



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE**



**ESTUDOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DOS ÓLEOS ESSENCIAS E EXTRATOS
DE *Hyptis dilatata* Benth (Lamiaceae), PROCEDENTES DA SERRA DO TEPEQUÉM -
AMAJARI / RORAIMA**

SIRLEY PEREIRA ALMEIDA

**Manaus-AM
Julho / 2017**

SIRLEY PEREIRA ALMEIDA

**ESTUDOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS
DE *Hyptis dilatata* Benth (Lamiaceae), PROCEDENTES DA SERRA DO TEPEQUÉM -
AMAJARI / RORAIMA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE / UFAM, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Linha de Pesquisa: Bioprospecção e Desenvolvimento de Bioprocessos e Bioprodutos

Orientador: Dr. Wanderli Pedro Tadei (INPA)

Co-orientador: Dr. Antônio Alves de Melo Filho
Dr. Otoniel Ribeiro Duarte

**Manaus-AM
Julho / 2017**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A447e Almeida, Sirley Pereira
Estudos Químicos e Biológicos dos Óleos Essenciais e Extratos de *Hyptis dilatata* Benth (Lamiaceae), procedentes da Serra do Tepequém - Amajari / Roraima / Sirley Pereira Almeida. 2017
152 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Wanderli Pedro Tadei
Coorientador: Antônio Alves de Melo Filho
Coorientador: Otoniel Ribeiro Duarte
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Óleo essencial. 2. bactérias. 3. *Aedes aegypti*. 4. *Anopheles darlingi*. I. Tadei, Wanderli Pedro II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

SIRLEY PEREIRA ALMEIDA**“ESTUDOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DO ÓLEO ESSENCIAL E
EXTRATOS DE *Hyptis dilatata* BENTH (LAMIACEAE), PROCEDENTES DA
SERRA DO TEPEQUÉM-AMAJARI/RORAIMA”.**

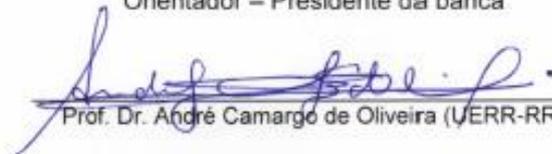
Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, na Universidade do Estado do Amazonas-UEA, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia e Biodiversidade.

Orientador: Prof. Dr. Wanderli Pedro Tadei

Banca examinadora:

Prof. Dr. Wanderli Pedro Tadei (INPA)

Orientador – Presidente da banca



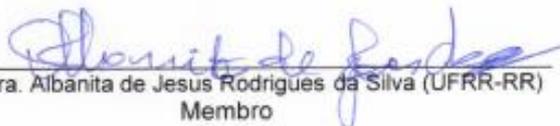
Prof. Dr. André Camargo de Oliveira (UERR-RR)

Membro



Profa. Dra. Elisângela Gomes Fidelis de Moraes (EMBRAPA)

Membro



Profa. Dra. Alvanita de Jesus Rodrigues da Silva (UFRR-RR)

Membro



Prof. Dr. Habel Nasser Rocha da Costa (UFRR-RR)

Membro

MANAUS – AMAZONAS

Julho/2017

Dedico este trabalho ao meu Deus todo poderoso por ser minha fortaleza, que por meio do seu infinito amor me conduz a desenvolvê-lo. Ao meu esposo José Roberto, a minha mãe Eunice e as minhas princesas, Heloísa e Gabriela.

Com saudades, dedico ao meu pai José Bezerra Filho (*in memoriam*), pelo amor, carinho e ensinamentos a mim transmitidos, e por tudo que fez em vida para que eu alcançasse.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser a luz e a fortaleza na minha vida, sem a sua ajuda nada seria possível.

Ao meu marido, José Roberto, que sempre foi meu companheiro e meu alicerce, desde o início deste curso, apoiando e tendo paciência nos momentos difíceis e cuidando das nossas filhas na minha ausência, com carinho e dedicação.

As minhas filhas que são meus tesouros, Heloísa e Gabriela, pela paciência e compreensão dos momentos que estive ausente, durante o desenvolvimento desta tese.

Aos meus pais José Bezerra Filho (in memoriam) e Eunice Pereira Silva, que sempre investiram na minha vida, e por tudo que se esforçaram para me oferecer dentro dos limites e possibilidades, pelo amor, paciência e preocupação, e aos meus irmãos que sempre se alegraram com minha vitória.

