



**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Departamento de Química Fundamental
Programa de Pós-Graduação em Química**

Marcelo Felipe Rodrigues da Silva

**Caracterização de aleloquímicos envolvidos nas interações
interespecíficas entre plantas e duas espécies de diptera: *Beebeomyia
taccarivora* Wendt & Maia sp. nov. e *Aedes aegypti* Linnaeus**

Recife
2018

Marcelo Felipe Rodrigues da Silva

Caracterização de aleloquímicos envolvidos nas interações interespecíficas entre plantas e duas espécies de diptera: *Beebeomyia taccarivora* Wendt & Maia sp. nov. e *Aedes aegypti* Linnaeus

Tese de doutorado apresentada como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Química pelo Programa de Pós-Graduação em Química da UFPE.

Orientadora: Prof^a Dr^a Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro

Co-Orientador: Dr^o Artur Campos Dália Maia

Recife
2018

Catálogo na fonte
Bibliotecária Elaine Cristina de Freitas CRB4-1790

S586c Silva, Marcelo Felipe Rodrigues da
Caracterização de aleloquímicos envolvidos nas interações interespecíficas entre plantas e duas espécies de díptera: *Beebeomyia taccarivora* Wendt & Maia sp. nov. e *Aedes aegypti* Linnaeus / Marcelo Felipe Rodrigues da Silva . – 2018.
112 f.

Orientadora: Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química Fundamental. Recife, 2018.
Inclui referências e apêndice.

1. Ecologia Química 2. Espectrometria de massas 3. Eavesdropping I. Navarro, Daniela Maria do Amaral Ferraz. (Orientadora). II. Título.

577.14

CDD (22. ed.)

UFPE-FQ 2018-21

MARCELO FELIPE RODRIGUES DA SILVA

Caracterização de aleloquímicos envolvidos nas interações interespecíficas entre plantas e duas espécies de diptera: *Beebeomyia taccarivora* Wendt & Maia sp. nov. e *Aedes aegypti* Linnaeus

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química.

Aprovado em: 15/01/2018

BANCA EXAMINADORA

Profa. Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro
(Orientadora)
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Wendel José Teles Pontes
Departamento de Zoologia
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Ruth Rufino do Nascimento
Instituto de Química e Biotecnologia
Universidade Federal de Alagoas

Prof. Ricardo Oliveira da Silva
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Geanne Karla Novais Santos
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

A todos que contribuíram direta e indiretamente
para o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Os meus agradecimentos não caberiam em poucas páginas, pois existem muitas pessoas a quem agradecer. Dizer a estas pessoas pelo menos um ponto no qual sou grato, levaria todas as páginas do trabalho. No entanto, alguns merecem serem citados, de forma especial, uma vez que participaram ativamente no desenvolvimento desta pesquisa e que ainda vão me ajudar a terminá-la.

Queria agradecer à minha orientadora Prof^ª Dr^ª Daniela Navarro por todo apoio e dedicação no desenvolvimento desta tese. Por ter confiado em mim, mesmo em momentos tão difíceis pelos quais passei antes de me tornar seu orientando. Meus mais sinceros agradecimentos.

À minha família, meu Pai, mãe e irmã por terem me incentivado sempre a continuar. À minha família que está hoje sempre comigo: Minha esposa Priscylla e meu filho Miguel que deram todo amor e carinho. Que todo esse amor foi convertido em vontade de viver e sempre fazer o que mais gosto, que é o estudo e a pesquisa.

Meus mais sinceros agradecimentos a Artur Maia pela Co-Orientação, sempre ajudando e me ensinando a se aventurar durante nossas pesquisas.

À todos do Laboratório de Ecologia Química (LEQ) – que desde a minha qualificação a lista cresceu bastante, mas que fique meu voto de agradecimento a todos.

Em fim, aos órgãos de fomento Capes, CNPq, Facepe e Pronex pelo apoio financeiro. À UFPE pelo espaço cedido.

Todo este documento foi produzido por software livre.
Seja livre! Use linux!

RESUMO

O estudo dos compostos químicos como mediadores na comunicação entre os seres é denominado de Ecologia Química. Na seção 1 foi estudada a relação química entre *Beebeomyia taccarivora* Wendt & Maia **sp. nov.** (Diptera; Richardiidae) e os compostos voláteis do perfume floral de *Taccarum ulei* Engl. & K. Krause e *Gearum brasiliense* N. E. Brown (Araceae: Tribo Spathicarpeae). Com o objetivo de investigar a hipótese de que um canal químico levaria o florívoro às plantas hospedeiras, testes eletrofisiológicos e comportamentais foram realizados. (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona e diidro- β -ionona, componentes majoritários do perfume floral de *T. ulei*, foram observados em inflorescências em diferentes proporções/estágios de maturação e se mostraram ativos nos testes eletrofisiológicos. Nos testes comportamentais em laboratório para ambos os sexos de *B. taccarivora* ($0,27 \leq p \leq 1$, Teste de Fisher) o headspace de inflorescências antéticas ($p < 0,001$) e a diidro- β -ionona ($p = 0,0082$) foram significativamente mais atrativos que o controle (Testes Binominais Exatos). Desta forma foi confirmado que *B. taccarivora* utilizava o perfume floral para encontrar seu sítio de oviposição. A composição do perfume floral de *G. brasiliense*, inédita até então, (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (43,34%) e (Z)-jasmona (42,08%) foram identificados como os majoritários, seguidos de salicinato de metila (5,46%), veratrol (3,54%), (E)-nerolidol (2,49%), Metil-2-metoxibenzoato (1,04%) e metil benzoato (0,54%). Testes eletrofisiológicos foram realizados com headspace do perfume do buquê, onde praticamente vários dos compostos majoritários foram ativos. Com isso têm-se um bom indicativo que *B. taccarivora* pode utilizar também do perfume floral de *G. brasiliense* para localizar suas inflorescências. Na seção 2 foi estudada a composição e atividades biológicas do óleo essencial de *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (Piperaceae), diante do mosquito transmissor da Dengue, o *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). O óleo essencial de folhas frescas de *P. corcovadensis* foi obtido por hidrodestilação num aparelho do tipo Clevenger em rendimento de 0,21% (m/m). Os componentes foram identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, levando a 31 compostos que representam 96,61% do óleo essencial. Os principais constituintes do óleo foram 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno (30,62%), terpinoleno (17,44%), *trans*-cariofileno (6,27%), α -pineno (5,92%), δ -cadineno (4,92%) e Limoneno (4,46%). O 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno foi isolado por cromatografia em camada fina e identificado por ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio e carbono. Os bioensaios contra as larvas do *A. aegypti* revelaram que o óleo essencial ($CL_{50} = 30,52$ ppm), o terpinoleno ($CL_{50} = 31,16$ ppm) e o 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno isolado ($CL_{50} = 22,1$ ppm) possuíam atividades larvicidas. Além disso, o óleo essencial exibiu uma forte atividade deterrente de oviposição a 50 e 5 ppm.

Palavras-chaves: Ecologia Química. Espectrometria de massas. Eavesdropping.

ABSTRACT

The study of chemical compounds as mediators in the communication between beings and denominated of Chemical Ecology. In section 1 was studied the chemical relationship between *Beebeomyia taccarivora* Wendt & Maia sp. n. (Diptera; Richardiidae) and the volatile floral scent compounds of *Taccarum ulei* Engl. & K. Krause and *Gearum brasiliense* N. E. Brown (Araceae: Tribe Spathicarpeae). With the objective of investigating the hypothesis that a chemical channel would take the florivorous to the host plants, electrophysiological and behavioral tests were performed. (S)-2-OH-5-Me-3-hexanone and dihydro- β -ionone, major components of *T. ulei* floral scent, were observed in inflorescences at different ratios / maturation stages and were active in electrophysiological tests. In laboratory behavioral tests for both sexes of *B. taccarivora* ($0.27 \leq p \leq 1$, Fisher's test) the headspace of anthetic inflorescences ($p < 0.001$) and dihydro- β -ionone ($p = 0.0082$) were significantly more attractive than the control (exact binomial tests). In this way it was confirmed that *B. taccarivora* used the floral perfume to find its oviposition site. The composition of the floral perfume of *G. brasiliense*, previously unpublished, (*E*)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene (43.34%) and (*Z*)-jasmone (42.08%) were identified as the major components, followed by methyl salicylate (5.46%), veratole (3.54%), (*E*)-nedolidol (2.49%), Methyl-2-methoxybenzoate (1.04%), and methyl benzoate (0.54%). Electrophysiological tests were performed with headspace of the bouquet perfume, where several of the major compounds were active. With this we have a good indication that *B. taccarivora* can also use the floral perfume of *G. brasiliense* to locate its inflorescences. In section 2 the composition and biological activities of the essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (Piperaceae) were studied, in front of the mosquito transmitting Dengue, *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). The essential oil of fresh leaves of *P. corcovadensis* was obtained by hydrodistillation in a Clevenger type apparatus in yield of 0.21% (w/w). The components were identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), leading to 31 compounds representing 96.61% of the essential oil. The main constituents were 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene (30.62%), terpinolene (17.44%), trans-caryophyllene (6.27%), α -pinene (5.92%), δ -cadinene (4.92%) and Limonene (4.46%). 1-Butyl-3,4-methylenedioxybenzene was isolated by thin layer chromatography and identified by hydrogen and carbon nuclear magnetic resonance (NMR). Bioassays against *A. aegypti* larvae revealed that essential oil ($LC_{50} = 30.52$ ppm), terpinolene ($LC_{50} = 31.16$ ppm) and isolated 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene ($LC_{50} = 22, 1$ ppm) had strong larvicidal activities. In addition, the essential oil exhibited strong oviposition activity at 50 and 5 ppm.

Key words: Chemical ecology. Mass spectrometry. Eavesdropping.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Esquema genérico de antena aristada. Fonte: Adaptada de (HANSSON, 1999). Microscopias da antena de *Drosophila melanogaster* mutante do tipo *lozenge*. Adaptada de (RIESGO-ESCOVAR; PIEKOS; CARLSON, 1997).....21
- Figura 2: A) Corte lateral de uma sensila do macho da mariposa lua *Actias luna* (Lepidoptera; Saturniidae). B) Esquema simplificado do ciclo bioquímico de transporte do odorante ao neurônio receptor (PLO= Proteína Ligante de Odor). Fonte: A) Foto de M.M. Cordts em (HANSSON; STENSMYR, 2011), B) Adaptada de (MASIGA et al., 2014).....22
- Figura 3: Ilustração de um resposta eletrofisiológica diante de um composto ativo. Fonte: Os autores do presente trabalho..... 24
- Figura 4: CG-DEA de *Euzophera batangensis* diante do feromônio sexual feminino. Fonte: Adaptada de (KALINOVÁ et al., 2006).....25
- Figura 5: A) Ilustração da proporcionalidade entre a despolarização da antena e a dose de analito testada. B) Efeito da saturação e da adaptação/fadiga da antena. Fonte: A) adaptada de (THOMAZINI, 2009) e B) adaptada de (HENZELL, 1974).....26
- Figura 6: *Taccarum ulei*, A) Planta completa, B) Inflorescência e C) *Beebeomyia taccarivora*. Fonte: A), B) Os autores do presente trabalho, C)(MAIA et al., 2013a).....28
- Figura 7: A) Inflorescência de *Gearum brasiliense* N. E. Brown (Tribo Spathicarpeae), B) macho e C) fêmea de mosca Richardiidae encontradas nas inflorescências. Fonte: Foto de A) (HETTERSCHEID, 2002), B) e C) (BOGNER; GONÇALVES, 1999).....29
- Figura 8: A) Gaiola para eclosão das pupas e manutenção das moscas; B) Larvas e pupas de *B. taccarivora* em inflorescência de *T. ulei*; C) Inflorescências de *T. ulei* na bandeja para armazenamento na gaiola. Fonte: Os autores do presente trabalho.....33
- Figura 9: Montagem para extração de voláteis por headspace (sem o branco). Fonte: Os autores do presente trabalho..... 35
- Figura 10: Montagem das antenas de *Beebeomyia taccarivora* nos ensaios de eletrofisiologia. Fonte: Os autores do presente trabalho.....38
- Figura 11: Aparato para os ensaios de dupla escolha (olfatômetro em "Y"). Fonte: Os autores do presente trabalho..... 40
- Figura 12: Compostos majoritários do perfume floral de inflorescências termogênicas de *Taccarum ulei*. A) (S)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona; B) diidro-β-ionona. Fonte: Os autores do presente trabalho.....42
- Figura 13: Curvas de calibração de A) (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona e B) diidro-β-ionona. Fonte: Os autores do presente trabalho.....43
- Figura 14: Cromatograma de *T. ulei* com destaque na sobreposição de picos entre A) (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona e B) 3-OH-5-Me-2-hexanona. Fonte: Os autores do presente trabalho.44
- Figura 15: Variação na quantidade (capturada) e proporção dos majoritários (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona e diidro-β-ionona no decorrer da antese. Fonte: Os autores do presente trabalho..... 46
- Figura 16: Variação da contribuição (percentagem em área relativa – CG-EM) dos compostos majoritários do perfume floral no decorrer da antese (valores médios de 4 indivíduos). Fonte: os autores do presente trabalho.....47
- Figura 17: Cromatograma (CG-EM) de um *headspace* de inflorescências imaturas de *Taccarum ulei*..... 48

Figura 18: Ângulos de montagem testados. A) instável; B) estável. Fonte: Os autores do presente trabalho.....	50
Figura 19: A) Montagem da antena de <i>B. taccarivora</i> nos capilares; B) CG-DEA com 1ª resposta eletrofisiológica de <i>B. taccarivora</i> diante do perfume de <i>T. ulei</i> (↑=respostas). # = 2,3-heptanediona. Fonte: Os autores do presente trabalho.....	51
Figura 20: CG-DEA de <i>B. taccarivora</i> frente ao <i>headspace</i> de <i>T. ulei</i> – split 1:30 (↑=respostas). Fonte: Os autores do presente trabalho.....	52
Figura 21: Sobreposição de vários ensaios de CG-DEA de <i>B. taccarivora</i> (Richardiidae) diante de (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona em <i>split</i> 1:30. * = 3-OH-5-Me-2-hexanona. Fonte: Os autores do presente trabalho.....	53
Figura 22: CG-DEA de <i>B. taccarivora</i> diante do <i>headspace</i> de <i>T. ulei</i> – split 1:70.(↑=respostas). Fonte: Os autores do presente trabalho.....	53
Figura 23: Ovos de <i>B. taccarivora</i> numa inflorescência imatura de <i>T. ulei</i> . Fonte: Os autores do presente trabalho.....	55
Figura 24: CG-DEA de <i>B. taccarivora</i> diante do <i>headspace</i> de inflorescências imaturas de <i>T. ulei</i> . Fonte: Os autores do presente trabalho.....	56
Figura 25: Resultados do ensaios comportamentais de <i>B. taccarivora</i> diante do perfume floral e compostos isolados do perfume de inflorescências de <i>T. ulei</i> . N=número de observações que resultaram numa escolha. Os valores entre parênteses indicam o número de indivíduos que não apresentaram uma resposta clara nos testes (n.a.). Fonte: Os autores do presente trabalho.....	58
Figura 26: CG-DEA de <i>B. taccarivora</i> (Richardiidae) <i>população 2</i> com <i>headspace</i> contendo o perfume floral inflorescências antéticas de <i>Gearum brasiliense</i> . (↑=respostas, *=artefato ou repostas não reprodutíveis). Fonte: Os autores do presente trabalho....	62
Figura 36: Distribuição gênero <i>Piper</i> . Fonte: Adaptada de (JARAMILLO; MANOS, 2001).....	66
Figura 37: Recipiente utilizado nos ensaios de deterrência. Fonte: Foto de Júlio Aguiar.....	75
Figura 38: A) espectro de massas e B) cromatograma CG-DIC do composto não identificado isolado. Fonte: Os autores do presente trabalho.....	79
Figura 39: Espectro RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do composto não identificado (IR=1402). Fonte: Os autores do presente trabalho.....	80
Figura 40: Ampliação da região de aromáticos - RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃). Fonte: Os autores do presente trabalho.....	82
Figura 41: Ampliação do espectro RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) na região δ 0,4 – 3,0. Fonte: Os autores do presente trabalho.....	83
Figura 42: Possível estrutura do composto (IR=1402). Fonte: Os autores do presente trabalho..	84
Figura 43: Espectro de RMN ¹ H COSY (300 MHz, CDCl ₃). Fonte: Os autores do presente trabalho.....	84
Figura 44: espectro de RMN ¹³ C (75 MHz). Fonte: Os autores do presente trabalho.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos da diversidade estrutural em semioquímicos encontrados em insetos.....	18
Tabela 2: Identificação da composição volátil das inflorescências maduras de <i>T. ullei</i> no momento da antese.....	41
Tabela 3: Respostas dos testes de dupla escolha de <i>B. taccarivora</i> diante do odor floral de <i>T. ullei</i> e seus compostos majoritários isolados.....	57
Tabela 4: Identificação do <i>headspace</i> contendo o perfume floral de <i>Geurum brasiliense</i>	60
Tabela 5: Alguns exemplos de compostos isolados de espécies de <i>Piper</i> e suas respectivas atividades biológicas.....	67
Tabela 6: Identificação da composição volátil do óleo essencial das folhas de <i>Piper corcovadensis</i> (Miq.) C. DC.....	76
Tabela 7: Ocorrência do grupo <i>metilenodioxibenzeno</i> em compostos isolados de espécies do gênero <i>Piper</i>	81
Tabela 8: Atividade larvicida diante de larvas de <i>Aedes aegypti</i> (L4) dos extratos e óleo essencial obtidos por hidrodestilação das folhas de <i>P. corcovadensis</i> (Miq.) C. DC e dos compostos majoritários do óleo essencial terpinoleno e BMDB. ^a = média ± desvio padrão (N=4) da CL ₅₀ ; ^b = percentagem (v/v) da concentração de extrato aquoso.....	87
Tabela 9: Ensaios de atividade deterrente de oviposição.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

CG-DIC: Cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chama

CG-EM: Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

CG-DEA: Cromatografia gasosa acoplada à detecção eletroantegráfica

eV: elétron-volt

OMS: Organização Mundial de Saúde

ppm: partes por milhão

Tween ® 80: Monooleato de Sorbitan Etoxilado 20 EO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Headspace	19
1.2	As antenas dos insetos e as técnicas de Cromatografia Gasosa com Detector Eletroantegráfico (CG-DEA) e Eletroantenografia (EAG)	21
2	ESTUDO ELETROFISIOLÓGICO E COMPORTAMENTAL DO FLORÍVORO DE <i>Taccarum ulei</i> ENGL. & K. KRAUSE E <i>Gearum brasiliense</i> N. E. BROWN (ARACEAE: TRIBO SPATHICARPEAE)	27
2.1	Introdução	27
2.1.1	<i>Taccarum ulei</i> Engl. & K. Krause e <i>Gearum brasiliense</i> N. E. Brown (Araceae:Tribo Spathicarpeae).....	27
2.1.2	Família Richardiidae (Diptera).....	29
2.2	Objetivos	32
2.2.1	Objetivo geral.....	32
2.2.2	Objetivos Específicos.....	32
2.3	Materiais e Métodos	33
2.3.1	Coleta de material e manutenção da colônia.....	33
2.3.2	Coleta dos compostos voláteis.....	34
2.3.3	Identificação e quantificação dos componentes do odor floral de <i>T. ulei</i> e <i>G. brasiliense</i>	35
2.3.4	Ensaio de eletroantenografia acoplada a cromatografia gasosa (CG-DEA) das populações de <i>Beebeomyia taccarivora</i> (Richardiidae).....	37
2.3.4.1	<i>Preparação da solução de Ringer</i>	37
2.3.4.2	<i>Montagem das antenas de Beebeomyia taccarivora</i> (Richardiidae).....	37
2.3.5	Biotestes.....	38
2.3.6	Análises estatísticas.....	40
2.4	Resultados e discussão	41
2.4.1	Headspace das inflorescências termogênicas de <i>T. ulei</i>	41
2.4.2	Acompanhamento da antese floral de <i>T. ulei</i>	45
2.4.3	Análise CG-DEA de <i>B. taccarivora</i> diante do odor floral de <i>T. ulei</i>	49
2.4.4	Análise CG-DEA de <i>B. taccarivora</i> diante do <i>headspace</i> de inflorescências imaturas de <i>T. ulei</i>	54
2.4.5	Biotestes.....	56
2.4.5.1	<i>Ensaio de dupla escolha</i>	56
2.4.6	Headspace das inflorescências de <i>Gearum brasiliense</i>	59
2.4.7	Análise de CG-DEA de <i>B. taccarivora</i> com o perfume do buquê de <i>Gearum brasiliense</i>	61
2.5	Conclusões	64
2.6	Perspectivas	65

3	COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Piper corcovadensis</i> (PIPERACEAE)	66
3.1	Introdução	66
3.1.1	Metabólitos identificados em espécies do gênero <i>Piper</i>	67
3.1.2	Atividades biológicas de <i>Piper</i>	68
3.2	Objetivos	71
3.2.1	Geral.....	71
3.2.2	Específicos.....	71
3.3	Materiais e Métodos	72
3.3.1	Material vegetal.....	72
3.3.2	Obtenção do óleo essencial.....	72
3.3.3	Identificação e quantificação dos componentes do óleo essencial.....	72
3.3.4	Isolamento e caracterização do 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno (BMDB).....	74
3.3.5	Ensaio larvicidas.....	74
3.3.6	Ensaio de oviposição.....	75
3.4	Resultados e discussão	76
3.4.1	Obtenção, identificação e quantificação do óleo essencial.....	76
3.4.2	Isolamento e caracterização do composto não identificado (IR=1402).....	78
3.4.3	Ensaio larvicidas.....	87
3.4.4	Ensaio de oviposição.....	88
3.5	Conclusões	90
4	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	92
	APÊNDICE A – Artigo aceito e publicado como requisito ao doutorado no programa de Pós-Graduação em Química da UFPE	106

1 INTRODUÇÃO

Os seres vivos se valem de vários meios para se comunicarem, como sinais sonoros (gritos, cantos, etc.), visuais e químicos (WALKER, 2009). O estudo dos compostos químicos como mediadores na comunicação entre os seres é denominado de Ecologia Química (TRIGO et al., 2000). Os semioquímicos (*semeon* = sinal, portanto, “sinais químicos”) são os compostos responsáveis pela comunicação química entre os organismos (LAW; REGNIER, 1971; NORDLUND; LEWIS, 1976). Os semioquímicos são divididos em **feromônios** e **aleloquímicos**. Os feromônios são de natureza intraespecífica - indivíduos da mesma espécie utilizam um canal químico para comunicação (KARLSON; LÜSCHER, 1959); e os aleloquímicos são de natureza interespecífica – o canal químico é utilizado entre indivíduos de espécies diferentes (WHITTAKER; FEENY, 1971).

Os feromônios podem ser classificados como de *Agregação* – leva ao aumento de indivíduos na fonte do feromônio; *Alarme* – provocam um “alerta” nos indivíduos, seja para uma fuga ou ataque iminente; *Trilha* – utilizados para marcação do caminho entre uma fonte alimentar e o alojamento do indivíduo/colônia; *Sexual* – indicam o gênero dos indivíduos, além de muitas vezes sua receptividade para reprodução e *Territorial* – como o próprio nome sugere, são utilizados para demarcação territorial (LAW; REGNIER, 1971).

Já os aleloquímicos podem ser classificados em *Alomônios* – em que o emissor é beneficiado, mas não o receptor (NORDLUND; LEWIS, 1976). Na literatura podem ser encontrados vários exemplos, como o das plantas que podem produzir metabólitos secundários capazes de afastar possíveis predadores (ARAGÃO; DANTAS; BENITES, 2002); *Cairomônios* – o receptor é beneficiado, mas não o emissor (NORDLUND; LEWIS, 1976) e *Sinomônios* – tanto emissor quanto receptor são beneficiados (NORDLUND; LEWIS, 1976). É importante notar que um mesmo semioquímico pode se encaixar em diferentes classificações, dependendo dos indivíduos envolvidos, ou seja, o feromônio de determinada espécie pode ser usado como cairomônio por seu predador, ajudando este último na tarefa da localização de sua presa (CHRISTENSEN, 2005).

A natureza química dos agentes utilizados pelos organismos também é relevante. As características físico-químicas dos compostos utilizados na comunicação são

fundamentais, pois estas são determinantes para suas funções no meio ambiente. Por exemplo, como feromônio de alarme não seria útil o emprego de um agente químico de baixo coeficiente de difusão. Espera-se um componente volátil e de rápida dispersão, uma vez que um composto persistente causaria uma situação de stress contínuo, o que leva a danos no organismo receptor. Para um feromônio de trilha ou territorial pode-se esperar um componente menos volátil e mais persistente, já que uma rápida dispersão causaria a perda da “trilha”, logo perdendo a demarcação. Conforme o clima do habitat dos organismos, os compostos utilizados são também afetados; em florestas tropicais – mais quentes – os feromônios de marcação territorial, via de regra, possuem maior massa molecular que feromônios territoriais de organismos em climas temperados ou frios (WYATT, 2003).

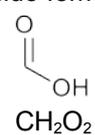
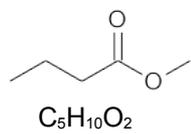
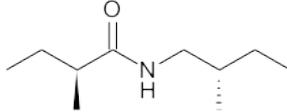
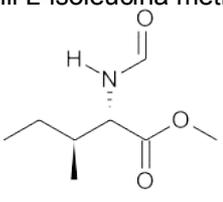
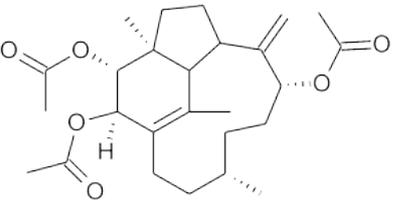
Quanto mais complexa a estrutura do semioquímico, mais específica é a forma na qual pode ser empregada (WYATT, 2003). Também são utilizadas misturas de compostos menos complexos em proporções específicas, o que veremos mais adiante. Feromônios sexuais são, via de regra, moléculas de complexidade considerável, visto que a resposta eletrofisiológica e concomitantemente comportamental é esperada somente nos indivíduos que possuem os receptores adequados. Contudo, a partir do momento em que este caminho é exposto, outros organismos podem ser capazes de detectar o novo “caminho aberto”. Neste momento pode haver *eavesdropping* (“espionagem” ou “ouvir um cochicho”), com vários relatos descritos na literatura (STOWE et al., 1995). Falando-se de insetos e restringindo nossos compostos somente aos voláteis, indivíduos com receptores mais “genéricos”, ou seja, insetos generalistas, são capazes de detectar uma gama de compostos considerável.

A diversidade e complexidade estrutural dos semioquímicos em insetos é bastante expressiva, com muitos compostos conhecidos. Observa-se desde compostos com 1 átomo de carbono como o ácido fórmico ou mesmo 26 átomos de carbono como Trinervita-1(15),8(19)-dien-2 β ,3 α -9-triol-2,3,9-O-triacetato (Tabela 1), atentando-se também para a quantidade de espécies que fazem o uso dessas substâncias, ou seja, quanto maior a complexidade do componente, via de regra, mais restrito é o número de espécies capazes de produzi-las/detectá-las.

Para um caso de um indivíduo, como por exemplo uma fêmea receptiva, que libera um feromônio sexual no ambiente para atração do macho, outros organismos podem ser capazes de detectar o componente exalado. Porém processar que este é um canal

destinado à cópula daquela espécie será algo que somente um indivíduo daquela espécie e gênero oposto será capaz de assim reconhecê-lo.

Tabela 1: Exemplos da diversidade estrutural em semioquímicos encontrados em insetos.

Nome do composto/fórmula molecular	Função do semioquímico	Referências
<p>Ácido fórmico</p>  <p>CH₂O₂</p>	<p>Feromônio de alarme, alomônio. Utilizado por centenas de espécies.</p>	(1)
<p>Metil butirato</p>  <p>C₅H₁₀O₂</p>	<p>Feromônio de agregação de <i>Colopterus truncatus</i> Randall (Coleoptera: Nitidulidae); Cairomônio de <i>Exorista bombycis</i> Louis (Diptera: Tachinidae); ; Feromônio de alarme de formigas da subfamília Ponerinae;</p>	(2) (3) (4)
<p><i>N</i>-(2'<i>S</i>)-metilbutanoil(2<i>S</i>)-metilbutilamina (A) - C₁₀H₂₁NO</p> 	<p>Feromônio sexual do besouro cerambicídeo <i>Migdolus fryanus</i> Westwood (Coleoptera: Cerambycidae)</p>	(5)
<p><i>N</i>-formil L-isoleucina metil éster (B)</p>  <p>C₈H₁₅NO₃</p>		
<p>Trinervita-1(15),8(19)-dien-2β,3α-9-triol-2,3,9-<i>O</i>-triacetato</p>  <p>C₂₆H₃₈O₆</p>	<p>Secreção de defesa (alomônio) de <i>Bulbitermes germanus</i> Haviland (Isoptera: Termitidae)</p>	(6)

Fonte: 1) (PHEROBASE, 2015); 2) (COSSÉ; BARTELT, 2000); 3) (DESHPANDE; JAMIL, 1997); 4) (MORGAN et al., 2003); 5) (BERGMANN; GONZÁLEZ; ZARBIN, 2009; LEAL et al., 1994); 6) (CHUAH, 2005).

A estereoquímica é um fator de suma importância na identificação de semioquímicos, uma vez que misturas racêmicas são, via de regra, biologicamente inativas ou pouco ativas em ensaios eletrofisiológicos e/ou comportamentais (MORI, 2007). Como pode ser visto na Tabela 1 os semioquímicos mais complexos e quirais costumam apresentar atividade biológica mais restrita que os compostos sem qualquer centro estereogênico.

Um dado que também deve ser levado em consideração é o custo energético associado à produção do semioquímico. Geralmente é necessária uma considerável parcela de recursos para manutenção do canal, em contrapartida o benefício são as melhores chances de sucesso reprodutivo. Por exemplo, inflorescências de *Philodendron aff. selloum* (Araceae) são visitadas por besouros durante o período de reprodução onde altas taxas de voláteis florais são emitidas (GOTTSBERGER; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, 1991), porém esta emissão declina após a polinização, o que sugere um custo associado à emissão de perfume.

A busca por semioquímicos teve um grande avanço junto com as técnicas de purificação e análise de compostos em amostras complexas (THOMAZINI, 2009). Para o caso dos insetos, a maioria dos compostos produzidos são moléculas de baixo peso molecular. Desta forma, o ar torna-se o principal meio para levar o sinal químico da origem ao seu alvo.(THOMAZINI, 2009)

Com essas informações em mãos, podemos citar algumas técnicas que auxiliaram e ainda hoje são bastante utilizadas na identificação e busca por compostos bioativos presentes em fase gasosa, entre elas o *headspace* e a eletrofisiologia.

1.1 Headspace

Inicialmente empregada para determinar o teor alcoólico do sangue na década de 60, a técnica *headspace* é utilizada na determinação da composição volátil de materiais

diversos (ROUSEFF; CADWALLADER, 2001). Com a vantagem de não utilizar solventes na extração de componentes de uma amostra, a técnica é muito útil para análise de componentes voláteis em indústrias de alimentos (frutas, carnes, bebidas, etc.) e de grande utilidade em pesquisas relacionadas à composição volátil de aromas florais. Sem o uso de solventes (quando necessário, utiliza-se quantidades ínfimas) como nas técnicas de extração convencionais, o *headspace* elimina assim componentes não-voláteis, impurezas do eluente, além de ser uma técnica não-destrutiva (ROUSEFF; CADWALLADER, 2001). Um exemplo a ser mencionado é a utilização da técnica de *headspace* para determinação da composição volátil de mangas Tommy Atkins e observar voláteis envolvidos num processo de maturação da fruta em dois processos de conservação (SANTOS, 2014).

O *headspace* utiliza um adsorvente que “captura” os compostos voláteis que são forçados a passarem por estas. Os adsorventes possuem diferentes características físico-químicas, ou seja, dependendo do material utilizado na produção dessa matriz pode-se direcionar para qual a melhor relação de adsorção, dependendo da natureza química dos compostos adsorvidos. As matrizes mais utilizadas são o Tenax™ TA e o Carboxen™ X. Geralmente a mistura destes adsorventes se complementa, pois possui a capacidade para adsorver compostos apolares e polares (SCHIESTL; MARION-POLL, 2002; WYATT, 2003).

Existem duas formas de análise por *headspace*: estático e dinâmico. O *headspace* estático baseia-se na captura dos componentes voláteis logo acima de uma amostra, com volume de gás definido. Como os compostos dispersos num volume de gás é bastante reduzido (são usados recipientes pequenos), geralmente há problemas na detecção de compostos minoritários. Já no *headspace* dinâmico, um fluxo de gás é canalizado entre a amostra e a matriz adsorvente, o que aumenta as chances de captura dos componentes voláteis pela matriz (ROUSEFF; CADWALLADER, 2001).

Juntamente com a cromatografia gasosa, a técnica de *headspace* ganhou espaço entre os laboratórios de pesquisa, facilitando a identificação de compostos voláteis em

matrizes complexas, o que seria mais difícil se não impossível utilizando-se as técnicas de extração convencionais.

1.2 As antenas dos insetos e as técnicas de Cromatografia Gasosa com Detector Eletroantegráfico (CG-DEA) e Eletroantenografia (EAG)

As antenas dos insetos são o principal órgão para detecção de sinais olfativos (HANSSON, 1999). Existem várias formas de antenas, porém direcionaremos o foco para as antenas aristadas. Essas antenas são compostas essencialmente por quatro partes: escapo, pedicelo, arista e flagerômero (Figura 1).

