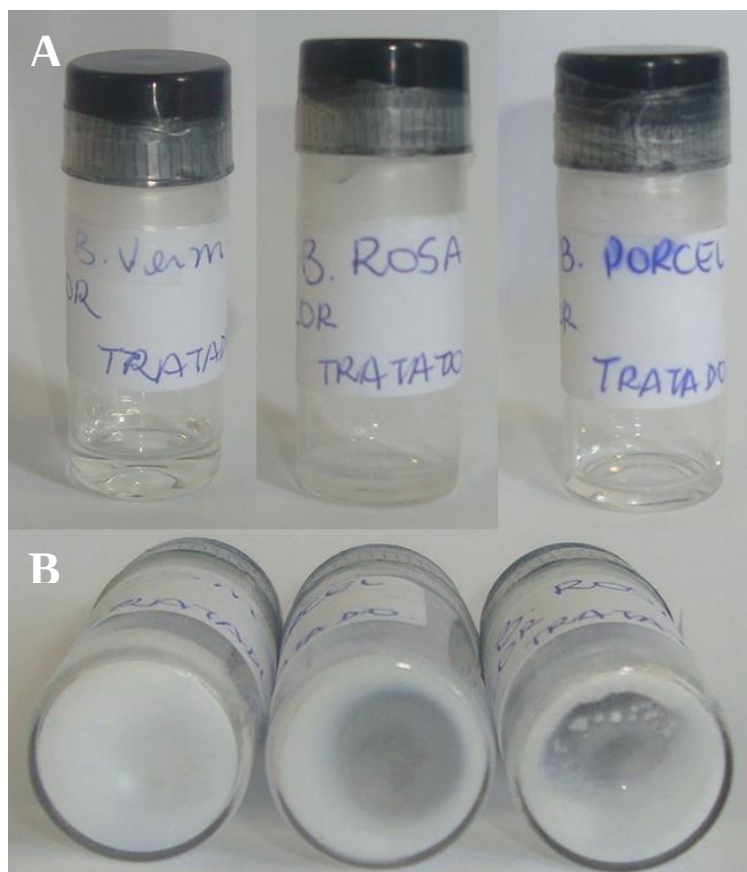


Figura 4.1 Óleos essenciais em temperatura ambiente (A) e resfriados (B), das três variedades da *E. elatior*: vermelha, rosa e porcelana.

Com o intuito de verificar a solubilidade do óleo essencial foram testados os solventes: etanol, acetona, DMSO e Tween®80 sendo o Tween®80 o solvente que apresentou melhor solubilidade quando em solução aquosa com os óleos essenciais, sendo assim escolhido para ser o cosolvente dos testes biológicos.

4.2.2 Extratos aquosos e hidrolatos

Os extratos aquosos apresentaram alta turbidez, aroma similar ao óleo essencial da variedade correspondente e pH levemente ácido, como é possível observar na tabela 4.2. A cor variou bastante de um extrato para o outro como é possível observar na figura 4.2.

Tabela 4.2 Valores de pH dos extratos aquosos

Variedade	Vermelha	Rosa	Porcelana
Extrato	4	4	4
Hidrolato	5	5	5

Depois da hidrodestilação, os mesmos foram filtrados com algodão e posteriormente com papel de filtro, à vácuo, e armazenados sob refrigeração de -24°C até emprego em análises e/ou bioensaios posteriores.

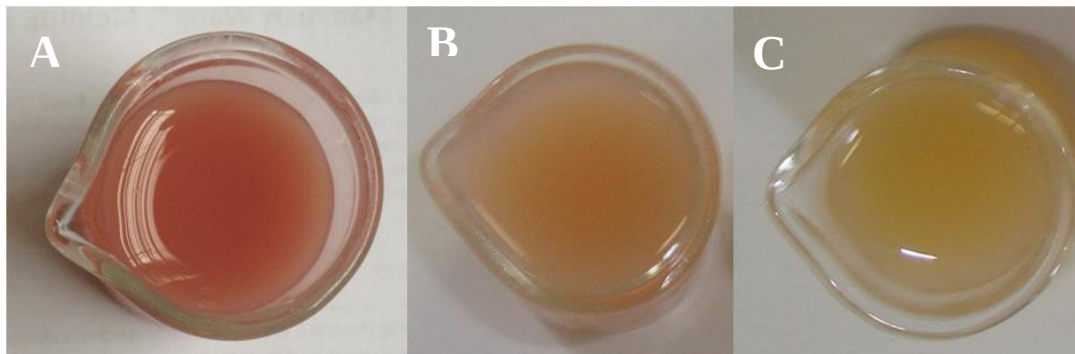


Figura 4.2 Extratos aquosos das variedades vermelha (A), rosa (B) e porcelana (C) da *E. elatior*

Os hidrolatos apresentaram leve turbidez, quase transparência completa, sem variação de cor para as três variedades estudadas. Todos apresentaram pH igual a 5, como é possível observar na tabela 4.2.

Após a hidrodestilação, os mesmos foram armazenados em recipiente âmbar, sob refrigeração de -24°C, até análise e/ou teste de atividade biológica.

4.3 Análises cromatográficas do óleo essencial da espécie *Etlingera elatior*

No presente trabalho um total de 43 componentes foram identificados através das análises de GC-MS, dos quais 15 estavam presentes nos óleos de três variedades, 2 foram detectados apenas na variedade vermelha, 11 apenas na rosa e 3 apenas na porcelana.

O resultado da análise dos óleos essenciais das três variedades de *E. elatior* estão listados na tabela 4.4, onde constam os índices de retenção calculados experimentalmente e os publicados na literatura para os compostos. A sequência de eluição dos componentes do óleo essencial está disposta no perfil cromatográfico na figura 4.3 e a numeração dos picos no cromatograma corresponde respectivamente aos compostos listados na tabela 4.4.

Como é possível observar na figura 4.3, o perfil cromatográfico das três variedades é bastante semelhante, principalmente no tocante a componentes majoritários, embora a proporção dos mesmos seja diferente para cada variedade. Os três apresentaram componentes até 37 minutos.

As amostras de *E. elatior* apresentaram-se ricas em alcoóis (vermelha: 33,22%; rosa: 28,23%; porcelana: 26,76%) e aldeídos (vermelha: 33,22%; rosa: 28,23%; porcelana: 26,76%), apresentando também monoterpenos (vermelha: 9,25%; rosa: 28,92%; porcelana: 3,03%) e sesquiterpenos (vermelha: 3,24%; rosa: 6,94%; porcelana: 3,22%).

O óleo essencial das três variedades de *E. elatior* não diferem consideravelmente em termos qualitativos, mas diferem em termos quantitativos, principalmente no que se refere à proporção dos componentes. Nas três variedades, os principais compostos identificados foram dodecanal (vermelha: 49,37%; rosa: 25,70%; porcelana: 57,73%), dodecanol (vermelha: 31,53%; rosa: 24,05%; porcelana: 24,58%) e α -pinene (vermelha: 7,83%; rosa: 22,98%; porcelana: 2,55%), como é possível observar na tabela 4.4.

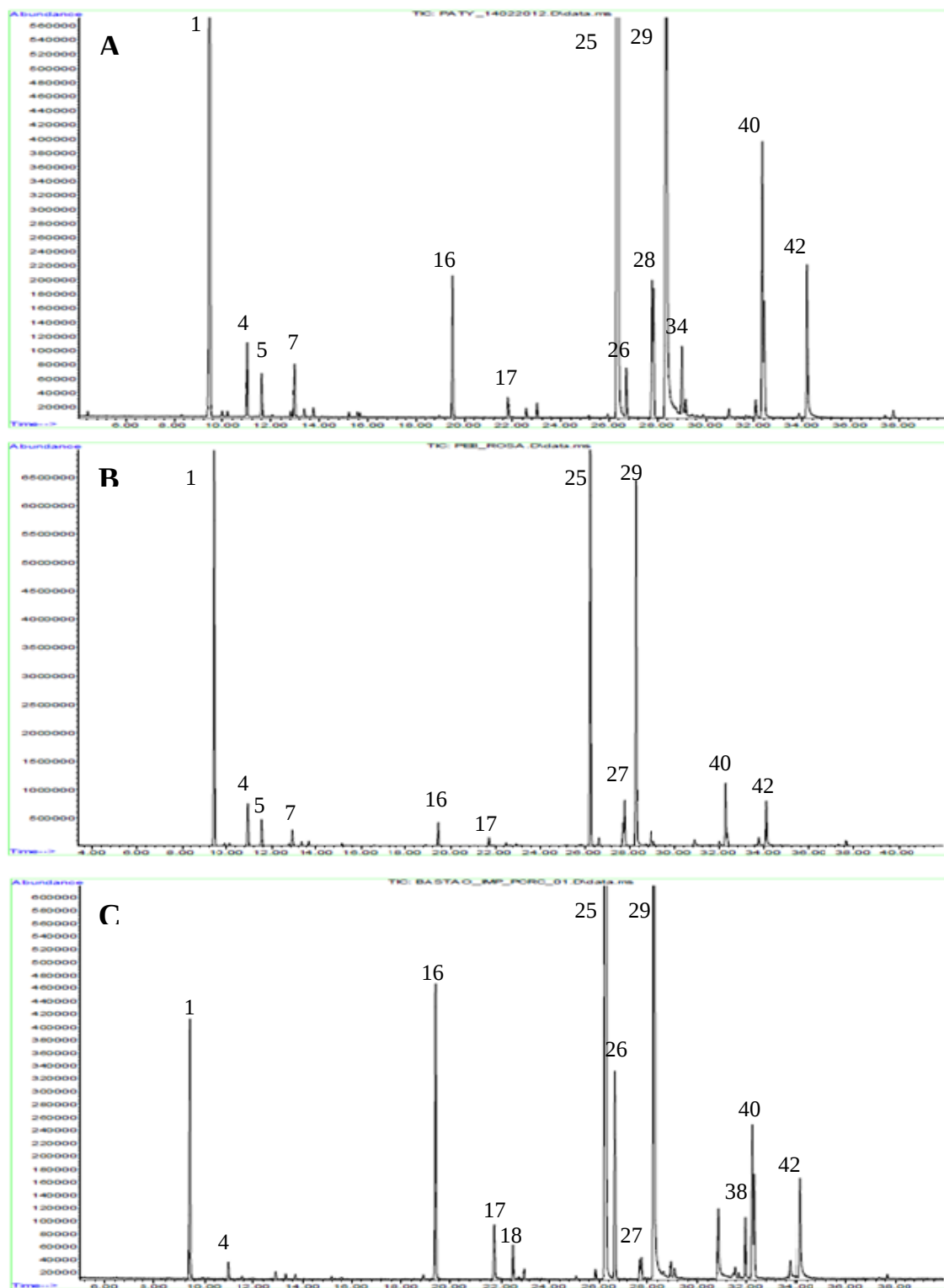


Figura 4.3. Cromatograma do óleo essencial da *E. elatior* (A) vermelha, (B) rosa e (C) porcelana obtido por GC-MS.

Tabela 4.4. Identificação dos constituintes do óleo essencial obtido das variedades vermelha, rosa e porcelana da *E. elatior*

Nº	Composto ^a	Índices de retenção		Área (%)		
		Calculado ^b	Literatura ^c	Vermelha	Rosa	Porcelana
1	α -Pinene	932	939	7,83	22,98	2,55
2	Camphene	948	954	0,05	0,19	-
3	Thuja-2,4(10)-diene	954	960	0,04	0,16	-
4	β -Pinene	976	979	0,55	2,56	0,20
5	β -Myrcene	991	990	0,29	1,50	-
6	p-Cymene	1025	1026	0,04	0,14	-
7	Limonene	1028	1029	0,38	0,96	0,09
8	β -(Z)-Ocimene	1038	1037	0,06	0,25	0,06
9	β -(E)-Ocimene	1049	1050	0,06	0,29	0,07
10	γ -Terpinene	1058	1059	-	0,03	-
11	α -Terpineol	1190	1188	-	0,09	0,06
12	Terpinolene	1088	1088	0,03	0,16	-
13	Pinene oxide	1099	1099	0,03	0,03	-
14	α -Campholenal	1126	1126	-	0,05	-
15	Undecane	1102	1100	0,03	-	-
16	n-Decanal	1206	1201	0,98	1,44	2,99
17	n-Decanol	1272	1269	0,17	0,52	0,65
18	2-Undecanone	1294	1294	0,08	0,18	0,35
19	methyl-Myrtenate	1298	1294	-	0,04	-
20	n-Undecanal	1307	1306	0,11	0,15	0,12
21	n-Undecanol	1373	1370	0,02	0,05	-
22	9-Decenyl acetate	1399	1399	0,03	-	-
23	<i>trans</i> -sobrerol	1377	1374	-	0,07	-
24	β -Elemene	1393	1390	-	0,08	-
25	n-Dodecanal	1410	1408	49,37	25,70	57,73
26	β -(E)-Caryophyllene	1422	1419	0,42	0,56	2,40
27	β -(E)-Farnesene	1459	1456	-	4,40	0,45
28	α -Humulene	1460	1454	1,99	-	-
29	n-Dodecanol	1476	1470	31,53	24,05	24,58
30	β -Selinene	1491	1490	-	0,25	0,21
31	α -Zingiberene	1499	1493	-	1,06	-
32	2-Tridecanone	1499	1495	-	-	0,23
33	Isodaucene	1503	1500	0,18	0,38	-
34	α -Farnesene	1503	1505	0,65	-	0,16
35	β -Bisabolene	1512	1505	-	0,08	-
36	γ -(Z)-Bisabolene	1520	1515	-	0,07	-
37	δ -Cadinene	1528	1523	-	0,06	-
38	Dodecanoic acid	1565	1566	0,09	0,66	1,24
39	β -Caryophyllene epoxide	1586	1583	-	-	0,20
40	Dodecyl acetate	1609	1607	3,15	4,86	2,86
41	Citronellyl angelate	1660	1657	-	0,17	-
42	n-Tetradecanol	1676	1672	1,50	3,61	1,53
43	n-Heptadecane	1699	1700	-	0,08	-
Total				99,66	97,91	98,73

^a Constituintes listados em ordem de eluição numa coluna apolar DB-5; ^b Índices de retenção calculados através dos tempos de retenção em relação aos da série de n-alcenos (C₉-C₁₉), em 30 minutos, em uma coluna DB-5; ^c Valores tirados do Adams¹²³; - Não detectado.

A proporção relativamente baixa de terpenos no óleo essencial dessa espécie, comparados com outros óleos essenciais^{48,104} pode ser decorrente da metodologia de extração utilizada. Quanto maior for o tempo de secagem da inflorescência da espécie *E. elatior* maior é a proporção de aldeídos e alcoóis e menor a proporção de terpenos.¹¹² De acordo com o autor se a extração da espécie *E. elatior* for realizada com poucas horas após o corte, três ou seis horas, a proporção de terpenos será maior, porém se o tempo entre o corte e a extração for grande, sendo o máximo testado pelos autores 72 horas, então a proporção de terpenos diminuirá, aumentando a proporção de aldeídos e alcoóis. Como a extração do óleo no presente trabalho foi maior que 6 horas após o corte, foi possível perceber a relação entre o tempo de extração após o corte e a composição do óleo, conforme a constatação feita pelos autores.

A proporção das classes de compostos presentes nos óleos essenciais das três variedades da *E. elatior* está disposta na tabela 4.5.