Ao meu co-orientador professor Dr. Antônio Alves de Melo Filho por ter me recebido e ensinado o caminho correto a seguir para o progresso desta pesquisa, por sua motivação, alegria, e dedicação que não mediu esforço para ajudar até em trabalho de campo. Agradeço também a sua esposa Cristina que contribuiu bastante, tanto na pesquisa em laboratório, como na pesquisa de campo, e a sua filha Mariana com sua grande ajuda na coleta da espécie em estudo, e toda equipe do grupo oleoquímicos do laboratório de química da UFRR, pelo carinho e ajuda, ao Pedro que sempre colaborou com esta pesquisa.

Agradeço ao meu orientador Dr. Wanderli Pedro Tadei, pela orientação deste trabalho e a dedicação, e ao meu outro co-orientador Dr. Otoniel Ribeiro Duarte, pela sua amizade e dedicação, sempre me apoiando, liberando os técnicos da EMBRAPA, para ajudar na coleta, o senhor Dalton e sua esposa que foram várias vezes comigo para pesquisa de campo, a Dra. Jane, e a todos da EMBRAPA-RR que ajudaram neste trabalho.

Agradeço a equipe do laboratório Malária e Dengue/INPA (Ricardo Katak, Jhuan, Elerson, Marta, D. Maria, Adriano, Eunice, Augusto, William e Joelma) que se tornaram pessoas de extrema importância na etapa final deste doutorado, pelo carinho, brincadeiras, amizades e sempre que precisei não negaram ajuda no decorrer do desenvolvimento das pesquisas em laboratório.

Eunice e Augusto, foram pessoas de extrema importância na finalização desta tese, não mediram esforço para ajudar no que precisei.

Aos meus companheiros de luta William e Joelma, noites sem dormir, de segunda a segunda no laboratório, duas pessoas que foram fundamentais para que eu finalizasse essa tese com êxito. Obrigada pela amizade, paciência, companheirismo em tudo, sei que minha aflição

refletia neles, pois procuravam sempre me ajudarem, mesmo tendo suas ocupações, portanto foram incansáveis nesta luta junto comigo.

A minha amiga peruana Diana, que sempre esteve ao meu lado, sempre que precisei.

A Juciane e família pelo carinho que sempre me recebeu na sua casa.

A Dra. Rose, que sempre me atendeu, nunca negou ajuda, foi fundamental na etapa final do doutorado.

Aos técnicos do laboratório de malária e dengue INPA/Manaus, ao Juracy, a Rejane que ajudou bastante no início da pesquisa, chegou a se deslocar das suas atividades, me acompanhando várias vezes nas coletas de campo. Aos meus amigos de Manaus que direta e indiretamente me ajudaram sempre que precisei.

A Dra. Ana Cristina, que me ajudou bastante no desenvolvimento das pesquisas finais.

Agradeço também aos meus amigos do doutorado, Helder Amorim, Cláudia Blair e Rosilene, pela amizade e a motivação que sempre passamos um para o outro, o cuidado que sempre tiveram comigo, ao esposo da minha amiga Cláudia Blair, o João Matos, desde que conheci este casal sempre procuraram me ajudar.

A Fernanda Guilhões que me recebeu no seu laboratório de Farmácia com muito carinho, sua ajuda foi fundamental em uma parte do desenvolvimento deste trabalho, liberando também alunos para auxiliar na pesquisa, a Talita e o Carlos.

À Dona Francisca (in memoriam), que no início deste curso me acolheu na sua casa com amor e carinho.

À minha amiga Shirley a qual tenho muito carinho e sua família por seu amor e carinho e sua contribuição.

Nossos sinceros agradecimentos à Fundação de Amparo de Pesquisa da Amazônia-FAPEAM, pelo auxílio da bolsa que financiou esse estudo.

À Secretaria de Educação do Estado de Roraima pela liberação para cursar o doutorado fora do estado.

A todos os professores da Rede Bionorte, ao coordenador geral do curso - UFAM: Dr. Spartaco Astolfi Filho e ao coordenador estadual do polo de Manaus: Professor Dr. Jair Max Furtunato Maia.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram os meus sinceros agradecimentos.

“Aqueles que esperam no senhor renovam suas forças. Voam alto como águias. Correm e não ficam exaustos, andam e não se cansam”.