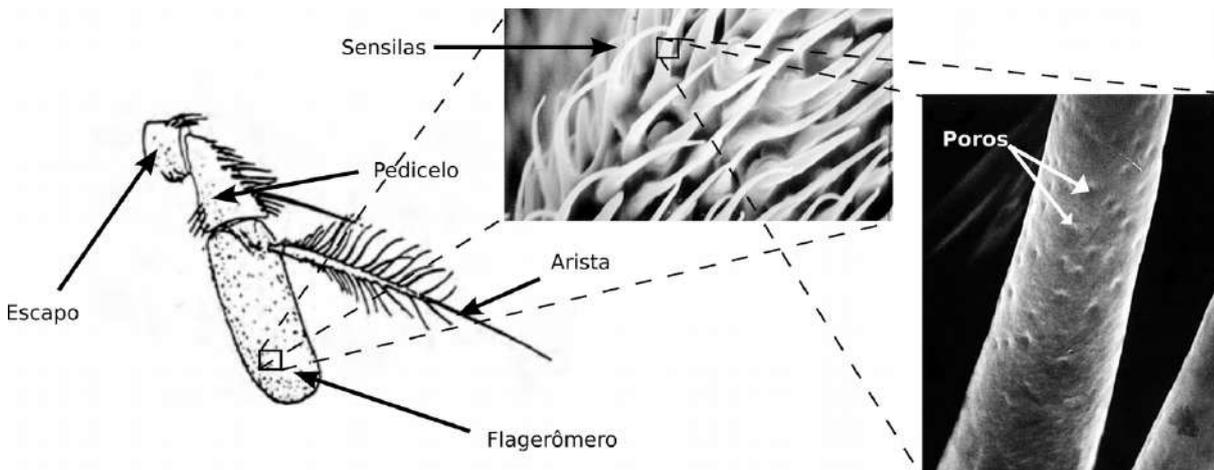


Figura 1: Esquema genérico de antena aristada. Fonte: Adaptada de (HANSSON, 1999). Microscópias da antena de *Drosophila melanogaster* mutante do tipo *lozenge*. Adaptada de (RIESGO-ESCOVAR; PIEKOS; CARLSON, 1997).

No flagerômero são encontradas as sensilas, estruturas responsáveis pelo olfato. Nelas ocorre o processo de detecção de odores do ambiente, através de um processo de ativação de proteínas ligantes de odores *PLO* (ou *OBP* - *odorant binding proteins*), que levam o odorante até os neurônios receptores olfatórios (ORNs – *olfactory receptor neurons*) seguida da degradação do odorante ao final do processo (HANSSON, 1999). Para que a antena seja capaz de detectar odores específicos, essas proteínas são altamente especializadas, sendo capazes de se ligar ao odorante de interesse mesmo

dentre tantos outros compostos no ambiente. O processo detalhado de ligação do odorante à proteína é complexo, no entanto um esquema simplificado pode ser observado na Figura 2.

Não seria interessante que determinado odorante continuasse ligado a proteína durante muito tempo, pois, como o inseto perceberia que o sinal foi perdido (em poucos milissegundos) e que ele precisa mudar sua rota para encontrar novamente o caminho até seu alvo (WYATT, 2003)? Para isso, existem enzimas específicas que liberam novamente a proteína ligante de odores para que esta volte novamente a levar a informação para ser transmitida pelo neurônio sensorial, degradando o odorante no processo (HANSSON, 1999). Este processo de degradação deve ser o mais rápido possível, uma vez que, como já mencionado, em poucos milissegundos um novo ciclo de detecção do caminho químico se inicia para possibilitar que o indivíduo alcance seu alvo com maiores chances de sucesso.

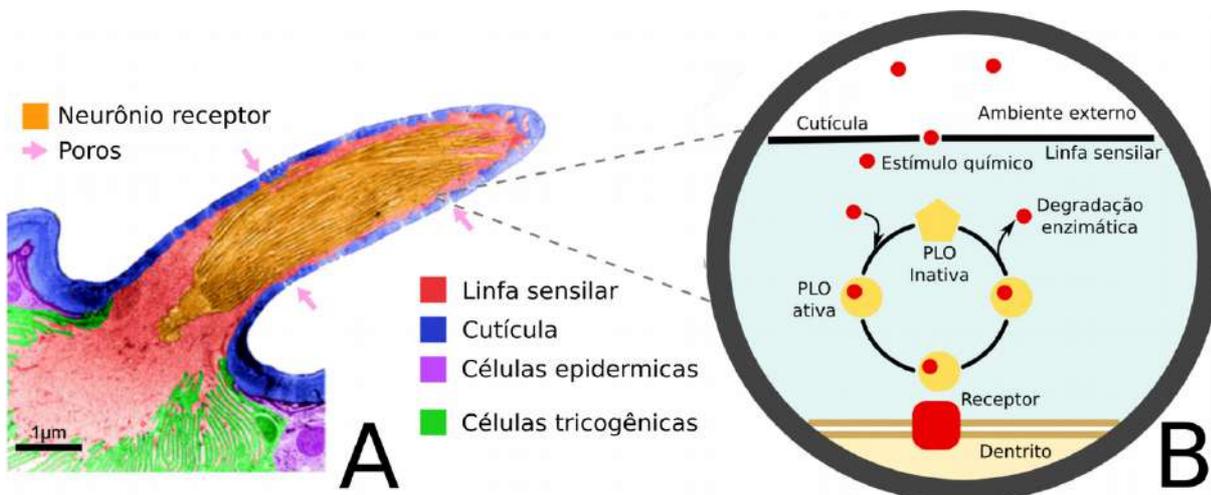


Figura 2: A) Corte lateral de uma sensila do macho da mariposa lua *Actias luna* (Lepidoptera; Saturniidae). B) Esquema simplificado do ciclo bioquímico de transporte do odorante ao neurônio receptor (PLO= Proteína Ligante de Odor). Fonte: A) Foto de M.M. Cordts em (HANSSON; STENSMYR, 2011), B) Adaptada de (MASIGA et al., 2014).

Estudos sobre como obter respostas diretamente das antenas dos insetos ganharam força, pois visam identificar amostras ativas diante das várias espécies estudadas, muitas vezes espécies de interesse econômico como insetos praga. O estímulo gerado no neurônio leva a uma pequena diferença de potencial. Este impulso é

bastante sutil (dependendo do tipo de antena, no somatório de todos os pulsos elétricos observados resultam do somatório de todos os neurônios após a amplificação do sinal pelo equipamento de detecção), contudo, com o aparato necessário, respostas eletrofisiológicas foram pioneiramente observadas por Schneider em 1957 (SCHNEIDER, 1957) em antenas da mariposa da seda *Bombyx mori* (Linnaeus, 1758) (HUMMEL; MILLER, 1984).

O aparato para a eletroantenografia (EAG) consiste basicamente de eletrodos, solução salina, um amplificador de alta impedância ($10^{12} \Omega$) e um equipamento de gravação dos dados (HUMMEL; MILLER, 1984; SCHIESTL; MARION-POLL, 2002). O estímulo químico é direcionado à antena através de um “puff” de ar, observando-se então se há ou não despolarização (respostas) àquele estímulo. A proporcionalidade entre a despolarização e a concentração do estímulo se dá de forma direta, dessa forma quanto mais concentrado o componente estimulante, maior será a intensidade da resposta. Logicamente, quanto mais proteínas receptoras de odores forem ativadas, mais impulsos serão desencadeados no neurônio receptor. Todavia, em determinado ponto (que é específico para cada espécie) em concentrações elevadas do componente teste há a saturação dos receptores, não sendo mais possível a detecção do estímulo (ALTAFINI, 2008; HENZELL, 1974).

Quando os aparatos de EAG foram acoplados com a cromatografia gasosa, surgiu uma nova técnica, mais eficiente, a cromatografia gasosa acoplada a um detector eletroantenográfico (*Gas Chromatography-Electroantennographic Detection* – CG-DEA). O primeiro acoplamento entre um cromatógrafo gasoso e um EAG foi realizado por Moorhouse (MOORHOUSE et al., 1969), utilizando como detector do cromatógrafo um DIC (ou FID = *flame ionization detector*), entretanto o estímulo era armazenado por 15 segundos e então liberado. Este método ficou conhecido como “GC-pulsed EAG” (HUMMEL; MILLER, 1984). Somente em 1975 foi desenvolvida uma forma de utilizar o fluxo de saída do cromatógrafo de forma contínua sobre a antena (ARN; STÄDLER; RAUSCHER, 1975).

O processo bioquímico para a despolarização observada quando um determinado odorante é ativo diante dos receptores das antenas é um processo complexo (SIEGEL, 2006) e na grande maioria das vezes os elementos envolvidos são desconhecidos (SCHIESTL; MARION-POLL, 2002). O que se observa como “respostas” são despolarizações correspondentes aos sinais observados no DIC (Figura 3).

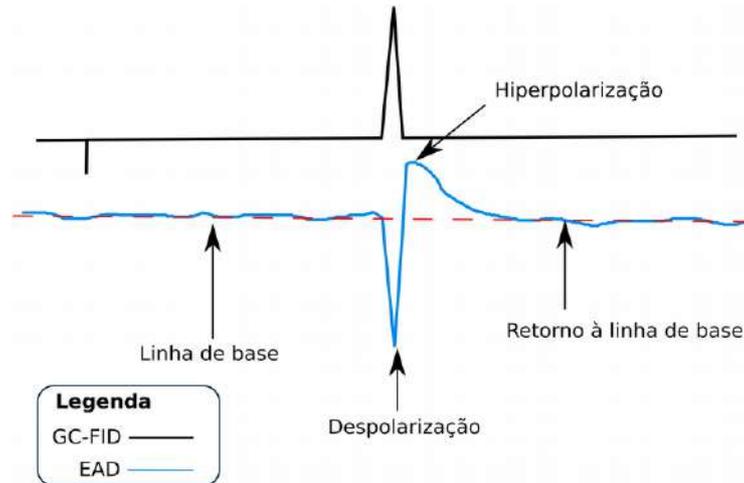


Figura 3: Ilustração de um resposta eletrofisiológica diante de um composto ativo. Fonte: Os autores do presente trabalho.

As antenas dos insetos possuem a capacidade de distinguir um determinado odor em misturas complexas, além de fazê-lo mesmo em concentrações extremamente baixas (THOMAZINI, 2009), tão baixas que mesmo a sensibilidade de equipamentos modernos pode ser insuficiente, sendo necessário o uso de técnicas mais complexas para se chegar a resultados satisfatórios. Um exemplo dessa diferença de sensibilidade pode ser observado na Figura 4 onde o feromônio sexual da fêmea da broca do caqui *Euzophera batangensis* Caradja (Pyralidae) (KALINOVÁ et al., 2006) foi submetido a uma análise cromatográfica acoplada um detector eletroantegráfico (CG-DEA).

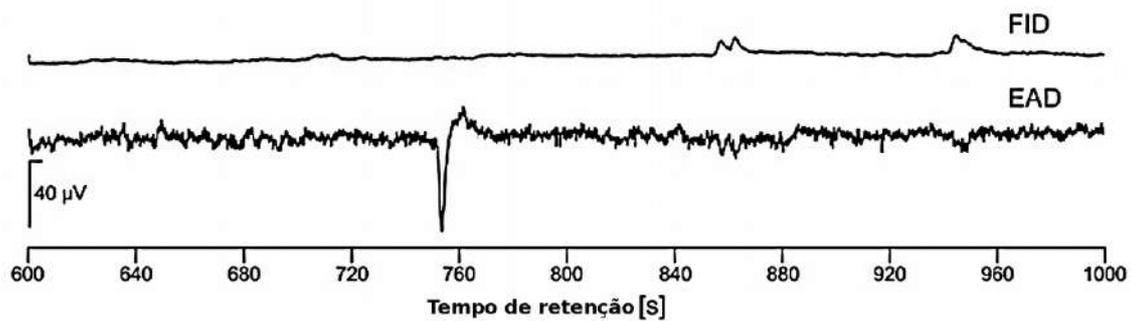


Figura 4: CG-DEA de *Euzophera batangensis* diante do feromônio sexual feminino. Fonte: Adaptada de (KALINOVÁ et al., 2006).

Como é visto na Figura 4, é possível identificar uma resposta eletrofisiológica clara para as antenas de *E. batangensis* por volta de 750 segundos, no entanto, nenhum sinal correspondente no DIC foi observado. Somente através da combinação de outras técnicas e confirmação com o análogo sintético os autores chegaram a estrutura do feromônio.

As antenas também apresentam diferentes intensidades de despolarização, sendo geralmente proporcional à quantidade de analito apresentada. Isso se deve ao fato dos receptores de odor serem proporcionalmente ocupados de acordo com a dose de componente, levando a mais complexos com as PLOs, conseqüentemente uma maior quantidade de dendritos é estimulada o que leva a uma potencialização do sinal emitido pela antena. Após a saturação dos receptores, não mais se observa a proporcionalidade entre quantidade de amostra testada e intensidade da despolarização. Um efeito comum nos experimentos de eletroantenografia é a diminuição da intensidade da resposta diante de um estímulo no decorrer do tempo. Esse efeito é causado pela fadiga ou adaptação da antena, o que leva a respostas lentas e claramente menos intensas (HENZELL, 1974). Todas estas observações podem ser ilustradas na Figura 5.

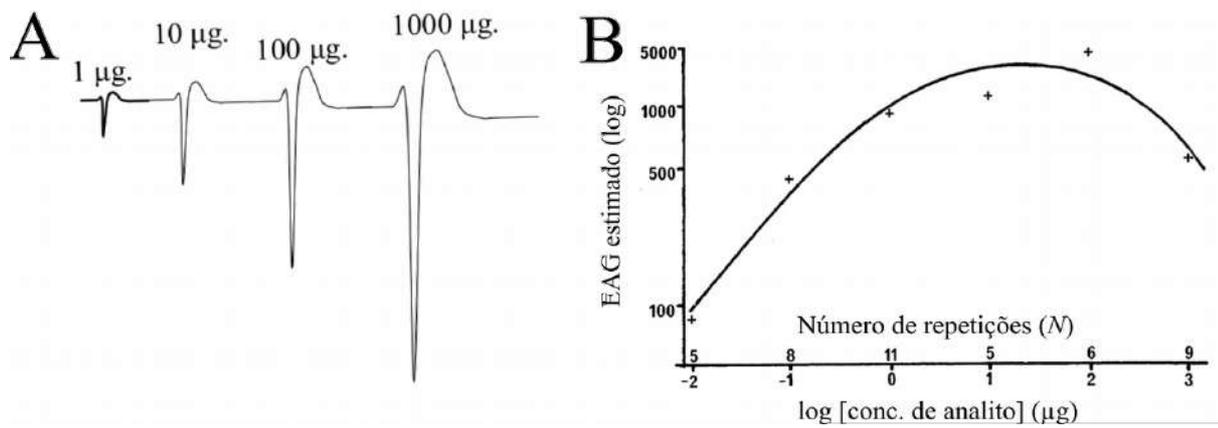


Figura 5: A) Ilustração da proporcionalidade entre a despolarização da antena e a dose de analito testada. B) Efeito da saturação e da adaptação/fadiga da antena. Fonte: A) adaptada de (THOMAZINI, 2009) e B) adaptada de (HENZELL, 1974).

2 ESTUDO ELETROFISIOLÓGICO E COMPORTAMENTAL DO FLORÍVORO DE *Taccarum ulei* ENGL. & K. KRAUSE E *Gearum brasiliense* N. E. BROWN (ARACEAE: TRIBO SPATHICARPEAE)

2.1 Introdução

2.1.1 *Taccarum ulei* Engl. & K. Krause e *Gearum brasiliense* N. E. Brown (Araceae:Tribo Spathicarpeae)

Com 3.750 espécies descritas em 125 gêneros, a família Araceae é composta por plantas herbáceas monocotiledôneas predominantemente neotropicais (BOYCE, P. C. & CROAT, T. B., 2011). *Taccarum ulei* Engl. & K. Krause (Figura 6) é uma arácea nativa da região nordeste do Brasil e de caráter sazonal, esta geófita possui um período de floração de aproximadamente dois meses concomitantemente ao período de chuvas de março (GONÇALVES, 2002; MAIA, 2011; MAIA et al., 2013a). Suas inflorescências são basicamente formadas por uma única espata que envolve uma espádice em que se localizam as flores femininas e masculinas. Nas inflorescências é observado o fenômeno de termogênese na qual o aumento da taxa metabólica na região floral leva a um aumento na temperatura dos tecidos florais de 10-14°C acima da temperatura ambiente, mais especificamente no início da fase feminina com liberação intensa de odor floral (MAIA, 2011; MAIA et al., 2013a).

O aroma das inflorescências de *T. ulei* foi recentemente identificado e em sua composição majoritária foram encontrados compostos pouco comuns em outras espécies, como a acilóina (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona e diidro-β-ionona (MAIA et al., 2013b). As inflorescências de *T. ulei* são visitadas (e efetivamente polinizadas) por besouros da tribo Cyclocephalini (Melolonthidae; Dynastinae), mais especificamente por duas espécies do gênero *Cyclocephala*: *C. cearae* e *C. celata*. Estes besouros utilizam a inflorescência como sítio de agregação, aproveitando-se dos recursos oferecidos como o calor da termogênese, alimentando-se dos estaminódios que circundam as flores na zona feminina, além de utilizarem a câmara floral como local para acasalamento (MAIA et al., 2013b; SANTOS, 2016). Na literatura foram descritos testes de atratividade em campo

com os componentes majoritários do perfume floral, obtendo sucesso na atração das duas espécies com armadilhas de interceptação de vôo iscadas com (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona, apesar do número de indivíduos atraídos ser inferior aos observados em inflorescências naturais (MAIA et al., 2013b).

Um outro visitante dessas inflorescências é uma mosca recém identificada *Beebeomyia taccarivora* Wendt & Maia sp. nov. (Diptera; Richardiidae) (Figura 6C), que deposita seus ovos nas inflorescências onde suas larvas se alimentam dos tecidos florais. Esta mosca, então no papel ecológico de florívora, chega às inflorescências em vários estágios de desenvolvimento, desde imaturas (ainda fechadas) ou mesmo em inflorescências antéticas. O que não está claro é o mecanismo utilizado por *B. taccarivora* para encontrar as inflorescências de *T. ulei*, ficando aberto a especulações.



Figura 6: *Taccarum ulei*, A) Planta completa, B) Inflorescência e C) *Beebeomyia taccarivora*. Fonte: A), B) Os autores do presente trabalho, C)(MAIA et al., 2013a).

Gearum brasiliense N. E. Brown (Figura 7) é a única espécie de seu gênero, coletada pela primeira vez em 1828 por W. J. Burchell (BOGNER; GONÇALVES, 1999; MAYO; BOGNER; BOYCE, 1994). É encontrada no Brasil nos estados de Goiás, Mato Grosso e Tocantins, mas estudos sobre esta aráceia são raros, com poucos registros na literatura (BOGNER; GONÇALVES, 1999; MAYO; BOGNER; BOYCE, 1994). As inflorescências de *G. brasiliense* também apresentam o fenômeno da termogênese, aquecendo-se durante um único dia ao mesmo tempo que emite um intenso aroma floral,

assim como em *T. ulei*. Evidências sobre um possível polinizador de *G. brasiliense* foram descritas na literatura (GONÇALVES; MAIA, 2006), em que foi constatada a visitação do besouro escarabeídeo *Cyclocephala celata*, um dos besouros que também visitam as inflorescências do *T. ulei*. A identificação da composição do perfume floral de *G. brasiliense* é inédita, sendo discutida no presente trabalho. Foi descrito na literatura (GONÇALVES; MAIA, 2006) que as inflorescências de *G. brasiliense* são também visitadas por outra população de *B. taccarivora* (Figura 7B, C). Assim como em *T. ulei*, não está claro o que leva as moscas a encontrar as inflorescências de *G. brasiliense*.

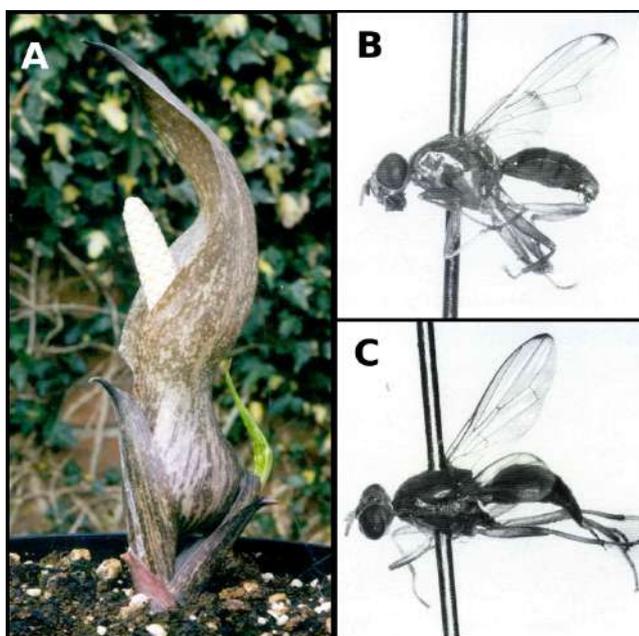


Figura 7: A) Inflorescência de *Gearum brasiliense* N. E. Brown (Tribo Spathicarpeae), B) macho e C) fêmea de mosca Richardiidae encontradas nas inflorescências. Fonte: Foto de A) (HETTERSCHIED, 2002), B) e C) (BOGNER; GONÇALVES, 1999).

2.1.2 Família Richardiidae (Diptera)

A família Richardiidae é composta por moscas de tamanho médio a pequeno (3 a 15 mm), com a coloração do corpo de amarelo ao marrom ou mesmo preto (WENDT et al., no prelo). Em sua maioria são saprófagas, alimentando-se de vegetação morta (BROWN et al., 2010), contudo sua biologia é pouco conhecida. Essa família de moscas é relativamente pequena consistindo em 32 gêneros com 190 espécies descritas (WENDT;

ALE-ROCHA, 2014). A família possui distribuição essencialmente neotropical (90% das espécies), exceto para o Chile, Antilhas e Patagônia (WENDT, 2012). As larvas de moscas da família Richardiidae já foram encontradas se alimentando de tecidos florais de várias espécies de plantas. Segundo a literatura, larvas de *Beebeomyia* sp. já foram observadas se desenvolvendo em flores de Araceae, Marantaceae e Musaceae (MACALPINE, 1993; WENDT, 2012). Recentemente Hernández-Ortiz e Aguirre (HERNÁNDEZ-ORTIZ; AGUIRRE, 2015) publicaram observações comportamentais de *Beebeomyia tuxtlaensis* n. sp., em que esta foi vista visitando as inflorescências ainda imaturas de *Dieffenbachia oerstedii* Schott (Araceae), na qual depositou seus ovos. *B. taccarivora* também apresentou um comportamento semelhante, visitando as inflorescências de *Taccarum ulei* (Araceae) em diferentes estágios de maturação (WENDT et al., no prelo). No entanto nenhum estudo sobre qual o caminho utilizado pelos insetos para localizar seu hospedeiro foi realizado.

São raros os trabalhos sobre eletrofisiologia em moscas da família Richardiidae descritos na literatura. Um estudo preliminar sobre o feromônio sexual da mosca do abacaxi *Melanoloma viatrix*, realizado por Rodríguez e Medina (RODRÍGUEZ; MEDINA, 2010) foi o único encontrado até então.

A mosca estudada neste trabalho é uma nova espécie da família Richardiidae, predando as inflorescências de *Taccarum ulei* e *Gearum brasiliense* em diferentes estágios de maturação. Estudos eletrofisiológicos e comportamentais foram realizados, na hipótese de que exista um canal químico que leve as fêmeas a ovipositarem nas inflorescências tanto de *T. ulei* quanto de *G. brasiliense*.

Na literatura (MAIA et al., 2013a) foi descrito que as inflorescências de *T. ulei* foram visitadas por besouros da tribo Cyclocephalini no momento da antese floral, assim como *G. brasiliense*. Os mesmos autores também observaram larvas de uma mosca (*Beebeomyia taccarivora* Wendt & Maia **sp. nov.** (Diptera; Richardiidae)) se alimentavam de tecidos florais em diferentes estágios de maturação floral ((BOGNER; GONÇALVES, 1999; MAIA et al., 2013a). Num estudo posterior (MAIA et al., 2013b) ficou demonstrada a atração do besouro *C. cearae* por um dos compostos isolados do perfume floral das

inflorescências antéticas de *T. ulei*, embora a taxa de atração seja significativamente menor do que as inflorescências naturais. Esses fatos nos motivaram a investigar: a) qual (is) fator (es) envolvido (s) nessas relações inseto-planta? b) Como as moscas encontram as inflorescências de *T. ulei* em diferentes estádios de maturação? c) As populações de moscas encontradas nas inflorescências de *T. ulei* e *G. brasiliense* possuem alguma relação entre si? d) Existe um caminho químico usado pelos insetos para encontrar essas plantas?

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo geral

Estudar a relação química entre *Beebeomyia taccarivora* Wendt & Maia sp. nov. (Diptera; Richardiidae) e as inflorescências de *Taccarum ulei* e *Gearum brasiliense* (Araceae).

2.2.2 Objetivos Específicos

Analisar a composição volátil das inflorescências de *T. ulei* e *G. brasiliense*;

Realizar ensaios eletrofisiológicos com *Beebeomyia taccarivora* sp. nov. (Diptera; Richardiidae) diante da composição volátil de *T. ulei* e *G. brasiliense* e identificar os compostos ativos;

Realizar ensaios comportamentais em laboratório com a composição volátil de *T. ulei* e *G. brasiliense* e testar a atratividade do(s) composto(s) ativo(s) nos ensaios eletrofisiológicos em biotestes em olfatômetro em “Y”.

2.3 Materiais e Métodos

2.3.1 Coleta de material e manutenção da colônia

Larvas e pupas de *Beebeomyia taccarivora* foram coletadas entre Abril e Maio de 2013-2016, numa região de urbanização escassa nas margens da BR 101 – Norte, entre os municípios de Abreu e Lima e Igarassu – Pernambuco, Brasil (7°47'41,63" S, 34°55'41,02" W; altitude aproximada de 105m). Inflorescências de *T. ulei* infestadas com ovos, larvas e pupas de *B. taccarivora* foram coletadas e armazenadas numa gaiola de tela (60x60x60 cm). O sistema foi acondicionado no Laboratório de Ecologia Química (UFPE-CCEN-DQF) e mantidos sob temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade de $70 \pm 10\%$ e iluminação natural. A gaiola foi umedecida com água destilada três vezes por dia com o auxílio de um borrifador. Após 18 dias foram observadas os primeiros espécimes adultos. Estes últimos foram alimentados com pedaços de maçã (pendurados na gaiola), com renovação do alimento a cada dois dias. Sempre que possível novas inflorescências de *T. ulei* eram adicionadas para alimento das larvas que viessem a eclodir (Figura 8).

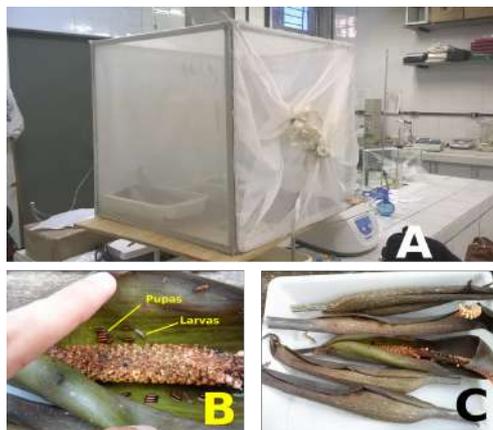


Figura 8: A) Gaiola para eclosão das pupas e manutenção das moscas; B) Larvas e pupas de *B. taccarivora* em inflorescência de *T. ulei*; C) Inflorescências de *T. ulei* na bandeja para armazenamento na gaiola. Fonte: Os autores do presente trabalho.

Inflorescências de *Gearum brasiliense* foram coletadas entre novembro e janeiro de 2014 numa área aberta de cerrado no sul do estado de Tocantins nas vizinhanças da cidade de Arraias, no Brasil Central (12°43'44,5"S, 47°23'22,4"W altitude aproximada de

374m). Inflorescências de *G. brasiliense* infestadas com larvas e pupas de *B. taccarivora* foram armazenadas sob condições análogas as descritas anteriormente para *T. ulei*.

2.3.2 Coleta dos compostos voláteis

As inflorescências de *T. ulei* foram coletadas na mesma época e local das larvas e pupas de *B. taccarivora*. Estas foram submetidas à técnica de *headspace* dinâmico durante sua antese (que se inicia por volta das 17h, Figura 9). As inflorescências foram postas em sacos de poliéster 31x41 cm (AssaPratsy, Alumileste), concomitantemente um saco vazio também foi submetido ao mesmo procedimento como “branco”. Tubos coletores (*traps*) compostos de 50 mg de uma mistura de 1:1 de Tenax™ TA (malha 60/80) e Carbopack™ X (malha 40/60) (previamente lavados em metanol e ativados a 240°C por 4h) foram adicionados nas saídas do fluxo de ar dos sacos, enquanto um filtro de carvão ativado foi utilizado para filtrar o ar de entrada. O fluxo foi mantido constante utilizando-se uma bomba de vácuo (modelo G 12/01EB, ASF Thomas, Inc. Alemanha) a 0,8 L/min durante 40 min. Os voláteis adsorvidos nos *traps* foram imediatamente dessorvidos com 500µL de hexano bidestilado. As amostras foram então armazenadas a -18°C. O procedimento análogo foi utilizado para a coleta de voláteis das inflorescências de *G. brasiliense*.



Figura 9: Montagem para extração de voláteis por headspace (sem o branco). Fonte: Os autores do presente trabalho.

Para o acompanhamento da antese e inflorescências imaturas utilizou-se o mesmo procedimento da coleta de cheiro para inflorescências antéticas, exceto pelo tubo coletor ser composto por ChromatoProbe quartz microvials (comprimento: 15 mm; diâmetro interno: 2,5 mm) contendo aproximadamente 3 mg de uma mistura de 1:1 de Tenax™ TA (malha 60/80 supelco) e Carboxen™ X (malha 20/40), fixada com lã de vidro. O fluxo foi mantido constante utilizando-se uma bomba de vácuo (modelo G 12/01EB, ASF Thomas, Inc. Alemanha) a 0,2 L/min durante 5 min. Iniciou-se a coleta dos voláteis por volta das 14h repetindo-se o procedimento em intervalos de aproximadamente 1h até as 00h. Foi utilizada dessorção térmica no injetor do cromatógrafo para análise dos componentes. As inflorescências imaturas foram ensacadas durante 1h antes do início da captura dos voláteis.

2.3.3 Identificação e quantificação dos componentes do odor floral de *T. ulei* e *G. brasiliense*.

A quantificação (área relativa) dos componentes dos perfumes florais de *T. ulei* e *G. brasiliense* foi obtida através da média de 3 análises, num cromatógrafo gasoso

(Thermo Trace GC Ultra, Thermo Scientific, Milan, Italy) com detector por ionização de chama (DIC). Para cada análise 1µL das amostras dos odores florais obtidos em *headspace* foram analisados em modo *splitless* nas seguintes condições: 40°C inicial por 2min, então 4°C/min até 230°C (a temperatura do injetor e do detector foi ajustada para 250°C), mantendo-se nesta temperatura por mais 5min. Nitrogênio foi utilizado como fase móvel a um fluxo de 1mL/min numa coluna VB-5, 30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, ValcoBond.

Os compostos foram identificados através da co-injeção da amostra com uma série homóloga de hidrocarbonetos (C₈-C₂₉) num cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM) modelo Agilent Technologies J&W, coluna HP-5, 60 m, 0,25 mm, 0,25 µm) sob as mesmas condições de aquecimento usadas no CG-DIC. Adicionalmente 230°C para a fonte de íons (70 eV) e 150°C para o quadrupolo - Agilent 5975C Series, Agilent Technologies, Palo Alto, USA, 0,5 scan/s, abrangendo a faixa *m/z* de 35 a 350. Os índices de retenção foram calculados através da equação de Van Den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL; DEC. KRATZ, 1963) e comparadas à literatura juntamente aos respectivos espectros e massas (Equação 1). A comparação com padrões analíticos também foi utilizada, quando estes eram disponíveis.

$$IR = 100 \times i \times \left[\frac{Tr_{(\alpha)} - Tr_{(n)}}{Tr_{(n+1)} - Tr_{(n)}} \right] + 100 N$$

Equação 1: Equação de Van Den Dool and Kratz

Equação de Van Den Dool e Kratz: em que **Tr_(α)** é o tempo de retenção do composto α em questão; **Tr_(n)** é o tempo de retenção do hidrocarboneto que elui antes de α; **Tr_(n+1)** é o tempo de retenção do hidrocarboneto que elui depois de α; **i** é diferença do número de carbonos entre os hidrocarbonetos que eluem depois e antes do composto de α e **N** é número de carbonos presente no hidrocarboneto que elui antes de α.

Para os compostos (S)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona e diidro-β-ionona, a quantificação foi realizada utilizando-se uma curva de calibração de 12 pontos com concentrações entre 0,001, 0,1, 1,0, 2,84, 7,11, 10,67, 17,78, 29,63, 37,92, 59,26, 74,07

g/L no CG-EM, sob as seguintes condições: temperatura inicial 70 °C mantendo-se por 1 min, depois 15 °C/min até 250 °C, mantendo-se por 2 min. Nos ensaios 1 µL de amostra foi analisado ajustando-se o *split* (10-250) de acordo com a concentração da amostra em cada ensaio, normalizando-se também as áreas obtidas de acordo com o *split* utilizado.