Tabela 4.5 Composição e classes de compostos dos óleos essenciais da *E. elatior*

Classe de compostos	Área (% do total de óleo)		
	Vermelha	Rosa	Porcelana
Ácido graxo	0,09 (1)	0,66 (1)	1,24 (1)
Álcool	33,22 (4)	28,23 (4)	26,76 (3)
Aldeído	50,46 (4)	27,29 (3)	60,84 (3)
Cetona	0,08 (1)	0,18 (1)	0,58 (2)
Éster	3,18 (2)	4,86 (1)	2,86 (1)
Hidrocarboneto	0,03 (1)	0,08 (1)	
Monoterpeno	9,25 (8)	28,92 (9)	3,03 (6)
Monoterpeno oxigenado	0,11 (3)	0,58 (7)	
Sesquiterpeno	3,24 (4)	6,94 (9)	3,22 (4)
Sesquiterpeno oxigenado		0,17 (1)	0,20 (1)

Composição de óleos essenciais foi expressa como percentagem de área de pico total. Os números entre parênteses indicam a diversidade de um determinado tipo.

A composição do óleo da variedade que foi extraída com menor tempo contando da hora do corte até o momento da extração apresentou maior proporção de terpenos, que foi a rosa com 28,92 e 6,94% de mono e sesquiterpenos respectivamente. E a variedade porcelana, que foi extraída com maior tempo entre o corte e a extração, apresentou proporção de aldeídos e alcoóis de quase 90%. Para confirmar se a composição dos óleos essenciais da inflorescência da *E. elatior* depende do tempo entre o corte e a extração, ao invés da variedade estudada, novas extrações, sempre realizadas com o mesmo tempo após o corte, devem ser realizadas.

A composição do óleo essencial de uma espécie de planta é, geralmente, específica para um determinado órgão e característica para o seu desenvolvimento, porém os aspectos ambientais são capazes de causar significativas variações. Alguns desses aspectos são: o ciclo vegetativo da planta; o processo de obtenção do óleo essencial; o ambiente no qual a espécie se desenvolve, o tipo de cultivo, a temperatura, umidade relativa, a quantidade de água e os nutrientes no terreno, entre outros.⁷⁴

Essa dependência da composição do óleo essencial das condições ambientais pode ser verificada ao se comparar a composição e o rendimento de óleos essenciais extraídos em diferentes locais e partes de planta. Constam na literatura alguns trabalhos sobre o óleo essencial dessa espécie e os resultados obtidos, principalmente no que se refere ao rendimento, compostos majoritários e a percentagem de compostos identificados, os quais podem ser vistos na tabela 4.3.

Tabela 4.3 Comparação entre rendimento e componentes majoritários de diferentes extrações de óleo essencial da *E. elatior*

Componentes majoritários	Área (% do total de óleo)									
Referência	40				113	56	53	132		
[Local de coleta]	[Malásia]				[Malásia]	[Malásia]	[Malásia]	[Brasil]		
	Folhas	Caule	Flores	Rizomas	Folhas	Folhas	Folhas	Rizoma e raiz	Flores	Caule
Rendimento	0,0735% ^a	0,0029% ^a	0,0334% ^a	0,0021% ^a	-	0,0860% ^a	0,7% ^a	0,4% ^a	0,9% ^b	0,1% ^b
<i>α</i> -Pinene	-	-	6,30	-	11,59	-	-	8,6	22,2	-
Camphene	-	-	-	-	-	-	-	18,0	-	-
<i>β</i> -Pinene	19,17	-	-	-	24,92	-	-	16,9	-	-
Myrcene	-	-	-	-	-	-	13,5	-	-	-
(<i>E</i>)-5-dodecene	-	26,99	-	-	-	-	-	-	-	-
Cyclododecane	-	-	40,32	34,45	-	-	-	-	-	-
Dodecanal	-	-	-	-	-	-	-	-	14,5	21,5
Caryophyllene	15,36	-	-	-	-	8,56	10,7	-	-	-
Dodecanol	-	-	-	-	-	-	-	-	42,5	34,6
1-Dodecene	-	-	-	-	24,31	-	-	-	-	-
Decanal	-	16,53	-	-	-	-	-	-	-	-
Caryophyllene oxide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22,5
1,1-dodecanediol, diacetate	-	34,26	24,38	47,28	-	-	-	-	-	-
<i>α</i> -humulene	-	-	-	-	-	-	11,8	-	-	-
(<i>E</i>)- <i>β</i> -Farnesene	27,90	-	-	-	-	13,60	-	-	-	-
Dodecyl acetate	-	-	-	-	-	6,68	-	-	-	-

^a Rendimento calculado a partir da razão m/m (massa de óleo obtido/massa de material seco)

^b Rendimento calculado a partir da razão mL/100g de material seco

É possível observar na tabela a variação dos componentes majoritários bem como a diferença na proporção dos compostos majoritários dos óleos obtidos das diferentes partes da planta, diferentes épocas e diferentes locais de extração. É possível notar que os componentes majoritários das folhas, por exemplo, diferem entre (*E*)- β -Farnesene^{40,56} e β -Pinene⁵³; no rizoma os majoritários diferem entre cyclododecane e 1,1-dodecanediol, diacetate⁴⁰ e α -pinene, β -pinene e camphene⁵³, mostrando que a composição do óleo essencial da planta varia consideravelmente devido a estes fatores.

A composição do óleo essencial das inflorescências de *E. elatior* relatado no presente estudo está de acordo com que previamente estabelecido por Zoghbi e Andrade¹³², mostrado na tabela 4.3, porém a proporção dos componentes está um pouco diferente. Enquanto que no presente trabalho foi encontrado que o composto majoritário do óleo é o dodecanal (vermelha: 49,37%; rosa: 25,70%; porcelana: 57,73%) para as três variedades, seguido pelo dodecanol (vermelha: 31,53%; rosa: 24,05%; porcelana: 24,58%) e α -pinene (vermelha: 7,83%; rosa: 22,98%; porcelana: 2,55%), os autores determinaram o dodecanol (42,5%) como o componente majoritário seguido por α -pinene (22,2%) e dodecanal (14,5%). Os autores não fizeram distinção sobre a variedade da espécie estudada.

A composição dos óleos essenciais de outras espécies do gênero *Etlintera* reportadas na literatura diferem bastante entre si, porém apresentam alguns constituintes em comum com o Bastão-do-Imperador (*E. elatior*) como α -pinene, β -pinene, decanal, dodecanal e dodecyl acetate, como mostrado na tabela 4.6. O decanol, dodecanol e tetradecanal não foram reportados para essas espécies do gênero.

Tabela 4.6 Presença ou ausência de constituintes majoritários do óleo essencial da espécie *E. elatior* em espécies do gênero *Etlingera*

Espécie (parte da planta)	<i>E. sphaerocephala</i> (inflorescência)	<i>E. punicea</i> (rizoma)	<i>E. littoralis</i> (folha e rizoma)	<i>E. fulgens</i> (folha)	<i>E. rubrostriata</i> (folha)	<i>E. maingayi</i> (folha)
Referência	54	55	53		56	
α -Pinene	+	+	+	-	-	-
β -Pinene	-	+	+	-	-	-
n-Decanal	-	-	-	-	+	-
n-Decanol	-	-	-	-	-	-
n-Dodecanal	-	-	-	+	-	-
n-Dodecanol	-	-	-	-	-	-
Dodecyl acetate	-	-	-	+	+	-
n-Tetradecanol	-	-	-	-	-	-

+ presente, - ausente

As Figuras 4.4 a 4.10 apresentam os espectros de massas dos constituintes majoritários das variedades da *E. elatior*, obtidos em espectrômetro de massa através da técnica de impacto eletrônico de 70 eV.

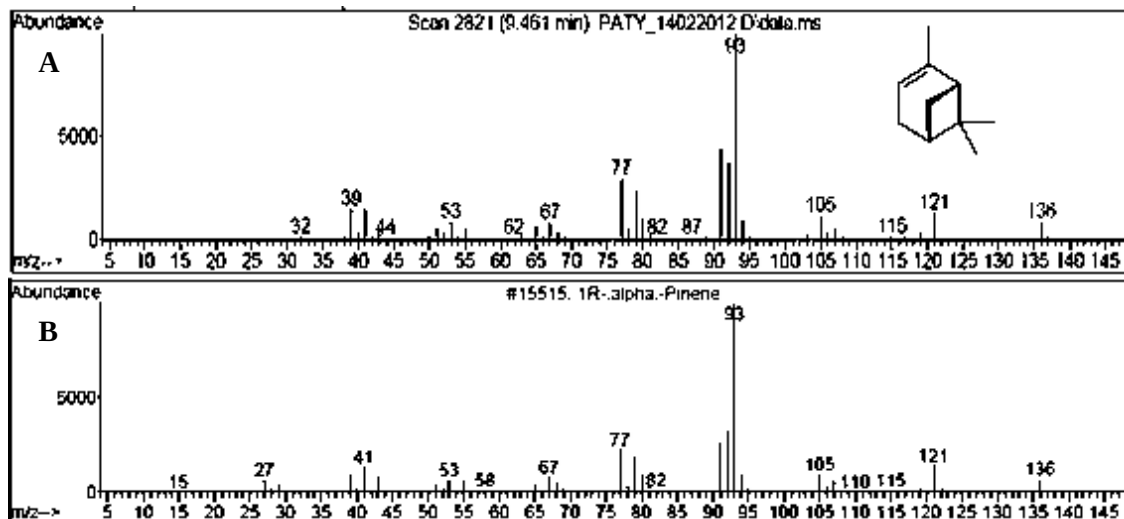


Figura 4.4 Espectro de massa do α -pinene, retirado da análise do óleo essencial da variedade vermelha da *E. elatior* (A) e retirado da biblioteca (B)

O α -pinene ($C_{10}H_{16}$, PF: $-64^{\circ}C$, PE: $155^{\circ}C$, Fig. 4.4) é um monoterpene de cadeia cíclica. É um líquido sem cor e límpido e possui aroma refrescante de pinheiro e traços de resina.^{133,134}

É largamente encontrado em óleos essenciais dentre elas *Alpinia purpurata*^{48,135}; pinheira¹³⁶; espécies de pimenta¹⁰⁶, *Chloroxylon swietenia*¹⁰⁵, marcela-do-campo¹³⁷, entre outros, como é mostrado por Maia e Andrade¹³⁸. A ele são atribuídos importantes atividades biológicas, tais como capacidade de redução do número de nódulos em tumores em estágio metastático de câncer de pulmão¹³⁹, atividade anti-inflamatória¹⁴⁰, antimicrobiana¹⁴¹, antioxidante¹⁴², atividade antiespasmódica em ratos, junto com o β -pinene¹⁴³, entre outras.

Apesar de estar presente em óleos essenciais que possuem atividade larvicida como o do presente trabalho, da *Alpinia purpurata*⁴⁸, de *Clausena dentata*¹⁰³, de duas espécies de eucalipto¹⁰⁷ e alecrim-de-chapada¹¹⁰, e possuir atividade larvicida contra outras larvas, como a do verme do arenque¹⁴⁴, não possui atividade larvicida significativa frente às larvas de *A. aegypti*, como mostrado por Santos e colaboradores⁴⁸. Representa 7,83; 22,98 e 2,55% das variedades vermelha, rosa e porcelana respectivamente.

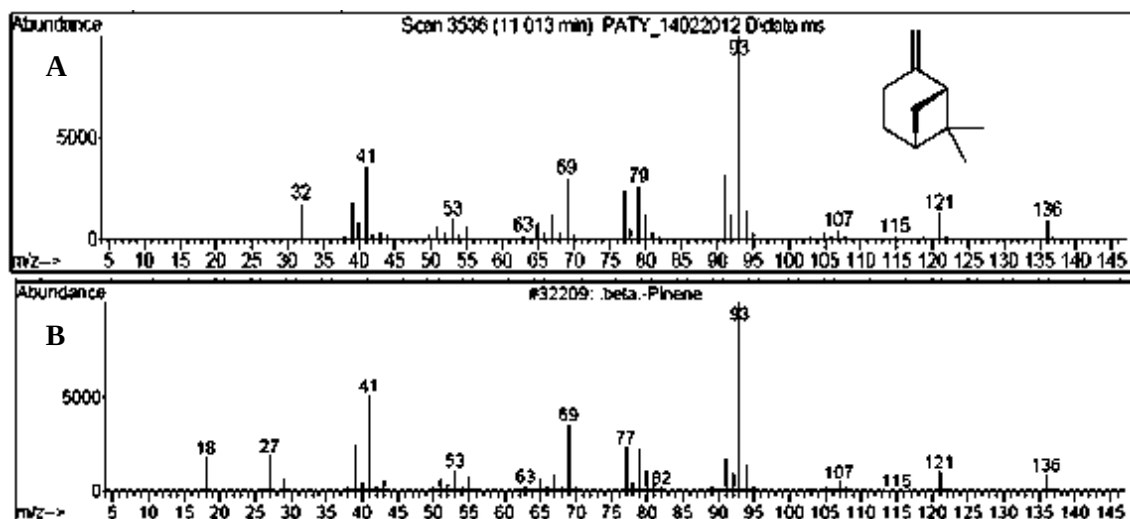


Figura 4.5 Espectro de massa do β -pinene, retirado da análise do óleo essencial da variedade vermelha da *E. elatior* (A) e retirado da biblioteca (B)

O β -pinene ($C_{10}H_{16}$, PF: $-61^{\circ}C$, PE: $165^{\circ}C$, Fig. 4.5) é um monoterpene cíclico, pouco solúvel em água, também bastante encontrado em óleos essenciais. É um líquido sem cor e possui aroma lenhoso, com traços de pinheiro e resina.¹³³

É conhecido na literatura por ser um composto presente em vários óleos essenciais, de partes diferentes das plantas. Também apresentou diversificadas atividades biológicas, como ser o princípio ativo, junto com o linalool, no óleo essencial da planta mexicana *Litsea glaucescens* que possui atividade antidepressiva¹⁴⁵, atividade antimicrobiana em bebidas de frutas cítricas, quando, sendo incrementada com a adição de outros terpenos como citral e linalool¹⁴⁶, ser o responsável, junto com o α -pinene, pela atividade antiespasmódica em ratos¹⁴³, antioxidante¹⁴², entre outras.

Apesar de estar presente em óleos essenciais com atividade larvica comprovada como o do presente trabalho, da *Alpinia purpurata*⁴⁸, de espécies de pimenta¹⁰⁶, do *Piper marginatum*¹⁰⁴ e de duas espécies de eucalipto¹⁰⁷), não possui atividade larvica significativa frente às larvas de *A. aegypti*, como mostrado também por Santos e colaboradores⁴⁸. Representa 0,55; 2,56 e 0,20% das variedades vermelha, rosa e porcelana respectivamente.