(Isaias 40:31)

RESUMO

As espécies da família Lamiaceae são conhecidas no Brasil por serem bastante aromáticas e por apresentarem propriedades bioativas como antioxidante, bactericida, fungicida e inseticida. Neste trabalho foi analisada a espécie *Hyptis dilatata* Benth, encontrada em áreas de cerrado no Brasil. Estudou-se os componentes químicos, a atividade biológica do óleo essencial e dos extratos de folhas e flores, considerando os períodos seco e chuvoso, de espécimes da Serra do Tepequém, em Roraima-Brasil. Os óleos essenciais foram extraídos das folhas coletadas em diferentes horários (manhã, tarde e noite) e das flores nos períodos seco e chuvoso. Em relação aos extratos hexânicos e etanólicos, oriundos das folhas e flores, estes foram extraídos de exemplares coletados nos períodos seco e chuvoso. Os resultados do perfil fitoquímico, originados a partir da análise dos extratos hexânicos e etanólicos das folhas e flores, apresentaram diferentes metabólitos secundários, sendo identificados cumarina, flavonóides, fenóis, saponinas, alcalóides, entre outros. A caracterização química dos óleos essenciais das folhas e flores mostrou como substâncias majoritárias α -pineno, β -pineno, limoneno, 3-careno, β -cariofileno, fenchona e cânfora. O óleo essencial extraído das flores, no período chuvoso e seco, inibiu a enzima acetilcolinesterase, respectivamente, 93,4% e 92,4%, enquanto que o óleo essencial extraído das folhas, no período seco e pela manhã, apresentou maior inibição (96,4%). Na análise da atividade de citotoxicidade, realizadas com larvas de *Artemia salina*, o óleo essencial extraído da folha coletada no período chuvoso, pela manhã, e o óleo essencial extraído da flor, coletada no período chuvoso, apresentaram maior toxicidade. Apresentaram também maior toxicidade os extratos etanólicos da folha e os extratos hexânicos da flor, ambas coletadas no período chuvoso. Nos ensaios antimicrobianos, os óleos das flores coletadas no período chuvoso e seco demonstraram maior inibição contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. A levedura *Candida albicans* só apresentou inibição com os óleos essenciais da flor coletada no período seco. No período chuvoso, somente o óleo essencial extraído das folhas coletadas no horário da manhã e tarde, mostraram inibição contra as bactérias *S. aureus* e *B. cereus*. Em relação ao período seco, o óleo essencial que apresentou maior inibição contra bactérias *B. cereus* foi coletado no horário da tarde. Os extratos hexânicos da flor coletada no período chuvoso mostraram maior inibição contra *S. aureus* e nas folhas coletadas no período chuvoso. Este extrato demonstrou maior toxicidade com a bactéria *Salmonella typhimurium*. No teste contra a levedura *C. albicans*, o extrato mais tóxico foi o hexânico da folha coletada no período seco. Neste trabalho também foram testados os óleos essenciais e extratos de *H. dilatata* em atividades larvicidas de *Aedes aegypti*, *Anopheles darlingi* e teste adulticidas com *Ae. aegypti*. O óleo essencial com maior toxicidade nas atividades larvicidas de *Ae. aegypti* foram extraídos da folha coletada no período chuvoso, no horário da noite e da flor no período chuvoso. Somente os extratos hexânicos extraídos das flores apresentaram atividade tóxica sobre as larvas de *Ae. aegypti*. Nas larvas de *An. darlingi*, a toxicidade predominou com os óleos essenciais das flores extraídas no período seco e no óleo essencial da folha extraído no mesmo período, no horário da manhã. Nos ensaios adulticida de *Ae. aegypti*, o óleo das folhas coletadas no período chuvoso, no horário da noite, apresentou mortalidade entre 54,4% a 91,9%, nas concentrações de 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, no intervalo de 90 minutos de exposição. No teste para o desenvolvimento do protótipo do produto com o óleo essencial da folha, coletada no período chuvoso e no horário da manhã, foi observada a ação do efeito *knockdown* (imobilidade do mosquito). Para tanto, considerou-se a atividade inseticida contra o mosquito *Ae. aegypti*, em 20 minutos no início do teste, com mais de 50% dos mosquitos em estado de *knockdown*.

Palavras Chave: Óleo essencial; bactérias; *Aedes aegypti*; *Anopheles darlingi*.