2.3.4 Ensaio de eletroantenografia acoplada a cromatografia gasosa (CG-DEA) das populações de *Beebeomyia taccarivora* (Richardidiidae)

2.3.4.1 *Preparação da solução de Ringer*

A solução salina utilizada nos capilares nos ensaios de eletrofisiologia foi preparada solubilizando 4,0 g de NaCl, 0,4 g de CaCl₂, 0,4 g de KCl em 1L de água destilada. Esta solução foi estocada sob resfriamento moderado (10°C).

2.3.4.2 *Montagem das antenas de Beebeomyia taccarivora (Richardidiidae)*

Indivíduos adultos de ambos os sexos de *B. taccarivora* e idades variadas foram separados da colônia e submetidos a temperaturas da ordem de 0°C por 3min. Após os indivíduos cessarem os movimentos, a cabeça do inseto foi removida com uma minitesoura, e então acoplada a um capilar previamente preenchido com solução salina (solução de Ringer). O conjunto cabeça/capilar foi acoplado ao amplificador de sinal. Para fechar o circuito foi utilizado um segundo capilar também previamente preenchido com solução salina e então acoplado a uma das antenas de *B. taccarivora* (Figura 10).

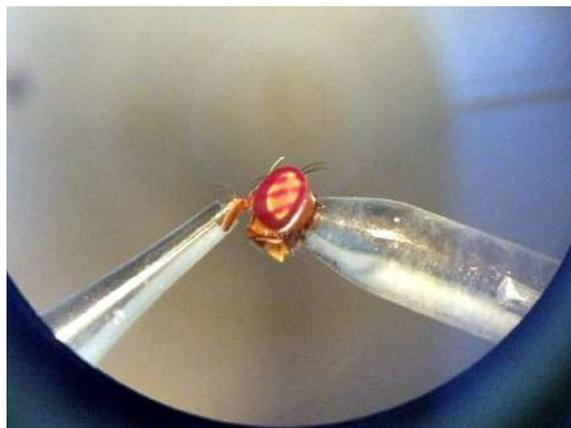


Figura 10: Montagem das antenas de *Beebeomyia taccarivora* nos ensaios de eletrofisiologia. Fonte: Os autores do presente trabalho.

Os ensaios foram realizados entre 8h e 18h num cromatógrafo gasoso (Thermo Trace GC Ultra, Thermo Scientific, Milan, Italy) acoplado a um detector DIC com divisão no final da coluna capilar (VB-5, 30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m, ValcoBond) para o sistema eletroantenográfico (IDAC-4 - *Intelligent Data Acquisition Controller with programmable output control*, Syntech, Kirchzarten, Germany). Este divisor bifurca o fluxo da coluna cromatográfica para o DIC e o DEA através de duas colunas de sílica fundida desativada de igual comprimento. Na linha de transferência a temperatura é mantida através de um módulo (TC-02 a 210°C). As condições para o ensaio cromatográfico foram de 150°C para temperatura de injetor, 60°C para o forno mantendo-se esta temperatura por 1 min, em seguida aumentando 7°C/min até 200°C permanecendo nesta temperatura por 2 min. $N_{2(g)}$ foi utilizado como fase móvel a 1 mL/min. Os analitos foram as amostras de *headspace* dos perfumes florais de *T. ulei* e *G. brasiliense*, injetados em modo split 1:10, 1:30 e 1:70. Um fluxo de ar filtrado e umedecido foi utilizado para manter a hidratação da antena e como fluido de arraste dos componentes da saída do cromatógrafo até esta.

2.3.5 Biotestes

Exemplares de ambos os sexos foram submetidos a ensaios para análise de atratividade do odor floral de *T. ulei*. Para isso foi utilizado um olfatômetro em “Y” de

dimensões 30x30x20cm com 24mm de diâmetro interno diante de um fluxo de ar constante de 0,6L/min (Figura 11). Para evitar respostas induzidas por luminosidade foi utilizada uma capela com luz difusa e fechada com tecido para evitar interferência. Os indivíduos foram previamente separados e deixados sob o fluxo de ar para adaptação durante 3 min. Em seguida o odor floral/composto isolado/mistura binária de compostos foi adicionado (2-20µg de composto isolado e/ou 4µL de *headspace*) num pequeno pedaço de papel de filtro (3 cm x 1 cm, aproximadamente) que foi colocado num lado do olfatômetro e no outro foi usado hexano destilado em igual quantidade como controle, aguardando-se aproximadamente 1 min para evaporação do solvente. As moscas foram então liberadas e aguardou-se até 5 minutos para se determinar se seu deslocamento caracterizava alguma escolha. Para isso, foi considerado como positivo para uma escolha quando o indivíduo permanecia no local ou pelo menos 2/3 do comprimento do braço do teste/controle por pelo menos 10s.

Quando o inseto pareceu indiferente (permanecendo no início do tubo, se locomovendo entre o teste e controle, não aparentando qualquer decisão) o experimento foi considerado não conclusivo, sendo-lhe atribuído “n.a.” - *nenhuma alternativa*. Para os padrões sintéticos foram preparadas soluções de 1,00g/L para (S)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona e 1,06g/L de diidro-β-ionona. Cada inseto foi testado uma única vez e a cada 5 indivíduos testados o sistema em “Y” foi lavado com etanol e água destilada. Em seguida o tubo foi seco em estufa a 90°C para remover qualquer resíduo de compostos voláteis. Em cada novo experimento novos papéis de filtro foram utilizados, assim como o tubo Y rotacionado (180°) para evitar qualquer preferência por lado.



Figura 11: Aparato para os ensaios de dupla escolha (olfatômetro em "Y"). Fonte: Os autores do presente trabalho.

2.3.6 Análises estatísticas

Para testar possíveis diferenças nas respostas de *Beebeomiya taccarivora* nos testes de dupla escolha, foram aplicados testes Binominais Exatos. Para avaliar a semelhança entre as respostas de machos e fêmeas foi utilizado o Teste de Fisher. Os testes Binominais Exatos e de Fisher foram calculados a partir das planilhas fornecidas em <http://www.biostathandbook.com/exactgof.html> e <http://www.biostathandbook.com/fishers.html>, respectivamente (acessado em 25/07/2017). Os resultados para ambos os testes foram considerados significativos quando $p < 0,05$ (bicaudal).

2.4 Resultados e discussão

2.4.1 Headspace das inflorescências termogênicas de *T. ulei*

Inflorescências de *T. ulei* foram submetidas a técnica de *headspace* dinâmico e a composição do perfume floral foi semelhante a descrita na literatura (MAIA et al., 2013b). Os compostos majoritários (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona e diidro- β -ionona são responsáveis por 80,44% do perfume floral (Tabela 2).

Tabela 2: Identificação da composição volátil das inflorescências maduras de *T. ulei* no momento da antese.

Nome do composto	I.R. calculado	I.R. da literatura	Área relativa (%) \pm desvio padrão
(S)-2-OH-5-Me-3-hexanona	955	Padrão analítico	67,03 \pm 0,63
3-OH-5-Me-2-hexanona	956	951 ^c	6,56 \pm 0,08
Diidro- β -ionona	1445	1434 ^a /1443 ^b	13,41 \pm 0,14
Compostos não identificados			13,00
Total identificados			87,00

Fonte: Os autores do presente trabalho. ^a(ADAMS, 2007), ^b(LEFFINGWELL; ALFORD, 2005), ^c(PETRETTO et al., 2017).

Os compostos majoritários encontrados no perfume floral de *T. ulei* – (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona 67,03%, Figura 12A; diidro- β -ionona (4-(2,6,6-trimetilciclohexen-1-il)butan-2-ona) 13,41%, Figura 12B – são raramente encontrados em concentrações consideráveis em outras espécies de angiospermas, geralmente sendo identificados como minoritários em odores florais. Como poucos exemplos em que a diidro- β -ionona está presente como majoritário do perfume floral de de outra espécie, podemos citar o *Philodendron adamantinum* (89,67%), sendo este o composto chave para atração do seu respectivo polinizador o besouro *Erioscelis emarginata* (Dynastinae, Scarabaeidae) nos ensaios em campo (PEREIRA et al., 2014), assim como *Philodendron acutatum* (74,41%) polinizado pelo besouro escarabeídeo *Cyclocephala celata* (Scarabaeidae, Dynastinae) que também visita as inflorescências de *T. ulei* (MAIA et al., 2010).

Segundo a literatura (MAIA et al., 2013b), *T. ulei* produz exclusivamente o enantiômero (S) da 2-hidroxi-5-metil-3-hexanona.

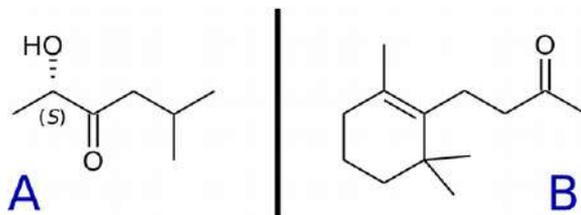


Figura 12: Compostos majoritários do perfume floral de inflorescências termogênicas de *Taccarum ulei*. A) (S)-2-hidroxi-5-metil-3-hexanona; B) diidro-β-ionona. Fonte: Os autores do presente trabalho.

A identidade dos dois compostos majoritários foi confirmada através de comparação com padrões sintéticos. A quantificação foi realizada por comparação das áreas do picos correspondentes numa curva de calibração para cada composto. Na construção de curvas de calibração (Figura 13), observou-se um ponto onde ocorreu uma mudança de inclinação para a curva de (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona, resultando em duas retas distintas: 0,001-1,00 g/L, $R^2_{\text{reta 1}} = 0,9988$ e outra entre 2,84-74,07 g/L, $R^2_{\text{reta 2}} = 0,9949$. Na curva para diidro-β-ionona também apresentou este comportamento, mas num ponto diferente: 0,001-2,84 g/L, $R^2_{\text{reta 1}} = 0,9741$ e outra em 7,11-74,07 g/L, $R^2_{\text{reta 2}} = 0,9657$.

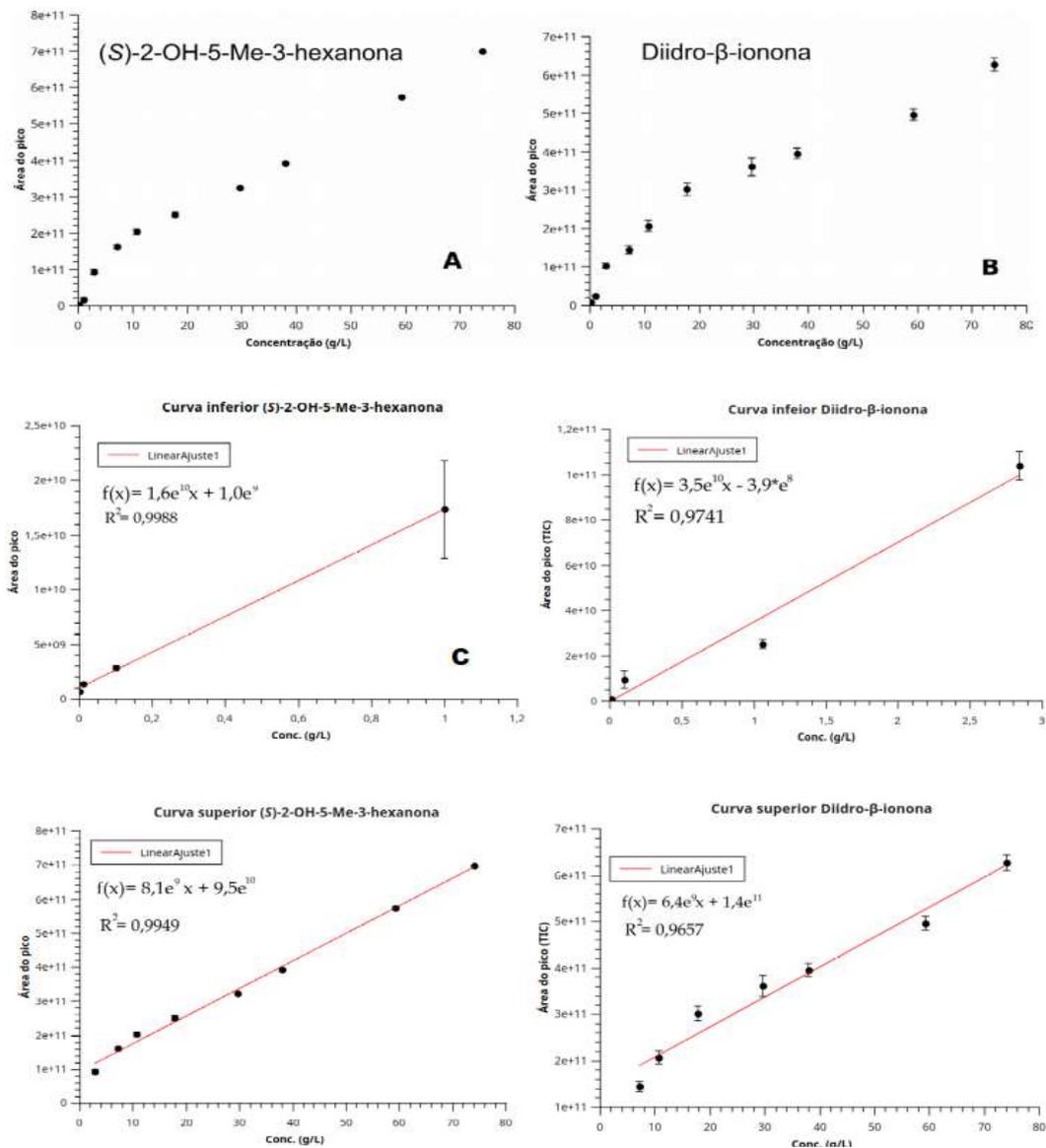


Figura 13: Curvas de calibração de A) (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona e B) diidro-β-ionona. Fonte: Os autores do presente trabalho.

A partir destas curvas de calibração foi possível calcular a quantidade de analito capturado nas armadilhas de cheiro. Adicionalmente, bem próximo à (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona elui a 3-OH-5-Me-2-hexanona como pode ser observado na Figura 14.

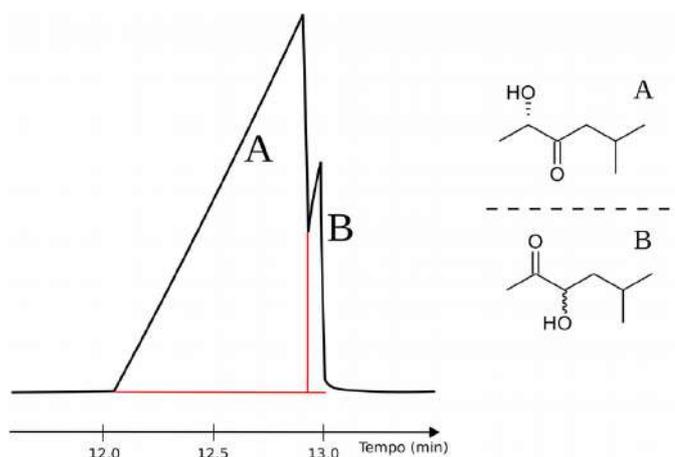


Figura 14: Cromatograma de *T. ulei* com destaque na sobreposição de picos entre A) (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona e B) 3-OH-5-Me-2-hexanona. Fonte: Os autores do presente trabalho.

A proporção entre as áreas dos picos (obtidas através de CG-DIC) da (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona e a 3-OH-5-Me-2-hexanona esteve de 10:1. A proporção entre as áreas desses dois compostos apresentou uma leve variação de indivíduo para indivíduo, todavia não muito distante da proporção mostrada anteriormente. A diferença na proporção entre estes compostos pode ser ainda mais acentuada, uma vez que a resolução dos sinais não foi completa. O pico de maior área acaba contribuindo também para a área do segundo por conta da sobreposição dos sinais e vice-versa.

O fato de ocorrer a sobreposição dos sinais da (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona e da 3-OH-5-Me-2-hexanona poderia causar influência nos testes eletroantenográficos (CG-DEA). Com isso uma resposta eletrofisiológica poderia ser “mascarada”, levando a resultados inconsistentes. Nos ensaios eletrofisiológicos as amostras de headspace foram injetadas em modo split, além de ser utilizada uma condição de análise diferente (7°C/min), o que levou a uma melhor resolução entre os sinais (Figura 21). Dois compostos minoritários não identificados do perfume floral também relatados na literatura (MAIA et al., 2013b) foram observados no presente trabalho: O composto não identificado

3 (maiores picos: m/z = 95 (99,9%); 68 (84,6%); 81 (70,4%); 67 (59,3%); 55 (47,7%); 80 (39,9%); 41 (34,6%); 79 (32,3%); 94 (32,0%); 136 (27,7%); 224 (M^+); área relativa= 7,97% \pm 0,11) e **3'** (maiores picos : m/z = 88 (99,9%); 96 (81,5%); 138 (71,3%); 55 (65,0%); 81 (49,5%); 41 (49,0%); 67 (47,8%); 84 (47,2%); 97 (43,8%); 70 (43,7%); 226 (M^+); área relativa= 2,1% \pm 0,1) possuem espectros de massas similares, contudo suas contribuições no ensaios comportamentais não foram relevantes.

2.4.2 Acompanhamento da antese floral de *T. ulei*

No acompanhamento da emissão de cheiro das inflorescências de *T. ulei* durante a antese ficou evidente a variação tanto na intensidade quanto na proporção dos compostos voláteis. No início da antese os compostos (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona e diidro- β -ionona foram observados em pequenas quantidades, no entanto, no decorrer da antese a quantidade de compostos voláteis capturados excedeu o máximo da curva de calibração realizada no presente trabalho (Figura 15). A quantidade de odor floral descarregada durante a antese pode ser ainda maior, considerando que provavelmente nem todo perfume floral foi capturado nas armadilhas de cheiro.

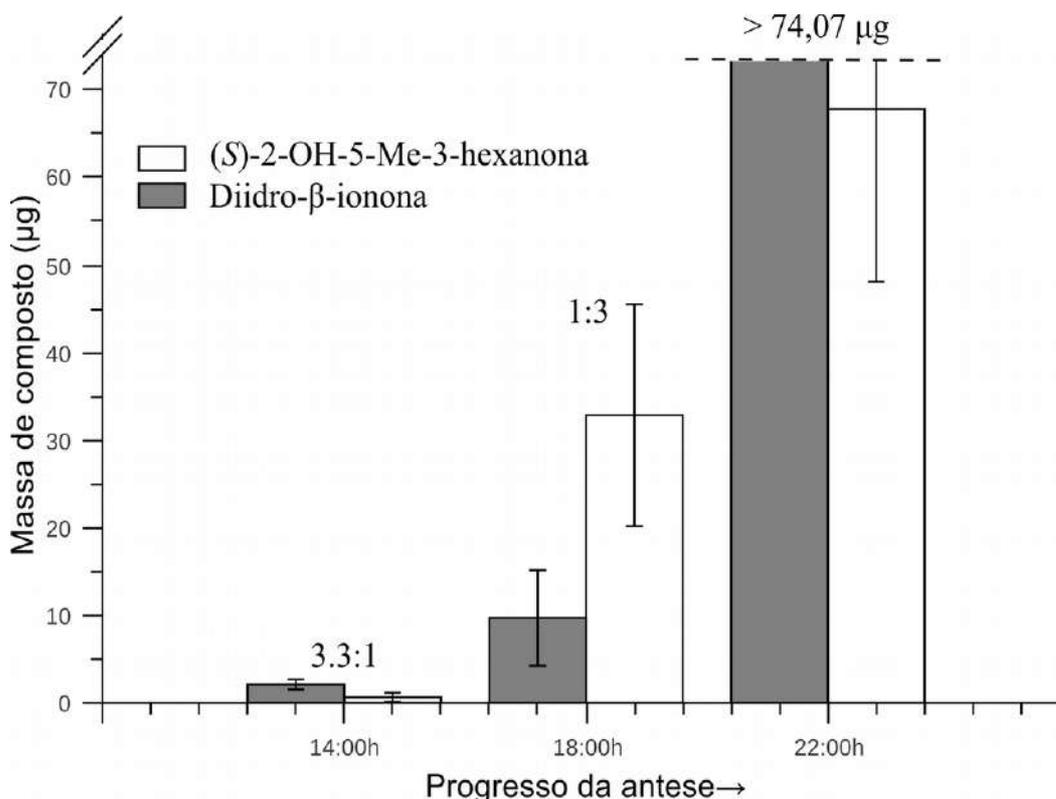


Figura 15: Variação na quantidade (capturada) e proporção dos majoritários (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona e diidro-β-ionona no decorrer da antese. Fonte: Os autores do presente trabalho.

Adicionalmente a proporção entre os compostos do perfume floral também foi observada. Uma variação na proporção entre os majoritários (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona e diidro-β-ionona foi constatada. A proporção entre os compostos mencionados praticamente se inverte no decorrer da antese, passando de 3,3:1 diidro-β-ionona : (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona nas primeiras horas de atividade até 1:3 por volta das 18:00h. Como observação pessoal, foi possível notar que no início dos experimentos (por volta das 14:00h) as inflorescências de *T. ulei* pré-antéticas liberavam um perfume mais adocicado, mais próximo do cheiro da diidro-β-ionona. No decorrer da antese era possível perceber uma mudança no odor liberado, passando então a um cheiro mais pungente, característico da (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona. Esse fato foi confirmado em nossos experimentos, onde ficou constatada a dominância da diidro-β-ionona no início da antese e posterior inversão na proporção entre (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona e diidro-β-ionona.

Não foram observadas grandes variações na contribuição por *área relativa* (CG-EM) dos compostos 3-OH-5-Me-2-hexanona, **3'** e **3**, além do fato dos compostos não identificados **3'** e **3** terem sido observados somente após 20:00h, decaindo após as 23:00h. Adicionalmente é possível constatar a inversão entre as áreas relativas a (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona e diidro- β -ionona no percurso da antese (Figura 16). Os compostos não identificados **3'** e **3** somente foram detectados após as 22:00h, somente observados em inflorescências antéticas de *T. ulei*. Esse resultado é interessante no sentido de que os insetos que visitam as inflorescências de *T. ulei* chegam às mesmas antes da liberação de **3'** e **3**. Uma observação pertinente ainda na Figura 16 é a dominância da diidro- β -ionona nos primeiros momentos da antese, fato este que será explorado com mais detalhes nos testes comportamentais.

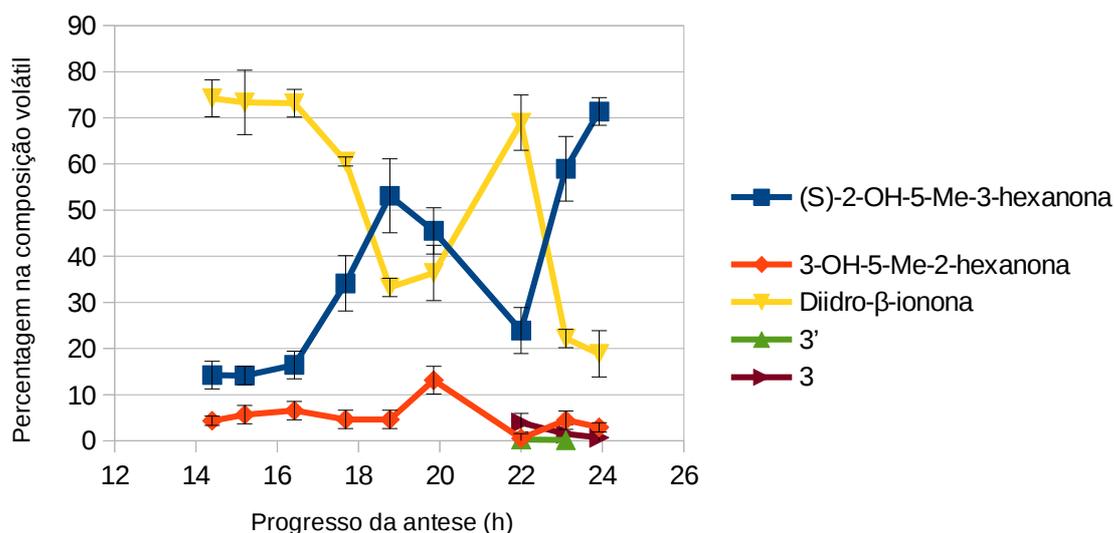


Figura 16: Variação da contribuição (percentagem em área relativa – CG-EM) dos compostos majoritários do perfume floral no decorrer da antese (valores médios de 4 indivíduos). Fonte: os autores do presente trabalho.

Utilizando-se a metodologia por dessorção com solvente não foram observados compostos voláteis nas amostras de *headspace* de inflorescências imaturas de *T. ulei*. Entretanto, quando a metodologia de captura de voláteis foi realizada com o auxílio de *ChromatoProbe quartz microvials*, compostos voláteis foram observados em quantidade diminutas, dentre eles os componentes majoritários do perfume floral de inflorescências termogênicas (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona e diidro- β -ionona. Isso mostra que os majoritários que compõem o buquê estão presentes em pequenas quantidades mesmo com as inflorescências ainda fechadas. Esse fato é fundamental para embasar a hipótese

de um canal químico sendo utilizado pelo florívoro para localizar seu sítio de oviposição. Como estes compostos são liberados pelas inflorescências em diferentes estágios de maturação, o florívoro seria capaz encontrá-las em diferentes momentos. O que explicaria a presença de larvas em inflorescências desde imaturas até antéticas.

A contribuição dos majoritários (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona e diidro- β -ionona na composição volátil das inflorescência imaturas variou entre 5-14% em pequena quantidade (0,0015 μ g aproximadamente, Figura 17). O restante da composição volátil das inflorescências imaturas de *T. ulei* mostrou-se uma mistura complexa, variando a composição entre os indivíduos analisados, contudo, os majoritários (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona e diidro- β -ionona foram presentes no perfume floral de todos indivíduos analisados ($N=5$).

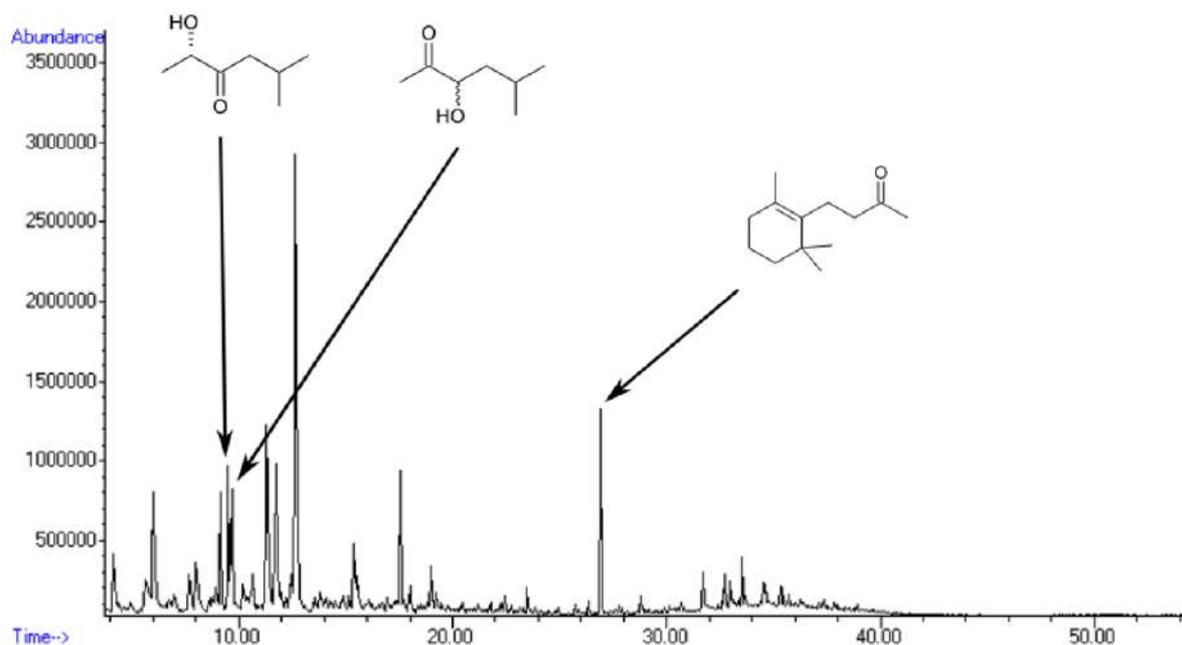


Figura 17: Cromatograma (CG-EM) de um *headspace* de inflorescências imaturas de *Taccarum ulei*.

2.4.4 Análise CG-DEA de *B. taccarivora* diante do odor floral de *T. ulei*

Foi possível observar nas montagens das antenas de *B. taccarivora* que estas se mostram bastante instáveis no início dos experimentos. Entretanto, por volta de 30 minutos depois de iniciada a montagem, chegou-se a níveis aceitáveis de interferência. Vale lembrar que oscilações na rede elétrica, eletrostática, climática e trepidações são fatores de grande influência em análises eletroantegráficas (MILLER, 1979). Os experimentos foram realizados em ambiente satisfatoriamente controlados para minimizar a interferência desses fatores.

Por se tratar de impulsos elétricos bastante sutis, a técnica de CG-DEA é vulnerável a interferências de várias naturezas, seja pela contaminação do ar no ambiente do experimento ou das condições de montagem das antenas. Bolhas de ar dentro dos capilares foram um problema recorrente, causando interferência na condutividade da solução salina. A posição em que os capilares são conectados à cabeça do inseto também é um fator relevante, já que o mal posicionamento dos capilares causou interferências severas no início dos experimentos. Logo após o corte da cabeça do inseto foi feito o acoplamento do capilar, entretanto, somente com um microscópio foi possível fazer o ajuste fino. Essa observação pode ser explicada pelo simples fato de que o contato entre a solução e a linfa do inseto deve ser estabelecido o máximo possível. Quando o contato não foi satisfatório se poderia esperar perda de linfa para o ambiente, além de falhas na comunicação entre os pulsos elétricos vindos da cabeça do inseto, assim, não fechando corretamente o circuito. Também foi observado que antenas dos machos se mostravam menos estáveis que a das fêmeas, levando-se mais tempo para a estabilização necessária para o início dos experimentos.

Notou-se também que o contato das antenas com vidro dos capilares também era um fator de instabilidade nas antenas, assim como uma conformação diferente da natural na posição das antenas (por volta de 120° entre as antenas e o “pescoço” [Figura 18]). Também foram testadas outras formas de montagem das antenas de *B. taccarivora*, como a montagem somente da antena, sem cabeça (pedicelo – flagerômero), assim como a montagem flagerômero – olho composto . Ambas demonstraram instabilidade nas

respostas eletrofisiológicas, o que nos levou a optar pela montagem flagerômero – cabeça (Figura 18).

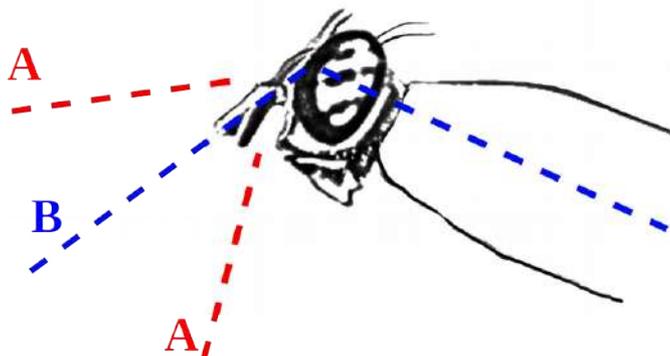


Figura 18: Ângulos de montagem testados. A) instável; B) estável. Fonte: Os autores do presente trabalho.

Após o ajuste das melhores condições de montagem das antenas foi possível iniciar os experimentos de CG-DEA, partindo do *headspace* do *T. ulei* realizado no momento da antese da inflorescência.

As antenas de *Beebeomyia taccarivora* (Richardiidae) foram montadas como mostra a Figura 19A e logo no primeiro dia de ensaio foi possível observar uma resposta eletrofisiológica clara para segundo majoritário do perfume de *T. ulei*, a diidro- β -ionona (2), como pode ser visto na Figura 19B. O cromatograma da Figura 19 mostra apenas os componentes majoritários do *headspace* de *T. ulei*, uma vez que os outros compostos citados na Tabela 2 estão em quantidades diminutas. Com uma injeção em *split* 1:10 ainda foi possível identificar um outro sinal (2,3-heptanediona) por volta de 360s (#), no entanto sem nenhuma resposta eletrofisiológica correspondente. Os ensaios eletrofisiológicos foram realizados para ambos os sexos, obtendo-se respostas semelhantes.