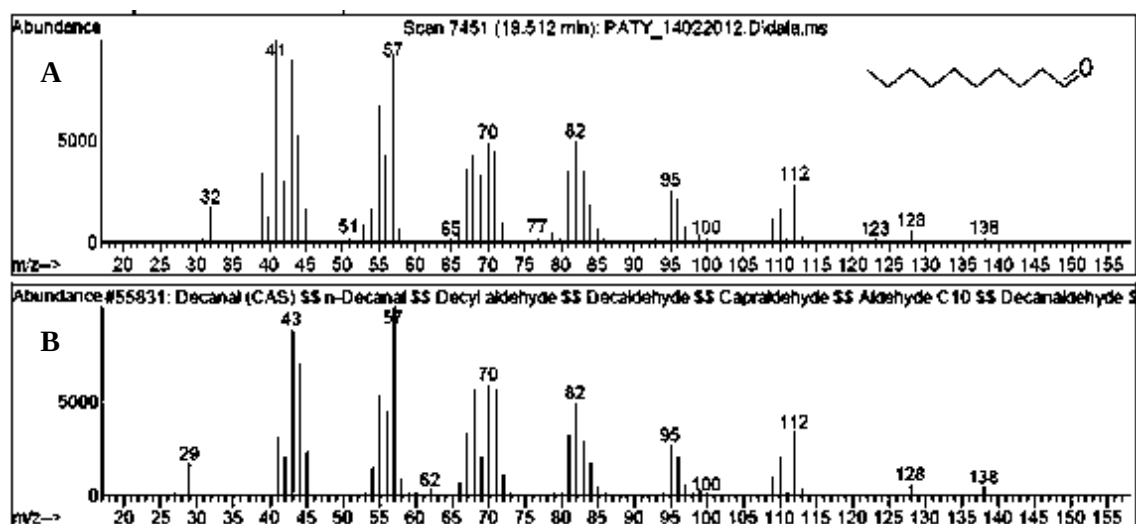


Figura 4.6 Espectro de massa do n-decanal, retirado da análise do óleo essencial da variedade vermelha da *E. elatior* (A) e retirado da biblioteca (B)

O n-decanal ($C_{10}H_{20}O$, PE: 207°C, Fig. 4.6) é um aldeído sem cor e límpido, pouco solúvel em água, mas largamente solúvel em etanol. Possui aroma doce forte e penetrante de cera com traços de casca de laranja.^{133,134}

É encontrado no óleo essencial do coentro¹⁴⁷, do *Chloroxylon swietenia*¹⁰⁵, entre outros. Possui atividade antifúngica¹⁴⁸ e menamitíca.¹⁴⁹ Apesar de estimular a antena do mosquito, em testes anteriores^{121,150}, não foi observada atividade atrativa ou repelente em teste de repelência em humanos, frente à *A. aegypti* nas doses de 1×10^{-6} , 1×10^{-5} , e 1×10^{-4} g.¹²¹ Representa 0,98; 1,44 e 2,99% das variedades vermelha, rosa e porcelana respectivamente.

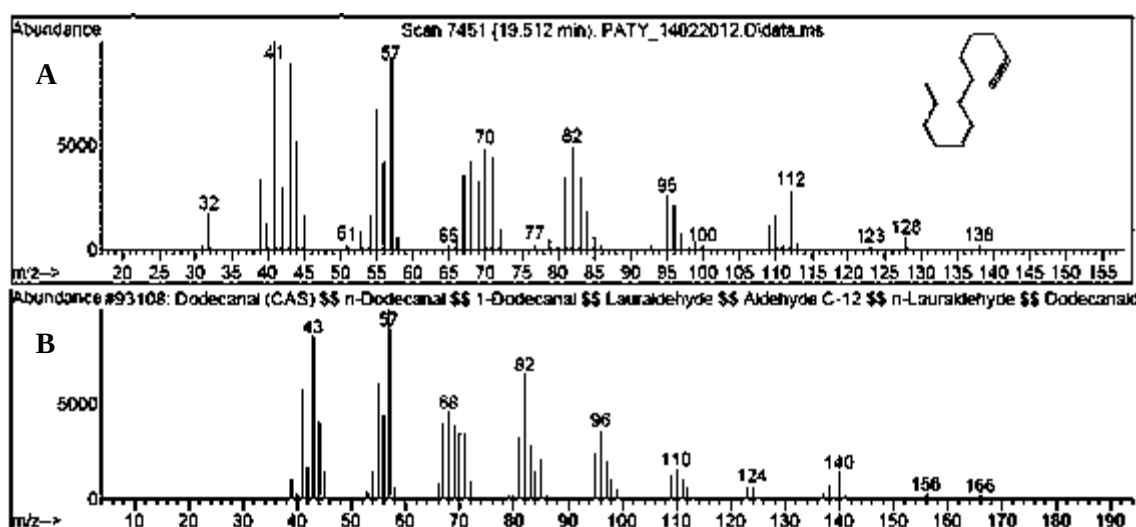


Figura 4.7 Espectro de massa do n-dodecanal, retirado da análise do óleo essencial da variedade vermelha da *E. elatior* (A) e retirado da biblioteca (B)

O n-dodecanal ($C_{12}H_{24}O$, PF: $-61^{\circ}C$, PE: $165^{\circ}C$, Fig. 4.7) é um aldeído linear, com aroma doce, muito fresco, floral, frutal e cítrico.^{134,151} Estudos mostraram que o dodecanal não tem efeito organoléptico no aroma dos óleos essenciais de cítricos.¹³³ E também que, apesar de estimular a antena do mosquito^{121,150}, como o decanal, não foi observada atividade atrativa ou repelente frente à *A. aegypti*, nas mesmas concentrações.¹²¹ Também provoca resposta em antenas de *Culex quinquefasciatus*.¹¹⁹

É encontrado no óleo essencial do coentro¹⁴⁷ o qual possui propriedade antimicrobiana; do coentro nhambí¹³⁵; de uma espécie de própolis grega¹⁵²; do cipó-caatinga¹³⁵, entre outros. Representa 49,37; 25,70 e 55,73% das variedades vermelha, rosa e porcelana respectivamente.

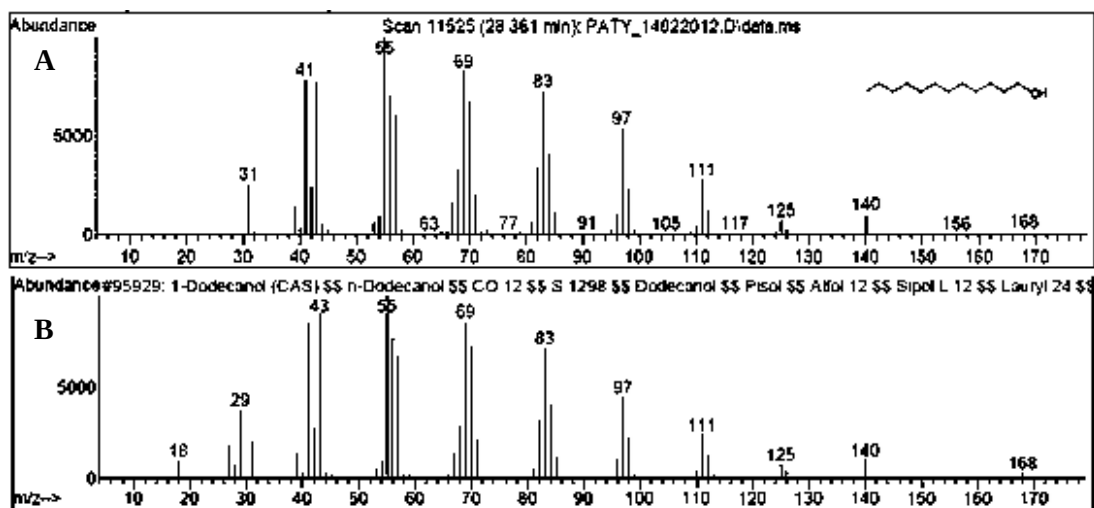


Figura 4.8 Espectro de massa do n-dodecanol, retirado da análise do óleo essencial da variedade vermelha da *E. elatior* (A) e retirado da biblioteca (B)

O n-dodecanol ($C_{12}H_{24}O$, PF: $26^{\circ}C$, PE: $185^{\circ}C$, Fig. 4.8) é um álcool linear, insolúvel em água, incolor e que dissolve bem em etanol. Possui aroma floral.¹⁵³ É encontrado no óleo essencial do cipó-caatinga¹³⁵; cupuaçu¹³⁷; erva-doce¹⁵⁴; hipérico¹⁵⁵; alecrim-da-serra¹⁵⁶, entre outros.

Possui atividade comprovada contra ovos, larvas e pupas do mosquito *A. aegypti* com concentrações letais (CL_{50}) de 4, 4, 4 e 3 litros por hectare para ovos, larvas em L1, larvas em L3-4 e pupas, respectivamente.¹⁵⁷ Representa 31,53; 24,05 e 24,58% das variedades vermelha, rosa e porcelana respectivamente.

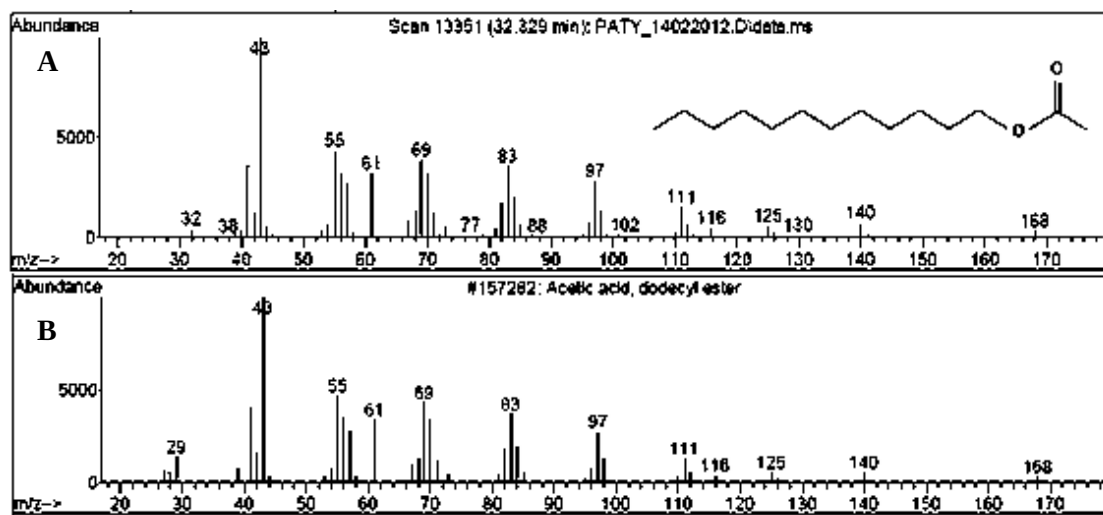


Figura 4.9 Espectro de massa do dodecyl acetate, retirado da análise do óleo essencial da variedade vermelha da *E. elatior* (A) e retirado da biblioteca (B)

O dodecyl acetate ($C_{14}H_{28}O_2$, PE: $150^{\circ}C$, Fig. 4.9) é um éster de cadeia linear, líquido, sem cor com aroma ceroso e cítrico.¹⁵⁸

É conhecido por ser um feromônio encontrado em várias espécies de insetos como *Trichoplusia ni*¹⁵⁹ e *Argyrotaenia velutinana*¹⁶⁰, entre outras. É encontrado também em óleos essenciais como da espécie *Hypericum linarioides*¹⁶¹, da espécie *Boronia megastigma*¹⁶², entre outras.

Representa 3,15, 4,86 e 2,86% das variedades vermelha, rosa e porcelana respectivamente.

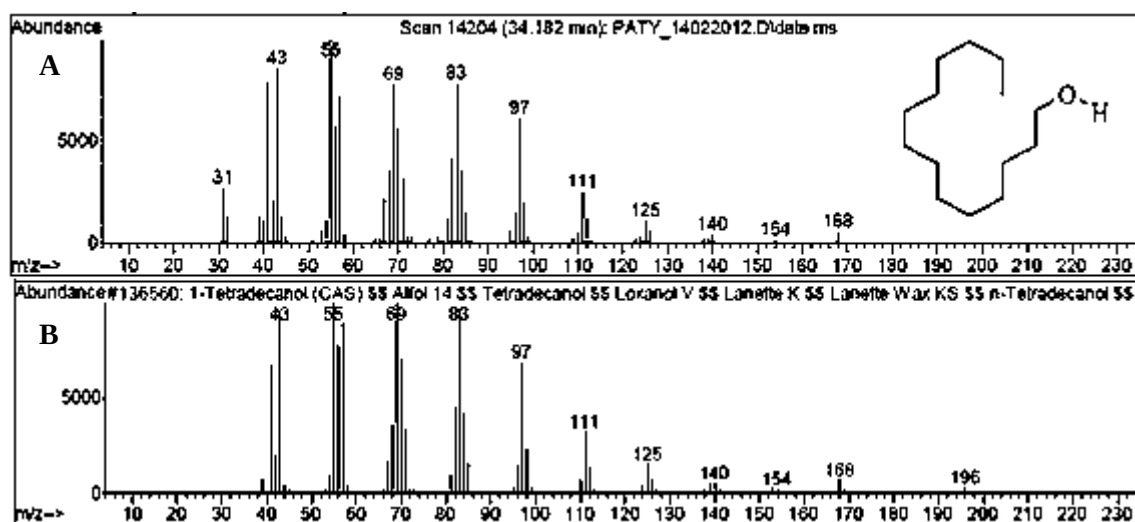


Figura 4.10 Espectro de massa do tetradecanol, retirado da análise do óleo essencial da variedade vermelha da *E. elatior* (A) e retirado da biblioteca (B)

O n-tetradecanol ($C_{14}H_{30}O$, PF: 35-39°C, PE: 289°C, Fig. 4.10) é um álcool linear, sólido e insolúvel em água, com odor fraco de álcool. É encontrado em óleos essenciais como do coentro nhambí¹³⁵, de uma espécie de orquídea¹³⁷, entre outros.

Possui, junto com o dodecanol e decanol, constituinte minoritário do óleo da *E. elatior*, atividade antibacteriana.¹⁶³ Também possui atividade comprovada contra ovos, larvas e pupas do mosquito *A. aegypti* com concentrações letais (CL_{50}) de 20, 285, 285 e 59 litros por hectare para ovos, larvas em L1, larvas em L3-4 e pupas, respectivamente.¹⁵⁷ Representa 1,50, 3,61 e 1,53% das variedades vermelha, rosa e porcelana respectivamente.

4.4 Screening fitoquímico dos extratos aquosos e hidrolatos

Os ensaios para detecção e prospecção preliminar dos diferentes constituintes químicos dos extratos aquosos e hidrolatos da *E. elatior*, com base no *screening* fitoquímico do Procedimento Operacional Padrão da Embrapa Amazônia Oriental, forneceram os resultados expostos na tabela 4.7.

Tabela 4.7 Detecção de classes de substâncias químicas presentes nos derivados da hidrodestilação da inflorescência de três variedades da *E. elatior* (Jack) R.M. Smith pelos métodos de prospecção fitoquímica de classes químicas*

Extratos	Taninos/ polifenóis	Saponinas	Flavonoides	Esteroides e triterpenóides
Hidrolato				
Variedade Vermelha	-	-	-	-
Variedade Rosa	-	-	-	-
Variedade Porcelana	-	-	-	-
Extrato Aquoso				
Variedade Vermelha	+	+	+	-
Variedade Rosa	+	+	+	-
Variedade Porcelana	+	+	+	-

*Screening fitoquímico do Procedimento Operacional Padrão da Embrapa Amazônia Oriental; + (positivo); - (negativo).

Para o teste mais específico para antocianinas, antocianidinas e flavonóides, descrito por Matos¹²⁸ foram verificados resultados positivos para flavonas, flavonóis e xantonas para os extratos aquosos da inflorescência das três variedades. Os resultados das colorações apresentadas pelos extratos e hidrolatos estão dispostos na tabela 4.8.

Tabela 4.8 Resultados das mudanças de coloração como indicativos da presença de compostos nos extratos aquosos

<i>Extratos</i>	<i>Cor em Meio</i>		
	Ácido (pH 3)	Básico (pH 8,5)	Básico (pH 11)
Hidrolatos	-	-	-
Extrato Aquoso			
Variedade Vermelha	Levemente avermelhada	-	Amarela
Variedade Rosa	Levemente avermelhada	-	Amarela
Variedade Porcelana	-	-	Amarela

- (negativo, não houve mudança de coloração).