ABSTRACT

The species of the family Lamiaceae are known in Brazil for being very aromatic and for presenting bioactive properties as antioxidant, bactericide, fungicide and insecticide. In this work was analyzed *Hyptis dilatata* Benth, found in areas of cerrado in Brazil. The chemical components, the biological activity of the essential oil and extracts of leaves and flowers, considering dry and rainy periods, of specimens of the Serra do Tepequém, in Roraima-Brazil, were studied. The essential oils were extracted from the leaves collected at different times (morning, afternoon and night) and from the flowers in the dry and rainy periods. In relation to the hexane and ethanolic extracts from leaves and flowers, these were extracted from specimens collected during the dry and rainy season. The results of the phytochemical profile, derived from the analysis of the hexane and ethanolic extracts of leaves and flowers, presented different secondary metabolites, being identified coumarin, flavonoids, phenols, saponins, alkaloids, among others. The chemical characterization of the essential oils of leaves and flowers showed as main substances α -pinene, β -pinene, limonene, 3-carene, β -caryophyllene, fenchone and camphor. The essential oil extracted from the flowers in the rainy and dry period inhibited the enzyme acetylcholinesterase, respectively, 93.4% and 92.4%, whereas the essential oil extracted from the leaves, in the dry period and in the morning, showed greater inhibition (96.4%). In the analysis of the cytotoxicity activity performed with larvae of *Artemia salina*, the essential oil extracted from the leaf collected in the rainy period in the morning, and the essential oil extracted from the flower, collected in the rainy season, presented higher toxicity. The ethanolic extracts of the leaf and the hexane extracts of the flower, both collected during the rainy season, were also more toxic. In the antimicrobial assays, flower oils collected in the rainy and dry period demonstrated greater inhibition against the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. The *Candida albicans* yeast only showed inhibition with the essential oils of the flower collected in the dry period. In the rainy season only the essential oil extracted from the leaf collected in the morning and afternoon, showed inhibition against the bacteria *S. aureus* and *B. cereus*. Regarding the dry period, the essential oil that showed the highest inhibition in *B. cereus* bacteria was collected in the afternoon. The hexane extracts of the flower collected in the rainy season showed greater inhibition of *S. aureus* and in the leaves collected in the rainy season. This extract showed greater toxicity with the bacterium *Salmonella typhimurium*. In the test against yeast *C. albicans*, the most toxic hexanic extract was that of the leaf collected in the dry period. In this work the essential oils and extracts of *H. dilatata* were also tested in larvicidal activities of *Aedes aegypti*, *Anopheles darlingi* and adulticides with *Ae. aegypti*. The essential oil with higher toxicity in the larvicidal activities of *Ae. aegypti* were extracted from the leaf collected in the rainy season, at night time and from the flower in the rainy season. Only the hexane extracts extracted from the flowers showed toxic activity on the larvae of *Ae. aegypti*. In larvae of *An. darlingi*, toxicity predominated with the essential oils of the flowers extracted in the dry period and in the essential oil of the leaf extracted in the same period, in the morning. In the adulticidal assays of *Ae. aegypti*, leaf oil collected in the rainy season at night showed a mortality of 54.4% to 91.9%, at concentrations of 62.5 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ and 1000 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ respectively in the range of 90 minutes of exposure. The knockdown effect (mosquito immobility) was observed in the test for the development of the product prototype with leaf essential oil, collected in the rainy season and in the morning. For that, the insecticidal activity against the mosquito *Ae. aegypti*, in 20 minutes at the start of the test, with more than 50% of mosquitoes in knockdown state.