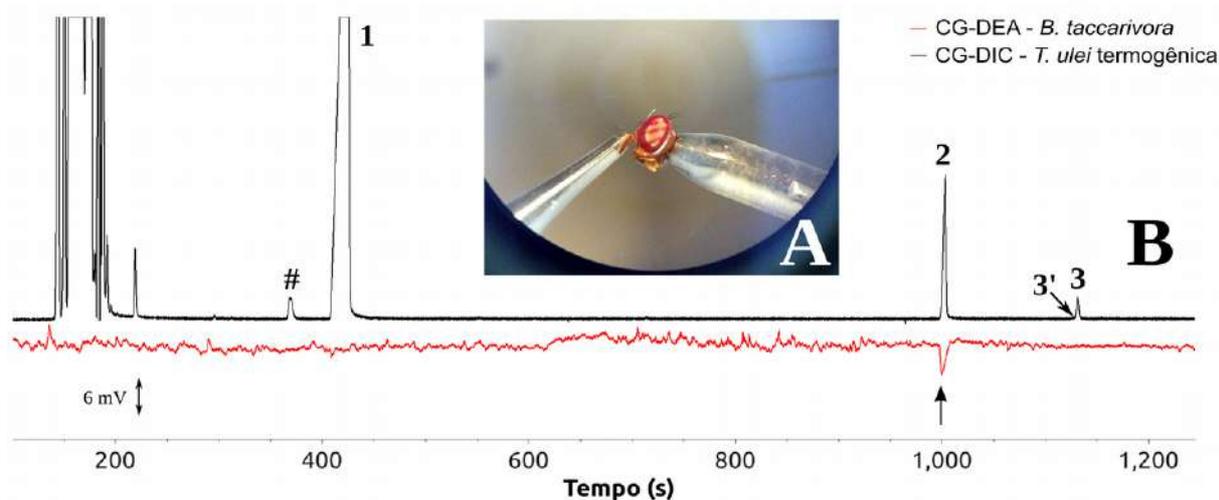


Figura 19: A) Montagem da antena de *B. taccarivora* nos capilares; B) CG-DEA com 1ª resposta eletrofisiológica de *B. taccarivora* diante do perfume de *T. ulei* (↑=respostas). # = 2,3-heptanediona. Fonte: Os autores do presente trabalho.

Observando-se o eletroantenograma (CG-DEA) da Figura 19 foi possível direcionar nossos estudos no sentido de ajustar o *split* utilizado no cromatógrafo para os ensaios (*split* 1:10). Todavia, foram utilizados outros valores para divisão da amostra, a fim de se obter o limite inferior de detecção e, assim, estabelecer a divisão ótima, com a melhor relação sinal/resposta para os ensaios eletroantegráficos (melhor relação entre o sinal do DIC e a mais clara resposta eletrofisiológica). Ainda na Figura 19 se pode observar uma resposta para a diidro-β-ionona (2), o mesmo quando o *split* foi ajustado para 1:30 (Figura 20). Uma nova amostra de *headspace* foi empregada nos testes seguintes, sendo utilizada para todos os ensaios de CG-DEA a partir daqui.

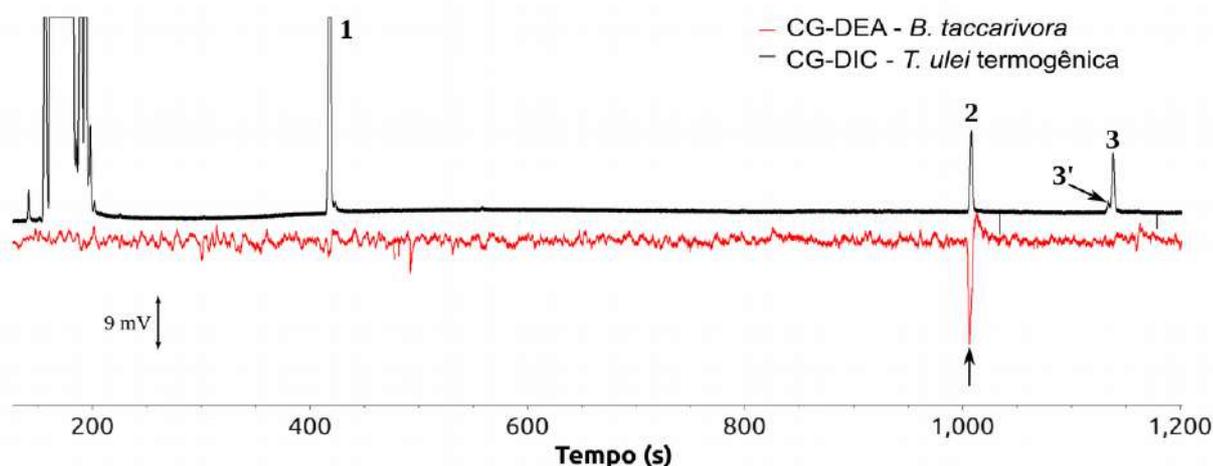


Figura 20: CG-DEA de *B. taccarivora* frente ao *headspace* de *T. ulei* – split 1:30 (↑=respostas). Fonte: Os autores do presente trabalho.

Aparentemente só respostas eletrofisiológicas correspondentes à diidro- β -ionona (2) foram observadas até o momento. Todavia, ao analisar os eletroantogramas (CG-DEA) de forma mais precisa, foi possível observar que também existe uma resposta eletrofisiológica correspondente à (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona (1), porém bastante sutil. Comparando-se vários testes, observa-se uma repetição de uma resposta correspondente a (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona, que se confunde em intensidade com a linha de base (Figura 21). Também é possível observar um pequeno pico eluído logo em seguida à (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona (1). Este pico pertence à 3-OH-5-Me-2-hexanona, que agora aparece melhor resolvido devido as condições de análise já citadas. Outra informação importante que pode ser obtida deste ensaio é o fato das antenas de *B. taccarivora* não apresentarem qualquer estímulo a 3-OH-5-Me-2-hexanona.

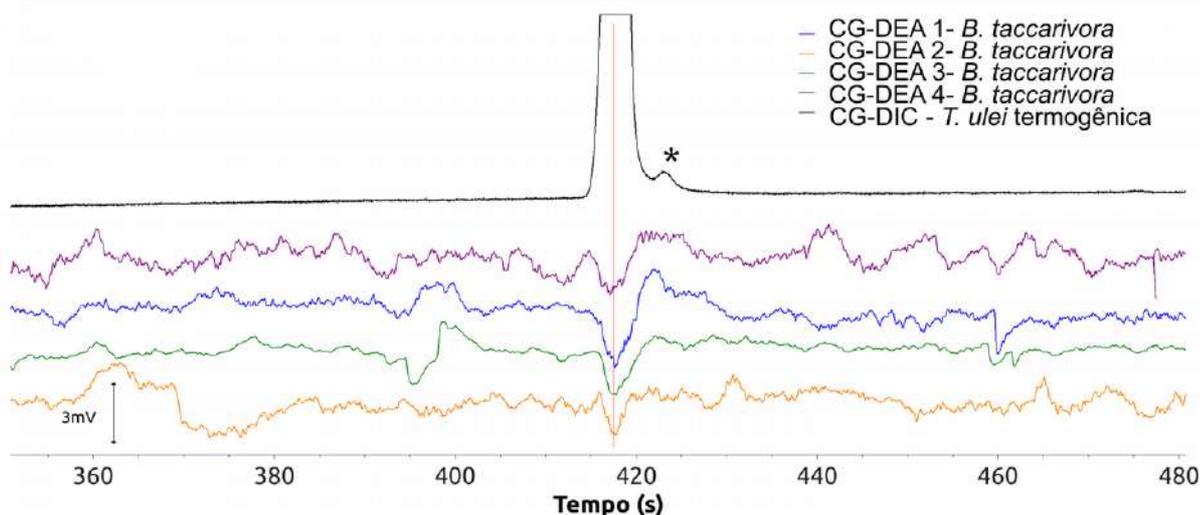


Figura 21: Sobreposição de vários ensaios de CG-DEA de *B. taccarivora* (Richardiidae) diante de (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona em *split* 1:30. * = 3-OH-5-Me-2-hexanona. Fonte: Os autores do presente trabalho.

Contudo, quando o *split* foi ajustado para 1:70 as antenas de *B. taccarivora* apresentaram respostas eletrofisiológicas diante de outros componentes majoritários do odor floral de *T. ulei*, como mostrado na Figura 22. As respostas com maior intensidade foram observadas para a (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona (1) e a já observada para diidro- β -ionona (2). Também é possível observar uma resposta bastante sutil para o terceiro majoritário do odor floral (3). Nem todas as corridas realizadas com *split* 1:70 resultaram numa resposta para o composto não identificado (3), mas em todas ficaram evidentes as respostas para (1) e (2).

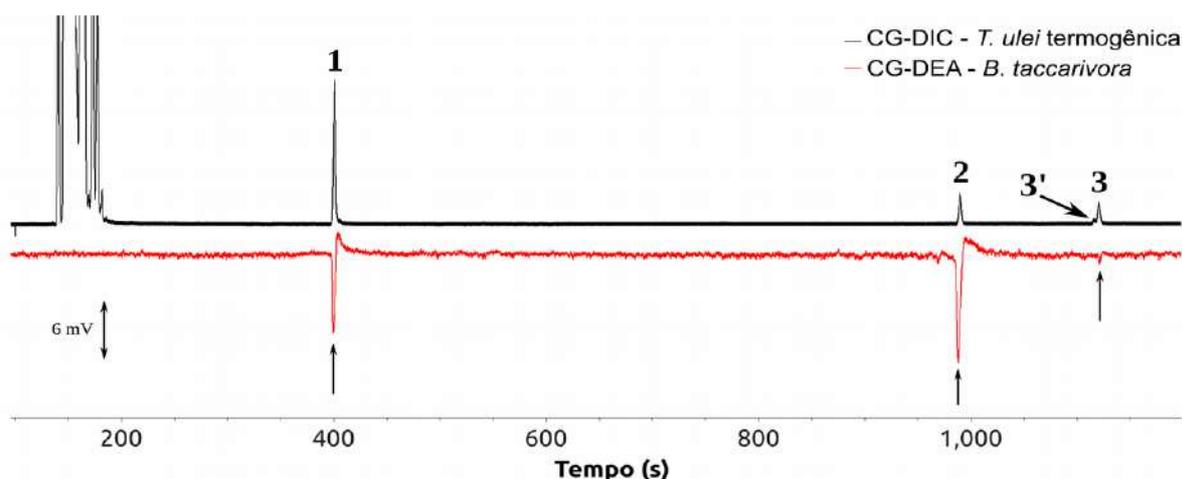


Figura 22: CG-DEA de *B. taccarivora* diante do headspace de *T. ulei* – *split* 1:70. (↑=respostas). Fonte: Os autores do presente trabalho.

A idade dos indivíduos pode influenciar nas respostas eletrofisiológicas em vários insetos (OTTER; TCHICAYA; SCHUTTE, 1991), e, apesar de não ter sido feito um controle da idade dos insetos utilizados – estes foram escolhidos de forma aleatória – assim as repetições das respostas se deram de indivíduos com idades diferentes. Uma explicação para este fato seria a fadiga das antenas diante de uma elevada concentração do analito (HENZELL, 1974). Um outro fator a ser considerado é a sobreposição dos sinais da (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona e da 3-OH-5-Me-2-hexanona (Figura 14). Como nas amostras injetadas num *split* menor a quantidade de 3-OH-5-Me-2-hexanona na alíquota que chega à antena é ainda considerável, de alguma forma a 3-OH-5-Me-2-hexanona possa estar agindo como um inibidor, bloqueando os canais com os quais as antenas levariam a informação da (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona. Quando a divisão da amostra foi ajustada para 1:70 a resolução dos sinais foi melhorada, liberando os canais para a interação com (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona.

As respostas diante da diidro- β -ionona se mostraram bastante pronunciadas em todos experimentos, mas o fato das respostas eletrofisiológicas da (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona apresentarem maior intensidade a baixas concentrações pode ser grande utilidade no ensaios comportamentais, uma vez que, ensaios eletrofisiológicos não são decisivos, porém são direcionadores bastante úteis no caso de misturas complexas das quais deseja-se encontrar princípios ativos.

2.4.5 Análise CG-DEA de *B. taccarivora* diante do *headspace* de inflorescências imaturas de *T. ulei*

Observou-se que mesmo as inflorescências imaturas coletadas estavam infestadas por larvas e até pupas de *B. taccarivora*, inclusive um registro de possíveis ovos foi realizado (Figura 23). Este fato nos motivou a investigar também possíveis voláteis que estariam envolvidos na atração de *B. taccarivora* ao sítio de oviposição.



Figura 23: Ovos de *B. taccarivora* numa inflorescência imatura de *T. ulei*. Fonte: Os autores do presente trabalho.

Os ovos de *B. taccarivora* encontrados nas inflorescências imaturas de *T. ulei* se assemelham aos observados em outra espécie de *Beebeomyia* recém-descoberta, *Beebeomyia tuxtlaensis* Hernández-Ortiz and Aguirre, **sp. nov.** (HERNÁNDEZ-ORTIZ; AGUIRRE, 2015) também numa espécie de Arácea, a *Dieffenbachia oerstedii* Schott (Araceae).

Ensaio de CG-DEA diante dos *headspaces* de inflorescências imaturas e folhas utilizando a dessorção por solvente também foram realizados (Figura 24), entretanto não foram observadas respostas eletrofisiológicas. Vale a pena ressaltar que a concentração dos componentes nessas amostras eram diminutas.

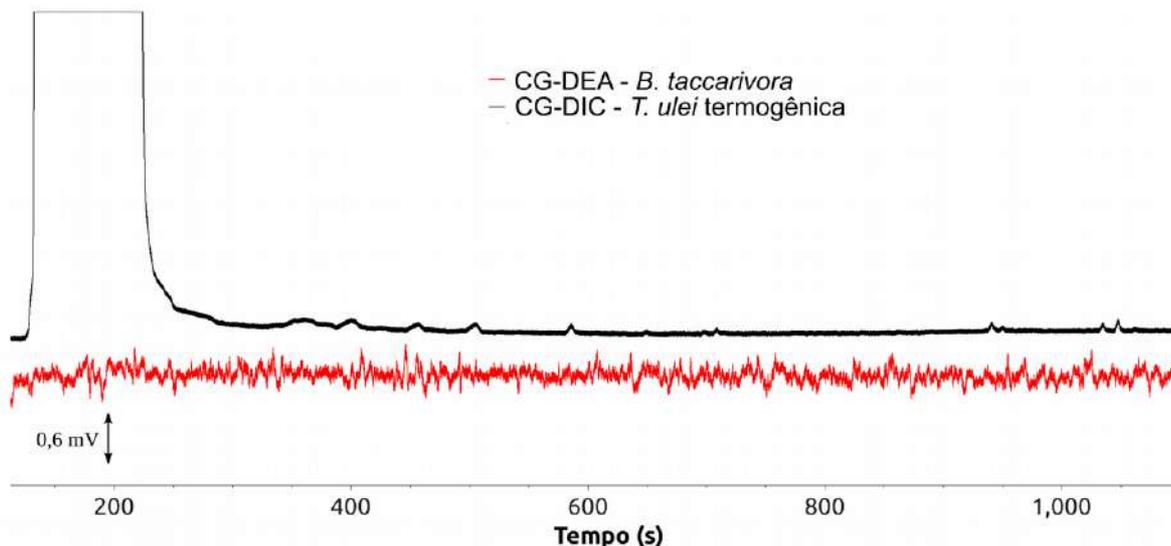


Figura 24: CG-DEA de *B. taccarivora* diante do *headspace* de inflorescências imaturas de *T. ulei*. Fonte: Os autores do presente trabalho.

Uma forma de minimizar o problema das concentrações dos compostos é o aumento do tempo de extração no *headspace*, seguido do aumento da quantidade de matriz adsorvente. A pré-concentração das amostras foi testada, porém as impurezas do solvente se tornaram mais evidentes após o procedimento, o que veio a prejudicar a identificação de possíveis analitos.

2.4.6 Biotestes

2.4.6.1 Ensaios de dupla escolha

Os experimentos no olfatômetro “Y” seguintes foram realizados sempre no turno da manhã, com insetos individuais e são mostrados na Tabela 3. Para o teste de atratividade do perfume floral de inflorescências termogênicas foram observados 90 fêmeas e 34 machos de idades aleatórias. Nossos resultados mostram que o perfume floral é

altamente atrativo para machos e fêmeas de *B. taccarivora* (Teste binomial exato, $p < 0,001$) e ambos os sexos responderam similarmente neste e nos demais testes (Teste exato de Fisher $0,27 \leq p \leq 1,0$, Figura 25). Estes resultados reforçam a hipótese de um canal químico (neste caso o perfume floral) sendo utilizado pelo florívoro para encontrar as inflorescências de *T. ulei*. Os ensaios eletrofisiológicos mostraram que as antenas de *B. taccarivora* responderam aos principais majoritários do perfume (S)-2-OH-5-Me-3-hexanone e diidro- β -ionona. Os testes seguintes foram então direcionados a esses componentes isolados e suas misturas binárias.

Tabela 3: Respostas dos testes de dupla escolha de *B. taccarivora* diante do odor floral de *T. ulei* e seus compostos majoritários isolados.

Tratamento	Nº de indivíduos por resposta			Total
	Teste	Controle	n.a.	
HS <i>T. ulei</i> x hexano destilado	65	29	30	124
(S)-2-OH-5-Me-3-hexanone x hexano destilado	13	10	15	38
diidro- β -ionona x hexano destilado	28	12	7	47
M1A x hexano destilado	8	6	8	22
M2A x hexano destilado	10	4	4	18
(S)-2-OH-5-Me-3-hexanone x HS <i>T. ulei</i>	7	20	2	29
diidro- β -ionona x HS <i>T. ulei</i>	17	10	3	30

Fonte: Os autores do presente trabalho.

Um fator limitante nos testes comportamentais foi a disponibilidade de insetos. A quantidade de larvas e pupas coletadas variava bastante entre as inflorescências infestadas, além de não ter sido realizado o controle de idade dos insetos por questão de logística; eram necessárias várias gaiolas para separar os indivíduos de acordo com a idade, o que tornou esse procedimento inviável. As coletas eram feitas semanalmente levando a uma larga variedade de idades dos insetos no decorrer da temporada.

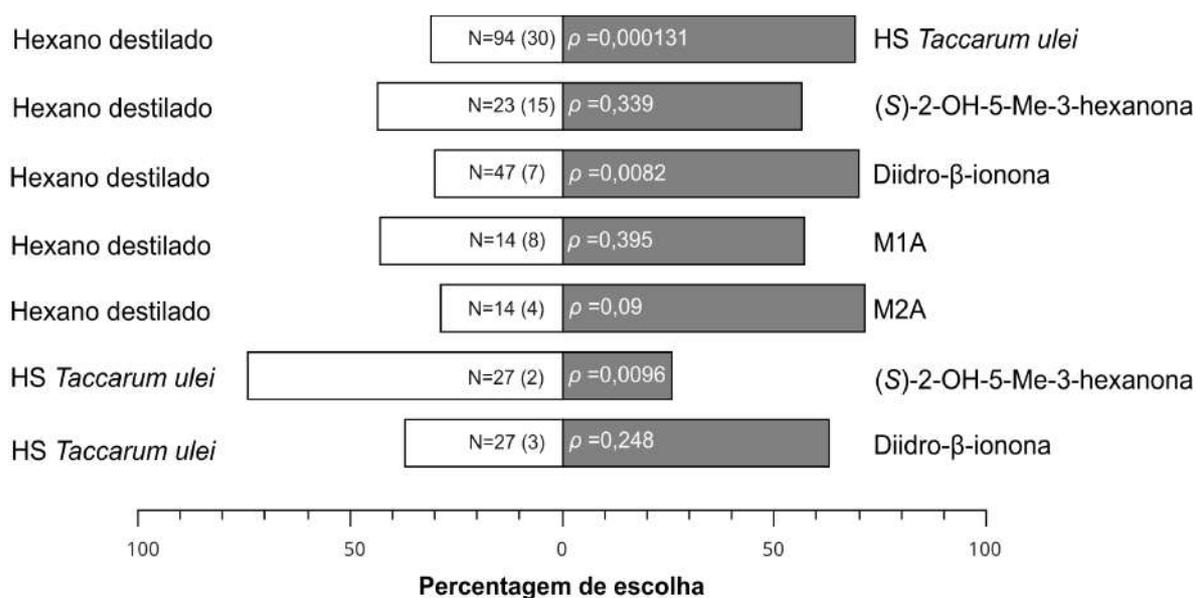


Figura 25: Resultados dos ensaios comportamentais de *B. taccarivora* diante do perfume floral e compostos isolados do perfume de inflorescências de *T. ulei*. N=número de observações que resultaram numa escolha. Os valores entre parênteses indicam o número de indivíduos que não apresentaram uma resposta clara nos testes (n.a.). Fonte: Os autores do presente trabalho.

Nos testes com os compostos isolados foram utilizados 10 μ g de (S)-2-OH-5-Me-3-hexanone aproximadamente diante do controle, contudo não houve preferência significativa entre as escolhas ($p= 0,339$). No entanto quando a mesma quantidade de diidro- β -ionona foi testada (10 μ g), este composto de mostrou atrativo em relação ao controle ($p= 0,0082$). Este resultado é muito importante, uma vez que diante desses fatos é possível observar que a diidro- β -ionona exerce o papel de componente atrativo para o florívoro de *T. ulei*. Vale a pena ressaltar que a diidro- β -ionona foi observada tanto em inflorescências imaturas (ainda fechadas) em diferentes estágios de maturação até nas inflorescências antéticas, em diferentes concentrações. Apesar disso observa-se também que a atratividade da diidro- β -ionona em nossos testes foi menos acentuada que a observada no *headspace* de inflorescências antéticas naturais.

Isso nos motivou a investigar se o efeito sinérgico entre os compostos ativos eletrofisiologicamente seria o responsável por tais diferenças nos testes comportamentais. Para isso duas misturas sintéticas foram testadas M1A (1:1 de (S)-2-OH-5-Me-3-hexanone e diidro- β -ionona e M2A (7:3 de (S)-2-OH-5-Me-3-hexanone : diidro- β -ionona, mimetizando a proporção observada nas inflorescências naturais no momento da antese

que foram realizadas a maioria das coletas de odor floral) em relação ao controle. As misturas sintéticas não se mostraram significativamente atrativas (M1A, $p= 0,395$ e M2A, $p= 0,09$).

Também foram realizados testes de atratividade de dupla escolha com os compostos isolados em relação ao perfume floral, onde $10\mu\text{g}$ de (S)-2-OH-5-Me-3-hexanone foi significativamente diferente do odor floral (este último como controle), com preferência de escolha para o *headspace*, todavia não houve diferença significativa entre a diidro- β -ionona e o *headspace* de inflorescências antéticas naturais, o que reforça a hipótese de um caminho está sendo usado por *B. taccarivora* para localizar as inflorescências de *T. ulei*. O fato de diidro- β -ionona ser liberada pelas inflorescências de *T. ulei* em diferentes estágios de maturação também explicaria a visita/oviposição do florívoro também em diferentes momentos.

Uma espécie do gênero *Beebeomyia* foi recentemente descrita (HERNÁNDEZ-ORTIZ; AGUIRRE, 2015) e os autores fizeram observações da interação entre a espécie recém descrita *Beebeomyia tuxtlaensis* e sua planta hospedeira *Dieffenbachia oerstedii* (Araceae), onde a mosca foi flagrada ovipositando na inflorescência da arácea ainda fechada. No entanto, nenhum dado sobre o caminho utilizado pelo florívoro para chegar as inflorescências foi realizado. Esse fato abre um precedente para este comportamento no momento da oviposição de *B. taccarivora*, que aparentemente segue este padrão com as inflorescências de *T. ulei* que, com o presente trabalho, ficou demonstrado que o florívoro encontra as inflorescências através do perfume floral.

2.4.7 *Headspace* das inflorescências de *Gearum brasiliense*

As inflorescências de *G. brasiliense* foram submetidas a um *headspace* da mesma forma que as inflorescências de *T. ulei*, conforme a literatura (MAIA et al., 2013b). A identificação da composição do perfume do buquê de *G. brasiliense* é descrita na Tabela 4.

Tabela 4: Identificação do *headspace* contendo o perfume floral de *Gearum brasiliense*.

Nome do composto	Índice de retenção calculado	Índice de retenção da literatura	Área relativa (%) ± desvio padrão
Metil benzoato	1094	1094 ^a	0,54±0,01
(<i>E</i>)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno	1120	1116 ^b	43,34±0,37
Veratrol	1148	1141 ^c	3,54±0,02
Metil salicilato	1195	1194 ^d	5,46±0,03
Metil 2-metoxibenzoato	1341	1335 ^e	1,04±0,02
(<i>Z</i>)-Jasmona	1404	1404 ^{c,f}	42,08±0,37
(<i>E,E</i>)- α -Farneseno	1510	1509 ^{c,e}	0,08±0,00
(<i>E</i>)-Nerolidol	1566	1568 ^{c,e}	2,49±0,03
Não identificados			1,42
Total identificados			98,58

Fonte: Os autores do presente trabalho. ^a (NIST, 2015a), ^b (SCHMIDT-BÜSSER et al., 2011), ^c (ADAMS, 2007), ^d (NIST, 2015b), ^e (BERTRAND; COMTE; PIOLA, 2006), ^f (SOTOMAYOR et al., 2004).

O homoterpeno (*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno é conhecido por ser liberado após danos causados por herbivoria em várias espécies de plantas (CARROLL; SCHMELZ; TEAL, 2008; HATANO et al., 2015; ISHIWARI; SUZUKI; MAEDA, 2007; MAGALHÃES et al., 2016). Este composto é o majoritário em vários perfumes florais de *Yucca* sp. (Agavaceae) em regiões áridas da América Central e do Norte, sendo o composto chave na atração da mariposa *Cydia pomonella* (Lepidoptera, Tortricidae) (KNIGHT; LIGHT, 2012). Foi também observado como componente minoritário no perfume floral de aráceas como em *Anthurium salvadorensense* (SCHWERDTFEGGER; GERLACH; KAISER, 2002) e *Philodendron adamantinum* (PEREIRA et al., 2014). No perfume floral de *G. brasiliense* do presente estudo este composto foi observado com 43,34% da composição volátil. O segundo maior componente do perfume, a (*Z*)-Jasmone integra vários perfumes florais (KNUDSEN et al., 2006), incluindo inflorescências de Araceae. Muitas delas visitadas por besouros da tribo Cyclocephaline (PEREIRA et al., 2014). *G. brasiliense* também é visitada por besouros escarabeídeos da tribo Cyclocephaline (GONÇALVES; MAIA, 2006), no entanto estudos mais aprofundados sobre o papel deste componente na atração dos besouros ainda não foi descrita.

A composição do perfume floral de inflorescências antéticas de *G. brasiliense* é inédita, assim como não há dados sobre o caminho utilizado por seus visitantes para localizar suas inflorescências. Da mesma forma que *T. ulei*, *B. taccarivora* chegam nas inflorescências de *G. brasiliense* em diferentes estágios de maturação, onde depositam seus ovos. Mesmo a mais de 1.500 Km de distância, temos a mesma espécie de mosca predando uma outra espécie de Arácea, porém a composição química do odor de *G. brasiliense* é completamente diferente da encontrada no *T. ulei*. Com isso temos duas populações da mesma espécie de mosca, que nomeamos de *população 1* aos indivíduos que foram coletados nas inflorescências de *T. ulei* e *população 2* aos indivíduos que foram coletados em inflorescências de *G. brasiliense*.

Não foi possível realizar o estudo da dinâmica de emissão de compostos voláteis de *G. brasiliense* devido ao elevado custo para realização desta etapa. Assim, os testes eletrofisiológicos foram realizados com amostras de *headspace* dinâmico com dessorção por solvente em apenas um momento da antese floral (por volta das 17h) .

2.4.8 Análise de CG-DEA de *B. taccarivora* com o perfume do buquê de *Gearum brasiliense*

Para testar a hipótese de que o odor floral de *G. brasiliense* estaria sendo usado por *B. taccarivora* (*população 2*) para localizar seu sítio de oviposição, testes eletrofisiológicos dessas moscas diante do perfume de *G. brasiliense* foram realizados. Fazendo-se uso da mesma metodologia de montagem de antenas que foi utilizada para analisar o odor floral de *T. ulei*, também foi realizado o ensaio de cromatografia gasosa com detecção eletroantegráfica para avaliar possíveis compostos ativos no perfume de *G. brasiliense*. O resultado dos estudos eletrofisiológicos pode ser observado na Figura 26.

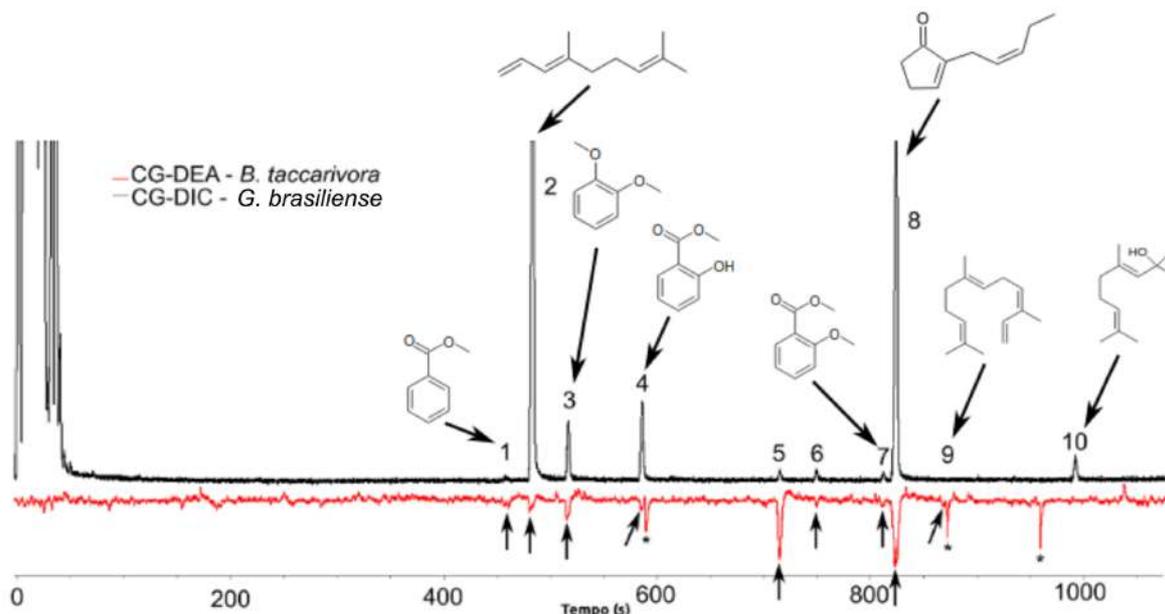


Figura 26: CG-DEA de *B. taccarivora* (Richardiidae) população 2 com headspace contendo o perfume floral inflorescências antéticas de *Gearum brasiliense*. (↑=respostas, *=artefato ou repostas não reproduzíveis). Fonte: Os autores do presente trabalho.

Como pode ser visto na Figura 26, vários compostos se mostraram ativos no ensaio eletrofisiológico. É notável a diferença na intensidade das despolarizações das antenas do inseto diante de diferentes proporções dos componentes do perfume floral. Mesmo a concentrações baixíssimas de analito, da qual quase não é possível diferenciar a resposta do DIC de sua linha de base, como no sinal 9 ((*E,E*)- α -farneseno), é possível distinguir as despolarização da antena da linha de base.

Como observação pessoal notou-se na montagem dos experimentos de eletrofisiologia certa dificuldade de estabilização das antenas de *B. taccarivora* população 2 em relação a população 1. Mesmo com o parecer taxonômico indicando que ambas populações são da mesma espécie, foi possível constatar certos comportamentos que as diferenciavam. Os indivíduos da população 2 se mostraram mais ariscos na gaiola de criação em relação aos indivíduos da população 1. Este comportamento aparentemente também se reproduziu nos ensaios eletrofisiológicos, elevando-se o grau de dificuldade para estabilização das antenas.

As respostas obtidas nos ensaios eletrofisiológicos são bons indicativos para hipótese de um caminho químico também ser utilizado pelo florívoro para encontrar as inflorescências de *G. brasiliense*, no entanto não significa que estes estímulos necessariamente levarão a respostas comportamentais no sentido de atratividade, ou mesmo a qualquer resposta comportamental. Não foi possível realizar ensaios comportamentais com a *população 2* de *B. taccarivora*, devido a disponibilidade de insetos. Como visto nos ensaios de CG-DEA, as antenas de *B. taccarivora* responderam vários compostos do perfume floral de *G. brasiliense*, o que eleva o grau de dificuldade, em relação ao *T. ulei*, para se determinar qual(is) é(são) o(s) composto(s) responsável(is) por uma eventual resposta comportamental.

2.5 Conclusões

A identificação dos odores florais de *T. ulei* e *G. brasiliense* foram satisfatórias, abrangendo mais de 80% das respectivas composições. O estudo da dinâmica de emissão de voláteis das inflorescências termogênicas de *T. ulei* revelou que os principais componentes do perfume floral são emitidos em proporções variáveis no decorrer da antese. Além disso, os componentes majoritários nas inflorescências antéticas, (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona e diidro- β -ionona, também foram detectados em pequenas concentrações em inflorescências imaturas.

A criação de *B. taccarivora* foi realizada satisfatoriamente, apesar de não haver registros da biologia dessa espécie na literatura. Os ensaios eletrofisiológicos foram bem sucedidos, tendo resultado em respostas claras para os majoritários da composição volátil de *T. ulei* e *G. brasiliense*.

Os ensaios comportamentais de dupla escolha no olfatômetro “Y” demonstraram que o *headspace* de inflorescências antéticas de *T. ulei* e o majoritário diidro- β -ionona foram significativamente mais atrativos que o controle. Desta forma, ficou comprovado que *B. taccarivora* utiliza um semioquímico, mais especificamente a diidro- β -ionona, para localizar as inflorescências de *T. ulei* em diferentes estágios de desenvolvimento.