A partir dos resultados dos testes foi possível constatar a provável presença de taninos, polifenóis e flavonoides nos extratos aquosos testados, enquanto que nos hidrolatos não houve resultado positivo para nenhum dos testes. Como os hidrolatos são soluções saturadas do próprio óleo essencial¹⁶⁴ é de se esperar que os mesmos possuem os componentes do óleo essencial: aldeídos, alcoóis e terpenos, em baixa quantidade, que não resultou em atividade larvicida.

A presença de flavonóides nas folhas e inflorescências da *E. elatior* já foram descritas anteriormente na literatura. Foram encontrados kaempferol 3-glucuronide, quercetin 3-glucuronide, quercetin 3-glucoside, e quercetin 3-rhamnoside nas folhas¹⁶⁵ e kaempferol e quercetin na inflorescência.¹⁶⁶

Estudos anteriores de extratos metanólicos da inflorescência da *E. elatior* também mostraram a presença de flavonoides, terpenóides, saponinas, taninos e carboidratos e a ausência de alcalóides e antraquinonas no extrato.⁷³

Wijekoon e colaboradores¹¹⁵ mostraram que a quantidade de flavonóides, antocianinas, taninos e fenóis nos extratos da inflorescência da *E. elatior* é maior quando extraídos com metanol e acetona, apresentando baixa quantidade quando extraído com água, que foi o solvente utilizado na obtenção dos extratos do presente trabalho.

Atividades larvicidas de flavonoides frente à larvas de *A. aegypti* já foram reportadas na literatura para várias espécies. O Pectolinarigenin, um flavonóide isolado das folhas de *Clerodendrum phlomidis* mostrou CL₅₀ de 0,79 ppm.¹⁶⁷ Nirma e colaboradores¹⁶⁸ isolaram sete isoflavonóides dos extratos hexânicos de *Muelleria frutescens* e atribuíram a atividade larvicida ao composto rotenone. Quatro compostos flavonóides das folhas e raízes de *Poncirus trifoliata* foram isolados e testados como agentes larvicidas e eles eram extremamente ativos, com concentrações letais de Poncirin (0,103 mg/L), Rhoifolin (0,085 mg/L), Naringina (0,122 mg/L) e Marmesin (0,082 mg / L).¹⁶⁹ Vasconcelos e colaboradores¹⁷⁰ estudaram a atividade larvicida de extratos de

folhas, caules, frutos e raízes de *Tephrosia toxicaria* e o flavonóide α -Toxicarol mostrou a melhor atividade larvicida (CL₅₀: 24,55 ppm). Os compostos: Rotenona, deguelin, Tephrosin, 6,7-dimetoxi-4-cromona, isolados a partir de várias partes de *Derris trifoliata* mostraram CL₅₀ de 0,5, 1,6, 1,5 e 13,4, respectivamente.¹⁷¹

4.5 Bioensaio

Utilizando os óleos, extratos aquosos e hidrolatos obtidos a partir da técnica de hidrodestilação para a *E. elatior* nas variedades vermelha, rosa e porcelana, foram realizados bioensaios larvicida e de oviposição frente ao mosquito *A. aegypti*.

4.5.1 Bioensaio larvicida

As larvas mantidas e examinadas por 24 e 48 horas nas soluções de óleo essencial e de extrato aquoso sofreram alterações morfológicas e motoras. Podemos afirmar isso devido à visualização motora das larvas. Os movimentos passaram de normal agitado para vagaroso, findando em larvas imóveis, que respondiam apenas ao estímulo da pipeta de Pasteur. A alteração da coloração e o tamanho normal das larvas foram características evidenciadas também nesse espaço de tempo, encontrando-se algumas larvas com encurtamento dos segmentos corporais e outras com alongamento dos mesmos. Ao morrer as, larvas apresentavam mudança de cor clara para uma mais enegrecida em toda parte do corpo para algumas larvas e outras apresentaram alteração em determinados locais específicos como cabeça, mesotórax, espiráculos e papilas anais.

Não houve mortalidade nas soluções controle, compostos por apenas água destilada e o cosolvente, pois a concentração dos cosolventes usada nos bioensaios, foi mais baixa que a CL₅₀ para estas substâncias conforme determinado por Kramer e colaboradores.¹⁷² Estes pesquisadores desenvolveram um estudo sobre a toxicidade de 40 substâncias orgânicas (solventes e reagentes) em 4 horas de exposição dos compostos às larvas e verificaram que dentre os menos tóxicos estavam o DMSO (CL₅₀ = 10%), Tween 80 (CL₅₀ = 8%), acetona (CL₅₀ = 4,5%) e o etanol (CL₅₀ = 3,8%).

Seguindo a metodologia descrita no item 3.2.9 foram realizados testes larvicidas preliminares para determinação da faixa de concentração onde a concentração letal para 50% das larvas (CL₅₀) estaria inserida. Os resultados desses testes estão listados na tabela 4.9.

Tabela 4.9 Mortalidade em teste larvicide preliminar das larvas em estágio L4 de *A. aegypti* de derivados da hidrodestilação da inflorescência e folhas de três variedades da *E. elatior*

Extratos	Concentrações preliminares		
Óleo essencial	10 ppm	50 ppm	100 ppm
Variedade Vermelha	0 %	95 %	100 %
Variedade Rosa	5 %	50 %	100 %
Variedade Porcelana	0 %	85 %	100 %
Hidrolato	10 % (v/v)	50 % (v/v)	100% (v/v)
Variedade Vermelha	0 %	0 %	10 %
Variedade Rosa	0 %	0 %	10%
Variedade Porcelana	0 %	0 %	25 %
Extrato Aquoso	10 % (v/v)	50 % (v/v)	100% (v/v)
Variedade Vermelha	85 %	100 %	100 %
Variedade Rosa	75 %	100 %	100 %
Variedade Porcelana	70 %	100 %	100 %

Com os resultados preliminares obtidos e apresentados na tabela 4.8 foi possível observar que os hidrolatos, não apresentaram mortalidade significativa. Os óleos essenciais se mostraram ativos sempre alcançando uma mortalidade de 100% na concentração de 100 ppm e os extratos aquosos se mostraram extremamente ativos, apresentando uma mortalidade de 100% nas concentrações de 50% (v/v).

A partir dos resultados preliminares foram realizados sucessivos testes com diferentes concentrações com o intuito de chegar à concentração letal para 50% das larvas (CL₅₀). As mortalidades para as concentrações em cada teste e suas distribuições em gráfico de concentração *versus* mortalidade, geradas pelo software Probit estão dispostas na figura 4.11.

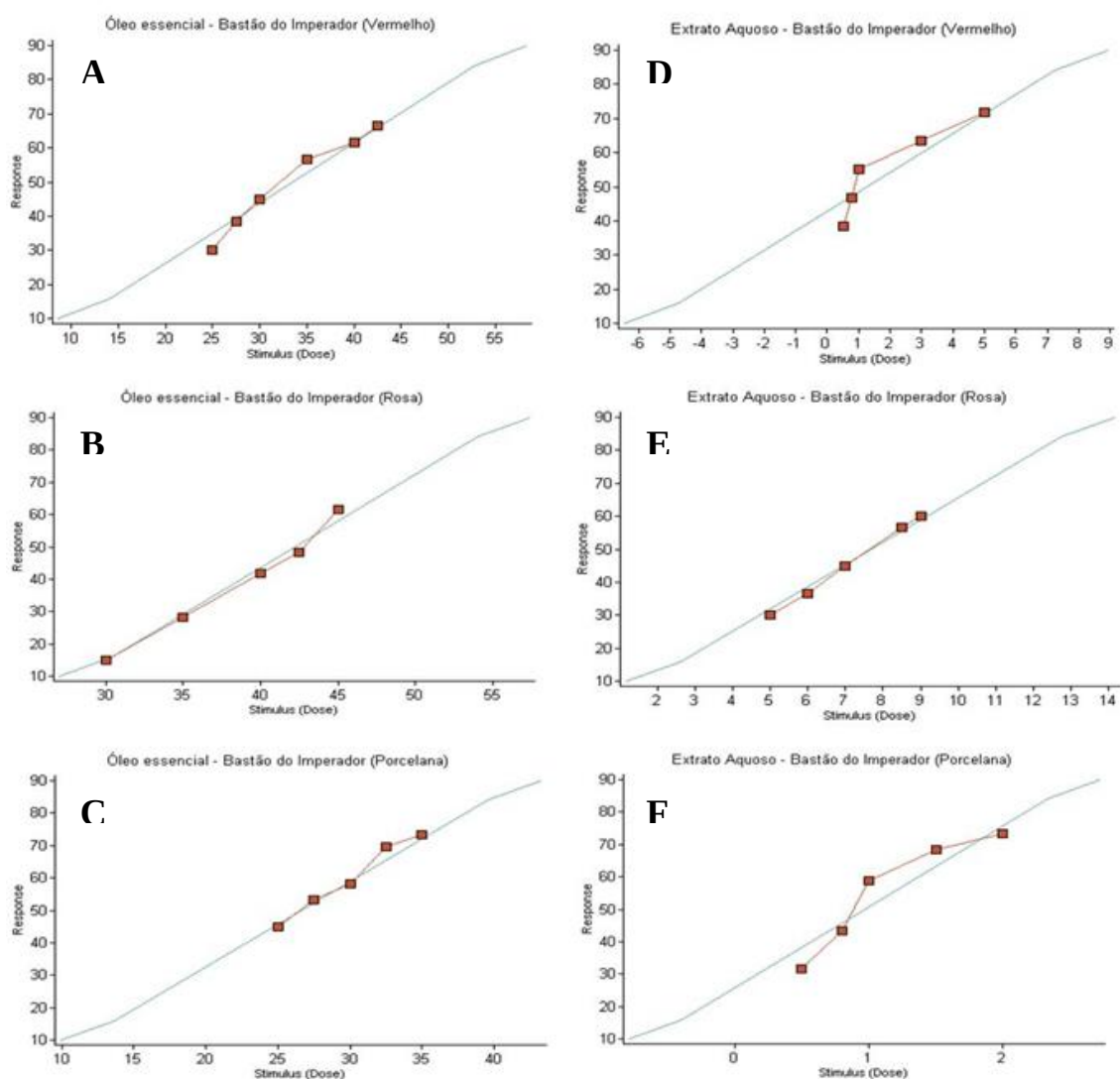


Figura 4.11 Gráficos Concentração (stimulus) versus mortalidade (response) dos dados obtidos dos testes larvicidas para o óleo essencial das variedades vermelha (A), rosa (B) e porcelana (C) e extrato aquoso das variedades vermelha (D), rosa (E) e porcelana (F) da *E. elatior*

A partir do cálculo de sobrevivência Probit foi possível chegar ao valor de concentração letal (CL_{50}) para os óleos e extratos aquosos das variedades vermelha, rosa e porcelana da *E. elatior*. A concentração letal para os óleos essenciais foi de 33,47; 42,22 e 26,62 ppm para as variedades vermelha, rosa e porcelana, respectivamente. Para os extratos aquosos, a faixa de concentração onde se situa a concentração letal (CL_{50}) foi bem pequena em termos de (v/v) sendo 1,26; 7,68 e 0,97% para as variedades vermelha, rosa e porcelana, respectivamente.

Os dados de CL_{50} , bem como os erros padrão e intervalo de confiança dos valores estão listados na tabela 4.10.

Tabela 4.10 Concentrações letais para 50% (CL₅₀) das larvas em estágio L4 de *A. aegypti* de óleo essencial e extrato aquoso da inflorescência de três variedades da *E. elatior*

Extratos	CL ₅₀ (IC) ^a	Erro padrão	Valor-p	X ²
Óleo essencial				
Variedade Vermelha	33,47 ppm (30,63 – 36,31)	± 1,45	0,9964	0,1743
Variedade Rosa	42,22 ppm (40,32 – 44,12)	± 0,97	0,9635	0,2813
Variedade Porcelana	26,62 ppm (24,53 – 28,71)	± 1,06	0,9921	0,0975
Extrato Aquoso				
Variedade Vermelha	1,26 % ^b (0,29 – 2,23)	± 0,49	0,9434	0,3849
Variedade Rosa	7,68 % ^b (6,86 – 8,50)	± 0,42	0,9959	0,0629
Variedade Porcelana	0,97 % ^b (0,76 – 1,18)	± 0,11	0,9199	0,4954

^a Valores médios de concentração letal (CL₅₀) e intervalo de confiança de 95% são resultados de medidas feitas em triplicata. ^b Porcentagem (v/v) de extrato aquoso. (IC): intervalo de confiança. χ^2 = qui quadrado.

De acordo com Cheng e colaboradores¹⁷³ óleos essenciais com valores de CL₅₀ acima de 100 ppm não devem ser considerados ativos, enquanto que os que apresentam valores de CL₅₀ entre 50 e 100 ppm são bioativos. Neste estudo os resultados dos bioensaios larvicidas dos óleos essenciais da *E. elatior* variedades vermelha, rosa e porcelana (33,47 ppm; 42,22 ppm e 26,62 ppm, respectivamente) e extratos aquosos (1,26% para a vermelha, 7,68% para a rosa e 0,97% para a porcelana), mostram que esta espécie apresenta bom potencial para uso no controle das larvas do mosquito. A procura por substâncias com potencial larvicida de origem natural é importante não apenas para evitar o desenvolvimento de larvas resistentes, variando as formas de combate, mas também devido ao risco de efeitos mutagênicos causados pelos compostos sintéticos utilizados atualmente.¹⁷⁴

Os componentes majoritários identificados dos óleos essenciais, dodecanal e dodecanol foram analisados quanto à atividade larvicida individualmente. O α -pinene não foi testado, pois em testes anteriores foi constatado que não possui atividade larvicida.⁴⁸ Os resultados preliminares para esses compostos estão dispostos na tabela 4.11.

Tabela 4.11 Mortalidade em teste larvicida preliminar das larvas em estágio L4 de *A. aegypti* de majoritários dos óleos essenciais: dodecanal e dodecanol

Componentes	Concentrações preliminares		
	10 ppm	25 ppm	50 ppm
Dodecanal	5 %	15 %	80 %
Dodecanol	30 %	95 %	100 %

Os resultados dos testes larvicidas, presentes na tabela 4.10 indicam uma relação direta entre a atividade larvicida dos óleos e seus componentes majoritários, que pode ser observada na forma de gráfico, no gráfico 4.1.

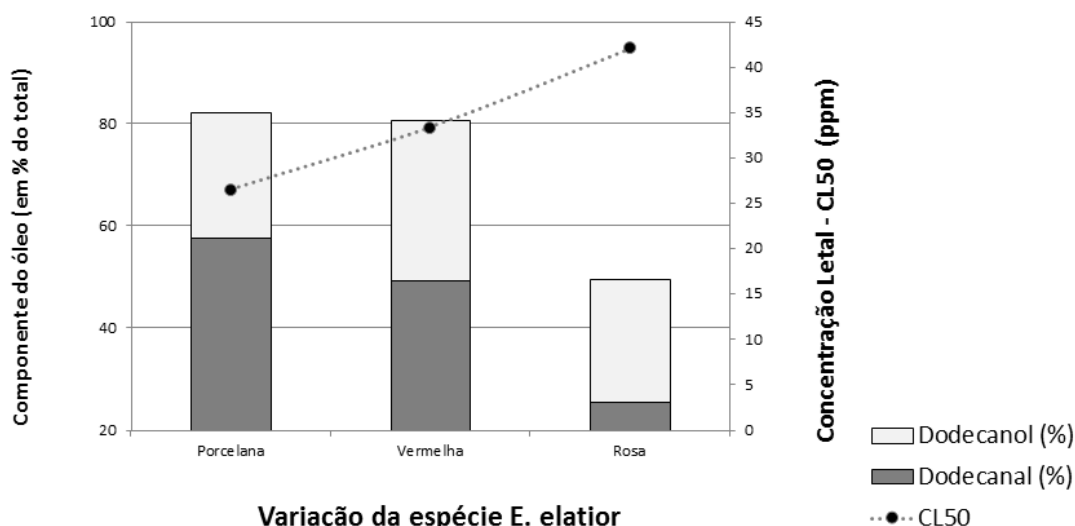


Gráfico 4.1 Relação entre a proporção dos componentes majoritários dodecanal e dodecanol e a atividade larvicida do óleo essencial das três variedades da *E. elatior*.