Key words: Essential oil; bacteria; *Aedes aegypti*; *Anopheles darlingi*.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura I-1 – Estrutura dos compostos isolados.....	29
Figura I-2 – Exsicata de <i>Hyptis dilatata</i> Benth	30
Figura I-3 – Folhas e flores de <i>Hyptis dilatata</i>	31
Figura I-4 – Extração do óleo essencial da flor.	33
Figura I-5 – Fluxograma da parte experimental das folhas e flores de <i>Hyptis dilatata</i>	34
Figura I-6 – Fluxograma das atividades biológicas dos extratos hexânico e etanólico das folhas de <i>H. Dilatata</i>	35
Figura I-7 – Período Chuvoso: Cumarina - Folha extrato hidroetanólico (A); Folha extrato etanólico (B); Folha extrato hexano (C).	43
Figura I-8 – Período Seco: Cumarina - Folha extrato hexano (A); Folha extrato etanólico (B); Flor extrato hidroetanólico (C); Folha extrato.	44
Figura I-9 – Teste para Heterosídeo: Período seco (A); Período chuvoso (B).	44
Figura I-10 – Teste para saponinas no período seco com extrato hidroetanólico da flor (A); extrato hexânico da folha (B); extrato etanólico; (C) extrato hidroetanólico da folha (D).	46
Figura I-11 – Teste para saponinas no período chuvoso com extrato hexânico da folha (A); extrato etanólico da folha (B).	46
Figura I-12 – Teste Para alcaloides no período seco: Reação DRG - Dragendoff na flor com extrato hidroetanólico (A); Reação de Mayer na flor do extrato hidroetanólico (B); Reação de Hager na flor com extrato hidroetanólico (C); Reação DRG na folha com extrato hidroetanólico (D); Reação de Mayer na folha do extrato hidroetanólico (E); Reação de Hager na folha do extrato hidretanólico (F); Reação de DRG na folha com extrato etanólico (G); Reação de Mayer na folha com extrato etanólico (H); Reação de Hager na folha com extrato etanólico (I); Reação DRG na folha com extrato hexano (J); Reação de Mayer na folha do extrato hexânico (K); Reação de Hager na folha com extrato hexânico (L).	47
Figura I-13 – Atividade do ensaio do radical livre DPPH, dos extratos hexânicos e etanólico das folhas e flores de <i>Hyptis dilatata</i> : A - *FHC - Extrato hexânico da folha do período chuvoso; B - FEC - Extrato etanólico da folha do período chuvoso; C -FLHC – Extrato hexânico da flor do período chuvoso; D - FHS – Extrato hexânico da folha do período seco; E - Padrão – Ácido Gálico.	52
Figura I-14 – Atividade do ensaio do radical livre ABTS, dos extratos hexânicos e etanólicodas folhas e flores de <i>Hyptis dilatata</i> : A - *FHC - Extrato hexânico da folha do período chuvoso; B - FEC - Extrato etanólico da folha do período chuvoso; C - FLHC – Extrato hexânico da flor do período chuvoso; D - FHS – Extrato hexânico da folha do período seco; E - Padrão - Ácido Gálico.	53

CAPÍTULO II

Figure II-1 – Chemical structures of the major constituents of the essential oils of <i>H. dilatata</i> flowers	66
---	----

- Figure II-2 – Chromatogram of the essential oil from *H. dilatata* flowers, harvested in the rainy period (A) and dry period (B)68
- Figure II-3 – Curve of essential oil activity of *Hyptis dilatata* essential oil against *Artemia salina*. A - Essential oil obtained in rainy period; B -Essential oil obtained in dry period71
- Figure II-4 – Curve of LC₅₀ for essential oil of *H. dilatata*: Rainy Period: A - *Staphylococcus aureus*; B - *Bacillus cereus*; C - *Citrobacter freundii*. Dry period: D - *Staphylococcus aureus*; E - *Bacillus cereus*; F - *Candida albicans*.....73