2.6 Perspectivas

Determinar a quantidade mínima do perfume floral de *Taccarum ulei* e da diidro- β -ionona necessária para desencadear uma resposta eletrofisiológica nas antenas de *Beebeomyia taccarivora*, através de experimentos de eletroantenografia (EAG);

Realizar ensaios de atratividade do campo com o perfume floral de *T. ulei* e diidro- β -ionona;

Realizar testes de atratividade em laboratório com *B. taccarivora* diante do perfume floral de *Gearum brasiliense* e os compostos ativos nos ensaios eletrofisiológicos;

Realizar ensaios de atratividade do campo com o perfume floral de *G. brasiliense* e os possíveis compostos ativos nos ensaios de atratividade em laboratório;

3 COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper corcovadensis* (PIPERACEAE)

3.1 Introdução

A família das piperáceas é constituída por mais de 4000 espécies distribuídas em 5 gêneros: *Manekia*, *Peperomia*, *Piper*, *Verhuellia* e *Zippelia* (GUTIERREZ; GONZALEZ; HOYO-VADILLO, 2013; SAMAIN et al., 2008). *Piper* é o maior gênero da família abrangendo aproximadamente 2000 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (JARAMILLO; MANOS, 2001; PARMAR et al., 1997) (Figura 36).

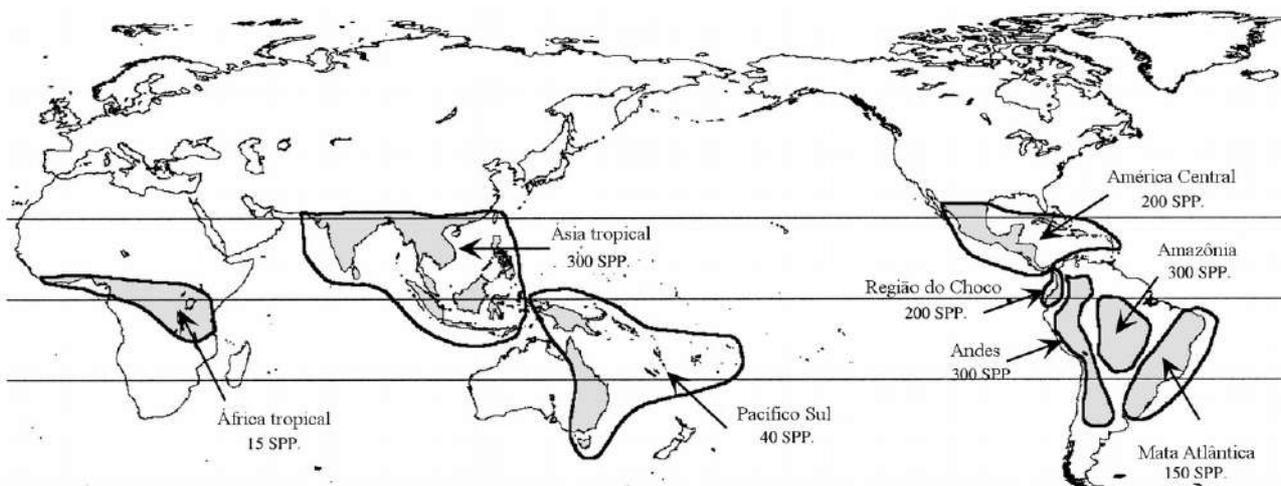


Figura 36: Distribuição gênero *Piper*. Fonte: Adaptada de (JARAMILLO; MANOS, 2001).

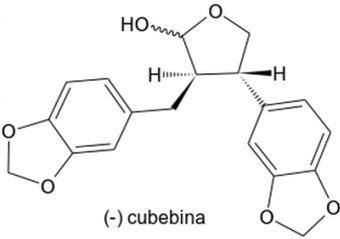
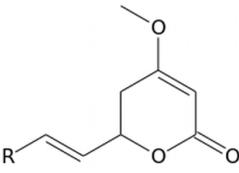
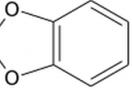
O gênero *Piper* possui grande importância ecológica e econômica. Vários estudos sobre as relações ecológicas podem ser encontrados, envolvendo desde as mais variadas interações com insetos, assim como aves e morcegos (DE FIGUEIREDO, 2000; DYER; PALMER, 2004; RAMOS; VANIN; KATO, 2008). Uma das mais conhecidas espécies desse gênero é a *Piper nigrum*, mais conhecida no Brasil pelo nome popular de “pimenta do reino”. Esta espécie é amplamente utilizada ao redor do globo, principalmente nas culturas indiana e chinesa, sendo empregada para diversos fins, desde medicinais a

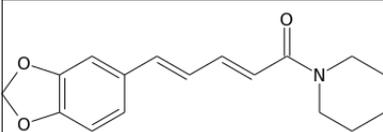
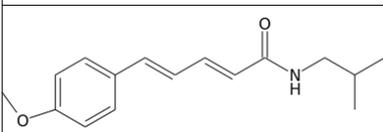
culinários (LIN et al., 2006; MARQUES, 2009; MEHMOOD; GILANI, 2010; NUNES et al., 2007). O comércio de metabólitos secundários provenientes de espécies de *Piper* possui boa representatividade no Brasil, como do dilapiol, inseticida natural isolado da *P. aduncum* (MAIA et al., 1998; SILVA et al., 2007). No entanto, um dos mais requisitados metabólitos extraídos de espécies de *Piper* é o safrol, um alilbenzeno utilizado na indústria tanto como inseticidas piretróides ou como precursor na síntese do fármaco metilenodioximetanfetamina (MDMA, ou “ecstasy”) (BARREIRO; FRAGA, 1999; MAIA et al., 1987; NUNES et al., 2007).

3.1.1 Metabólitos identificados em espécies do gênero *Piper*

Os compostos identificados em espécies de *Piper* são geralmente flavonoides, amidas, lignanas, terpenos, esteroides, propenilfenóis, alcaloides, etc. (DYER; PALMER, 2004; MARQUES, 2009; PARMAR et al., 1997). Na Tabela 5 podemos observar algumas estruturas identificadas em espécies de *Piper* com várias atividades biológicas descritas.

Tabela 5: Alguns exemplos de compostos isolados de espécies de *Piper* e suas respectivas atividades biológicas.

Estrutura	Espécies	Atividade	Referências
 <p>(-) cubebina</p>	<i>P. cernuum</i> <i>P. clusii</i> <i>P. cubeba</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. trichostachyon</i>	Antibacteriana Anti-histamínica Anti-inflamatória Tripanomicida Antileishmanial	(BODIWALA et al., 2007; DANELUTTE et al., 2005; DE SOUZA et al., 2005; HIRATA et al., 2008; KOUL et al., 1983, 1988; REZENDE et al., 2016)
 <p>R=  , Metisticina</p> <p>R= fenil, Cavaína</p>	Metisticina <i>P. methysticum</i>	Hepatotóxica Herbicida Antifúngica Ansiolítica	(FU et al., 2008; SMITH et al., 2001; XUAN et al., 2006)
	Cavaína <i>P. methysticum</i> <i>P. rusbyi</i>	Ansiolítica Antitrombótica Atenuação da contratilidade vascular Leishmanicida	(BANERJI; DHARA, 1974; MARTIN et al., 2002; PARMAR et al., 1997; SMITH et al., 2001; WHITTON et al., 2003)

 <p>Piperina</p>	<p><i>P. guineense</i> <i>P. hancei</i> <i>P. khasiana</i> <i>P. longum</i> <i>P. macropodum</i> <i>P. nepalense</i> <i>P. nigrum</i> (+ 21)</p>	<p>Inseticida, Estimulante de Proliferação de Melanócitos Antitumoral Tripanomicida Antimicrobiana Imunomodulatória Antiinflamatória</p>	<p>(ADDAE-MENSAH et al., 1977; BANERJI; DHARA, 1974; BEZERRA et al., 2006; GUPTA; ATAL; GAIND, 1972; HIRATA et al., 2008; JONG-WOONG et al., 1992; LEE et al., 2005, 2001; NARUI et al., 1995; PARMAR et al., 1997; PATRA; GHOSH, 1974; RIBEIRO et al., 2004; SCOTT et al., 2002; STÖHR; XIAO; BAUER, 2001; SUNILA; KUTTAN, 2004)</p>
 <p>Piperovatina</p>	<p><i>P. alatabaccum</i> <i>P. callosum</i> <i>P. laetispicum</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. piscatorum</i> <i>P. scutifolium</i></p>	<p>Inseticida Piscicida Anti-inflamatória Anestésica Bactericida Carrapaticida</p>	<p>(ANTUNES et al., 2001; COSTA; MORS, 1981; CUNICO et al., 2006, 2007; FACUNDO; DA SILVEIRA; MORAIS, 2005; FACUNDO; MORAIS; BRAZ FILHO, 2004; FANG et al., 2007; JENSEN et al., 2006; MAKAPUGAY et al., 1983; MCFERREN et al., 2002; MCFERREN; RODRIGUEZ, 1998; RODRIGUES SILVA et al., 2008)</p>

Fonte: Adaptada de (MARQUES, 2009).

3.1.2 Atividades biológicas de *Piper*

As atividades biológicas associadas a espécies do gênero *Piper* são as mais variadas, podemos citar propriedades citotóxica (ORJALA et al., 1994), inseticida (LIMA et al., 2009), bactericida (DOGNINI et al., 2012), leshimanicida (GHOSAL et al., 2012) e fungicida (DA SILVA et al., 2014) entre tantas outras obtidas de seus extratos ou óleos essenciais (Tabela 5). *Piper permucronatum*, *Piper hostmanianum* e *P. marginatum* se

mostraram ativos no combate às larvas do mosquito transmissor da dengue, o *Aedes aegypti*, com valores de LC₅₀ de 36, 54 (mg/mL, (DE MORAIS et al., 2007)) e 14,3 ppm (AUTRAN et al., 2009) respectivamente.

Várias espécies de plantas do gênero *Piper* são empregadas na medicina popular de países tropicais como Brasil, China, Índia, Jamaica e México (PARMAR et al., 1997). Por exemplo, *Piper cernuum* (conhecida popularmente como “pimenta-de-morcego”) é usada no Brasil no combate à cólicas abdominais (STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). Também podemos citar as espécies *Piper marginatum* e *Piper tuberculatum* usadas como sedativos em casos de picadas de cobra (DE ARAÚJO JÚNIOR et al., 1999; STASI; HIRUMA-LIMA, 2002) .

O terpeno terpinoleno foi identificado no óleo essencial de várias espécies de *Piper*, tais como *P. xylosteoides* (POTZERNHEIM et al., 2006), *Piper reginellii* (DOS SANTOS et al., 2015), *Piper aleyreanum* (DA SILVA et al., 2014) e vários outros exemplos (BAGHERI; ABDUL MANAP; SOLATI, 2014; PÉRES et al., 2009; PIMENTEL et al., 2013). Na grande maioria das ocorrências esse componente foi observado em pequenas quantidades (abaixo de 1%, com exceção de *P. hispidinervum* (5,4%) (SAUTER et al., 2012), *P. aduncum* (2,06%) e *P. xylosteoides* (1,4%) (POTZERNHEIM et al., 2006)). Na literatura é possível encontrar importantes atividades biológicas relacionadas ao terpinoleno, tais como antiviral (BAGETTA, 2012), inibidor de proteínas em células de câncer (MATSUDA, 2011) e um potente larvicida diante de *A. aegypti* e *A. albopictus* (CHENG et al., 2009).

O arbusto *Piper corcovadensis* (Miq) C. DC (sin. *Ottonia corcovadensis*) conhecido popularmente como falso jaborandi é usado na medicina popular em algumas regiões brasileiras no combate a dores de dente. Segundo a literatura (MARQUES, 2009) a piperovatina (Tabela 5), um composto com diversas atividades biológicas associadas e majoritário dos extratos das folhas, caule e raízes de *P. corcovadensis*. A composição do óleo essencial das folhas de *P. corcovadensis* já foi publicada (FACUNDO; MORAIS; BRAZ FILHO, 2004), entretanto no presente trabalho mostraremos a identificação do óleo essencial da população de uma região diferente da publicada anteriormente. Adicionalmente foram realizados ensaios larvicidas e de oviposição frente ao mosquito *A.*

aegypti, para o óleo essencial das folhas de *P. corcovadensis* e os compostos majoritários isolados.

3.2 Objetivos

3.2.1 Geral

Estudar a composição e atividades larvicida e deterrente do óleo essencial do arbusto *Piper corcovadensis* (Miq) C. DC (Piperaceae) frente ao mosquito *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae)

3.2.2 Específicos

Analisar a composição volátil do óleo essencial de *Piper corcovadensis*;

Realizar ensaios larvicidas com o óleo essencial e compostos majoritários isolados de *Piper corcovadensis* frente às larvas do *A. aegypti*;

Realizar ensaios de deterrência de oviposição com o óleo essencial e compostos majoritários isolados de *Piper corcovadensis* frente às larvas do *A. aegypti*;

3.3 Materiais e Métodos

3.3.1 Material vegetal

Folhas de *Piper corcovadensis* foram coletadas do Jardim Botânico do Recife. O material foi autenticado e depositado por Jefferson Rodrigues Maciel (código de identificação: J. R. MACIEL 1655).

3.3.2 Obtenção do óleo essencial

Num balão de 5L foram adicionados aproximadamente 500g de folhas frescas de *P. corcovadensis* e 2,5L de água destilada. O material foi submetido à hidrodestilação, num aparelho tipo-Clevenger, por 3h. Separou-se então o óleo essencial do hidrolato. O óleo então foi seco em sulfato de sódio anidro e estocado num freezer a -18°C para posterior análise. O rendimento da extração foi calculado pela razão entre a massa de óleo essencial obtida e a massa de folhas frescas utilizada na hidrodestilação. O material vegetal residual foi então filtrado obtendo-se o extrato aquoso que foi armazenado num frasco âmbar sob refrigeração em geladeira. O procedimento foi repetido por 3 vezes.

3.3.3 Identificação e quantificação dos componentes do óleo essencial

A quantificação (área relativa) dos componentes dos perfumes florais de *T. ulei* e *G. brasiliense* foi obtida através da média de 3 análises, num cromatógrafo gasoso (Thermo Trace GC Ultra, Thermo Scientific, Milan, Italy) com detector por ionização de chama (DIC). Para cada análise 1µL das amostras dos odores florais obtidos em *headspace* foram analisados em modo *splitless* nas seguintes condições: 40°C inicial por

2min, então 4°C/min até 230°C (a temperatura do injetor e do detector foi ajustada para 250°C), mantendo-se nesta temperatura por mais 5min. Nitrogênio foi utilizado como fase móvel a um fluxo de 1mL/min numa coluna VB-5, 30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, ValcoBond.

Os compostos foram identificados através da co-injeção da amostra com uma série homóloga de hidrocarbonetos (C₈-C₂₉) num cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM) modelo Agilent Technologies J&W, coluna HP-5, 60 m, 0,25 mm, 0,25 µm) sob as mesmas condições de aquecimento usadas no CG-DIC. Adicionalmente 230°C para a fonte de íons (70 eV) e 150°C para o quadrupolo - Agilent 5975C Series, Agilent Technologies, Palo Alto, USA, 0,5 scan/s, abrangendo a faixa *m/z* de 35 a 350. Os índices de retenção foram calculados através da equação de Van Den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL; DEC. KRATZ, 1963) e comparadas à literatura juntamente aos respectivos espectros e massas. A comparação com padrões analíticos também foi utilizada, quando estes eram disponíveis.

$$IR = 100 \times i \times \left[\frac{Tr_{(\alpha)} - Tr_{(n)}}{Tr_{(n+1)} - Tr_{(n)}} \right] + 100 N$$

Equação de Van Den Dool and Kratz

Equação de Van Den Dool e Kratz: em que **Tr_(α)** é o tempo de retenção do composto α em questão; **Tr_(n)** é o tempo de retenção do hidrocarboneto que elui antes de α; **Tr_(n+1)** é o tempo de retenção do hidrocarboneto que elui depois de α; **i** é diferença do número de carbonos entre os hidrocarbonetos que eluem depois e antes do composto de α e **N** é número de carbonos presente no hidrocarboneto que elui antes de α.

3.3.4 Isolamento e caracterização do 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno (BMDB)

Deixou-se 80 mg de óleo essencial de *P. corcovadensis* eluir numa placa para cromatografia de camada fina - CCD (placa de vidro 20x20 equipada com sílica gel revestida com indicador fluorescente F₂₅₄) em hexano destilado, em seguida os compostos foram revelados com luz ultravioleta. A faixa de sílica com fator de retenção (Rf) = 0,27 foi cuidadosamente removida e lavada em hexano destilado. A mistura foi filtrada e o solvente removido. Para as análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio e carbono foi utilizado um Varian Unity Plus (¹H, 300 MHz e ¹³C, 75MHz) e a amostra contendo o analito foi dissolvida com clorofórmio deuterado (CDCl₃).

3.3.5 Ensaios larvicidas

Os ensaios da atividade larvicida frente às larvas de quarto instar (L4) do *Aedes aegypti* foram realizados para o óleo essencial de *P. corcovadensis*, terpinoleno, 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno (BMDB), hidrolato e extrato aquoso. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Ecologia Química (LEQ-UFPE). Uma metodologia adaptada da Organização Mundial de Saúde (SANTOS et al., 2012; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005) foi empregada para execução dos ensaios. Foi realizado inicialmente o teste preliminar com 20 larvas do mosquito (L4) para soluções de 10, 50 e 100ppm da amostra a ser testada. As soluções foram preparadas adicionando-se 0,005g da amostra e 0,1g de Tween[®]80, completando-se o volume para 100mL com água destilada num balão volumétrico de mesmo volume. O controle negativo foi realizado com água destilada e Tween[®]80 (exceto para o teste com hidrolato e extrato aquoso, nos quais utilizou-se somente água destilada) e como controle positivo foi utilizada uma solução de Themephos (0,01 ppm), ambas sob as mesmas condições das amostras teste. Após 24h foi realizada a vistoria da mortalidade, assim como de quaisquer alterações comportamentais ou morfológicas das larvas. Um nova vistoria foi realizada após 48h de exposição ao agente testado. Foram consideradas mortas as larvas que não responderam a estímulos físicos ou não apresentaram o movimento de convexão (subir à superfície e

descer no recipiente), natural para larvas em estado normal. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. As novas concentrações testadas foram baseadas no resultado do teste preliminar. A CL_{50} foi determinada através de análise de sobrevivência *Probit* no software Statplus® 2008, com intervalo de confiança de 95% (SANTOS et al., 2012).

3.3.6 Ensaios de oviposição

Para os testes de deterrência foram utilizadas 10 fêmeas de *A. aegypti*, grávidas, numa gaiola de tela 33 x 21 x 30 cm. Dentro das gaiolas foram colocados dois copos plásticos (10 cm de diâmetro) dispostos em lados diagonalmente opostos. Dentro de um dos copos foi adicionado 25mL da solução contendo o óleo essencial/composto isolado a ser testado e no outro copo 25mL da solução controle. A solução teste (50 ppm) foi preparada diluindo-se 10 mg do óleo essencial em 1,4 mL de etanol completando-se o volume final de 200mL com água destilada. A superfície interna dos copos foi preenchida com um pedaço de papel de filtro (12x12 cm), dobrado forma de cone (Figura 37).



Figura 37: Recipiente utilizado nos ensaios de deterrência. Fonte: Foto de Júlio Aguiar.

Depois dos copos contendo as amostras serem adicionados nas gaiolas, estas foram mantidas no escuro por 16h a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $70 \pm 5\%$. Após esse período os ovos depositados nos papéis de filtro em cada copo foram contados. Os experimentos foram replicados 6 vezes. Diferenças entre os valores médios de ovos em cada ensaio foram analisados utilizando o teste-*t* de Student, onde foram considerados

significativamente diferentes quando $p < 0,05$ (AUTRAN et al., 2009; SANTOS et al., 2012). O mesmo procedimento foi realizado com o composto isolado 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno (15 ppm) e terpinoleno (8,5 ppm).

3.4 Resultados e discussão

3.4.1 Obtenção, identificação e quantificação do óleo essencial

O procedimento de hidrodestilação das folhas de *P. corcovadensis* resultou num óleo claro, com rendimento de 0,21% m/m. A identificação dos componentes do óleo essencial mostrou que este é composto predominantemente por monoterpenos (35,08%) e sesquiterpenos (20,42%), contudo um componente era responsável por 30,62% da composição. Não foi possível identificar este composto por comparação do índice de retenção/espectro de massas com a literatura (ADAMS, 2007). A composição do óleo essencial pode ser vista na Tabela 6.

Tabela 6: Identificação da composição volátil do óleo essencial das folhas de *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC.

Nº	Compostos*	Índice de retenção (IR)		Contribuição na composição (como % do óleo)	
		Calculado	Literatura ^c	± desvio padrão	
1	α-pineno	932	932	5,92	0,119
2	Sabineno	972	969	0,20	0,081
3	β-pineno	974	974	2,59	0,553
4	β-mirceno	991	988	1,89	0,044
5	α-felandreno	1003	1002	0,80	0,151
6	Careno <δ-3>	1009	1008	1,06	0,201
7	α-terpineno	1016	1014	0,27	0,009
8	Cimeno <para->	1024	1020	0,29	0,016
9	Limoneno	1028	1024	4,46	0,140
10	γ-Terpineno	1058	1054	0,16	0,034
11	terpinoleno	1088	1086	17,44	0,181

12	<i>trans</i> -sabinol	1135	1137	0,15	0,037
13	α -copaeno	1378	1374	0,73	0,027
14	Não identificado	1402	--	30,62	0,931
15	α -gurjuneno	1412	1409	0,56	0,083
16	<i>trans</i> -cariofileno	1422	1417	6,27	0,049
17	β -gurjuneno	1435	1431	0,54	0,028
18	α -humuleno	1458	1452	0,57	0,088
19	<i>allo</i> -aromadendreno	1465	1458	0,34	0,015
20	<i>trans</i> -cadina-1(6),4-dieno	1481	1475	0,17	0,043
21	Germacreno D	1486	1484	2,12	0,066
22	β -alaskeno	1501	1498	1,66	1,500
23	γ -cadineno	1519	1513	1,93	0,016
24	δ -cadineno	1528	1522	4,92	0,121
25	<i>trans</i> -cadina-1,4-dieno	1537	1533	0,30	0,006
26	α -cadineno	1542	1537	0,31	0,007
27	Sesquiterpeno não identificado	1579	-	3,91	0,119
28	Óxido de cariofileno	1586	1582	0,42	0,003
29	Cubenol <1-epi->	1631	1628	0,16	0,010
30	τ -Cadinol	1644	1638	2,48	0,087
31	α -Muurolol	1649	1644	0,40	0,050
32	α -Cadinol	1657	1652	2,97	0,077

Não identificados 34,01(2)

Monoterpenos 35,08 (11)

Monoterpenos oxigenados 0,15 (1)

Sesquiterpenos 20,42 (13)

Sesquiterpenos oxigenados 6,43 (5)

Sesquiterpenos não identificados 3,91 (1)

Total de identificados 65,99

Fonte: adaptada de (DA SILVA et al., 2016). * Os componentes estão listados de acordo com a ordem de eluição.

A identificação do óleo essencial de *Piper corcovadensis* (sin. *Ottonia corcovadensis*) Miq. (Piperaceae) foi descrita anteriormente (FACUNDO; MORAIS; BRAZ FILHO, 2004), porém a composição obtida no presente trabalho se mostrou consideravelmente distinta. No presente trabalho os componentes majoritários da

composição do óleo essencial foram o terpinoleno (17,44%), *trans*-cariofileno (6,27%), α -pineno (5,92%), δ -cadineno (4,92%) e limoneno (4,46%), e um composto não identificado (30,62%). Num trabalho anterior (FACUNDO; MORAIS; BRAZ FILHO, 2004) foram identificados 16 compostos do óleo essencial das folhas de *O. corcovadensis*, sendo *trans*-cariofileno (13,6%), limoneno (12,7%), e *epi*-bicciclosesquifelandreno (10,3%) os componentes majoritários. Uma explicação para estas diferenças pode estar na variação das populações estudadas, uma vez que a planta do presente trabalho foi coletada numa região de Mata Atlântica no nordeste brasileiro e a outra descrita na literatura (FACUNDO; MORAIS; BRAZ FILHO, 2004) foi coletada na Floresta Amazônica no norte do Brasil. Diferenças nas condições edáficas, assim como diferenças crípticas ou subespécies podem também ser responsáveis pela discrepância de metabólitos identificados (DA SILVA et al., 2016).

3.4.2 Isolamento e caracterização do composto não identificado (IR=1402)

Após os procedimento de purificação, 21 mg do composto até então não identificado (IR=1402, fator de retenção na CCD= 0,27) foi obtido, com rendimento de 26,3% em relação ao óleo essencial (m/m). O mesmo foi analisado por cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (CG-DIC) sob as mesmas condições de análise do óleo essencial, levando a um pico com 99,37% de pureza (Figura 38B). O espectro de massas (Figura 38A) do composto nos dá algumas informações importantes, como o fragmento $m/z=77$ característico da perda do íon $C_6H_5^+$ em compostos aromáticos, o pico base em $m/z=135$ e o íon molecular pronunciado em $m/z=178$.

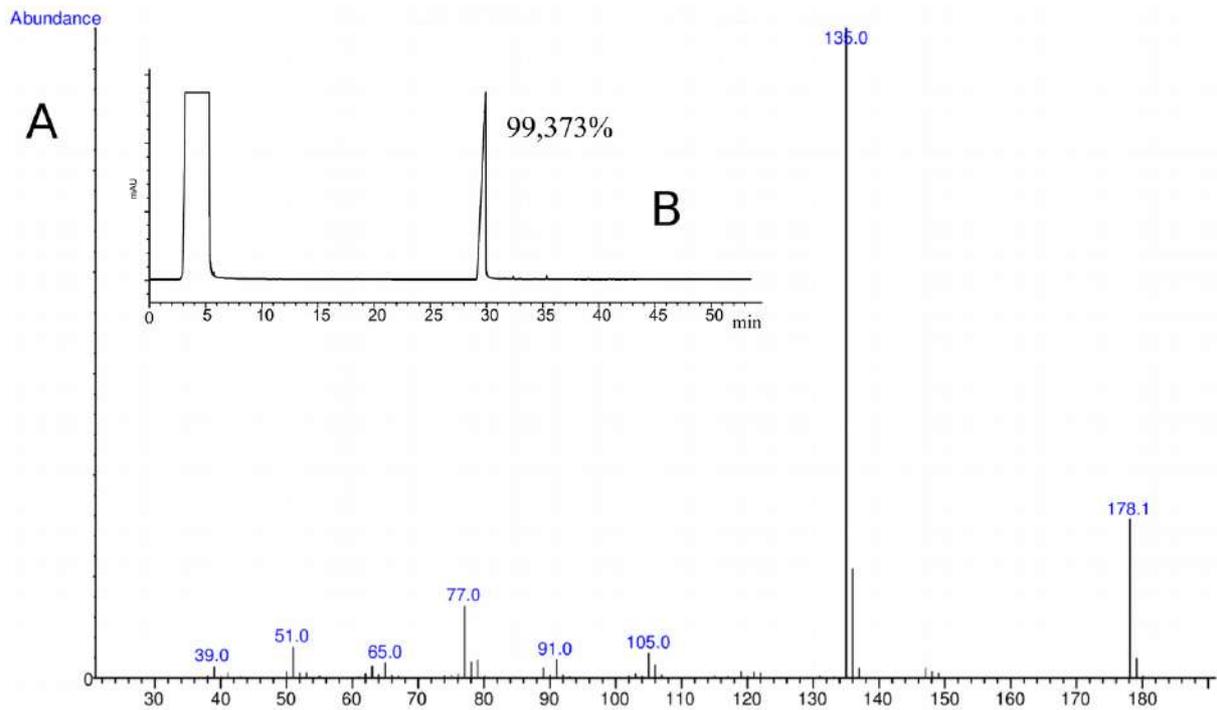


Figura 38: A) espectro de massas e B) cromatograma CG-DIC do composto não identificado isolado. Fonte: Os autores do presente trabalho.

O índice de retenção do composto em questão foi comparado com a literatura, no entanto não foram localizados compostos com tal índice e padrão de fragmentação concomitantemente. Este fato não nos permitia afirmar sobre a identidade do componente, uma vez que padrões de fragmentação semelhantes podem ocorrer em moléculas distintas, o que abre margem a especulações.

Para confirmar a identidade do composto em questão, o componente majoritário isolado do óleo essencial de *P. corcovadensis* foi analisado por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (^1H RMN, ^{13}C RMN e ^1H -COSY). O espectro RMN ^1H do composto em questão é mostrado na Figura 39.

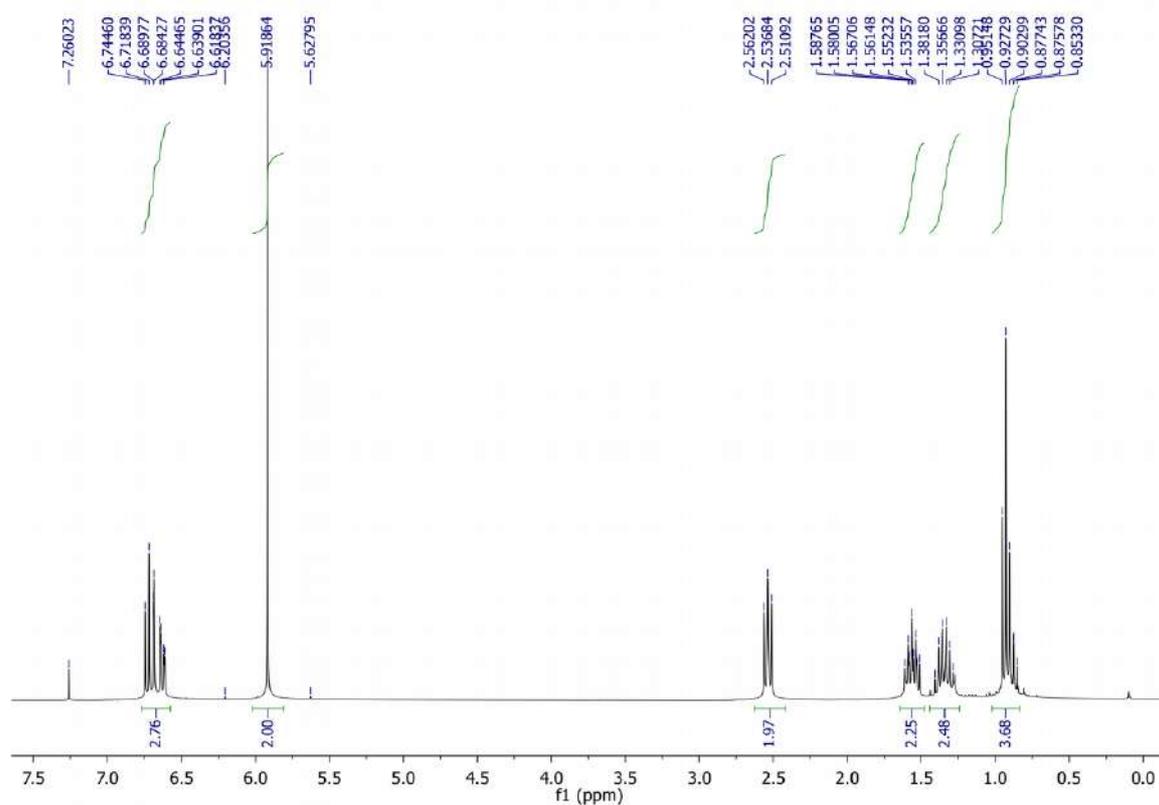
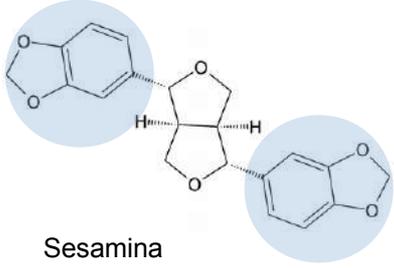
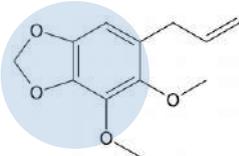
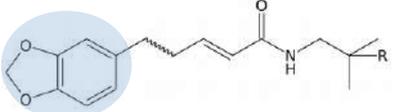
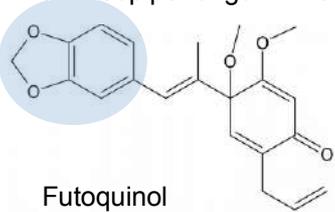


Figura 39: Espectro RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto não identificado (IR=1402). Fonte: Os autores do presente trabalho.

Os sinais em δ 6,68 são característicos de compostos aromáticos e o singlete em δ 5,92 sugere hidrogênios isolados próximos a elementos eletronegativos, causando o efeito de desblindagem. Esses dados corroboram com a hipótese de um composto detentor de anel aromático como observado no fragmento $m/z=77$ no espectro de massas.

Dos vários compostos isolados de espécies de *Piper* descritos na literatura foi possível notar que o grupo *metilenodioxibenzeno* se mostrou presente em várias estruturas (Tabela 7).

Tabela 7: Ocorrência do grupo *metilenodioxibenzeno* em compostos isolados de espécies do gênero *Piper*.

Estrutura/nome	Ocorrência	Referências
 Sesamina	<i>P. sylvaticum</i> <i>P. cubeba</i> <i>P. refractorum</i>	(BANERJI; DHARA, 1974; BODIWALA et al., 2007);
 Dilapiol	<i>P. aduncum</i> <i>P. obliquum</i> <i>P. hispidinervum</i> <i>P. regnellii</i>	(BENEVIDES, 1999; ESTRELA et al., 2006; GUERRINI et al., 2009; ORJALA et al., 1994; RAFAEL et al., 2008)
 R=H → isopiperlonguminina	<i>P. corcovadensis</i>	(COSTA; MORS, 1981)
 Futoquinol	<i>P. futokadsura</i> <i>P. kadsura</i> <i>P. schimidtii</i>	(CHEN; YU; XU, 1993; LIN et al., 2006; STRICKLER et al., 1989; TYAGI et al., 1993)

Fonte: Adaptada de (MARQUES, 2009)

Os deslocamentos dos sinais correspondentes aos hidrogênios do sistema aromático e dos hidrogênios do grupo *metilenodioxi* (O-CH₂-O, δ 5,92) são compatíveis com os sinais encontrados em nosso trabalho. Isso levantou a hipótese de que o composto isolado neste trabalho também apresentava este grupo em sua estrutura. Para testar esta hipótese foi investigado a qual sistema os sinais desses prótons correspondem, em outras palavras, qual a disposição dos substituintes do sistema aromático. Após ampliação da área em questão no espectro Figura 40, foi possível observar que os prótons H_a (δ 6,73) acoplam em orto com os prótons H_b (d, J_{orto} =7,86 Hz, 1H). O próton H_b (δ 6,63) acopla com H_a (dd, J_{orto} =7,86 Hz, 1H) e também com H_x (δ 6,69, d, J_{meta} =1,69 Hz, 1H).