O óleo essencial que apresentou maior atividade larvicida, com CL₅₀ de 26,62 ppm foi o óleo da variedade porcelana, que possui a maior proporção de dodecanal (57,73%) e dodecanol (24,58%) que somados correspondem a mais de 80% da composição do óleo. O óleo essencial da variedade vermelha, que apresentou a segunda maior mortalidade, com CL₅₀ de 33,47 ppm apresenta uma proporção de dodecanal (49,37%) e dodecanol (31,53%) que somados correspondem também a mais de 80% da composição do óleo. Porém a variedade rosa, cujo óleo apresentou a menor mortalidade com CL₅₀ de 42,22 ppm, possui a menor quantidade de dodecanal (25,70%) e dodecanol (24,05%) que somados não correspondem a 50% da composição do óleo. O óleo essencial da variedade rosa também foi o que apresentou a maior proporção de α -pinene na sua composição, o qual, como foi citado anteriormente⁴⁸, não apresenta atividade larvicida na faixa desejada e recomendada para óleos essenciais (CL₅₀ <100 ppm).¹⁷³

Testes sucessivos foram realizados a fim de determinar a CL₅₀ dos compostos majoritários dos óleos essenciais, encontrando um valor de 50,88 e 7,76 ppm para o dodecanal e dodecanol respectivamente, como mostrado na tabela 4.12.

Tabela 4.12 Concentrações letais para 50% (CL₅₀) das larvas em estágio L4 de *A. aegypti* de majoritários dos óleos essenciais: dodecanal e dodecanol

Compostos	CL ₅₀ (IC) ^a	Erro padrão	Valor-p	X ²
Dodecanal	50,88 ppm (48,25 – 53,95)	± 0,01	0,9420	0,1196
Dodecanol	7,76 ppm (7,32 – 8,25)	± 0,01	0,9818	0,1733

^a Valores médios de concentração letal (CL₅₀) e intervalo de confiança de 95% são resultados de medidas feitas em triplicata. (IC): intervalo de confiança. χ^2 = qui quadrado.

A atividade larvicida do dodecanol já havia sido descrita anteriormente por Sinniah¹⁵⁷ que testou a atividade larvicida de alcoóis alifáticos de 2 a 18 carbonos, porém sua metodologia calculou o CL₅₀ de 4 L/hectare para o referente composto. Esta é a primeira vez que a atividade larvicida do dodecanol está sendo descrita com uma CL₅₀ de 50,88 ppm.

De acordo com Cheng e colaboradores¹⁷³ óleos essenciais com CL₅₀ abaixo de 100 ppm são considerados ativos e aqueles que apresentarem CL₅₀ menor que 50 ppm são considerados altamente ativos. Porém quando se fala em compostos isolados ou sintéticos o intervalo de concentração onde são considerados ativos é diferente. O organofosforado temephos, registrado nos EUA em 1965, para utilização em agricultura e controle de mosquitos é recomendado pela OMS para uso em água potável, possuem uma CL₅₀ de 0,0177 ppm. Outros compostos utilizados largamente no combate às larvas do mosquito também tem CL₅₀ muito baixas como o fenthion (0,0559 ppm), methoprene (0,0025 ppm).^{175,176}

Os óleos também apresentaram uma pequena quantidade (< 1%) de limonene, γ -terpinene¹⁷⁷ e decanol¹⁵⁷ que foram reportados anteriormente como larvicidas frente às larvas de *A. aegypti*, possuem uma CL₅₀ de 27 e 56 ppm para limonene e γ -terpinene, respectivamente. Desta maneira, ao comparar os dados de CL₅₀ dos óleos essenciais da tabela 4.10, podemos dizer que o limonene e γ -terpinene podem estar contribuindo para a atividade dos óleos essenciais, podendo estar apresentando efeito sinérgico.

A atividade larvicida do óleo essencial e extrato aquoso da *E. elatior* revelaram-se potencialmente interessantes para uso como larvicida natural no controle do vetor da dengue, devido ao resultado aqui apresentado. O que destaca esta espécie na utilização como larvicida comercial, além do seu potencial bioativo, é a produção em escala comercial para esta planta no estado de Pernambuco. A *E. elatior* é produzida e vendida como planta ornamental, já com uma colheita bem estabelecida durante todo o ano, as plantas descartadas no corte por não se adequar aos padrões de consumo ou plantas descartadas após seu uso como ornamento, poderiam ser aproveitadas para a extração de óleo essencial e o subproduto de sua extração, o extrato aquoso. Como mostrado por Abdelmageed e colaboradores¹¹² quanto maior o tempo de secagem da planta, após a colheita, maior a proporção de aldeídos e álcoois que, como mostrado anteriormente, são os prováveis responsáveis pela mortalidade. Através dessa informação pode-se inferir que plantas com três ou mais dias de corte, com baixo valor para ornamento, possuem óleo

essencial com maior poder larvicida comparadas com plantas frescas, recém-cortadas. Dessa forma, agrega-se valor ao que seria descartado pelos produtores ou consumidores, possibilitando o reaproveitamento do descarte e aumento do material comercializável pelos pequenos produtores.

Além disso, o dodecanol possui toxicidade em ratos com dose letal de 36 mL/Kg, que foi classificado como praticamente não-tóxico, sendo um aditivo alimentar permitido nos Estados Unidos e Europa¹⁷⁸ e o dodecanal também é um aditivo alimentar permitido nos Estados Unidos¹⁷⁹ sendo assim candidatos ideais para o controle da larva do mosquito por apresentarem baixa toxicidade humana e toxicidade para a larva do mosquito *A. aegypti*.

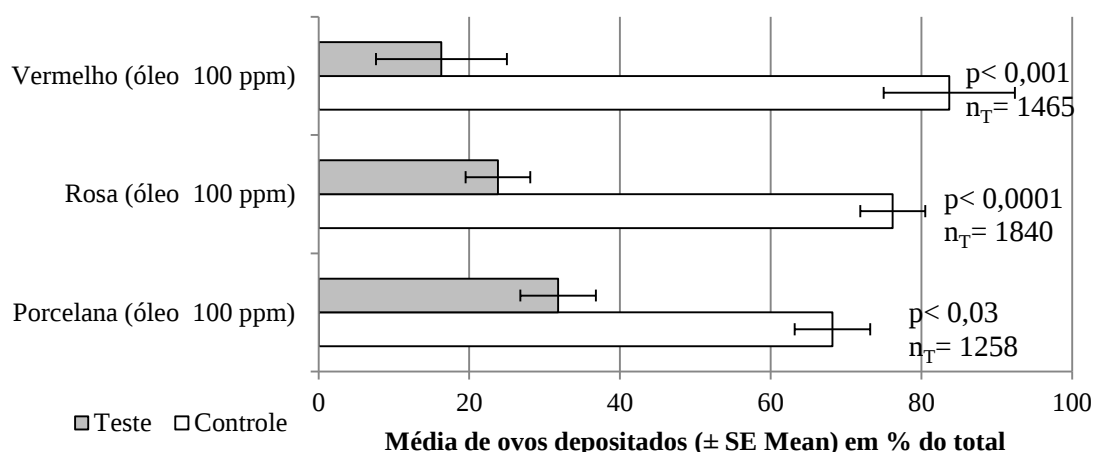
4.5.2 Bioensaio de oviposição dos óleos essenciais e extratos aquosos

Os testes de oviposição frente à fêmea do *A. aegypti* foram realizados objetivando verificar a resposta de oviposição das fêmeas para compostos voláteis presentes no óleo essencial (100 ppm) e nos extratos aquosos (5% v/v).

No gráfico 4.2 estão dispostos os valores da porcentagem de ovos depositados no recipiente com a solução teste e controle para os óleos essenciais das três variedades da *E. elatior*.

Os testes demonstraram significativo efeito destes compostos como deterrentes de oviposição para as fêmeas de *A. aegypti*. O óleo essencial da variedade vermelha apresentou a melhor atividade deterrente de oviposição, levando $83,7 \pm 5,6\%$ nos copos com solução controle em relação aos copos com a solução teste. Os óleos essenciais das variedades rosa e porcelana também apresentaram significativa preferência nos recipientes contendo a solução controle de $76,2 \pm 6,7\%$ e $68,2 \pm 6,6\%$ respectivamente.

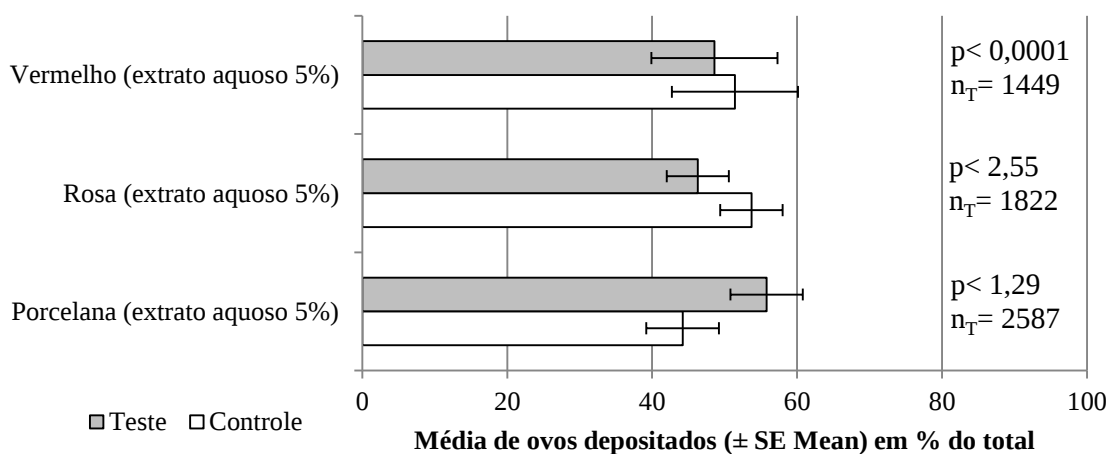
Gráfico 4.2 Média de ovos depositados ($\pm$ SE) em % do total de ovos para o controle e teste no bioensaio de oviposição dos óleos essenciais das três variedades da *E. elatior*.



SE: erro padrão; n_T: número total de ovos. *Para resultados significativos, p < 0,05.

No gráfico 4.3 estão dispostos os valores da porcentagem de ovos depositados no recipiente com a solução teste e controle para os extratos aquosos das três variedades da *E. elatior*.

Gráfico 4.3 Média de ovos depositados (±SE) em % do total de ovos para o controle e teste no bioensaio de oviposição dos extratos aquosos das três variedades da *E. elatior*.



SE: erro padrão; n_T: número total de ovos. *Para resultados significativos, p < 0,05.

Os extratos aquosos das três variedades da *E. elatior* não apresentaram diferença significativa entre a quantidade de ovos depositados nos recipientes com as soluções controle e teste.

Este fato pode ser atribuído a vários fatores, como a provável ausência de componentes voláteis que possam atuar nas antenas do mosquito fazendo com que a fêmea evite o sítio de oviposição, componentes do próprio extrato que sejam percebidos pela fêmea ao tocar no sítio de oviposição, entre outros.

Em estudos relacionados, uma solução de 20 mg/L de óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* foi relatada por induzir uma resposta forte em testes de oviposição contra as fêmeas de *A. aegypti* ao longo de um bioensaio 5 dias¹⁸⁰, enquanto que os óleos essenciais de folhas, inflorescências e caule de *Piper marginatum* mostraram efeitos deterrente nas concentrações de 100 ppm, com inibição de 40% em comparação com os controles.¹⁰⁴ Em estudo realizado por Tawatsin e colaboradores¹⁸¹, óleos essenciais de cúrcuma, gengibre, goiabeira e pimenta do reino, com concentração de 0,01% (v/v), apresentaram repelência que variava entre 16,6 a 94.7% de percentagem de ovos a mais depositados no controle em relação ao teste.

Outras espécies da família Zingiberaceae apresentaram atividade repelente frente às fêmeas de *A. aegypti* como o gengibre (*Zingiber officinale*), cúrcuma (*Curcuma longa*)^{181,182} em teste de repelência por exposição e de oviposição.

A escolha do método de analisar a resposta dos mosquitos ao óleo essencial em sítios de oviposição de fêmeas grávidas é guiada por vários fatores. Inicialmente, estímulos visuais e olfativos são empregados para encontrar locais potenciais pela fêmea. Depois de considerada adequação a localização é verificada no que diz respeito a agentes químicos e fatores físicos por receptores distribuídos ao longo do corpo do mosquito. Quando impedimentos para oviposição são detectados pela fêmea, poucos ou nenhum ovo é depositado no local.²³

4.6 Análise eletrofisiológica

O óleo essencial da espécie *E. elatior* apresentou atividade deterrente em bioensaio de oviposição frente às fêmeas de *A. aegypti* em concentração de 100 ppm. Posteriormente, o óleo de *E. elatior* foi submetido à análise eletrofisiológica simultânea de GC/FID e GC/EAD em concentração de 300 ppm, a fim de obter respostas das antenas dos mosquitos aos compostos no óleo.

As antenas da fêmea do mosquito são difíceis de manter estabilidade quando comparadas com outros insetos, porém após montagem de várias antenas foi possível obter a estabilidade desejada a ponto de observar uma tendência nas respostas. Estes dados foram obtidos depois de 10 repetições efetuadas com 10 antenas diferentes do mosquito, nas mesmas condições. O cromatograma com a melhor visualização das respostas está ampliado na figura 4.12.

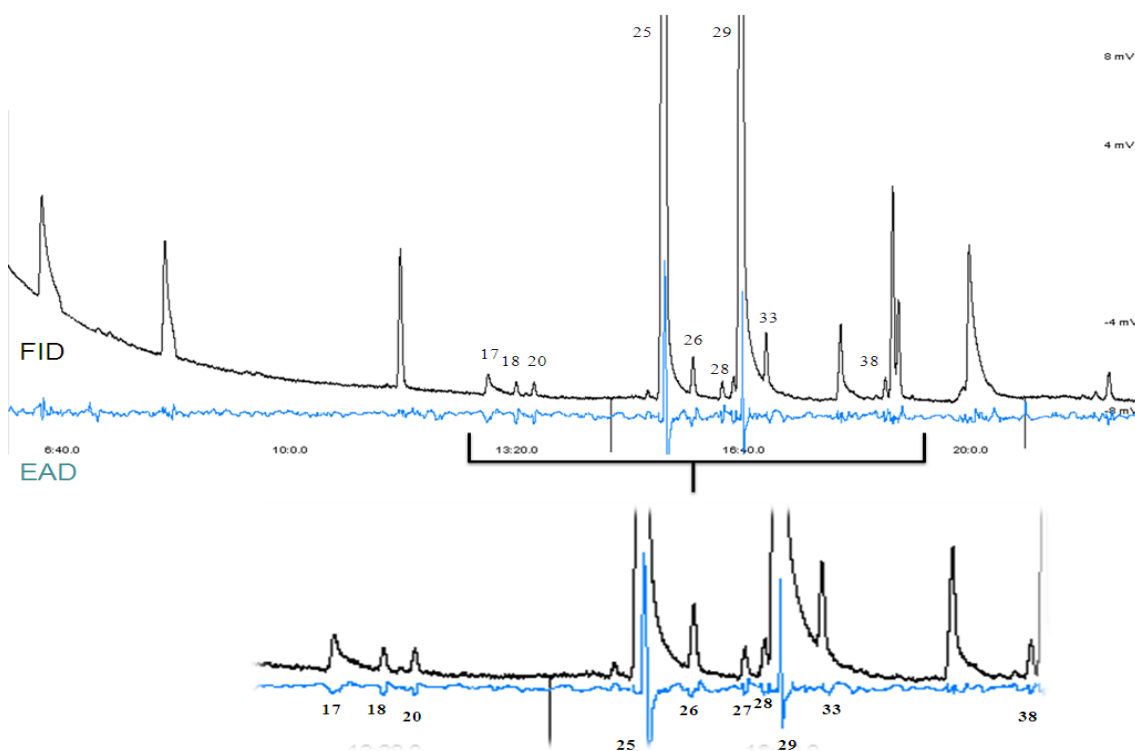


Figura 4.12 O cromatograma (CG) do óleo essencial de *E. elatior* com detecção simultânea por FID (superior) e por Detecção Eletroantenográfica (inferior) usando uma antena de *A. aegypti*.