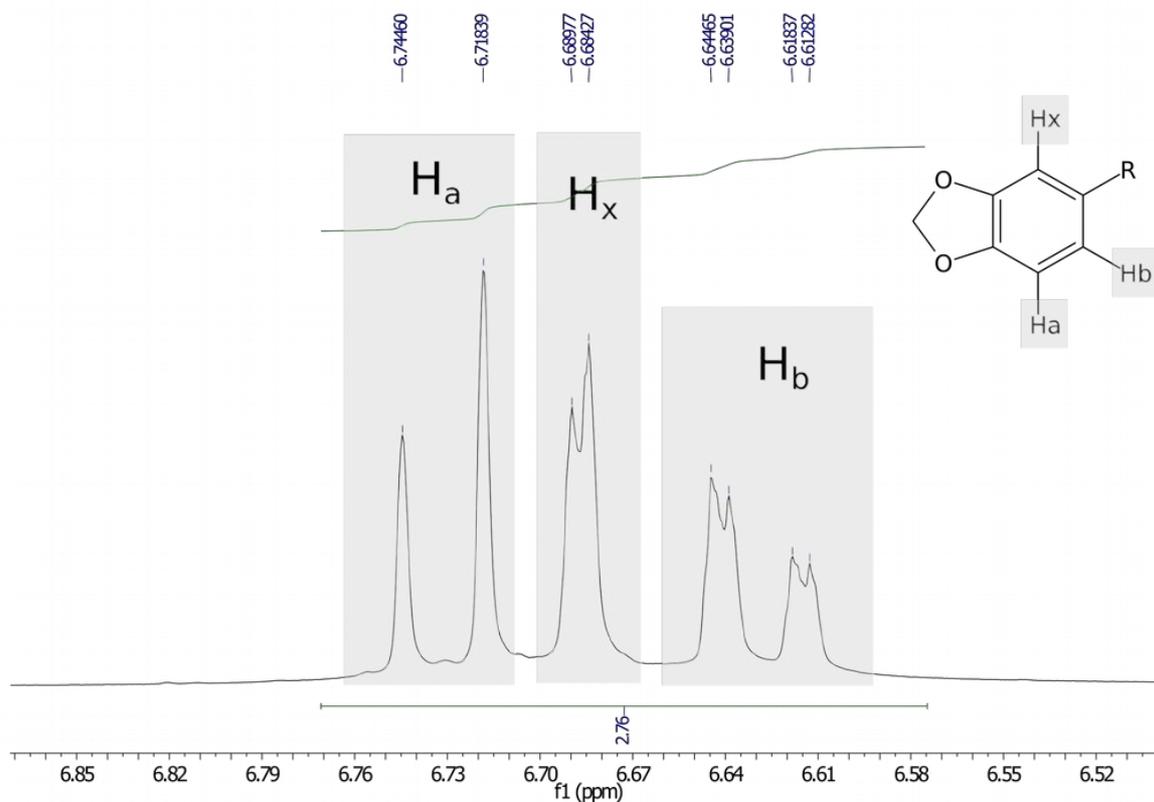


Figura 40: Ampliação da região de aromáticos - RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$). Fonte: Os autores do presente trabalho.

Desta forma foi possível chegar ao sistema do tipo ABX, com o anel aromático tri-substituído. Os outros sinais presentes no espectro são característicos de hidrogênios alifáticos. A multiplicidade de alguns dos sinais não ficou muito clara, o que pode ser motivado por uma cadeia alquílica com maior grau de liberdade ou mesmo por conta de solvente residual na amostra, neste caso o solvente utilizado foi o hexano, cujos sinais correspondentes caem na mesma faixa (δ 0,8 – 1,3). A Figura 41 mostra a ampliação dos sinais da região entre δ 0,7 – 2,8.

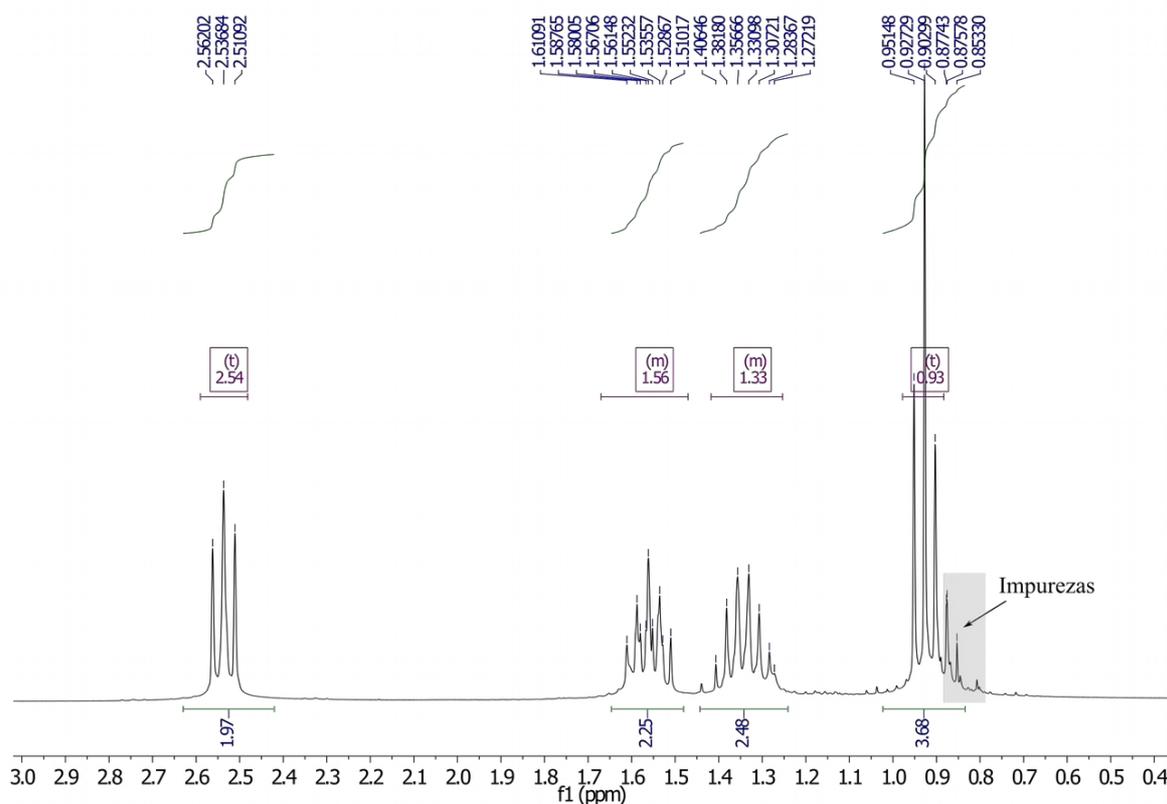
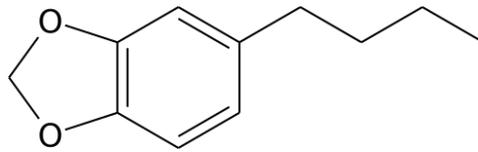


Figura 41: Ampliação do espectro RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) na região δ 0,4 – 3,0. Fonte: Os autores do presente trabalho.

Na Figura 41 podemos observar um tripleto em δ 2,54 (t, $J = 7,55$, 2H) e dois multipletos em δ 1,56 (m, 2H) e δ 1,33 (m, 2H). Também foi possível identificar um tripleto em δ 0,93 (t, $J = 7,27$, 3H). As diferenças nos valores de integração dos sinais em δ 1,33 e δ 0,93 podem ser decorrentes de resíduos de *n*-hexano, solvente utilizado no processo de purificação. Em δ 0,93 alguns sinais de impurezas puderam ser observados, provavelmente também de *n*-hexano residual.

Baseado nos valores de integração e de acordo com a multiplicidade dos sinais na região mostrada na Figura 41, a hipótese de que os sinais correspondentes são provenientes de uma cadeia alquílica aberta como a mostrada na ilustração da Figura 42 foi levantada:



Fórmula: C₁₁H₁₄O₂
 Massa exata: 178,0994

Figura 42: Possível estrutura do composto (IR=1402). Fonte: Os autores do presente trabalho.

Na literatura (PINDER; PRICE, 1967) este composto foi identificado na composição volátil de *Ottonia vahlij*, Kth. Os autores descreveram que o fragmento $m/z=135$ corresponde ao íon C₈H₇O₂⁺, também observado em derivados do safrol. Contudo, não revelaram o índice de retenção do referido composto.

Também foi realizado o experimento de ressonância bidimensional ¹H-COSY (Figura 43), o qual nos dá informações a cerca dos acoplamentos entre os hidrogênios de carbonos adjacentes, ou seja, hidrogênios distantes duas ou três ligações entre si.

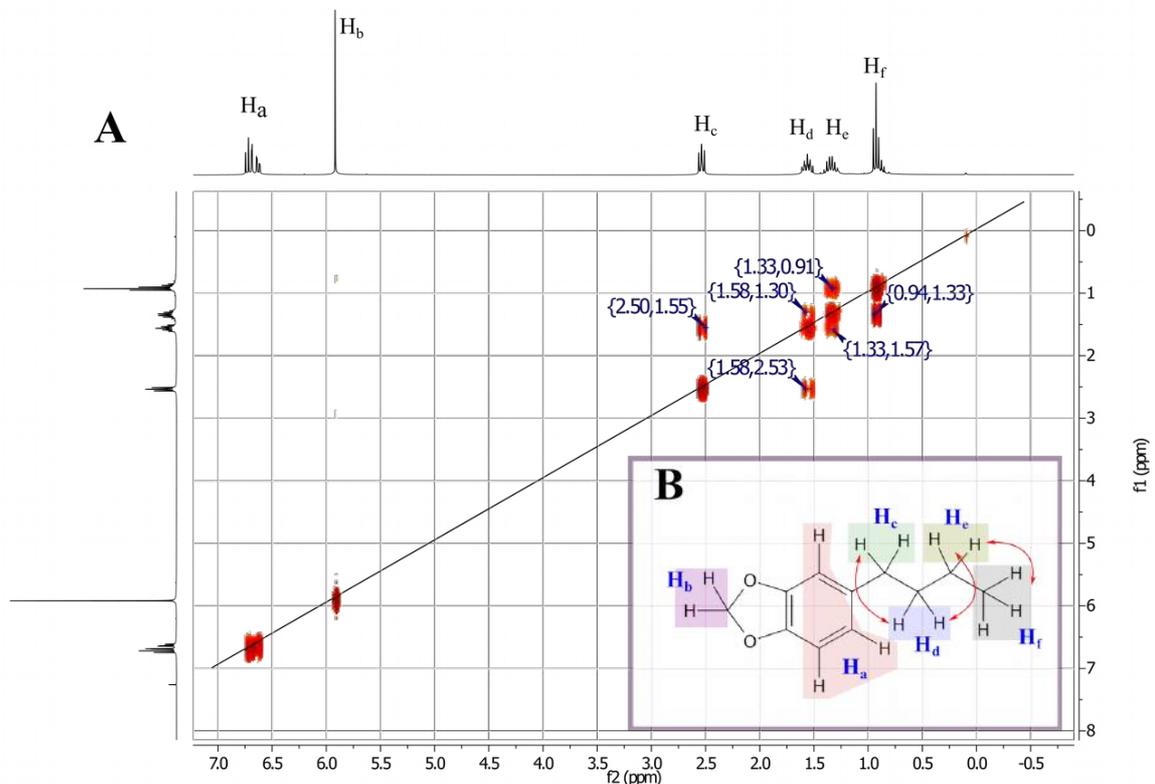


Figura 43: Espectro de RMN ¹H COSY (300 MHz, CDCl₃). Fonte: Os autores do presente trabalho.

No espectro de $^1\text{H-COSY}$ foi possível notar a correlação entre os prótons H_f com os prótons H_e (δ 0,94; 1,33), assim como H_e possui correlação também com H_d (δ 1,33; 1,57), além de H_f . H_d correlaciona com H_e e com H_c (δ 1,58; 2,53) e finalmente H_c possui correlação somente com H_d (δ 2,55; 1,55). Os sinais em δ 6,68 e δ 5,92 tem suas correlações na diagonal do espectro indicando que não possuem correlação outros prótons da molécula. De fato, os prótons do anel aromático acoplam somente entre si, como já descrito no sistema ABX anteriormente. Os prótons do grupo *metilenodioxi* (-O-CH₂-O-) estão isolados o que não leva a qualquer correlação com os demais hidrogênios da molécula, fato também observado em suas correlações no espectro $^1\text{H-COSY}$.

A confirmação da estrutura veio com o experimento de RMN ^{13}C (Figura 44) onde foi possível identificar 11 sinais: δ 147,67; 145,60; 137,04; 121,27; 109,11; 108,25; 100,92; 35,63; 34,19; 22,49; 14,21. Os sinais em δ 77,71; 77,28; 76,86 são provenientes do solvente de análise.

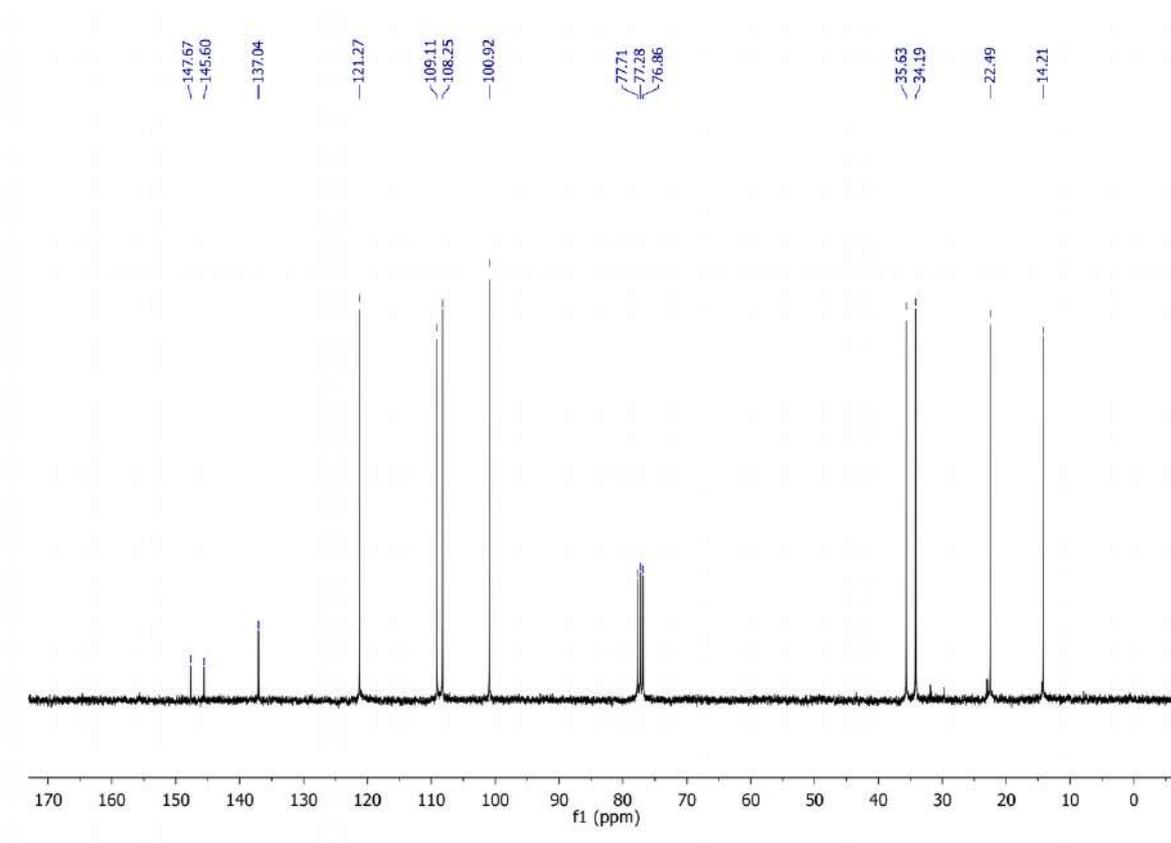


Figura 44: espectro de RMN ^{13}C (75 MHz). Fonte: Os autores do presente trabalho.

Os sinais observados em δ 147,67; 145,60; 137,04; 121,27; 109,11; 108,25 podem ser atribuídos aos átomos de carbono do anel aromático, desblindados por efeitos anisotrópicos. O sinal em δ 100,92 pode ser atribuído ao carbono do sistema (-O-CH₂-O-). Já os sinais em δ 35,63; 34,19; 22,49; 14,21 são característicos de carbonos alquílicos, corroborando para estrutura proposta na Figura 42.

Após uma busca aprofundada na literatura sobre a estrutura proposta, baseada na elucidação do presente trabalho, foi constatada que este composto foi descrito como majoritário de *Ottonia anisum* (MOREIRA; KAPLAN; GUIMARÃES, 1997), *Piper klotzschianum* (NASCIMENTO et al., 2013) e *Ottonia vahlii*, Kth. (PINDER; PRICE, 1967). Os sinais obtidos no espectro mostrado na Figura 44, assim como os demais experimentos elucidativos realizados correspondem aos descritos na literatura (MARQUES et al., 2008; MOREIRA; KAPLAN; GUIMARÃES, 1997; NASCIMENTO et al., 2013; PINDER; PRICE, 1967).

Com a molécula elucidada e confirmada por RMN ¹H, ¹³C, ¹H-COSY e CG-EM, foi possível afirmar que o composto isolado em questão tratava-se do *1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno*. Na literatura (NASCIMENTO et al., 2013) foi relatada a presença de 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno (BMDB) no óleo essencial das raízes (96,19%), caule (84,75%), folhas (81,04%) e sementes (36,92%) de *Piper klotzschianum*, no entanto os autores não desenvolveram experimentos com o composto isolado diante das larvas de *A. aegypti*.

Após a identificação do 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno no óleo essencial de *P. corcovadensis* o total de compostos identificados na Tabela 6 passou a 96,61% da composição volátil.

3.4.3 Ensaio larvicidas

O óleo essencial de *P. corcovadensis*, os majoritários terpinoleno e 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno (BMDB), assim como o extrato aquoso resultante da hidrodestilação se mostraram bastante ativos diante das larvas de *A. aegypti* (Tabela 8). Nos ensaios preliminares com o óleo essencial foram observadas mortalidades entre 0,7 e 100% das larvas L4 de *A. aegypti* a 10 ppm, 50 ppm e 100ppm. De acordo com os testes preliminares, os ensaios larvicidas do óleo essencial, do BMDB e terpinoleno foram direcionados usando as faixas de concentração 20-50 ppm, 14-24 ppm 20-45 ppm, respectivamente. Os resultados da CL_{50} do óleo essencial de *P. corcovadensis*, do BMDB, do terpinoleno, hidrolato e extrato aquoso são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8: Atividade larvicida diante de larvas de *Aedes aegypti* (L4) dos extratos e óleo essencial obtidos por hidrodestilação das folhas de *P. corcovadensis* (Miq.) C. DC e dos compostos majoritários do óleo essencial terpinoleno e BMDB. ^a = média \pm desvio padrão (N=4) da CL_{50} ; ^b = porcentagem (v/v) da concentração de extrato aquoso.

Amostra (unidade)	CL_{50}^a	Intervalo de confiança 95%
Óleo essencial (ppm)	30,52 \pm 0,99	28,64 – 32,51
BMDB (ppm)	22,11 \pm 0,50	21,11 – 23,08
terpinoleno	31,16 \pm 0,90	29,54 – 33,06
Extrato aquoso (%) ^b	2,93 \pm 0,08	2,77 – 3,10
Hidrolato	Não ativo	--

Fonte: Os autores do presente trabalho e adaptada de (DA SILVA et al., 2016)

De acordo com a literatura, um óleo essencial com $CL_{50} < 50$ ppm pode ser considerado como potente larvicida (CHENG et al., 2003). Com exceção do hidrolato, que não apresentou atividade, todas as demais amostras foram ativas e com concentração letal inferior a 50 ppm, ou seja, potentes larvicidas.

3.4.4 Ensaio de oviposição

Nos ensaios de deterrência o óleo essencial de *P. corcovadensis* exibiu-se um potente deterrente de oviposição em relação ao controle. O quantitativo de ovos nos copos contendo a solução de óleo essencial foi significativamente inferior ao número de ovos nos copos contendo o controle, em 5 ppm ($38,1 \pm 10,8\%$ dos ovos depositados no teste, $p= 0,001$) e 50 ppm ($12,3\% \pm 4,86$ dos ovos depositados no teste, $p<0,001$)(Tabela 9).

O próximo passo foi investigar qual(is) o(s) componente(s) seria(m) responsável(is) pela forte atividade deterrente de oviposição do óleo essencial de *P. corcovadensis*. O majoritário BMDB foi então submetido ao ensaio de deterrência de oviposição sob as mesmas condições do óleo essencial, utilizando-se inicialmente a concentração de 1,5 ppm, equivalente à sua contribuição em em 5 ppm do óleo essencial. Entretanto, o BMDB não foi significativamente deterrente ($p=0,167$, Tabela 9), assim como a 15 ppm, concentração equivalente a sua contribuição no óleo essencial a 50 ppm ($p=0,624$, Tabela 9).

Tabela 9: Ensaio de atividade deterrente de oviposição.

Óleo essencial de <i>Piper corcovadensis</i> (50 ppm)			
	Teste	Controle	
	416	2971	$P < 0,001$
% do total	12,3	87,7	
N° total de ovos	3387		
Óleo essencial de <i>Piper corcovadensis</i> (5 ppm)			
	Teste	Controle	
	1555	2455	$P = 0,001$
% do total	38,1	61,9	
N° total de ovos	4010		
BMDB (1,5 ppm)			
	Teste	Controle	
	1083	1003	$P = 0,167$

		39,8	60,2	
% do total				
N° total de ovos		2086		
BMDB (15 ppm)				
	Teste		Controle	
		1275	1537	
% do total		46,4	53,6	<i>P</i> = 0,624
N° total de ovos		2812		
terpinoleno (8,5 ppm)				
	Teste		Controle	
		2076	2507	
% do total		52,9	47,1	<i>P</i> = 0,52
N° total de ovos		4583		

Fonte: Os autores do presente trabalho.

Diante desse resultado partimos para o segundo componente majoritário do óleo essencial de *P. corcovadensis*, o terpinoleno, que representa 17,44% da composição. Em nenhuma outra espécie desse gênero esse composto apresentou essa proporção, geralmente abaixo de 1%, salvo algumas exceções já descritas no presente trabalho. Não havia relatos na literatura sobre ensaios de deterrência de oviposição em *A. aegypti* com este composto, o que nos motivou a fazê-lo. No entanto, o terpinoleno não demonstrou atividade deterrente em nossos ensaios ($p= 0,52$).

Para explicar esses resultados, a hipótese de os componentes minoritários do óleo essencial serem responsáveis pela atividade de deterrência de oviposição foi levantada, assim como o efeito sinérgico da mistura dos componentes do óleo essencial.

3.5 Conclusões

A identificação do óleo essencial de *Piper corcovadensis* foi realizada levando a 96,61% da composição. O 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno (BMDB) foi isolado com 99,37% de pureza e identificado por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, em que os dados obtidos corresponderam aos encontrados na literatura.

O óleo essencial, o BMDB, o terpinoleno e o extrato aquoso resultante do processo de hidrodestilação das folhas frescas de *P. corcovadensis* exibiram forte atividade larvicida diante de *A. aegypti*.

Nos ensaios de oviposição o óleo essencial de *P. corcovadensis* exibiu um forte efeito deterrente diante de fêmeas grávidas de *A. aegypti*, mesmo em baixas concentrações (5 ppm).

4 CONCLUSÕES

A identificação dos odores florais de *T. ulei* e *G. brasiliense* foram satisfatórias, abrangendo mais de 80% das respectivas composições. O estudo da dinâmica de emissão de voláteis das inflorescências termogênicas de *T. ulei* revelou que os principais componentes do perfume floral são emitidos em proporções variáveis no decorrer da antese. Além disso, os componentes majoritários nas inflorescências antéticas, (S)-2-OH-5-Me-3-hexanona e diidro- β -ionona, também foram detectados em pequenas concentrações em inflorescências imaturas.

A criação de *B. taccarivora* foi realizada satisfatoriamente, apesar de não haver registros da biologia dessa espécie na literatura. Os ensaios eletrofisiológicos foram bem sucedidos, tendo resultado em respostas claras para os majoritários da composição volátil de *T. ulei* e *G. brasiliense*.

Os ensaios comportamentais de dupla escolha no olfatômetro “Y” demonstraram que o *headspace* de inflorescências antéticas de *T. ulei* e o majoritário diidro- β -ionona foram significativamente mais atrativos que o controle. Desta forma, ficou comprovado que *B. taccarivora* utiliza um semioquímico, mais especificamente a diidro- β -ionona, para localizar as inflorescências de *T. ulei* em diferentes estágios de desenvolvimento.

A identificação do óleo essencial de *Piper corcovadensis* foi realizada levando a 96,61% da composição. O 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno (BMDB) foi isolado com 99,37% de pureza e identificado por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, em que os dados obtidos corresponderam aos encontrados na literatura.

O óleo essencial, o BMDB, o terpinoleno e o extrato aquoso resultante do processo de hidrodestilação das folhas frescas de *P. corcovadensis* exibiram forte atividade larvicida diante de *A. aegypti*.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. 4. ed. Carol Stream: Allured Publishing, 2007.
- ADDAE-MENSAH, I. et al. Novel amide alkaloids from the roots of *Piper guineense*. **Phytochemistry**, v. 16, n. 6, p. 757–759, jan. 1977.
- ALTAFINI, D. L. **Percepção química de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: tortricidae) ao feromônio sexual e a voláteis de plantas hospedeiras**. Dissertação de Mestrado—[s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.
- ANTUNES, P. et al. Spectroscopic characterization of N-isobutyl-6-(p-methoxyphenyl) 2E,4E-hexadieneamide extracted from *Ottonia propinqua*. **Vibrational Spectroscopy**, v. 27, n. 2, p. 175–181, dez. 2001.
- ARAGÃO, C. A.; DANTAS, B. F.; BENITES, F. R. G. Efeito de aleloquímicos em tricomas foliares de tomateiro na repelência a ácaro (*Tetranychus urticae* Koch.) em genótipos com teores contrastantes de 2-tridecanona. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n. 1, jan. 2002.
- ARN, H.; STÄDLER, E.; RAUSCHER, S. The electroantennographic detector - A selective and sensitive tool in the gas chromatographic analysis of insect pheromones. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 30c, p. 722–725, 1975.
- AUTRAN, E. S. et al. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). **Bioresource technology**, v. 100, n. 7, p. 2284–8, abr. 2009.
- BAGETTA, G. (ED.). **Herbal medicines: development and validation of plant-derived medicines for human health**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2012.
- BAGHERI, H.; ABDUL MANAP, M. Y. B.; SOLATI, Z. Response surface methodology applied to supercritical carbon dioxide extraction of *Piper nigrum* L. essential oil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 1, p. 149–155, jun. 2014.
- BANERJI, J.; DHARA, K. P. Lignan and amides from *Piper sylvaticum*. **Phytochemistry**, v. 13, n. 10, p. 2327–2328, out. 1974.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. A utilização do safrol, principal componente químico do óleo de sassafráz, na síntese de substâncias bioativas na cascata do ácido araquidônico: anti-inflamatórios, analgésicos e anti-trombóticos. **Química Nova**, v. 22, p. 744–759, 1999.

BENEVIDES, P. Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 2, p. 339–343, set. 1999.

BERGMANN, J.; GONZÁLEZ, A.; ZARBIN, P. H. G. Insect pheromone research in South America. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 7, p. 1206–1219, 2009.

BERTRAND, C.; COMTE, G.; PIOLA, F. Solid-phase microextraction of volatile compounds from flowers of two Brunfelsia species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, n. 5, p. 371–375, maio 2006.

BEZERRA, D. P. et al. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by pipartine and piperine, two alkaloid amides from Piper. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 6, p. 801–807, jun. 2006.

BODIWALA, H. S. et al. Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*. **Journal of Natural Medicines**, v. 61, n. 4, p. 418–421, 1 out. 2007.

BOGNER, J.; GONÇALVES, E. G. The Genus *Gearum* N. E. Brown (Araceae: Tribe Spathicarpeae). **Aroideana**, v. 22, p. 20–29, 1999.

BOYCE, P. C. & CROAT, T. B. **The Überlist of Araceae, Totals for Published and Estimated Number of Species in Aroid Genera**. 2011.

BROWN, B. V. et al. **Manual of Central American Diptera**. Ottawa: NRC Research Press, 2010. v. 2

CARROLL, M. J.; SCHMELZ, E. A.; TEAL, P. E. A. The Attraction of *Spodoptera frugiperda* Neonates to Cowpea Seedlings is Mediated by Volatiles Induced by Conspecific Herbivory and the Elicitor Inceptin. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, n. 3, p. 291–300, 1 mar. 2008.

CHEN, Y. C.; YU, P. Z.; XU, P. J. Anti-platelet activating factor constituents, 2,5-diaryltetrahydrofuran type lignans, from *Piper futokadsura* Sied. et Zucc. **China journal of Chinese materia medica**, v. 18, p. 292–294, 1993.

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

CHENG, S.-S. et al. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 452–456, jan. 2009.

CHRISTENSEN, T. A. (ED.). Classification of Semiochemicals. In: *Frontiers in neuroscience*. Boca Raton: CRC Press, 2005. p. 44.

CHUAH, C.-H. Interspecific variation in defense secretions of Malaysian termites from the genus *Bulbitermes*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 4, p. 819–827, 1 abr. 2005.

COSSÉ, A. A.; BARTELT, R. J. Male-produced Aggregation Pheromone of *Colopterus truncatus*: Structure, Electrophysiological, and Behavioral Activity. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 7, p. 1735–1748, jul. 2000.

COSTA, S. S.; MORS, W. B. Amides of *Ottonia corcovadensis*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 6, p. 1305–1307, jan. 1981.

CUNICO, M. M. et al. Potencial antimicrobiano e alelopático das amidas isoladas do extrato das raízes de *Ottonia martiana* Miq. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 746–749, jul. 2006.

CUNICO, M. M. et al. Phytochemical and antibacterial evaluation of essential oils from *Ottonia martiana* miq. (Piperaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 184–188, 2007.

DA SILVA, J. K. R. et al. Essential oils of Amazon Piper species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 55–60, jul. 2014.

DA SILVA, M. F. R. et al. Composition and Biological Activities of the Essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (Piperaceae). **Experimental Parasitology**, mar. 2016.

DANELUTTE, A. P. et al. Divergence of secondary metabolism in cell suspension cultures and differentiated plants of *Piper cernuum* and *P. crassinervium*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6b, p. 1425–1430, nov. 2005.

DE ARAÚJO JÚNIOR, J. X. et al. Cepharanone B from *Piper tuberculatum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, n. 3, p. 325–327, abr. 1999.

DE FIGUEIREDO, R. Pollination Biology of Piperaceae Species in Southeastern Brazil. **Annals of Botany**, v. 85, n. 4, p. 455–460, abr. 2000.

DE MORAIS, S. M. et al. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from Piper species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 10, p. 670–675, out. 2007.

DE SOUZA, V. A. et al. Trypanocidal activity of (-)-cubebin derivatives against free amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 2, p. 303–307, jan. 2005.

DESHPANDE, A. A.; JAMIL, K. Identification of the kairomones of *Exorista bombycis* (Dipt., Tachnidae), a major pest of *Bombyx mori* (Lep., Bombycidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 121, n. 1–5, p. 103–106, jan. 1997.

DOGNINI, J. et al. Antibacterial activity of high safrole contain essential oils from *Piper xylosteoides* (Kunth) Steudel. **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 3, p. 241–244, 11 maio 2012.

DOS SANTOS, A. L. et al. Comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry (GC×GC/TOFMS) for the analysis of volatile compounds in *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. essential oils. **Microchemical Journal**, v. 118, p. 242–251, jan. 2015.

DYER, L. A.; PALMER, A. D. N. (EDS.). **Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004.

ESTRELA, J. L. V. et al. Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 217–222, fev. 2006.

FACUNDO, V. A.; DA SILVEIRA, A. S. P.; MORAIS, S. M. Constituents of *Piper alatabaccum* Trel & Yuncker (Piperaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, n. 7, p. 753–756, jul. 2005.

FACUNDO, V. A.; MORAIS, S. M.; BRAZ FILHO, R. Constituintes químicos de *Ottonia corcovadensis* Miq. da floresta Amazônica: atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono. **Química Nova**, v. 27, n. 1, fev. 2004.

FANG, J. et al. Chemical constituents in root and stem of *Piper laetispicum* (II). **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, v. 38, p. 1289–1292, 1 set. 2007.

FU, P. P. et al. Toxicity of Kava Kava. **Journal of Environmental Science and Health, Part C**, v. 26, n. 1, p. 89–112, 13 mar. 2008.