As análises mostraram que as fêmeas são sensíveis às substâncias associadas aos picos 17, 18, 20, 25, 26, 27, 28, 29, 33 e 38, que foram identificados como n-decanol, 2-undecanone, n-undecanal, n-dodecanal, (E)-caryophyllene, β -(E)-Farnesene, α -Humulene, n-dodecanol, isodaucene e dodecanoic acid (figura 4.13).

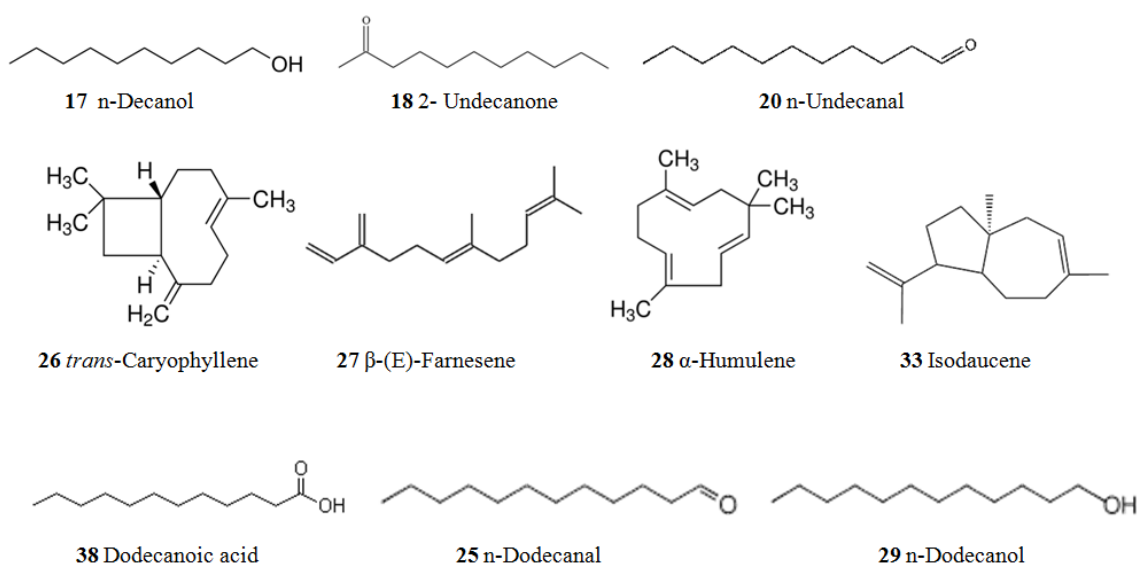


Figura 4.13 Compostos bioativos de *E. elatior* frente as antenas de fêmeas do mosquito *A. aegypti*.

Trabalhos anteriores utilizando a técnica de GC-EAD indicaram resultado positivo de outros componentes do óleo. O *trans*-caryophyllene como estimulador da antena do *A. aegypti*¹²² e como repelente do mesmo.¹⁸³ O dodecanal^{121,150}, decanal e limoneno^{150,184} também estimularam a antena de *A. aegypti*. Os aldeídos undecanal e dodecanal já foram reportados na literatura por estimularem a antena do *Culex quinquefasciatus*¹¹⁹ ambos estão presentes no odor excretado por humanos.

Campbell¹⁸⁵ encontrou uma série de compostos presentes em óleos essenciais que apresentaram estímulo na antena de *A. aegypti* entre os mais de 40 compostos estão β-caryophyllene, α-terpineol, β-pinene, germacrene-D, limonene, α-zingiberene, que estão presentes no óleo da *E. elatior*.

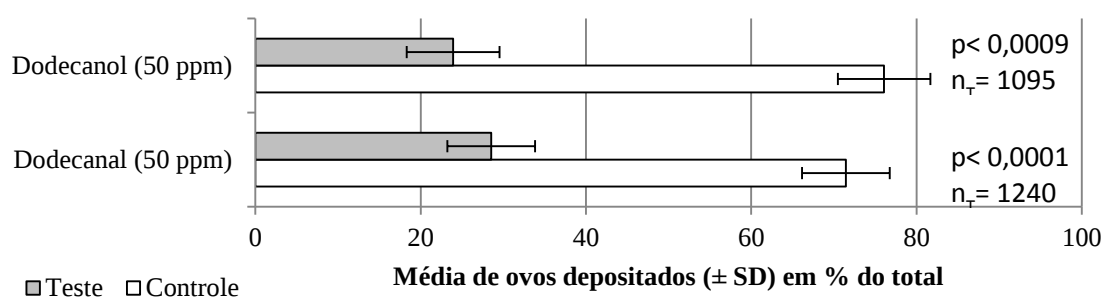
O óleo essencial do gengibre (*Zingiber officinale*), membro da família Zingiberaceae, mostrou em trabalhos anteriores quatro compostos ativos em EAD de *A. aegypti*, sendo eles α-curcumene, zingiberene, β-bisabolene, e β-sesquiphellandrene.¹⁸⁵

Apesar de o componente decanal estimular a antena em testes realizados pela mesma técnica, teste em campo na concentração de 10⁵ng/50μl de solvente, demonstraram ser menos atrativos para as fêmeas de *A. aegypti* grávidas quando comparado com o controle (AtrAedes®).¹⁸⁶

4.7 Bioensaio de oviposição dos componentes dos óleos

A fim de testar a atividade deterrente dos componentes majoritários do óleo essencial de *E. elatior*, que apresentaram respostas das antenas das fêmeas do mosquito, testes seguindo a mesma metodologia utilizada para os óleos essenciais foram realizados. Soluções de 50 ppm, sendo etanol o cosolvente, de dodecanol e dodecanal foram preparadas e os resultados do comportamento das fêmeas no teste de oviposição estão mostrados no gráfico 4.4.

Gráfico 4.4 Média de ovos depositados ($\pm$ SE) em % do total de ovos para o controle e teste no teste de oviposição dos componentes majoritários da *E. elatior*.



SE: erro padrão; n_T: número total de ovos. Para resultados significativos, p < 0,05.

Como mostra o gráfico 4.4, os testes revelaram que os componentes majoritários do óleo essencial apresentam atividade deterrente semelhante ao óleo essencial. Numa concentração de 50 ppm os compostos apresentaram significativa atividade deterrente sendo mais de 70% dos ovos depositados nos recipientes com a solução controle em ambos os casos.

Os resultados obtidos pelo GC-EAD corroboram a informação que as antenas da fêmea de *A. aegypti* são sensíveis a dodecanal e dodecanol que são responsáveis por uma atividade deterrente em teste de oviposição com concentrações de 50 ppm. Não é possível, porém, afirmar que esses compostos exclusivamente são os responsáveis pela atividade deterrente dos óleos, mas o resultado comportamental corrobora as respostas obtidas com a técnica de GC-EAD.

Bioensaios de oviposição devem ser realizados com os outros compostos que mostraram resposta frente às antenas da fêmea do *A. aegypti* no EAD, em concentrações que levem em consideração sua proporção no óleo essencial, para se verificar seu potencial deterrente na oviposição da fêmea do mosquito *A. aegypti*.

**Caracterização química, atividade larvicida e deterrente de oviposição
do óleo essencial da inflorescência do Bastão do Imperador (*Etlingera
elator*) frente à *Aedes aegypti***

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- Através do estudo da composição do óleo essencial da inflorescência da espécie *E. elatior*, foram identificados 99,66; 97,91 e 98,73% dos componentes do óleo para as variedades vermelha, rosa e porcelana, respectivamente, sendo o dodecanal, dodecanol e α -pinene os componentes majoritários. Notou-se ainda que, diferentemente da maioria dos óleos essenciais de flores, os componentes majoritários não são terpenos e sim aldeídos e alcoóis, representando mais de 80% do óleo para as variedades vermelha e porcelana.
- A atividade larvícida sobre *A. aegypti* foi verificada para o óleo essencial e para o extrato aquoso da inflorescência de *E. elatior* apresentando valor de CL₅₀ igual a 33,47; 42,22 e 26,62 ppm para os óleos essenciais e 1,26; 7,68 e 0,97% para os extratos aquosos das variedades vermelha, rosa e porcelana, respectivamente. Os quais podem ser considerados ativos, como descrito na literatura, onde amostras apresentando valores de CL₅₀ abaixo de 100 ppm podem ser consideradas ativas e constituem bons larvicidas.
- Os componentes majoritários dos óleos essenciais demonstraram potencial larvícida isoladamente com CL₅₀ igual a 50,88 e 7,76 ppm para o dodecanal e dodecanol, respectivamente. O dodecanol foi o mais ativo e pode ser considerado o principal responsável pela atividade larvícida do óleo essencial.
- O poder larvícida do óleo essencial da espécie *E. elatior* é maior quando a proporção de álcoois e aldeídos é maior, o que segundo a literatura ocorre dias após o corte, agregando valor às flores que por motivos de controle de qualidade seriam descartadas pelo produtores ou consumidores.
- O estudo fitoquímico do extrato aquoso da inflorescência de *E. elatior* revelou a presença de taninos, polifenóis e flavonoides, consistente com os resultados relatados na literatura.
- Os óleos essenciais, com concentração de 100 ppm, das três variedades de *E. elatior* se mostraram deterrentes em bioensaio de oviposição. Os bioensaios de oviposição das fêmeas do *A. aegypti* com extratos aquosos, com concentração de 5% não proporcionaram qualquer resposta no comportamento do mosquito. A inexistência de atividade nos extratos aquosos pode ser atribuída à ausência ou

baixa concentração de voláteis que não influenciaram a oviposição da fêmea de *A. aegypti*.

- Pela técnica de GC-EAD com antenas de *A. aegypti* frente ao óleo essencial da variedade vermelha da *E. elatior* que demonstrou atividade deterrente na oviposição observou-se que oito compostos despolarizaram a antena de fêmeas do *A. aegypti*, sendo eles n-decanol, 2-undecanone, n-undecanal, n-dodecanal, (*E*)-caryophyllene, β -(*E*)-Farnesene, α -Humulene, n-dodecanol, isodaucene e dodecanoic acid.
- O bioensaio de oviposição com os compostos puros mostraram que a atividade deterrente observada para os componentes majoritários e eletrofisiologicamente ativos (dodecanol e dodecanal), na concentração de 50 ppm, corroborou os resultados obtidos no EAD.

**Caracterização química, atividade larvícida e deterrente de oviposição
do óleo essencial da inflorescência do Bastão do Imperador (*Etlingera
elaticior*) frente à *Aedes aegypti***

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

- Identificar os componentes ativos dos extratos aquosos.
- Realizar ensaio de oviposição em concentrações menores de óleo essencial para determinar a partir de que concentração de óleo, ele apresenta atividade deterrente de oviposição.
- Realizar teste de oviposição com os compostos identificados como ativos na eletroantenografia a fim de testar sua atividade deterrente.
- Realizar mais testes eletroantenográficos a fim de validar os estímulos observados nos testes preliminares realizados.
- Realizar extrações de óleo essenciais para as três variedades da espécie com o mesmo tempo de corte para determinar se a diferença observada nos componentes das mesmas provém da variação dentro da espécie ou do tempo de corte e secagem.

**Caracterização química, atividade larvícida e deterrente de oviposição
do óleo essencial da inflorescência do Bastão do Imperador (*Etlingera
elator*) frente à *Aedes aegypti***

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências das imagens:

¹ <http://www.prefeitura.unicamp.br/prefeitura/ca/DENGUE/AEDES2.gif>

² http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/aedes_aegypti.htm

³ <http://aps.group.shef.ac.uk/apsrtp/aps-rtp-2010/basit-rasheed/research.html>

<http://www.flickrriver.com/photos/carlosolimpio/5524174803/>

⁴ <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=319&sid=32&tpl=printer>

<http://www.arbovirus.health.nsw.gov.au/mosquit/photos/mosquitphotos.htm>

⁵

a) http://www.equatorialexotics.com/price_e_zingiber_heliconia.htm

b) <http://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/Etlingera>

c) <http://www.elarishtropicalexotics.com/online-plant-store-profiles/etlingera-pyramidosphaera-cv-orange-tulip/80.aspx>

d) <http://www.tejastropicals.com/common-name/tropicals/etlingera-hemisphaerica-pink-tulip-2.html>

e) <http://tropicaldesigns.com/new07/Etlingera.jpg>

f) <http://www.jungle-asia.com/photo.php?iid=199&k=belok&backurl=thumbs.php%3Fk%3Dbelok>

g) <http://phylodiversity.net/bb07/students/megan/species12.html>

h) <http://www.tropicaldesigns.com/malaysian-plants-main.html>

i) <http://globaltwitcher.com/gallery.asp?thingid=94241&filter=class&filtervarde=30&taxa=0&type=1&language=>

j) <http://gingersofindia.com/images/pictures/fenzlii.jpg>

k) <http://www.orchids-flowers.com/tropical-flowers/white-torch-ginger-etlingera-elatior-thai-queen/>

l) <http://www.oocities.org/fahshin/gingers/littoralis.html>

⁶A)

<http://t3.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQL83M0OkIdOyAxzCAQNn4pg0mm5XDjbl0eqNAdmAMs0aRhoCVW>

B)

<http://t0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQyOXpbO4SOe1Hu1dTRsEcZJIHUK2aFqJzyffLNlsDYd828neyX7Q>

C)

http://t0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTAXa1yExkd4oLeYzgRMSrCrG1h4aZ5YhxmBqpBTWosmR_7yAdNhQ

D)

https://encrypted-tbn1.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSHEYuOQyCx2WiQlGlirKGD7QOhiBZ-6GYTwJR7F2fn_CjTjFdylQ

- (1) Pinheiro, F. P.; Corber, S. J. *World health statistics quarterly Rapport trimestriel de statistiques sanitaires mondiales* **1997**, 50, 161–169.
- (2) Gubler, D. J. *Annals Of The New York Academy Of Sciences* **2001**, 951, 13–24.
- (3) Saude, M. da Dengue
http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/ap_balnco_dengue.pdf
 (accessed Aug 10, 2012).
- (4) OMS *Dengue haemorrhagic fever diagnosis, traitement, prevention and control*; 2nd ed.; World Health Organization (WHO): Geneva, 1997.
- (5) OMS Dengue and severe dengue
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>.
- (6) Rosen, L. *Medecine tropicale revue du Corps de sante colonial* **1999**, 59, 495–498.
- (7) Guzmán, M. G.; García, G.; Kourí, G. *Revista Panamericana de Salud Pública* **2006**, 19, 204–215.
- (8) Ligon, B. L. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* **2005**, 16, 60–65.
- (9) Teo, D.; Ng, L. C.; Lam, S. *Transfusion medicine Oxford England* **2009**, 19, 66–77.
- (10) Oliveira, L. In *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*; Coura, J. R., Ed.; 2005; pp. 75–97.
- (11) Joshi, V.; Mourya, D. T.; Sharma, R. C. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **2002**, 67, 158–161.
- (12) Forattini, O. P. *Culicidologia Médica, v.2: Identificação, Biologia e Epidemiologia*; Edusp, 2002; Vol. 2, p. 864.
- (13) Aciole, S. D. G. Avaliação da atividade inseticida dos óleos essenciais das plantas Amazônicas Annonaceae, Boraginaceae e de Mata Atlântica Myrtaceae como alternativa de controle as larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: culicidae), Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2009.
- (14) Lopez-Sanchez, j. *Indian journal of history of science* **1981**, 16, 156–168.
- (15) FUNASA *Dengue: Instruções para pessoal de combate ao vetor – Manual de Normas Técnicas*; 3rd ed.; Ministério da Saúde Brasileira, 2001.
- (16) Gomes, A. dos S.; Sciavico, C. J. de S.; Eiras, Á. E. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **2006**, 39, 327–332.
- (17) Consoli, R. A. G. B.; Oliveira, R. L. *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil*; Editora FIOCRUZ: Rio de Janeiro, 1994.