GHOSAL, S. et al. Leishmanicidal Compounds from the Fruits of *Piper longum*. **Planta Medica**, v. 78, n. 09, p. 906–908, 10 maio 2012.

GONÇALVES, E. G. **Sistemática e evolução da tribo Spathicarpeae (Araceae)**. Tese de Doutorado—São Paulo-SP: Universidade de São Paulo, 2002.

GONÇALVES, E. G.; MAIA, A. C. D. New Evidence of Pollination in *Gearum brasiliense* (Araceae-Spathicarpeae). **Aroideana**, v. 29, p. 148–151, 2006.

GOTTSBERGER, G.; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. Olfactory and Visual Attraction of *Erioscelis emarginata* (Cyclocephalini, Dynastinae) to the Inflorescences of *Philodendron selloum* (Araceae). **Biotropica**, v. 23, n. 1, p. 23, mar. 1991.

GUERRINI, A. et al. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 27, n. 1, p. 39–48, jan. 2009.

GUPTA, O. P.; ATAL, C. K.; GAIND, K. N. Constituents of *Piper nepalense*. **Phytochemistry**, v. 11, n. 8, p. 2646, ago. 1972.

GUTIERREZ, R. M. P.; GONZALEZ, A. M. N.; HOYO-VADILLO, C. Alkaloids from piper: a review of its phytochemistry and pharmacology. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 13, n. 2, p. 163–193, fev. 2013.

HANSSON, B. S. **Insect olfaction**. Berlin; New York: Springer, 1999.

HANSSON, B. S.; STENSMYR, M. C. Evolution of Insect Olfaction. **Neuron**, v. 72, n. 5, p. 698–711, dez. 2011.

HATANO, E. et al. A herbivore-induced plant volatile interferes with host plant and mate location in moths through suppression of olfactory signalling pathways. **BMC Biology**, v. 13, n. 1, dez. 2015.

HENZELL, R. F. Electroantennogram responses of male *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae) to phenol and related compounds. **New Zealand Journal of Zoology**, v. 1, n. 4, p. 515–522, dez. 1974.

HERNÁNDEZ-ORTIZ, V.; AGUIRRE, A. A new species of the Neotropical genus *Beebeomyia* (Diptera: Richardiidae) with observations of its biology on *Dieffenbachia oerstedii* (Araceae). **Journal of Natural History**, p. 1–13, 25 fev. 2015.

HETTERSCHEID, W. ***Gearum brasiliense* N.E. Br.**, 2002. Disponível em: <<http://www.aroid.org/genera/gearum/brasiliense/1.php>>. Acesso em: 17 fev. 2015

HIRATA, N. et al. Histamine release inhibitory activity of *Piper nigrum* leaf. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 10, p. 1973–1976, out. 2008.

HUMMEL, H. E.; MILLER, T. A. **Techniques in Pheromone Research**. New York, NY: Springer New York, 1984.

ISHIWARI, H.; SUZUKI, T.; MAEDA, T. Essential Compounds in Herbivore-Induced Plant Volatiles that Attract the Predatory Mite *Neoseiulus womersleyi*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 33, n. 9, p. 1670–1681, 1 set. 2007.

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, v. 88, n. 4, p. 706–716, 1 abr. 2001.

JENSEN, H. R. et al. Gene expression profiles of *Drosophila melanogaster* exposed to an insecticidal extract of *Piper nigrum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 1289–1295, 22 fev. 2006.

JONG-WOONG, A. et al. Piperidine alkaloids from *Piper retrofractum* fruits. **Phytochemistry**, v. 31, n. 10, p. 3609–3612, out. 1992.

KALINOVÁ, B. et al. GC×GC/TOF - MS technique — A new tool in identification of insect pheromones: Analysis of the persimmon bark borer sex pheromone gland. **Talanta**, v. 69, n. 3, p. 542–547, 15 maio 2006.

KARLSON, P.; LÜSCHER, M. 'Pheromones': a New Term for a Class of Biologically Active Substances. **Nature**, v. 183, n. 4653, p. 55–56, jan. 1959.

KNIGHT, A. L.; LIGHT, D. M. Monitoring Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) in Sex Pheromone-Treated Orchards With (E)-4,8-Dimethyl-1,3,7-Nonatriene or Pear Ester in

Combination With Codlemone and Acetic Acid. **Environmental Entomology**, v. 41, n. 2, p. 407–414, 1 abr. 2012.

KNUDSEN, J. T. et al. Diversity and Distribution of Floral Scent. **The Botanical Review**, v. 72, n. 1, p. 1–120, mar. 2006.

KOUL, S. K. et al. Lignans of *Piper clusii*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 4, p. 999–1000, 1983.

KOUL, S. K. et al. Lignans of *Piper trichostachyon*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 5, p. 1479–1482, jan. 1988.

LAW, J. H.; REGNIER, F. E. Pheromones. **Annual Review of Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 533–548, jun. 1971.

LEAL, W. S. et al. Female sex pheromone of the longhorn beetle *Migdolus fryanus* Westwood: N-(2'S)-methylbutanoyl 2-methylbutylamine. **Experientia**, v. 50, n. 9, p. 853–856, 1 set. 1994.

LEE, S. A. et al. Piperine from the fruits of *Piper longum* with inhibitory effect on monoamine oxidase and antidepressant-like activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 7, p. 832–835, jul. 2005.

LEE, S.-E. et al. Fungicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L., against phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, v. 20, n. 6, p. 523–528, jul. 2001.

LEFFINGWELL, J. C.; ALFORD, E. D. Volatile constituents of perique tobacco. **Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 4, p. 899–915, 2005.

LIMA, R. K. et al. Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Acta Amazonica**, v. 39, p. 377–382, 2009.

LIN, L.-C. et al. Anti-inflammatory Neolignans from *Piper adsura*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 5, p. 842–844, maio 2006.

MACALPINE, J. F. (ED.). **Manual of Nearctic Diptera**. Repr ed. Hull, Que: Canadian Government Publ. Centre, 1993. v. 2

MAGALHÃES, D. M. et al. Influence of Two Acyclic Homoterpenes (Tetranorterpenes) on the Foraging Behavior of *Anthonomus grandis* Boh. **Journal of Chemical Ecology**, v. 42, n. 4, p. 305–313, 1 abr. 2016.

MAIA, A. C. D. et al. Pollination of *Philodendron acutatum* (Araceae) in the Atlantic Forest of Northeastern Brazil: A Single Scarab Beetle Species Guarantees High Fruit Set. **International Journal of Plant Sciences**, v. 171, n. 7, p. 740–748, set. 2010.

MAIA, A. C. D. **Atração olfatória em sistemas de polinização Cyclocephalini-arácea (Scarabaeidae, Dynastinae; Araceae) e manutenção em cativeiro de Cyclocephala**. Tese de Doutorado—João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 2011.

MAIA, A. C. D. et al. The cowl does not make the monk: scarab beetle pollination of the Neotropical aroid *Taccarum ulei* (Araceae: Spathicarpeae): Pollination of *Taccarum ulei*. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 108, n. 1, p. 22–34, jan. 2013a.

MAIA, A. C. D. et al. The floral scent of *Taccarum ulei* (Araceae): Attraction of scarab beetle pollinators to an unusual aliphatic acyloin. **Phytochemistry**, v. 93, p. 71–78, set. 2013b.

MAIA, J. G. S. et al. Espécies de Piper da Amazônia ricas em safrol. **Química Nova**, v. 10, p. 200–204, 1987.

MAIA, J. G. S. et al. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, n. 4, p. 269–272, jul. 1998.

MAKAPUGAY, H. C. et al. Piperovatine, the tongue-numbing principle of *Ottonia frutescens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 7, n. 2, p. 235–238, mar. 1983.

MARQUES, A. M. et al. Caracterização de derivado arilbutanoídico em folhas e raízes de *Ottonia anisum* Sprengel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 709–712, 2008.

MARQUES, J. V. **Atividade Biológica de Amidas e Análogos de Espécies de Piper e Estudos Biossintéticos**. Tese de doutorado - São Paulo: Universidade de São Paulo, 2009.

MARTIN, H. B. et al. Kavain Attenuates Vascular Contractility Through Inhibition of Calcium Channels. **Planta Medica**, v. 68, n. 9, p. 784–789, set. 2002.

MASIGA, D. et al. Chemosensory receptors in tsetse flies provide link between chemical and behavioural ecology. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 9, p. 426–428, set. 2014.

MATSUDA, S. Terpinolene, a component of herbal sage, downregulates AKT1 expression in K562 cells. **Oncology Letters**, 18 nov. 2011.

MAYO, S. J.; BOGNER, J.; BOYCE, P. C. Gearum (Araceae) Rediscovered. **Kew Bulletin**, v. 49, n. 4, p. 785–788, 1 jan. 1994.

MCFERREN, M. A. et al. In vitro neuropharmacological evaluation of piperovatine, an isobutylamide from *Piper piscatorium* (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, n. 3, p. 201–207, dez. 2002.

MCFERREN, M. A.; RODRIGUEZ, E. Piscicidal properties of piperovatine from *Piper piscatorium* (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, n. 2, p. 183–187, mar. 1998.

MEHMOOD, M. H.; GILANI, A. H. Pharmacological Basis for the Medicinal Use of Black Pepper and Piperine in Gastrointestinal Disorders. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 5, p. 1086–1096, out. 2010.

MILLER, T. A. **Insect Neurophysiological Techniques**. New York, NY: Springer New York, 1979.

MOORHOUSE, J. E. et al. Method for Use in Studies of Insect Chemical Communication. **Nature**, v. 223, n. 5211, p. 1174–1175, 13 set. 1969.

MOREIRA, D. L.; KAPLAN, M. A. C.; GUIMARÃES, E. F. 1-Butyl-3,4-Methylenedioxybenzene as the Major Constituent of Essential Oil from *Ottonia anisum* Sprengel (Piperaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, n. 5, p. 565–568, 1 set. 1997.

MORGAN, E. D. et al. Comparative Survey of Abdominal Gland Secretions of the Ant Subfamily Ponerinae. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, n. 1, p. 95–114, jan. 2003.

MORI, K. Significance of chirality in pheromone science. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 24, p. 7505–7523, dez. 2007.

NARUI, T. et al. Studies on the constituents of *Piper hancei* of spice from Okinawa. **Natural Medicines**, v. 49, 1 jan. 1995.

NASCIMENTO, J. C. DO et al. Larvicidal activities and chemical composition of essential oils from *Piper klotzschianum* (Kunth) C. DC. (Piperaceae). **Pest Management Science**, v. 69, n. 11, p. 1267–1271, 1 nov. 2013.

NIST. Benzoic acid, methyl ester, 2015a. Disponível em: <Benzoic acid, methyl ester>

NIST. Methyl salicylate, 2015b. Disponível em: <methyl salicylate>

NORDLUND, D. A.; LEWIS, W. J. Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. **Journal of Chemical Ecology**, v. 2, n. 2, p. 211–220, 1976.

NUNES, J. D. et al. Citogenética de *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 7, p. 1049–1052, jul. 2007.

ORJALA, J. et al. Cytotoxic and Antibacterial Dihydrochalcones from *Piper aduncum*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 1, p. 18–26, 1 jan. 1994.

OTTER, C. J. D.; TCHICAYA, T.; SCHUTTE, A. M. Effects of age, sex and hunger on the antennal olfactory sensitivity of tsetse flies. **Physiological Entomology**, v. 16, n. 2, p. 173–182, jun. 1991.

PARMAR, V. S. et al. Phytochemistry of the genus *Piper*. **The International Journal of Plant Biochemistry and Molecular Biology**, v. 46, n. 4, p. 597–673, out. 1997.

PATRA, A.; GHOSH, A. Amides of *Piper chaba*. **Phytochemistry**, v. 13, n. 12, p. 2889–2890, dez. 1974.

PEREIRA, J. et al. *Philodendron adamantinum* (Araceae) lures its single cyclocephaline scarab pollinator with specific dominant floral scent volatiles. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 111, n. 3, p. 679–691, 1 mar. 2014.

PÉRES, V. F. et al. Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 9, p. 2389–2395, set. 2009.

PETRETTO, G. L. et al. Stir bar sorptive extraction coupled with GC/MS applied to honey: optimization of method and comparative study with headspace extraction techniques. **European Food Research and Technology**, v. 243, n. 5, p. 735–741, maio 2017.

PHEROBASE. Pherobase. Disponível em:
<[http://www.pherobase.net/database/compound/compounds-detail-formic acid.php](http://www.pherobase.net/database/compound/compounds-detail-formic-acid.php)>.

PIMENTEL, F. A. et al. Extracts from the leaves of *Piper piscatorium* (Trel. Yunc.) obtained by supercritical extraction of with CO₂, employing ethanol and methanol as co-solvents. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 490–495, maio 2013.

PINDER, A. R.; PRICE, S. J. The chemistry of *Ottonia vahlii*, Kth. Part I. The volatile constituent. **Journal of the Chemical Society C: Organic**, n. 0, p. 2597–2598, 1967.

POTZERNHEIM, M. et al. Essential Oil of *Piper xylosteoides* (Kunth) Steud. from Federal District, Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, n. 5, p. 523–524, 1 set. 2006.

RAFAEL, M. S. et al. Potential control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) with *Piper aduncum* L. (Piperaceae) extracts demonstrated by chromosomal biomarkers and toxic effects on interphase nuclei. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 7, n. 3, p. 772–781, 2008.

RAMOS, C. S.; VANIN, S. A.; KATO, M. J. Metabolism of (–)-grandisin from *Piper solmsianum* in Coleoptera and Lepidoptera species. **Phytochemistry**, v. 69, n. 11, p. 2157–2161, ago. 2008.

REZENDE, K. C. S. et al. Antibacterial activity of (–)-cubebin isolated from *Piper cubeba* and its semisynthetic derivatives against microorganisms that cause endodontic infections. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 3, p. 296–303, maio 2016.

RIBEIRO, T. S. et al. Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 13, p. 3555–3558, jul. 2004.

RIESGO-ESCOVAR, J. R.; PIEKOS, W. B.; CARLSON, J. R. The *Drosophila* antenna: ultrastructural and physiological studies in wild-type and lozenge mutants. **Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology**, v. 180, n. 2, p. 151–160, fev. 1997.

RODRIGUES SILVA, D. et al. Anti-inflammatory activity of the extract, fractions and amides from the leaves of *Piper ovatum* Vahl (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 3, p. 569–573, mar. 2008.

RODRÍGUEZ, J. P. G.; MEDINA, D. A. V. **Estudios preliminares sobre la feromona sexual de la mosca de la piña *Melanoloma viatrix* y los posibles semioquímicos**

involucrados en la relación planta insecto. Monografía—Bucaramanga, Colombia: Universidad Industrial de Santander, 2010.

ROUSEFF, R. L.; CADWALLADER, K. R. (EDS.). **Headspace Analysis of Foods and Flavors.** Boston, MA: Springer US, 2001. v. 488

SAMAIN, M.-S. et al. Verhuellia Revisited-Unravelling Its Intricate Taxonomic History and a New Subfamilial Classification of Piperaceae. **Taxon**, v. 57, n. 2, p. 583–587, 2008.

SANTOS, G. K. N. et al. Essential oils from *Alpinia purpurata* (Zingiberaceae): Chemical composition, oviposition deterrence, larvicidal and antibacterial activity. **Industrial Crops and Products**, v. 40, n. 0, p. 254–260, nov. 2012.

SANTOS, G. K. N. **Estudo de semioquímicos e perfil de hidrocarbonetos cuticulares em três espécies de besouros antófilos da tribo Cyclocephalini (Dynastinae, Scarabaeidae, Coleoptera).** Tese de Doutorado—Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

SANTOS, M. DE J. L. **Classificação de mangas Tommy Atkins γ -irradiadas: Um modelo metabolômico.** Dissertação de Mestrado—Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2014.

SAUTER, I. P. et al. Chemical composition and amoebicidal activity of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 292–295, nov. 2012.

SCHIESTL, F. P.; MARION-POLL, F. Detection of Physiologically Active Flower Volatiles Using Gas Chromatography Coupled with Electroantennography. In: JACKSON, J.; LINSKENS, H. (Eds.). **Analysis of Taste and Aroma.** Molecular Methods of Plant Analysis. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2002. v. 21p. 173–198.

SCHMIDT-BÜSSER, D. et al. Identification of host-plant chemical stimuli for the European grape berry moth *Eupoecilia ambiguella*. **Physiological Entomology**, v. 36, n. 2, p. 101–110, jun. 2011.

SCHNEIDER, D. Elektrophysiologische Untersuchungen von Chemo- und Mechanorezeptoren der Antenne des Seidenspinners *Bombyx mori* L. **Zeitschrift für vergleichende Physiologie**, v. 40, n. 1, p. 8–41, 1 jan. 1957.

SCHWERDTFEGGER, M.; GERLACH, G.; KAISER, R. Anthecology in the Neotropical Genus *Anthurium* (Araceae): A Preliminary Report. **Selbyana**, v. 23, n. 2, p. 258–267, 2002.

SCOTT, I. M. et al. Insecticidal activity of *Piper tuberculatum* Jacq. extracts: synergistic interaction of piperamides. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 4, n. 2, p. 137–144, maio 2002.

SIEGEL, G. J. (ED.). **Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects**. 7th ed ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier, 2006.

SILVA, W. C. et al. Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera: Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 2, p. 293–298, jun. 2007.

SMITH, K. K. et al. Anxiolytic effects of kava extract and kavalactones in the chick social separation-stress paradigm. **Psychopharmacology**, v. 155, n. 1, p. 86–90, abr. 2001.

SOTOMAYOR, J. A. et al. *Thymus zygis* Subsp. Gracilis: Watering Level Effect on Phytomass Production and Essential Oil Quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 17, p. 5418–5424, 1 ago. 2004.

STASI, L. C. D.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo-SP: UNESP, 2002.

STÖHR, J. R.; XIAO, P. G.; BAUER, R. Constituents of Chinese Piper species and their inhibitory activity on prostaglandin and leukotriene biosynthesis in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, n. 2–3, p. 133–139, maio 2001.

STOWE, M. K. et al. The chemistry of eavesdropping, alarm, and deceit. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 1, p. 23–28, jan. 1995.

STRICKLER, M. P. et al. Strategy for the preparative-scale high-performance liquid chromatographic isolation of kadsurenone and futoquinol from the medicinal plant *Piper futokadsura*. **Journal of Chromatography A**, v. 484, p. 369–379, dez. 1989.

SUNILA, E. ; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 2–3, p. 339–346, fev. 2004.

THOMAZINI, M. J. A comunicação química entre os insetos: obtenção e utilização de feromônios no manejo de pragas. In: **Embrapa Florestas**. p. 339–354.

TRIGO, J. R. et al. Ecologia Química. **Chemkeys - Liberdade para aprender**, p. 1–9, 2000.

TYAGI, O. D. et al. Lignans and neolignans from *Piper schmidtii*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 2, p. 445–448, jan. 1993.

VAN DEN DOOL, H.; DEC. KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, n. 0, p. 463–471, 1963.

WALKER, S. F. **Animal Communication**. In: Boston, MA: Elsevier, 2009. p. 26–35.

WENDT, L. D. **Estudo taxonômico dos gêneros de Richardiidae e análise filogenética de Richardiinae (Diptera, Tephritoidea)**. Tese de Doutorado—Manaus, Amazonas: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, maio 2012.

WENDT, L. D.; ALE-ROCHA, R. Taxonomic revision of wasp-like richardiids, *Neoidiotypa* Osten-Sacken (Diptera, Tephritoidea, Richardiidae). **Zootaxa**, v. 3857, n. 4, p. 527, 1 set. 2014.

WHITTAKER, R. H.; FEENY, P. P. Allelochemicals: Chemical Interactions between Species. **Science**, v. 171, n. 3973, p. 757–770, fev. 1971.

WHITTON, P. A. et al. Kava lactones and the kava-kava controversy. **Phytochemistry**, v. 64, n. 3, p. 673–679, out. 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides**. Geneva: World Health Organization, 2005.

WYATT, T. D. **Pheromones and animal behaviour: communication by smell and taste**. Cambridge, UK ; New York: Cambridge University Press, 2003.

XUAN, T. D. et al. Herbicidal and Fungicidal Activities of Lactones in Kava (*Piper methysticum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 720–725, fev. 2006.

APÊNDICE A – Artigo aceito e publicado como requisito ao doutorado no programa de Pós-Graduação em Química da UFPE

Experimental Parasitology 165 (2016) 64–70



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexpr



Full length article

Composition and biological activities of the essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (Piperaceae)



Marcelo Felipe Rodrigues da Silva^a, Patrícia Cristina Bezerra-Silva^a,
Camila Soledade de Lira^a, Bheatriz Nunes de Lima Albuquerque^a,
Afonso Cordeiro Agra Neto^{b, c}, Emmanuel Viana Pontual^d, Jefferson Rodrigues Maciel^c,
Patrícia Maria Guedes Paiva^b, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro^{a, *}

^a Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-560, Recife, PE, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, PE, Brazil

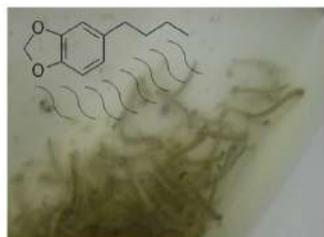
^c Jardim Botânico de Recife, Pernambuco, 54240-450, Recife, PE, Brazil

^d Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brazil

HIGHLIGHTS

- Essential oil of *Piper corcovadensis* exhibited larvicidal and strong oviposition deterrent activities.
- The major constituents of the oil were 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene **BMDB** and terpinolene.
- Essential oil and terpinolene are able to interfere with the activity of proteases from L₄ gut enzymes.
- This paper constitutes the first report of biological activities associated with essential oil of leaves of *P. corcovadensis*.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 July 2015

Received in revised form

1 December 2015

Accepted 14 March 2016

Available online 16 March 2016

Keywords:

Piperaceae

Piper corcovadensis

Essential oil

1-Butyl-3,4-methylenedioxybenzene

Larvicidal activity

Oviposition activity

Proteases enzymes

ABSTRACT

Essential oil from fresh leaves of the shrub *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC was obtained in 0.21% (w/w) yield by hydrodistillation in a Clevenger type apparatus. Thirty-one components, accounting for 96.61% of the leaf oil, were identified by gas chromatography-mass spectrometry. The major constituents of the oil were 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene (30.62%), terpinolene (17.44%), *trans*-caryophyllene (6.27%), α -pinene (5.92%), δ -cadinene (4.92%), and Limonene (4.46%). Bioassays against larvae of the Dengue mosquito (*Aedes aegypti*) revealed that leaf oil (LC₅₀ = 30.52 ppm), terpinolene (LC₅₀ = 31.16 ppm), and pure 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene (LC₅₀ = 22.1 ppm) possessed larvicidal activities and are able to interfere with the activity of proteases from L₄ gut enzymes. Additionally, the essential oil exhibited a strong oviposition deterrent activity at 50 and 5 ppm. This paper constitutes the first report of biological activities associated with the essential oil of leaves of *P. corcovadensis*.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

* Corresponding author.

E-mail address: dmf@ufpe.br (D.M.A.F. Navarro).

1. Introduction

Piper is the largest genus in the family Piperaceae and comprises more than 4000 species distributed in 5 genera including *Manekia*, *Peperomia*, *Piper*, *Verhuellia* and *Zippelia* (Gutierrez et al., 2013; Samain et al., 2010). Members of the genus *Piper* are found in tropical regions throughout the world and are employed in folk medicine in various countries including Brazil, China, India, Jamaica and Mexico (Parmar et al., 1997). In Brazil, for example, *Piper cernuum* (known locally as “pimenta-de-morcego”) is used to combat abdominal colic (Stasi and Hiruma-Lima, 2002), while *Piper marginatum* and *Piper tuberculatum* are employed as sedatives against snake bites (de Araújo Júnior et al., 1999; Stasi and Hiruma-Lima, 2002).

A number of studies have demonstrated the cytotoxic (Orjala et al., 1994), insecticidal (Lima et al., 2009), bactericidal (Dognini et al., 2012), leishmanicidal (Ghosal et al., 2012) and fungicidal (Prakash et al., 2012) activities of extracts and essential oils derived from a number of species of *Piper*. Additionally, the essential oils of *Piper permucronatum*, *Piper hostmanianum* and *P. marginatum* have been shown to possess significant larvicidal activities against the invasive dengue-transmitting mosquito *Aedes aegypti* with respective LC₅₀ values of 36 and 54 µg/mL (de Moraes et al., 2007) and 14.3 ppm (Autran et al., 2009).

The chemical constituents of *Piper* species generally comprise flavonoids, amides, lignans, terpenes, steroids, propenylphenols, and alkaloids (Parmar et al., 1997). Moreover, the essential oils of many *Piper* species were found to contain high concentrations of the phenylpropene safrole (Gupta et al., 1985) various analogues of which are widely used as intermediates in the synthesis of diverse therapeutic agents (Barreiro and Fraga, 1999). In this context, the essential oils of *Piper callosum*, *Piper divaricatum* and *Piper xylosteoides* reportedly comprise 64, 98 and 84.1% of safrole, respectively (Barbosa et al., 2012; Dognini et al., 2012; Maia et al., 1987), while *Piper hispidinervum* (long pepper) oil contains 90% of safrole such that this species is becoming a major commercial source of the phenylpropene in Brazil (Lima et al., 2009). Furthermore, safrole along with α and β -pinene are known to be active against *A. aegypti* (Barbosa et al., 2012; Simas et al., 2004).

The terpene terpinolene was also found in the essential oil of several species of *Piper*, such as *P. xylosteoides* (Potzernheim et al., 2006), *Piper reginellii* (dos Santos et al., 2015), *Piper aleyreanum* (da Silva et al., 2014), among others (Bagheri et al., 2014; Péres et al., 2009; Pimentel et al., 2013), in smallest amounts (below 5%, except *P. hispidinervum*, with 5.4% (Sauter et al., 2012)). Biological activities associated with terpinolene have also been described, such as antiviral (Bagezza, 2012) activity and inhibitor proteins in cancer cells (Matsuda, 2011), as well as its strong larvicidal activity against *A. aegypti* and *Aedes albopictus* (Cheng et al., 2009).

The shrub *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (syn. *Otonia corcovadensis*), also known as fake jaborandi, is used in Brazilian folk medicine to combat toothache. A recent study revealed that piperovatin, a compound with bactericidal, tickicidal, insecticidal, piscicidal, anti-inflammatory and anesthetic activities, was a major constituent of the leaf, stem and root extracts of this species (Marques, 2009). An earlier work describes the composition, but reports no biological activity of the essential oil of leaves of *P. corcovadensis* (Facundo et al., 2004). On this basis, the aim of the present study was to identify the components of the essential oil from leaves of *P. corcovadensis* and to investigate the larvicidal, proteases from L₄ gut enzymes and oviposition activities of the oil against *A. aegypti*.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Leaves of *P. corcovadensis* were collected at the Jardim Botânico de Recife, (Pernambuco, Brazil). Plant material was authenticated by Jefferson Rodrigues Maciel and a voucher specimen deposited at the Herbarium of the Jardim Botânico de Recife with identification number J. R. MACIEL 1655.

2.2. Preparation of essential oil

Fresh leaves (ca. 500 g) were comminuted and hydrodistilled for 3 h in a modified Clevenger-type apparatus. The essential oil layer was separated from the hydrolate (aqueous layer), dried over anhydrous sodium sulfate, and stored in a hermetically sealed amber-glass vial at -5°C until required for analysis. The percentage yield of essential oil was taken as the quotient of the weight of obtained essential oil divided by the fresh weight of the leaves. After hydrodistillation, the residual plant material was filtered and the so obtained aqueous extract was reserved for bioassays (Santos et al., 2012). The whole procedure was repeated 3 times.

2.3. Gas chromatographic analyses

Gas chromatography (GC) was performed using a Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) Trace GC Ultra gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID), a split/splitless injector and a Hamilton Bonaduz (Bonaduz Switzerland) HB-5 fused silica capillary column (30 m \times 0.25 mm; film thickness 0.25 µm). The oven temperature was held at 40 °C for 2 min and then increased at 4 °C/min to 230 °C. The injector and detector were both maintained at 250 °C, and the essential oil solution was injected in the splitless mode. Each analysis was carried out in triplicate. Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) was carried out using an Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) series 5975C quadrupole analyzer equipped with an Agilent J & W non-polar DB-5 fused silica capillary column (60 m \times 0.25 mm i.d.; film thickness 0.25 µm). The oven temperature was held at 60 °C for 3 min, then increased at 2.5 °C/min to 240 °C and subsequently held for 10 min. The helium carrier gas flow was maintained with a constant pressure of 100 kPa, and the injector was operated at 250 °C in the split mode (1:20). The detector temperature was 280 °C, the ionization potential was 70 eV, and mass spectra were scanned in the range 20–350 *m/z* at a rate of 0.5 scans/s (Autran et al., 2009).

2.4. Identification of oil constituents

Individual components of the essential oils were initially identified from their Retention Indices, obtained by co-injection of oil samples and C₈–C₃₀ *n*-alkanes, calculated according to the equation of van Den Dool and Kratz (1963), and compared with those published by Adams (2007). The acquired mass spectra were matched with those stored in the library of the GC–MS system (MassFinder 4 comprising NIST08 MS Library and Wiley Registry of Mass Spectral Data, 9th Edition) and with other published data. The composition of each essential oil was expressed in the form of percentages of total peak area as recorded by GC–FID.

2.5. Isolation and characterization of 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene (BMDB)

A solution of the essential oil of *P. corcovadensis* (80 mg in 5 mL hexane) was subjected to preparative thin-layer chromatography

on a silica gel plate (20 × 20 cm) using hexane as the eluting solvent. The area of silica gel layer associated with the major component (RF = 0.27, hexane; UV detection) was recovered, extracted with hexane, and the solvent removed under reduced pressure to yield pure compound **BMDB** (21 mg; 26.3% yield). The ¹H and ¹³C NMR spectra of pure compound **BMDB** dissolved in CDCl₃ were recorded using a Varian Unity Plus 300 MHz spectrometer operated at 300 MHz for ¹H and 75 MHz for ¹³C. Chemical shifts were recorded in ppm (δ) with TMS as internal standard.

2.6. Assay of larvicidal activities

The larvicidal activities of the essential oil from leaves of *P. corcovadensis*, terpinolene, and of the isolated **BMDB** were assayed against fourth-instar *A. aegypti* using an adaptation of the method recommended by the World Health Organization (Navarro et al., 2003; Santos et al., 2012; World Health Organization, 2005). Stock solutions (100 ppm) were prepared by dissolving 10 mg of either essential oil, or terpinolene, or pure **BMDB** in 0.1 g of tween 80 and diluting with distilled water to a final volume of 100 mL. Twenty early fourth-instar larvae of *A. aegypti* were placed in a beaker containing the diluted test solution, and larval mortality

was determined after 24 and 48 h. Larvae were considered dead when they did not respond to stimulus or when they did not rise to the surface of the solution (World Health Organization, 2005). Assays were replicated four times and each was accompanied by a negative control in which the larvae were treated with 0.1 g of tween 80 in distilled water. Themephos (0.01 ppm) was used as positive control. Hydrolate and aqueous extract were assayed using a concentration range of 1–100% (v/v). Piper essential oil, **BMDB** and terpinolene were assayed using a concentration range of 20–50 ppm, 14–24 ppm and 20–45 ppm, respectively. Lethal concentration 50 (LC₅₀) values were calculated using a probit analysis with a reliability interval of 95% (Santos et al., 2012).

2.7. Assay of oviposition activities

The oviposition bioassay was performed according to the method of Navarro et al. (2003). Test solutions containing 50 ppm of sample were prepared by diluting 10 mg of essential oil in 1.4 mL of ethanol and diluting with distilled water to a final volume of 200 mL. The control solution contained 1.4% of ethanol in distilled water. Ten gravid *A. aegypti* females were placed in a bioassay cage (33 × 21 × 30 cm) together with two disposable cups (10 cm

Table 1
Identification of constituents of the essential oil obtained from fresh leaves of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC.

N°	Identify ^a	Retention Indices		Content (as % of total oil) ± StDv	
		Determined ^b	Literature ^c		
1	α-Pinene	932	932	5.92	0.119
2	Sabinene	972	969	0.20	0.081
3	β-Pinene	974	974	2.59	0.553
4	β-Myrcene	991	988	1.89	0.044
5	α-Phellandrene	1003	1002	0.80	0.151
6	Carene <δ-3>	1009	1008	1.06	0.201
7	α-Terpinene	1016	1014	0.27	0.009
8	Cymene <para->	1024	1020	0.29	0.016
9	Limonene	1028	1024	4.46	0.140
10	γ-Terpinene	1058	1054	0.16	0.034
11	Terpinolene	1088	1086	17.44	0.181
12	trans-Sabinol	1135	1137	0.15	0.037
13	α-Copaene	1378	1374	0.73	0.027
14	1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene	1402	1408 ^d	30.62	0.931
15	α-Gurjunene	1412	1409	0.56	0.083
16	trans-Caryophyllene	1422	1417	6.27	0.049
17	β-Gurjunene	1435	1431	0.54	0.028
18	α-Humulene	1458	1452	0.57	0.088
19	allo-Aromadendrene	1465	1458	0.34	0.015
20	trans-Cadina-1(6),4-diene	1481	1475	0.17	0.043
21	Germacrene D	1486	1484	2.12	0.066
22	β-Alaskene	1501	1498	1.66	1.500
23	γ-Cadinene	1519	1513	1.93	0.016
24	δ-Cadinene	1528	1522	4.92	0.121
25	trans-Cadina-1,4-diene	1537	1533	0.30	0.006
26	α-Cadinene	1542	1537	0.31	0.007
27	Unidentified sesquiterpene	1579	–	3.91	0.119
28	Caryophyllene oxide	1586	1582	0.42	0.003
29	Cubanol <1-epi->	1631	1628	0.16	0.010
30	τ-Cadinol	1644	1638	2.48	0.087
31	α-Murolol	1649	1644	0.40	0.050
32	α-Cadinol	1657	1652	2.97	0.077
Phenylpropanoids					30.62 (1)
Monoterpene					35.08 (11)
Oxygenated Monoterpene					0.15 (1)
Sesquiterpene					20.42 (13)
Oxygenated Sesquiterpene					6.43 (5)
Unidentified sesquiterpene					3.91 (1)
Total					96.61

^a Peaks listed in order of elution from a 30 m non-polar DB-5 capillary column, GC-FID detector.

^b Retention Indices calculated in relation to a series of C₈–C₃₀ n-alkanes.

^c Values taken from Adams (2007) (Adams, 2007) unless otherwise stated.

^d Value taken from Nascimento et al. (2013) (Nascimento et al., 2013).

Table 2

Activities against fourth-instar larvae of *Aedes aegypti* of extracts obtained by hydrodistillation of the leaves of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC, terpinolene and of **BMDB**, the major components of the essential oil.

Sample	LC ₅₀ ^a	95% Confidence interval
Essential oil (ppm)	30.52 ± 0.99	28.64–32.51
Aqueous extract (%) ^b	2.93 ± 0.08	2.77–3.10
Hydrolate	Not active	–
1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene (ppm)	22.11 ± 0.50	21.13–23.08
Terpinolene (ppm)	31.16 ± 0.90	29.54–33.06

^a Mean values ± SD ($n = 4$) of lethal concentration 50.

^b Percentage (v/v) concentration of aqueous extract.

diameter), one containing 25 mL of test solution and the other 25 mL of control solution, located at the diagonally opposite corners of the cage. A piece (12 × 12 cm) of filter paper was placed on the internal surface of each cup to provide a support for oviposition. The cages were maintained in the dark at 28 ± 1 °C under 70 ± 5% relative humidity for 16 h following which the oviposition response was determined from the number of eggs laid on each of the filter papers. Each assay was replicated at least six times. Differences between mean values were analyzed using the Student *t*-test and those presenting *p* values < 0.05 were considered to be statistically significant (Autran et al., 2009; Santos et al., 2012). The same experiment was performed to pure **BMDB** (15 ppm) and terpinolene (8.5 ppm).

2.8. Effect of essential oil from *P. corcovadensis* leaves, **BMDB** and terpinolene on *L*₄ gut enzymes

2.8.1. *A. egypti* *L*₄ extract

The extract from *L*₄ gut was obtained according to Napoleão et al. (2012). The larvae were anesthetized by incubating them at 4 °C during 10 min and their guts were torn out with a needle using a stereomicroscope (Leica MZ6). Next, the guts (approximately 100) were homogenized with 0.1 M Tris–HCl pH 8.0 containing 0.15 M NaCl (1 mL) in a tissue grinder. Following, the mixture was centrifuged (9,000 × *g*, 4 °C, 15 min) and the supernatant corresponded to the *L*₄ gut extract, which was used to investigate the effects of essential oil, **BMDB** and terpinolene on *L*₄ gut enzymes. The protein content in *L*₄ gut extract was estimated according to Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin (31.25–500 µg/ml) as the standard.

2.8.2. Zymography of proteases from *L*₄ gut after incubation with the essential oil from *P. corcovadensis* leaves, **BMDB** or terpinolene

Zymography for proteases was carried out according to the method described by Garcia-Carreño et al. (1993). Aliquots of *L*₄ gut extract (20 µg of protein) were incubated with 1.0 µg of the

essential oil, **BMDB** or terpinolene for 30 min at 27 ± 5 °C. 0.1 M Tris–HCl pH 8.0 corresponded to the control solution. Next, the mixtures were submitted to SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis containing sodium dodecyl sulfate) using a 12% (w/v) gel prepared according to Laemmli (1970). The gel was placed in a styrofoam box containing ice during the electrophoresis running aiming to maintain the temperature below 10 °C to avoid damages to *L*₄ enzymes. After running, the gel was washed with a 2.5% Triton X-100 solution prepared in 0.1 M Tris–HCl pH 8.0 to remove the denaturing agent SDS and incubated (30 min at 4 °C) with 3% casein (w/v) in 0.1 M Tris–HCl pH 8.0. Following, the gel was incubated at 37 °C for 90 min to allow the digestion of casein by *L*₄ gut proteases. After incubation time, the gel was washed with 0.1 M Tris–HCl pH 8.0 and stained with 0.02% (v/v) Coomassie Brilliant Blue in 10% (v/v) acetic acid. Light bands against the dark background indicate digestion of casein and thus were considered proteolytic polypeptides (Pontual et al., 2012).

2.8.3. Effect of essential oil from *P. corcovadensis* leaves, **BMDB** and terpinolene on trypsin activity from *L*₄ gut

The assay was performed in microtiter plates (TPP-Techno Plastic Products), according to the procedure reported by Pontual et al. (2012). *L*₄ gut extract (20 µg of protein) was incubated (15 min) with the essential oil (5–25 µg), **BMDB** (1.0–12.5 µg) or terpinolene (5–30 µg) to allow their possible interaction with *L*₄ trypsin-like enzymes. Control of enzyme activity was performed using *L*₄ gut extract in absence of essential oil and **BMDB**. After incubation, the substrate *N*-benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA, 8 µM) was added (5 µL) and the experiments were maintained at 37 °C during 30 min for substrate hydrolysis. Next, the absorbance at 405 nm was measured and the inhibition of *L*₄ trypsin activity was calculated by the quotient between the values of remaining trypsin activity in presence of essential oil or **BMDB** and the activity from control (100% trypsin activity). Three independent experiments were performed in triplicate.

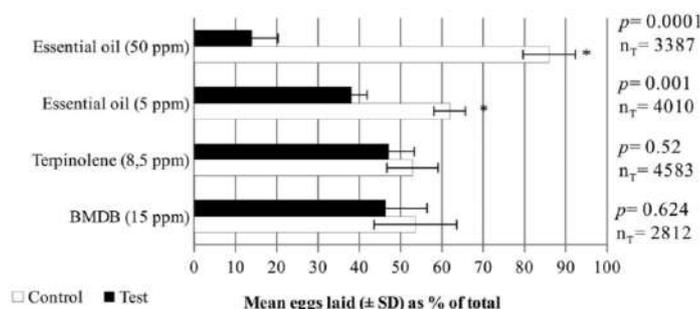
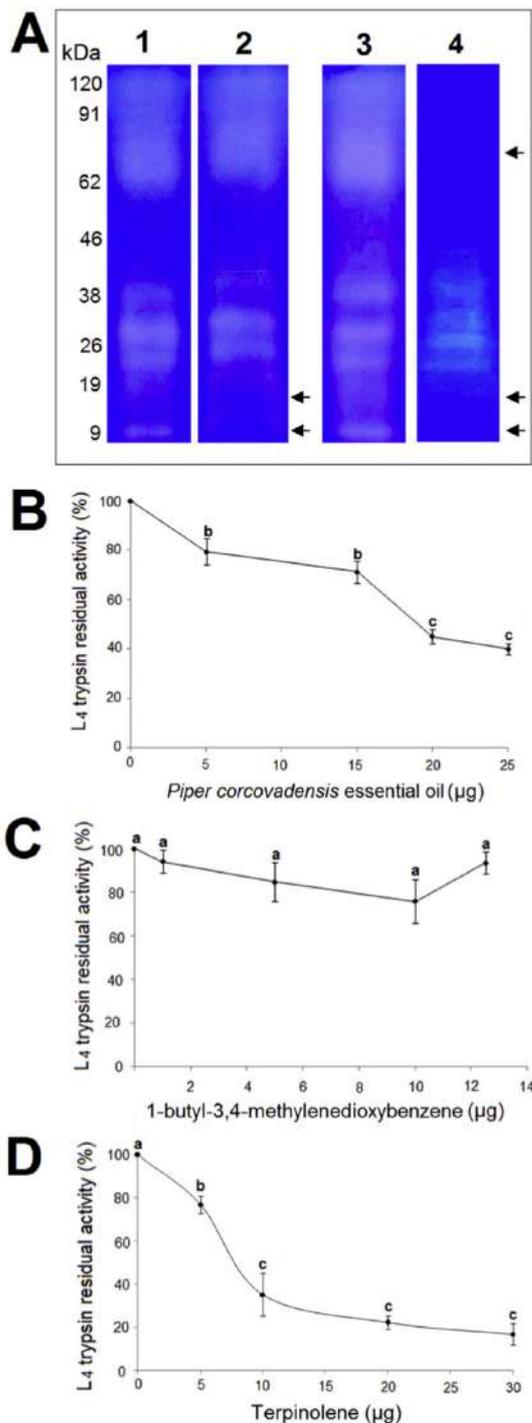


Fig. 1. Oviposition responses of gravid *Aedes aegypti* to the essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC, Terpinolene and 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene (**BMDB**). Assays were replicated at least 6 times and each involved 10 gravid female mosquitoes. The values shown are representing mean percentages ± SD of the total eggs laid in response to the treatment. *n*_T = total number of eggs.



3. Results and discussion

The major constituents of the oil were found to be 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene (30.62%), terpinolene (17.44%), *trans*-caryophyllene (6.27%), α -pinene (5.92%), δ -cadinene (4.92%), and Limonene (4.46%), Table 1. These results differ from those found by the authors Fadunco et al. (2004). These authors identified only 16 components of the leaf oil, and the major constituents were *trans*-caryophyllene (13.6%), limonene (12.7%), and *epi*-bicyclosesquiphelandrene (10.3%). The specimens analyzed in the present study were collected in the Atlantic forest near to Recife (state of Pernambuco, northeastern Brazil), while those studied by Fadunco et al. (2004) were collected in the Amazon forest in the vicinity of Porto Velho (state of Roraima, northern Brazil). The difference of the oil compositions could be related to different edaphic conditions or variations in the populations studied, or could also be due to the use of different cryptic species or subspecies.

The mass spectrum of BMDB and the ^1H and ^{13}C NMR spectra of the pure compound were consistent with the literature data (Marques et al., 2008; Moreira et al., 1997). The safrole derivative BMDB was described for the first time as the major component of the essential oil of *Ottonia vahlii* (Pinder and Price, 1967) and has subsequently been detected in *Ottonia anisum* (Moreira et al., 1997) and in the leaves, root, seed and stem of *Piper klotzschianum* (Nascimento et al., 2013).

The essential oils of several species in the family Piperaceae contain phenylpropanoids that possess diverse biological properties including antioxidant (*p*-methoxycinnamic acid (Korkina, 2007) and antimicrobial (3-[3,4-dihydroxy-phenyl]-propionic acid methyl ester (D'Almeida et al., 2012)) activities.

Evaluations of the larvicidal activities of the essential oil from leaves of *P. corcovadensis* and of compound BMDB against the Dengue mosquito larvae were performed. In preliminary larvicidal assays, the leaf oil showed 0, 70 and 100% mortality against fourth-instar *A. aegypti* at concentrations of 10, 50 and 100 ppm, respectively. The LC_{50} value of 30.52 ppm for the essential oil (Table 2) was calculated from the results of bioassays carried in the concentration range 20–50 ppm. According to Cheng et al. (2003), essential oils that show $\text{LC}_{50} < 50$ ppm can be regarded as possessing high larvicidal activities. Other essential oils of Piper species were shown to possess significant larvicidal activity against *A. aegypti*, as *Piper aduncum* ($\text{LC}_{50} = 46.00$ ppm), *P. marginatum* ($\text{LC}_{50} = 34.00$ ppm) and *P. klotzschianum* ($\text{LC}_{50} = 10.00$ ppm) (Nascimento et al., 2013; Santana et al., 2015).

Isolated compound BMDB (GC purity of 99.37%) showed stronger activity than the essential oil, exhibiting an LC_{50} value of 22.1 ± 0.5 ppm whereas terpinolene showed a $\text{LC}_{50} = 31.16$ ppm. Biological activity was already reported for safrole and derivatives (Hung et al., 2003; Su et al., 2007; Navarro et al., 2014). These data are similar to those exhibited by (*R*)- and (*S*)-limonene, γ -terpinene and *p*-cymene, LC_{50} : 27 ppm, 30 ppm, 56 ppm and <50 ppm, respectively (Navarro et al., 2014).

The aqueous extract and the hydrolate obtained from the hydrodistillation of the essential oil (section 2.2) were also submitted to the larvicidal bioassay, but only the aqueous extract

Fig. 2. Effect of essential oil from *Piper corcovadensis* leaves and BMDB on L4 gut enzymes. (A) Zymography of proteases from L4 gut extract (1) and L4 gut extract after incubation with *P. corcovadensis* essential oil (2), BMDB (3) or Terpinolene (4). Arrows indicate the polypeptide bands in L4 gut extract that were inhibited after incubation with the essential oil. Inhibition of trypsin activity from L4 gut extract by *P. corcovadensis* essential oil (B), BMDB (C), and Terpinolene (D). The 100% of L4 gut trypsin activity corresponded to an absorbance (405 nm) of 0.244 ± 0.009 . The dots are the mean \pm standard deviations of three independent experiments achieved in triplicate. Different letters indicate significant ($p < 0.05$) differences between the effects of different concentrations for each sample.

showed a good larvicidal activity (Table 2).

In the oviposition bioassays, the leaf oil from *P. corcovadensis* showed a strong oviposition deterrent effect since, in comparison with the control vessel, significantly lower percentages of eggs were laid in the test vessels containing essential oil at concentrations of 5 ppm (38.1% laid eggs: $\text{cup}_{\text{test}} = 38.1\% \pm 10.8$; $\text{cup}_{\text{control}} = 61.9\% \pm 10.8$; $p = 0.001$) and 50 ppm (12.3% laid eggs: $\text{cup}_{\text{test}} = 12.3\% \pm 4.86$; $\text{cup}_{\text{control}} = 87.7\% \pm 4.86$; $p < 0.001$) (Fig. 1).

A literature search showed that in most of the essential oils from *Piper* species, the monoterpene terpinolene was present in concentrations below 1%, save for *P. hispidinervum* (5.4%) (Sauter et al., 2012), *P. aduncum* (2.06%) (Potzernheim et al., 2006) and *P. xylosteoides* (1.4%) (Potzernheim et al., 2006). In essential oil of *P. corcovadensis* studied in this work, terpinolene represent 17.44%, being the second major component after **BMDB**. According to the literature, this monoterpene has strong larvicidal activity against *A. aegypti* (Perumalsamy et al., 2009), but no study on its oviposition deterrent activity was performed, which motivated us to do so. However, the terpinolene has not shown deterrent activity of oviposition in 8.5 ppm, the concentration that reflect its composition in the oil (47.1% laid eggs: $\text{cup}_{\text{test}} = 47.1\% \pm 17.6$; $\text{cup}_{\text{control}} = 52.9\% \pm 17.6$; $p = 0.52$) (Fig. 1). The major components of the oil did not exhibit oviposition deterrent activity in the concentrations tested. A minor component of the oil may be responsible to the oviposition deterrent activity.

It has been reported that *A. aegypti* larvae secrete several serine proteases including trypsin- and chymotrypsin-like enzymes, which are involved in insect digestion processes (Kunz, 1978; Venancio et al., 2009). In addition, several studies have reported that the insecticidal mechanism of a set of compounds active against *A. aegypti* involves the inhibition of digestive enzymes (Agra-Neto et al., 2014; Napoleão et al., 2012; Pontual et al., 2012). In this sense, we evaluated if the essential oil from *P. corcovadensis* leaves and the majority compounds **BMDB** and terpinolene are able to interfere with the activity of proteases from L_4 gut.

Zymography for proteases revealed that L_4 gut extract contains a set of active proteases with molecular mass ranging from 120.0 to 9.0 kDa, since many light bands were observed against the dark background of casein stained with Coomassie Brilliant Blue (Fig. 2A, Lane 1). This datum agrees with that reported by Napoleão et al. (2012) which also reported that the extract from L_4 gut contains multiple polypeptides with proteolytic activity. The zymography also revealed that incubation of L_4 gut extract with *P. corcovadensis* essential oil resulted in the blockage of at least two proteases from L_4 gut, since a reduction in intensity of the lytic zone was observed for polypeptides of approximately 19.0 and 9.0 kDa (Fig. 2A, Lane 2). On the other hand, no protease inhibition was observed when L_4 extract was incubated with **BMDB** (Fig. 2A, Lane 3). Similar to the profile detected for the essential oil, incubation with terpinolene also inhibited the intensity of proteolytic polypeptides with molecular mass of 19.0 and 9.0 kDa. In addition, the terpinolene inhibited the activity of polypeptide bands with high molecular masses.

The importance of trypsin-like enzymes for nutrition, growth and development of *A. aegypti* larvae (Borovsky and Meola, 2004; Kunz, 1978; Venancio et al., 2009) stimulated us to evaluate the effect of *P. corcovadensis* essential oil, **BMDB** and terpinolene on trypsin activity from L_4 gut. The trypsin inhibition assay revealed that the essential oil from *P. corcovadensis* and the terpinolene significantly ($p < 0.05$) inhibited the activity of L_4 trypsin-like enzymes (Fig. 2B and D), while this activity was not significantly ($p > 0.05$) altered by **BMDB** (Fig. 2C). These results corroborate with that from Zymography described above.

When compounds that are able to inhibit digestive enzymes are offered to insect larvae, the blockage of protein hydrolysis at the

larval gut can impair the absorption of essential amino acids, leading the insect to death by starvation (Paiva et al., 2013). The data reported here suggested that the larvicidal mechanism of *P. corcovadensis* essential oil and terpinolene involves the inhibition of proteases from L_4 gut, including trypsin-like enzymes, while **BMDB** seems lead the larvae to death by other mechanisms that not include damages to proteolysis at the larval gut. The essential oil compounds are capable to kill *A. aegypti* larvae by proteases inhibition (Santos et al., 2014).

4. Conclusion

The essential oil from leaves of *P. corcovadensis* were extracted and identified. The major components were 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene (**BMDB**) and terpinolene. The aqueous extracts and the leaf essential oil, as well as pure **BMDB** and terpinolene, exhibit significant larvicidal activity against *A. aegypti*. The leaf oil presented a strong oviposition deterrent effect even in low concentration (5 ppm), the oil inhibiting egg laying of pregnant females. According to Trypsin inhibition assays the larvicidal mechanism of *P. corcovadensis* essential oil and terpinolene involves the inhibition of the activity of L_4 trypsin-like enzymes whereas **BMDB** should act through other mechanisms.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Dengue (CNPq/INCTDengue) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco/Programa de Fomento a Núcleos de Excelência/Programa de Pesquisa para o Sistema Único de Saúde (FACEPE/PRONEX 2008/PPSUS 2008) for financial support.

References

- Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, fourth ed. Allured Publishing, Carol Stream.
- Agra-Neto, A.C., Napoleão, T.H., Pontual, E.V., Santos, N.D. de L., Andrade Luz, L., Oliveira, C.M.F., Melo-Santos, M.A.V., Coelho, L.C.B.B., Navarro, D.M.A.F., Paiva, P.M.C., 2014. Effect of *Moringa oleifera* lectins on survival and enzyme activities of *Aedes aegypti* larvae susceptible and resistant to organophosphate. Parasitol. Res. 113, 175–184. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-013-3640-8>.
- Autran, E.S., Neves, I.A., Silva, C.S.B., Santos, G.K.N., Câmara, C.A.G., Navarro, D.M.A.F., 2009. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). Bioreour. Technol. 100, 2284–2288. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.10.055>.
- Bagetta, G. (Ed.), 2012. Herbal Medicines: Development and Validation of Plant-derived Medicines for Human Health, Clinical Pharmacognosy. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Bagheri, H., Abdul Manap, M.Y.B., Solati, Z., 2014. Response surface methodology applied to supercritical carbon dioxide extraction of *Piper nigrum* L. essential oil. LWT – Food Sci. Technol. 57, 149–155. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.01.015>.
- Barbosa, Q.P.S., Câmara, C.A.G. da, Ramos, C.S., Nascimento, D.C.O., Lima-Filho, J.V., Guimarães, E.F., 2012. Chemical Composition, Circadian Rhythm and Antibacterial Activity of Essential Oils of *Piper Divaricatum*: a New Source of Safrão, vol. 35, pp. 1806–1808.
- Barreiro, E.J., Fraga, C.A.M., 1999. A utilização do safrão, principal componente químico do óleo de sassafrão, na síntese de substâncias bioativas na cascata do ácido araquidônico: anti-inflamatórios, analgésicos e anti-trombóticos. Quim. Nova 22, 744–759.
- Borovsky, D., Meola, S.M., 2004. Biochemical and cytoimmunological evidence for the control of *Aedes aegypti* larval trypsin with Aea-TMOF. Arch. Insect Biochem. Physiol. 55, 124–139. <http://dx.doi.org/10.1002/arch.10132>.
- Cheng, S.-S., Chang, H.-T., Chang, S.-T., Tsai, K.-H., Chen, W.-J., 2003. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. Bioreour. Technol. 89, 99–102. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00008-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00008-7).
- Cheng, S.-S., Chang, H.-T., Lin, C.-Y., Chen, P.-S., Huang, C.-G., Chen, W.-J., Chang, S.-T., 2009. Insecticidal activities of leaf and twig essential oils from *Clausena excavata* against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae. Pest Manag. Sci. 65, 339–343. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.1693>.

- D'Almeida, R.E., Alberto, M.R., Quispe, C., Schmeda-Hirschmann, G., Isla, M.I., 2012. Antimicrobial phenylpropanoids from the Argentinean highland plant *Parastrephia lucida* (Meyen) Cabrera. *J. Ethnopharmacol.* 142, 407–414. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.05.010>.
- Da Silva, J.K.R., Pinto, L.C., Burbano, R.M.R., Montenegro, R.C., Guimarães, E.F., Andrade, E.H.A., Maia, J.G.S., 2014. Essential oils of Amazon Piper species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Ind. Crops Prod.* 58, 55–60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.04.006>.
- De Araújo Júnior, J.X., de Oliveira Chaves, M.C., da Cunha, E.V.L., Gray, A.J., 1999. Cepharanone B from *Piper tuberculatum*. *Biochem. Syst. Ecol.* 27, 325–327. [http://dx.doi.org/10.1016/S0305-1978\(98\)00083-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0305-1978(98)00083-0).
- De Morais, S.M., Facundo, V.A., Bertini, L.M., Cavalcanti, E.S.B., dos Anjos Júnior, J.F., Ferreira, S.A., de Brito, E.S., de Souza Neto, M.A., 2007. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from Piper species. *Biochem. Syst. Ecol.* 35, 670–675. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2007.05.002>.
- Dognini, J., Meneghetti, E.K., Teske, M.N., Begnini, I.M., Rebelo, R.A., Dalmarco, E.M., Verdi, M., de Gaspar, A.L., 2012. Antibacterial activity of high safrole contain essential oils from *Piper xylostoides* (Kunth) Steudel. *J. Essent. Oil Res.* 24, 241–244. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2012.676768>.
- Dos Santos, A.L., Polidoro, A., dos, S., Schneider, J.K., da Cunha, M.E., Saucier, C., Jacques, R.A., Cardoso, C.A.L., Mota, J.S., Caramão, E.B., 2015. Comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry (GC×GC/TOFMS) for the analysis of volatile compounds in *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. essential oils. *Microchem. J.* 118, 242–251. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2014.07.007>.
- Facundo, V.A., Morais, S.M., Braz Filho, R., 2004. Constituintes químicos de *Ottonia corcovadensis* Miq. da floresta Amazônica: atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono. *Quim. Nova* 27, 79–83.
- Garcia-carreno, F.L., Dimes, L.E., Haard, N.F., 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* 214, 65–69. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1993.1457>.
- Ghosal, S., Deb, A., Mishra, P., Vishwakarma, R., 2012. Leishmanicidal compounds from the fruits of *Piper longum*. *Planta Med.* 78, 906–908. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1298537>.
- Gupta, M.P., Arias, T.D., Williams, N.H., Bos, R., Tattje, D.H.E., 1985. Safrole. The main component of the essential oil from *Piper auritum* of Panama. *J. Nat. Prod.* 48 <http://dx.doi.org/10.1021/np50038a026>, 330–330.
- Gutiérrez, R.M.P., González, A.M.N., Hoyo-Vadillo, C., 2013. Alkaloids from piper: a review of its phytochemistry and pharmacology. *Mini Rev. Med. Chem.* 13, 163–193. <http://dx.doi.org/10.2174/1389557511313020001>.
- Hung, S.-L., Chen, Y.-L., Chen, Y.-T., 2003. Effects of safrole on the defensive functions of human neutrophils. *J. Periodontol. Res.* 38, 130–134. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0765.2003.01652.x>.
- Korkina, L.G., 2007. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. *Cell. Mol. Biol. Noisy-Gd. Fr.* 53, 15–25.
- Kunz, P.A., 1978. Resolution and properties of the proteinases in the larva of the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem.* 8, 43–51. [http://dx.doi.org/10.1016/0020-1790\(78\)90009-4](http://dx.doi.org/10.1016/0020-1790(78)90009-4).
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>.
- Lima, R.K., Cardoso, M.G., Moraes, J.C., Melo, B.A., Rodrigues, V.G., Guimarães, P.L., 2009. Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Amaz.* 39, 377–382.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Maia, J.G.S., Silva, M.L. da Luz, A.J.R., Zogbi, M.G.B., Ramos, L.S., 1987. Espécies de Piper da Amazônia ricas em safrol. *Química Nova* 10, 200–204.
- Marques, A.M., Velozo, L.S.M., Guimarães, E.F., Kaplan, M.A.C., 2008. Caracterização de derivado arributanolídico em folhas e raízes de *Ottonia anisum* Sprengel. *Rev. Bras. Farmacogn.* 18, 709–712.
- Marques, J.V., 2009. Atividade Biológica de Amidas e Análogos de Espécies de Piper e Estudos Biossintéticos (Doctorate Thesis). Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Matsuda, S., 2011. Terpinolene, a component of herbal sage, downregulates AKT1 expression in K562 cells. *Oncol. Lett.* 3, 321–324. <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2011.491>.
- Moreira, D.L., Kaplan, M.A.C., Guimarães, E.F., 1997. 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene as the major constituent of essential oil from *Ottonia anisum* Sprengel (Piperaceae). *J. Essent. Oil Res.* 9, 565–568. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.1997.9700778>.
- Napoléão, T.H., Pontual, E.V., Lima, T. de A., Santos, N.D. de L., Sá, R.A., Coelho, L.C.B.B., Navarro, D.M.A.F., Paiva, P.M.G., 2012. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. *Parasitol. Res.* 110, 609–616. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-011-2529-7>.
- Nascimento, J.C. do, David, J.M., Barbosa, L.C., de Paula, V.F., Demuner, A.J., David, J.P., Conserva, L.M., Ferreira, J.C., Guimarães, E.F., 2013. Larvicidal activities and chemical composition of essential oils from *Piper klotzschianum* (Kunth) C. DC. (Piperaceae). *Post Manag. Sci.* 69, 1267–1271. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.3495>.
- 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., 2003. The potential attractant or repellent effects of different water types on oviposition in *Aedes aegypti* L. (Dipt., Culicidae). *J. Appl. Entomol.* 127, 46–50. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0418.2003.00690.x>.
- Navarro, D.M.A.F., da Silva, P.C.B., da Silva, M.F.R., Napoléão, T.H., Paiva, P.M.G., 2014. Larvicidal activity of plant and algae extracts, essential oils and isolated chemical constituents against *Aedes aegypti*. *Nat. Prod. J.* 3, 268–291. <http://dx.doi.org/10.2174/221031550304140328113732>.
- Orjala, J., Wright, A.D., Behrends, H., Folkers, G., Sticher, O., Rüegger, H., Rali, T., 1994. Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*. *J. Nat. Prod.* 57, 18–26. <http://dx.doi.org/10.1021/np50103a003>.
- Paiva, P.M.G., Pontual, E.V., Napoléão, T.H., Coelho, L.C.B.B., 2013. Lectins and trypsin inhibitors from plants: biochemical characteristics and adverse effects on insect larvae. In: *Insects and Other Terrestrial Arthropods: Biology, Chemistry and Behavior*, Microbiology Research Advances. Nova Science Publishers, New York, p. 52.
- Parmar, V.S., Jain, S.C., Bish, K.S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O.D., Prasad, A.K., Wengel, J., Olsen, C.E., Boll, P.M., 1997. Phytochemistry of the genus piper. *Int. J. Plant Biochem. Mol. Biol.* 46, 597–673. [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00328-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00328-2).
- Péres, V.F., Moura, D.J., Sperotto, A.R.M., Damasceno, F.C., Caramão, E.B., Zini, C.A., Safi, J., 2009. Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. *Food Chem. Toxicol.* 47, 2389–2395. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.06.035>.
- Perumalsamy, H., Kim, N.-J., Ahn, Y.-J., 2009. Larvicidal activity of compounds isolated from *Asarum heterotropoides* against *Culex pipiens pallens*, *Aedes aegypti*, and *Ochlerotatus togol* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 46, 1420–1423.
- Pimentel, F.A., Cardoso, M. das G., Guimarães, I.G.L., Queiroz, F., Barbosa, L.C.A., Morais, A.R., Nelson, D.L., Andrade, M.A., Zaccaroni, L.M., Pimentel, S.M.N.P., 2013. Extracts from the leaves of *Piper piscatorum* (Trel. Yunc.) obtained by supercritical extraction of with CO₂, employing ethanol and methanol as co-solvents. *Ind. Crops Prod.* 43, 490–495. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.067>.
- Pinder, A.R., Price, S.J., 1967. The chemistry of *Ottonia vahlii*, Kth. Part I. The volatile constituent. *J. Chem. Soc. C. Org.* 2597–2598. <http://dx.doi.org/10.1039/J9670002597>.
- Pontual, E.V., Napoléão, T.H., Dias de Assis, C.R., de Souza Bezerra, R., Xavier, H.S., Navarro, D.M.A.F., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G., 2012. Effect of *Moringa oleifera* flower extract on larval trypsin and acetylcholinesterase activities in *Aedes aegypti*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 79, 135–152. <http://dx.doi.org/10.1002/arch.2012.1012>.
- Potzernheim, M., Costa, A.F., Bizzo, H.R., Carvalho-Silva, M., Vieira, R.F., 2006. Essential oil of *Piper xylostoides* (Kunth) Steud. From Federal district. *Braz. J. Essent. Oil Res.* 18, 523–524. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2006.9699160>.
- Prakash, B., Singh, P., Mishra, P.K., Dubey, N.K., 2012. Safety assessment of *Zanthoxylum alatum* Roxb. essential oil, its antifungal, antiflatuloxin, antioxidant activity and efficacy as antimicrobial in preservation of *Piper nigrum* L. fruits. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 183–191. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2011.11.007>.
- Samain, M.-S., Vrijdaghs, A., Hesse, M., Goetghebuer, P., Jimenez Rodriguez, F., Stoll, A., Neinhuis, C., Wanke, S., 2010. Verhuelia is a segregate lineage in Piperaceae: more evidence from flower, fruit and pollen morphology, anatomy and development. *Ann. Bot.* 105, 677–688. <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcq031>.
- Santana, H.T., Trindade, F.T.T., Stabeli, R.G., Silva, A.A.E., Militão, J.S.T.L., Facundo, V.A., 2015. Essential oils of leaves of Piper species display larvicidal activity against the dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Rev. Bras. Plantas Med.* 17, 105–111.
- Santos, G., Dutra, K., Lira, C., Lima, B., Napoléão, T., Paiva, P., Maranhão, C., Brandão, S., Navarro, D., 2014. Effects of *Ortisia rhamnifolioides* essential oil on *Aedes aegypti* oviposition, larval toxicity and trypsin activity. *Molecules* 19, 16573–16587. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules191016573>.
- 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., 2012. Essential oils from *Alpinia purpurata* (Zingiberaceae): chemical composition, oviposition deterrence, larvicidal and antibacterial activity. *Ind. Crops Prod.* 40, 254–260. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.03.020>.
- Sauter, I.P., Rossa, G.E., Lucas, A.M., Cibulski, S.P., Roehle, P.M., da Silva, L.A.A., Rott, M.B., Vargas, R.M.F., Cassel, E., von Poser, G.L., 2012. Chemical composition and amoebicidal activity of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil. *Ind. Crops Prod.* 40, 292–295. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.03.025>.
- Simas, N.K., Lima, E. da C., Conceição, S. da R., Kuster, R.M., Oliveira Filho, A.M. de, Lage, C.L.S., 2004. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue: atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Quim. Nova* 27, 46–49.
- Stasi, L.C.D., Hiruma-Lima, C.A., 2002. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica, second ed. UNESP, São Paulo-SP.
- Su, L., Zhao, B., Lv, X., Wang, N., Zhao, J., Zhang, S., Miao, J., 2007. Safrole oxide induces neuronal apoptosis through inhibition of integrin β4/SOD activity and elevation of ROS/NADPH oxidase activity. *Life Sci.* 80, 999–1006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2006.11.041>.
- Van Den Dool, H., Dec Kratz, P., 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr. A* 11, 463–471. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X).
- Venancio, T.M., Cristofoletti, P.T., Ferreira, C., Verjovski-Almeida, S., Terra, W.R., 2009. The *Aedes aegypti* larval transcriptome: a comparative perspective with emphasis on trypsins and the domain structure of peritrophins. *Insect Mol. Biol.* 18, 33–44. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2583.2008.00845.x>.
- World Health Organization, 2005. Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides. World Health Organization, Geneva.