- (18) Ahmad, R.; Chu, W.-L.; Ismail, Z.; Lee, H.-L.; Phang, S.-M. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* **2004**, 35, 79–87.
- (19) Donini, A.; Gaidhu, M. P.; Strasberg, D. R.; O'donnell, M. J. *Journal of Experimental Biology* **2007**, 210, 983–992.
- (20) Lozovei, A. L. In *Entomologia Médica e Veterinária*; Marcondes, C. B., Ed.; Editora Atheneu, 2001; pp. 59–104.
- (21) Carrera, M. *Inseto de Interesse Médico e Veterinário*; UFPR: Curitiba, 1991.
- (22) Barata, E. A. de F.; Costa, A. I. P. da; Chiaravalloti Neto, F.; Glasser, C. M.; Barata, J. M. S.; Natal, D. *Revista de Saúde Pública* **2001**, 35, 237–242.
- (23) Bentley, M. D.; Day, J. F. *Annual Review of Entomology* **1989**, 34, 401–421.
- (24) Navarro, D. M. A. F.; De Oliveira, P. E. S.; Potting, R. P. J.; Brito, A. C.; Fital, S. J. F.; Sant'Ana, A. E. G. *Journal of Applied Entomology* **2003**, 127, 46–50.
- (25) Pizano, M. *Acta Horticulturae* **2005**, 683.
- (26) Luz, P. B. da; Almeida, E. F. A.; Paiva, P. D. de O.; Ribeiro, T. R. *Informe Agropecuário* **2005**, 26, 62–72.
- (27) Castro, C. E. . *Helicônias como flores de corte: adequação de espécies e tecnologia pós-colheita*, Universidade de São Paulo, 1993.
- (28) Agência Brasil <http://agenciabrasil.ebc.com.br/noticia/2011-09-17/mercado-brasileiro-de-flores-e-plantas-ornamentais-emprega-mais-de-190-mil-pessoas>.
- (29) Loges, V.; Costa, A. S.; Guimarães, W. N. R.; Teixeira, M. C. F. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* **2008**, 14, 15–22.
- (30) Loges, V.; Castro, A. C. R.; Martins, L. S. S.; Willadino, L.; Teixeira, M. C. F.; Lira Júnior, M. A.; Pinheiro, P. G. L.; Souza, J. W. O.; Melo, M. G. *Acta Horticulturae* **2005**, 683, 345–350.
- (31) Ferreira, A.; Souza Filho, I. C.; Albuquerque, S. C.; Brasil, H. S. *Floricultura em Pernambuco* **2002**, 21–59.
- (32) K. Larsen, Halijah Ibrahim, S. H. K. and L. G. S. *Gingers of Peninsular Malaysia and Singapore*; Natural History Publications (Borneo): Kota Kinabalu, 1999.
- (33) Schmidt, D. de F. N. *Estudo químico, farmacológico e biológico dos rizomas de Curcuma zedoaria (Zingiberaceae)*, Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.
- (34) Vimala, S.; Norhanom, A. W.; Yadav, M. *British Journal of Cancer* **1999**, 80, 110–116.

- (35) Cronquist, A. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*; Columbia University Press: New York, 1981; Vol. 34.
- (36) Kress, W. J.; Prince, L. M.; Williams, K. J. *American Journal of Botany* **2002**, 89, 1682–1696.
- (37) Metcalfe, C. R.; Tomlinson, P. B.; Cutler, D. F.; Ayensu, E. S. *Anatomy of the Monocotyledons: Commelinales-Zingiberales*, by P. B. Tomlinson; Clarendon Press, 1969.
- (38) Dahlgren, R. M. T.; Clifford, H. T.; Yeo, P. F.; Faden, R. B.; Jacobsen, N.; Jacobsen, K.; Jensen, S. R.; Nielsen, B. J.; Rasmussen, F. N. *The families of the Monocotyledons - Structure, evolution, and taxonomy*; Springer-Verlag: Berlin, 1985.
- (39) Sirirungsa, P. *International Union of Pure and Applied Chemistry* **1998**, 70, 98–110.
- (40) Jaafar, F. M.; Osman, C. P.; Ismail, N. H.; Awang, K. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences* **2007**, 10, 269–273.
- (41) Joly, A. B. *Botânica - Introdução à taxonomia vegetal*; Companhia Editora Nacional: São Paulo, 1993.
- (42) Reanmongkol, W.; Subhadhirasakul, S.; Khaisombat, N.; Fuengnawakit, P.; Jantasila, S.; Khamjun, A. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* **2006**, 28, 999–1008.
- (43) Tewtrakul, S.; Subhadhirasaku, S.; Kummee, S. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* **2003**, 25, 239–243.
- (44) Cheenpracha, S.; Karalai, C.; Ponglimanont, C.; Subhadhirasakul, S.; Tewtrakul, S. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, 14, 1710–1714.
- (45) Almeida, M. C. Estudo do processamento por radiação em espécies da família Zingiberaceae: açafrão (*Curcuma longa* L.), Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) e Zedoaria (*Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe), Universidade de São Paulo, 2012.
- (46) Habsah, M.; Amran, M.; Mackeen, M. M.; Lajis, N. H.; Kikuzaki, H.; Nakatani, N.; Rahman, A. A.; Ghafar; Ali, A. M. *Journal of Ethnopharmacology* **2000**, 72, 403–410.
- (47) Mau, J.-L.; Lai, E. Y. C.; Wang, N.-P.; Chen, C.-C.; Chang, C.-H.; Chyau, C.-C. *Food Chemistry* **2003**, 82, 583–591.
- (48) Santos, G. K. N.; Dutra, K. A.; Barros, R. A.; Da Câmara, C. A. G.; Lira, D. D.; Gusmão, N. B.; Navarro, D. M. A. F. *Industrial Crops and Products* **2012**, 40, 254–260.

- (49) Winters, G. *Revista Natureza* **1995**, 91, 14–23.
- (50) CEAPE Zingiberaceae
http://www.ceapdesign.com.br/familias_botanicas/zingiberaceae.html.
- (51) Mood, J. D. *Heliconia Society International Bulletin* **1996**, 8, 1–8.
- (52) Criley, R. A. *Heliconia Society International Bulletin* **1996**, 8, 3–6.
- (53) Wong, K. C.; Sivasothy, Y.; Boey, P. L.; Osman, H.; Sulaiman, B. *Journal of Essential Oil Research* **2010**, 22, 461–466.
- (54) Yahya, M. A. A.; Yaacob, W. A.; Din, L. B.; Nazlina, I. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences* **2010**, 14, 32–40.
- (55) Tadtong, S.; Wannakhot, P.; Poolsawat, W.; Athikomkulchai, S.; Ruangrunsi, N. *Journal of Health Research* **2009**, 23, 77–79.
- (56) Chiang, E. C. W.; Yan, L. Y.; Ali, N. M. *International Journal for the Advancement of Science & Arts* **2010**, 1, 1–12.
- (57) Nowakowska, Z. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, 42, 125–137.
- (58) Portet, B.; Fabre, N.; Roumy, V.; Gornitzka, H.; Bourdy, G.; Chevalley, S.; Sauvain, M.; Valentin, A.; Moulis, C. *Phytochemistry* **2007**, 68, 1312–1320.
- (59) Ficker, C. E.; Smith, M. L.; Susiarti, S.; Leaman, D. J.; Irawati, C.; Arnason, J. T. *Journal of Ethnopharmacology* **2003**, 85, 289–293.
- (60) Chan, E. W. C.; Lim, Y. Y.; Omar, M. *Food Chemistry* **2007**, 104, 1586–1593.
- (61) Chan, E. W. C.; Lim, Y. Y.; Wong, L. F.; Lianto, F. S.; Wong, S. K.; Lim, K. K.; Joe, C. E.; Lim, T. Y. *Food Chemistry* **2008**, 109, 477–483.
- (62) Ishii, T.; Matsuzawa, H.; Vairappan, C. S. *Journal Of Tropical Biology And Conservation* **2010**, 7, 75–80.
- (63) Chuakul, W.; Boonpleng, A. *Journal of Medicinal* **2003**, 10, 33–39.
- (64) Chapman, T. S. *Ornamental gingers: a guide to the selection and cultivation*; The Author: Louisiana, 1995.
- (65) Keppler, A. K. *Exotic tropicals of Hawaii*; 5th ed.; Mutual Publishing: Honolulu, 1996.
- (66) Lamas, A. M. *Flores: produção, pós-colheita e mercado*; Instituto Frutal: Fortaleza, CE, 2004.
- (67) Loges, V.; Teixeira, M. do C. F.; Castro, A. C. R. de; Costa, A. S. da *Horticultura Brasileira* **2005**, 23, 699–702.

- (68) Yunus, M. F.; Aziz, M. A.; Kadir, M. A.; Rashid, A. A. *Scientia Horticulturae* **2012**, 135, 145–150.
- (69) Loges, V.; Castro, A. C. R.; Guimarães, W. N. R.; Costa, A. S.; Teixeira, M. C. F. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* **2008**, 14, 91–97.
- (70) Mohamad, H.; Lajis, N. H.; Abas, F.; Ali, A. M.; Sukari, M. A.; Kikuzaki, H.; Nakatani, N. *Journal of Natural Products* **2005**, 68, 285–288.
- (71) Haleagrahara, N.; Jackie, T.; Chakravarthi, S.; Rao, M.; Kulur, A. *The Journal of toxicological sciences* **2010**, 35, 663–671.
- (72) Habsah, M.; Ali, A. M.; Lajis, N. H.; Sukari, M. A.; Yap, Y. H.; Kikuzaki, H.; Nakatani, N. *The Malaysian Journal of Medical Sciences* **2005**, 12, 6–12.
- (73) Lachumy, S. J. T.; Sasidharan, S.; Sumathy, V.; Zuraini, Z. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **2010**, 3, 769–774.
- (74) Simões, C. M. O.; Petrovick, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*; UFRGS: Porto Alegre, 2007.
- (75) Bell, E. A.; Charlwood, B. V. In *Secondary Plants Products*; Springer-Verlag: New York, 1980.
- (76) Sartoratto, A.; Machado, A. L. M.; Delarmelina, C.; Figueira, G. M.; Duarte, M. C. T.; Rehder, V. L. G. *Brazilian Journal of Microbiology* **2004**, 35, 275–280.
- (77) Leal, T. C. A. B.; Freitas, S. P.; Silva, J. F.; Carvalho, A. J. C. *Revista Ceres* **2001**, 48, 445–453.
- (78) Bizzo, H. R.; Hovell, A. M. C.; Rezende, C. M. *Química Nova* **2009**, 32, 588–594.
- (79) Taiz, L.; Zeiger, E. *Fisiologia Vegetal*; 3rd ed.; Artmed: Porto Alegre, 2004.
- (80) Brielman, H. L. In *Natural products from Plants*; CRC Press: Boca Raton, FL, 2006; pp. 10–19.
- (81) Castro, H. G.; Silva, D. J. H.; Ferreira, F. A.; Mosquim, P. R. *Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários*; 2nd ed.; Gráfica Suprema e Editora: Visconde do Rio Branco, 2004.
- (82) Semen, E. . H. *American Journal Environmental Sciences* **2005**, 1, 133–138.
- (83) Busatta, C. Caracterização Química e Atividade Antimicrobiana in vitro e em alimentos dos extratos de orégano e manjerona, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 2006.
- (84) Jiao, J.; Fu, Y.-J.; Zu, Y.-G.; Luo, M.; Wang, W.; Zhang, L.; Li, J. *Food Chemistry* **2012**, 134, 235–243.

- (85) Li, X.-J.; Wang, W.; Luo, M.; Li, C.-Y.; Zu, Y.-G.; Mu, P.-S.; Fu, Y.-J. *Food Chemistry* **2012**, 133, 437–444.
- (86) Watanabe, C. H.; Noose, T. M.; Garcia, C. A.; Pinheiro Povh, N. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s **2006**, 8, 76–86.
- (87) Silva, L. V.; Constancio, S. C. M.; Mendes, M. F.; Coelho, G. L. V. VI *Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica* **2005**.
- (88) ASTA *Official analytical methods of the American Spice Trade Association*; ASTA - American Spice Trade Association: Englewood Cliffs-NJ, 1968; pp. 8–11.
- (89) Bakkali, F.; Idaomar, M. *Food and Chemical Toxicology* **2008**, 46, 446–475.
- (90) Sonwa, M. M.; König, W. A. *Phytochemistry* **2001**, 56, 321–326.
- (91) Borges, A. R.; De Albuquerque Aires, J. R.; Higino, T. M. M.; Das Graças Freire de Medeiros, M.; Das Graças Lopes Citó, A. M.; Lopes, J. A. D.; De Figueiredo, R. C. B. Q. *Experimental Parasitology* **2012**, 132, 123–128.
- (92) Burt, S. *International Journal of Food Microbiology* **2004**, 94, 223–253.
- (93) Čavar, S.; Maksimović, M.; Vidic, D.; Parić, A. *Industrial Crops and Products* **2012**, 37, 479–485.
- (94) Hammer, K. A.; Carson, C. F.; Riley, T. V. *Journal of Applied Microbiology* **1999**, 86, 985–990.
- (95) Laubach, H. E. *Health* **2012**, 04, 443–447.
- (96) Machado, M.; Dinis, a M.; Salgueiro, L.; Custódio, J. B. a; Cavaleiro, C.; Sousa, M. C. *Experimental parasitology* **2011**, 127, 732–9.
- (97) De Medeiros, M. D. G. F.; Da Silva, A. C.; Citó, A. M. D. G. L.; Borges, A. R.; De Lima, S. G.; Lopes, J. A. D.; Figueiredo, R. C. B. Q. *Parasitology international* **2011**, 60, 237–41.
- (98) Pavlović, I.; Petrović, S.; Radenković, M.; Milenković, M.; Couladis, M.; Branković, S.; Drobac, M. P.; Niketić, M. *Food Chemistry* **2012**, 130, 310–315.
- (99) Wu, Q.; Wang, W.; Dai, X.; Wang, Z.; Shen, Z.; Ying, H.; Yu, C. *Journal of ethnopharmacology* **2012**, 139, 668–71.
- (100) Choochote, W.; Chaithong, U.; Kamsuk, K.; Jitpakdi, a; Tippawangkosol, P.; Tuetun, B.; Champakaew, D.; Pitasawat, B. *Fitoterapia* **2007**, 78, 359–64.
- (101) Nerio, L. S.; Olivero-Verbel, J.; Stashenko, E. *Bioresource technology* **2010**, 101, 372–8.

- (102) Isman, M. B. *Crop Protection* **2000**, 19, 603–608.
- (103) Rajkumar, S.; Jebanesan, A. *Journal of Asia-Pacific Entomology* **2010**, 13, 107–109.
- (104) Autran, E. S.; Neves, I. a; Da Silva, C. S. B.; Santos, G. K. N.; Da Câmara, C. a G.; Navarro, D. M. a F. *Bioresource technology* **2009**, 100, 2284–8.
- (105) Ravi Kiran, S.; Bhavani, K.; Sita Devi, P.; Rajeswara Rao, B. R.; Janardhan Reddy, K. *Bioresource technology* **2006**, 97, 2481–4.
- (106) De Moraes, S. M.; Facundo, V. A.; Bertini, L. M.; Cavalcanti, E. S. B.; Anjos Júnior, J. F. Dos; Ferreira, S. A.; De Brito, E. S.; De Souza Neto, M. A. *Biochemical Systematics and Ecology* **2007**, 35, 670–675.
- (107) Cheng, S.-S.; Huang, C.-G.; Chen, Y.-J.; Yu, J.-J.; Chen, W.-J.; Chang, S.-T. *Bioresource technology* **2009**, 100, 452–6.
- (108) Dharmagadda, V. S. S.; Naik, S. N.; Mittal, P. K.; Vasudevan, P. *Bioresource technology* **2005**, 96, 1235–40.
- (109) Chung, I.-M.; Seo, S.-H.; Kang, E.-Y.; Park, S.-D.; Park, W.-H.; Moon, H.-I. *Biochemical Systematics and Ecology* **2009**, 37, 470–473.
- (110) Silva, W. J.; Dória, G. a a; Maia, R. T.; Nunes, R. S.; Carvalho, G. a; Blank, a F.; Alves, P. B.; Marçal, R. M.; Cavalcanti, S. C. H. *Bioresource technology* **2008**, 99, 3251–5.
- (111) Cavalcanti, E. S. B.; Moraes, S. M. de; Lima, M. A. A.; Santana, E. W. P. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2004**, 99, 541–544.
- (112) Abdelmageed, A. H. A.; Faridah, Q. Z.; A, N. A.; Yaacob, M. **2011**, 5, 3432–3439.
- (113) Abdelwahab, S. I.; Zaman, F. Q.; Mariod, A. A.; Yaacob, M.; Abdelmageed, A. H. A.; Khamis, S. Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of the essential oils of *Etlingera elatior* and *Cinnamomum pubescens* Kochummen. *Journal of the science of food and agriculture* **2010**, 90, 2682–8.
- (114) Chan, E. W. C.; Lim, Y. Y.; Wong, S. K.; Lim, K. K.; Tan, S. P.; Lianto, F. S.; Yong, M. Y. *Food Chemistry* **2009**, 113, 166–172.
- (115) Wijekoon, M. M. J. O.; Bhat, R.; Karim, A. A. *Journal of Food Composition and Analysis* **2011**, 24, 615–619.
- (116) Arn, H.; Stadler, E.; Rauscher, S. *Zeitschrift fur Naturforschung* **1975**, 30C, 722–725.

- (117) Jhumur, U. S. *Silene otites* (Caryophyllaceae): Attraction of nectar-seeking mosquitoes to inflorescence odours, and temporal variation of flower scent and flower visitors, Universidade de Bayreuth, 2007.
- (118) Leal, W. S.; Uchida, K. *Journal of Asia-Pacific Entomology* **1998**, 1, 217–221.
- (119) Cooperband, M. F.; McElfresh, J. S.; Millar, J. G.; Cardé, R. T. *Journal of Insect Physiology* **2008**, 54, 1184–1192.
- (120) Campbell, C.; Gries, R.; Gries, G. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **2011**, 138, 21–32.
- (121) Logan, J.; Birkett, M.; Clark, S.; Powers, S.; Seal, N.; Wadhams, L.; Mordue (Luntz), A. J.; Pickett, J. *Journal of Chemical Ecology* **2008**, 34, 308–322.
- (122) Dekker, T.; Ignell, R.; Ghebru, M.; Glinwood, R.; Hopkins, R. *Parasites & Vectors* **2011**, 4, 1–7.
- (123) Adams, R. P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*; 4th ed.; Allured Publishing Corporation: Carol Stream, IL, 2009.
- (124) Van Den Dool, H.; Dec. Kratz, P. *Journal of Chromatography A* **1963**, 11, 463–471.
- (125) Dötterl, S.; Füssel, U.; Jürgens, A.; Aas, G. *Journal of Chemical Ecology* **2005**, 31, 2993–2998.
- (126) Moreira, E. A. *Tribuna Farmacêutica* **1979**, 47, 1–19.
- (127) Lock de Ugaz, O. *Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales*; Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú: Lima, 1988; pp. 1–7.
- (128) Matos, F. J. A. *Introdução a fitoquímica experimental*; 2nd ed.; Edições UFC: Fortaleza, 1997.
- (129) FIOCRUZ *Manutenção de Aedes aegypti em laboratório*; Rio de Janeiro, 2007.
- (130) OMS WHO/VBC/81 **1981**, 807, 1–6.
- (131) Finney, D. J. *Probit Analysis*; 3rd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1971.
- (132) Zoghbi, M. D. G. B.; Andrade, E. H. A. *Journal Of Essential Oil Research* **2005**, 17, 209–211.
- (133) Chida, M.; Yamashita, K.; Izumiya, Y.; Watanabe, K.; Tamura, H. *Journal of Food Science* **2006**, 71, S54–S58.

- (134) Choi, H.-S. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, 52, 8099–8104.
- (135) Maia, J. G. S.; Zoghbi, M. G. B.; Andrade, E. H. A. *Plantas Aromáticas na Amazônia e Seus Óleos Essenciais*; Museu Paraense Emílio Goeldi: Belém, 2001.
- (136) Andrade, E. H. A.; Zoghbi, M. D. B.; Maia, J. G. S.; Fabricius, H.; Marx, F. *Journal of Food Composition and Analysis* **2001**, 14, 227–232.
- (137) Zoghbi, M. G. B.; Andrade, E. H. A.; Maia, J. G. S. *Aroma de flores na Amazônia*; Museu Paraense Emílio Goeldi: Belém, 2001.
- (138) Maia, J. G. S.; Andrade, E. H. A. *Química Nova* **2009**, 32, 595–622.
- (139) Matsuo, A. L.; Figueiredo, C. R.; Arruda, D. C.; Pereira, F. V.; Scutti, J. A. B.; Massaoka, M. H.; Travassos, L. R.; Sartorelli, P.; Lago, J. H. G. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2011**, 411, 449–454.
- (140) Orhan, I.; Küpeli, E.; Aslan, M.; Kartal, M.; Yesilada, E. *Journal of Ethnopharmacology* **2006**, 105, 235–240.
- (141) Jiang, Y.; Wu, N.; Fu, Y.-J.; Wang, W.; Luo, M.; Zhao, C.-J.; Zu, Y.-G.; Liu, X.-L. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **2011**, 32, 63–68.
- (142) Wang, W.; Wu, N.; Zu, Y. G.; Fu, Y. J. *Food Chemistry* **2008**, 108, 1019–1022.
- (143) Sadraei, H.; Asghari, G. R.; Hajhashemi, V.; Kolagar, A.; Ebrahimi, M. *Phytomedicine* **2001**, 8, 370–376.
- (144) Navarro, M. C.; Noguera, M. A.; Romero, M. C.; Montilla, M. P.; De Selgas, J. M. G.; Valero, A. *Experimental Parasitology* **2008**, 120, 295–299.
- (145) Guzmán-Gutiérrez, S. L.; Gómez-Cansino, R.; García-Zebadúa, J. C.; Jiménez-Pérez, N. C.; Reyes-Chilpa, R. *Journal of Ethnopharmacology* **2012**, 143, 673–679.
- (146) Belletti, N.; Kamdem, S. S.; Tabanelli, G.; Lanciotti, R.; Gardini, F. *International Journal of Food Microbiology* **2010**, 136, 283–289.
- (147) Matasyoh, J. C.; Maiyo, Z. C.; Ngure, R. M.; Chepkorir, R. *Food Chemistry* **2009**, 113, 526–529.
- (148) Fernando, W. G. D.; Ramarathnam, R.; Krishnamoorthy, A. S.; Savchuk, S. C. *Soil Biology and Biochemistry* **2005**, 37, 955–964.
- (149) Gu, Y.-Q.; Mo, M.-H.; Zhou, J.-P.; Zou, C.-S.; Zhang, K.-Q. *Soil Biology and Biochemistry* **2007**, 39, 2567–2575.
- (150) Ghaninia, M.; Larsson, M.; Hansson, B. S.; Ignell, R. *The Journal of experimental biology* **2008**, 211, 3020–7.

- (151) Arctander, S. *Perfume and flavor compounds Vol. I, II.*; Det Hoffensbergske: Montclair, NJ, 1969.
- (152) Melliou, E.; Stratis, E.; Chinou, I. *Food Chemistry* **2007**, *103*, 375–380.
- (153) Jong, S. C.; Birmingham, J. M. In *Mushroom biology and mushroom production*; Chinese University Press: Pekin, 1993.
- (154) Santos, P. M.; Figueiredo, A. C.; Oliveira, M. M.; Barroso, J.; Pedro, L. G.; Deans, S. G.; Younus, A. K. M.; Scheffer, J. J. C. *Phytochemistry* **1998**, *48*, 455–460.
- (155) Radusiene, J.; Budzientiene, A.; Bemotiene, G. *Biochemical Systematics and Ecology* **2005**, *33*, 113–124.
- (156) Miguel, G.; Simões, M.; Figueiredo, A. C.; Barroso, J. G.; Pedro, L. G.; Carvalho, L. *Food Chemistry* **2004**, *86*, 183–188.
- (157) Sinniah, B. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **1983**, *77*, 35–38.
- (158) FAO *Compendium of Food Additive Specifications*; Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2007.
- (159) Bjostad, L.; Gaston, L.; Noble, L.; Moyer, J. H.; Shorey, H. H. *Journal of Chemical Ecology* **1980**, *6*, 727–734.
- (160) Baker, T. C.; Roelofs, W. L. *Journal of Insect Physiology* **1976**, *22*, 1357–1364.
- (161) Cakir, A.; Kordali, S.; Kilic, H.; Kaya, E. *Biochemical Systematics and Ecology* **2005**, *33*, 245–256.
- (162) Bussell, B. M.; Considine, J. A.; Spadek, Z. E. *Annals of Botany* **1995**, *76*, 457–463.
- (163) Kubo, I.; Muroi, H.; Masaki, H.; Kubo, A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1993**, *3*, 1305–1308.
- (164) Carvalho, A. F. U.; Melo, V. M. M.; Craveiro, A. A.; Machado, M. I. L.; Bantim, M. B.; Rabelo, E. F. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2003**, *98*, 569–571.
- (165) Williams, C. A.; Harborne, J. B. *Biochemical Systematics and Ecology* **1977**, *5*, 221–229.
- (166) Miean, K. H.; Mohamed, S. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49*, 3106–3112.
- (167) Muthu, C.; Daniel Reegan, A.; Kingsley, S.; Ignacimuthu, S. *Parasitology Research* **2012**, *111*, 1059–1065.

- (168) Nirma, C.; Rodrigues, A. M.; Basset, C.; Chevolot, L.; Girod, R.; Moretti, C.; Stien, D.; Dusfour, I.; Eparvier, V. *Natural Product Communications* **2012**, *7*, 1319–1322.
- (169) Rajkumar, S.; Jebanesan, A. *Parasitology Research* **2008**, *104*, 19–25.
- (170) Vasconcelos, J. N. e; Lima, J. Q.; Lemos, T. L. G. de; Oliveira, M. da C. F. de; Almeida, M. M. B.; Andrade-Neto, M.; Mafezoli, J.; Arriaga, A. M. C.; Santiago, G. M. P.; Braz-Filho, R. *Química Nova* **2009**, *32*, 382–386.
- (171) Yenesew, A.; Twinomuhwezi, H.; Kabaru, J. M.; Akala, H. M.; Kiremire, B. T.; Heydenreich, M.; Peter, M. G.; Eyase, F. I.; Waters, N. C.; Walsh, D. C. *East African Medical Journal* **2009**, *23*, 409–414.
- (172) Kramer, V. C.; Schnell, D. J.; Nickerson, K. W. *Journal of Invertebrate Pathology* **1983**, *42*, 285–287.
- (173) Cheng, S.-S.; Chang, H.-T.; Chang, S.-T.; Tsai, K.-H.; Chen, W.-J. *Bioresource Technology* **2003**, *89*, 99–102.
- (174) Aiub, C. A.; Coelho, E. C.; Sodré, E.; Pinto, L. F.; Felzenszwalb, I. *Genetics and Molecular Research* **2002**, *1*, 159–166.
- (175) Baruah, K. *The Journal of communicable diseases* **2004**, *36*, 100–104.
- (176) Phonchevin T, Upatham ES, Phanthumachinda B, Prasittisuk C, S. N. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **1985**, *16*, 240–247.
- (177) Santos, S. R. L.; Melo, M. A.; Cardoso, A. V.; Santos, R. L. C.; De Sousa, D. P.; Cavalcanti, S. C. H. *Chemosphere* **2011**, *84*, 150–153.
- (178) IPCS SIDS INITIAL ASSESSMENT PROFILE - Dodecanol
<http://www.inchem.org/documents/sids/sids/112538.pdf> (accessed Jul 28, 2012).
- (179) FDA FOOD ADDITIVES PERMITTED FOR DIRECT ADDITION TO FOOD FOR HUMAN CONSUMPTION
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?FR=172.515>.
- (180) Waliwitiya, R.; Kennedy, C. J.; Lowenberger, C. A. *Pest management science* **2009**, *65*, 241–8.
- (181) Tawatsin A, Asavadachanukorn P, Thavara U, Wongsinkongman P, Bansidhi J, Boonruad T, Chavalittumrong P, Soonthornchareonnon N, Komalamisra N, M. M. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **2006**, *37*, 915–931.
- (182) Trongtokit, Y.; Rongsriyam, Y.; Komalamisra, N.; Apiwathnasorn, C. *Phytotherapy research : PTR* **2005**, *19*, 303–9.

- (183) De Paula, J. P.; Gomes-Carneiro, M. R.; Paumgartten, F. J. R. *Journal of Ethnopharmacology* **2003**, *88*, 253–260.
- (184) Sant’Ana, A. L. Avaliação, extração, identificação e estudos eletrofisiológicos dos voláteis presentes em infusões de *Panicum maximum* que estimulam e/ou atraem fêmeas de *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) para oviposição, Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.
- (185) Campbell, C. J. Analyses of essential and edible oils, and constituents therein, as candidate repellents for the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae), Simon Fraser University, 2009.
- (186) Roque, R. A. Avaliação de atraentes de oviposição, identificados em infusões de capim colônia (*Panicum maximum*) para fêmeas de *Aedes aegypti* (L. 1762) (Diptera: Culicidae) em condições de semicampo e campo, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.