CAPÍTULO III

- Figura III-1 – Componentes químicos dos constituintes majoritários dos óleos essenciais da folha de *Hyptis dilatata*91
- Figura III-2 – Perfil cromatográfico do óleo essencial da folha *Hyptis dilatata* coletada no período seco, horário da manhã.1- α -pineno,2-Canfeno,3-Sabineno,4- β -pineno,5- Mirceno,6- α -felandreno,7- 3-careno,8- α -terpineno,9- p-cimeno,10- Limoneno,11- g-terpineno,12- Fenchona,13- Mentenol,14- Cãnfora,15- Fenchol,16- terpinen-4-ol,17- α -terpineol,18- β -cariofileno,19- Aromadendreno,20- Humuleno,21- D-germacrene,22- Óxido Cariofileno92
- Figura III-3 – Perfil cromatográfico do óleo essencial da folha *Hyptis dilatata* coletada no período seco, horário datarde. 1- α -pineno,2-Canfeno,3-Sabineno,4- β -pineno,5-Mirceno,6- α -felandreno,7- 3-careno,8- α -terpineno,9- p-cimeno,10- Limoneno,11- g-terpineno,12- Fenchona,13-Mentenol,14- Cãnfora,15- Fenchol,16- terpinen-4-ol,17- α -terpineol,18- β -cariofileno, 19- Aromadendreno, 20- Humuleno, 21- D-germacrene, 22- Óxido Cariofileno.....93
- Figura III-4 – Perfil cromatográfico do óleo essencial da folha *Hyptis dilatata* coletada no período seco, horário da noite.1- α -pineno,2- Canfeno,3- Sabineno,4- β -pineno,5- Mirceno,6- α -felandreno,7- 3-careno,8- α -terpineno,9- p-cimeno,10- Limoneno,11- g-terpineno,12-Fenchona,13- Mentenol,14- Cãnfora,15- Fenchol,16- terpinen-4-ol,17- α -terpineol,18- β -cariofileno, 19- Aromadendreno, 20- Humuleno, 21- D-germacrene, 22- Óxido Cariofileno.....94
- Figura III-5 – Perfil cromatográfico do óleo essencial da folha *Hyptis dilatata* coletada no período chuvoso, horário da manhã. 1- α -pineno,2- Canfeno,3- Sabineno,4- β -pineno,5- Mirceno,6- α -felandreno,7- 3-careno,8- α -terpineno,9- p-cimeno,10- Limoneno,11- g-terpineno,12-Fenchona,13- Mentenol,14- Cãnfora,15- Fenchol,16- terpinen-4-ol,17- α -terpineol,18- β -cariofileno, 19- Aromadendreno, 20- Humuleno, 21- D-germacrene, 22- Óxido Cariofileno.....95
- Figura III-6 – Perfil cromatográfico do óleo essencial da folha *Hyptis dilatata* coletada no período chuvoso, horário da tarde.1- α -pineno,2- Canfeno,3- Sabineno,4- β -pineno,5- Mirceno,6- α -felandreno,7- 3-careno,8- α -terpineno,9- p-cimeno,10- Limoneno,11- g-terpineno,12-Fenchona,13- Mentenol,14- Cãnfora,15- Fenchol,16- terpinen-4-ol,17- α -terpineol,18- β -cariofileno, 19- Aromadendreno, 20- Humuleno, 21- D-germacrene, 22- Óxido Cariofileno.....96
- Figura III-7 – Perfil cromatográfico do óleo essencial da folha *Hyptis dilatata* coletada no período chuvoso, horário danoite.1- α -pineno,2- Canfeno,3- Sabineno,4- β -pineno,5- Mirceno,6- α -felandreno,7- 3-careno,8- α -terpineno,9- p-cimeno,10- Limoneno,11- g-terpineno,12-Fenchona,13- Mentenol,14- Cãnfora,15- Fenchol,16- terpinen-4-ol,17- α -terpineol,18- β -cariofileno, 19- Aromadendreno, 20- Humuleno, 21- D-germacrene, 22- Óxido Cariofileno97
- Figura III-8 – Curva de atividade de óleo essencial das folhas coletadas no período seco/tarde: (A) *Staphylococcus aureus*, (B) *Bacillus cereus*, (C) *Citrobacter freundii*; período seco/noite: (D) *Staphylococcus aureus*, (E) *Bacillus cereus* e (F) *Citrobacter freundii* 105

Figura III-9 – Curva de atividade de óleo essencial das folhas coletadas no período chuvoso/ manhã: (A) <i>Staphylococcus aureus</i> ; e período chuvoso/tarde⊗ B) <i>Bacillus cereus</i>	106
---	-----

CAPÍTULO IV

Figura IV- 1 – Ovitampas utilizadas para a captura de ovos de <i>Aedes aegypti</i>	121
Figura IV- 2 – Criação das larvas de <i>Aedes aegypti</i> em laboratório.....	122
Figura IV- 3 – Repasto sanguíneo das fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> em laboratório. ... Erro! Indicador não definido.	
Figura IV- 4 – Oviposição das fêmeas de <i>Anopheles darlingi</i>	124
Figura IV- 5 – Estrutura dos ovos de <i>Anopheles darlingi</i>	125
Figura IV- 6 – Garrafas impregnadas contendo fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	128
Figura IV- 7 – Testes de atividade inseticida do protótipo do produto do óleo essencial de <i>Hyptis dilatata</i> para o controle de adultos de <i>Aedes aegypti</i>	129
Figura IV- 8 – Ação inseticida do óleo essencial de <i>Hyptis dilatata</i> em mosquitos <i>Aedes</i> Erro! Indicador não definido.	

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela I-1 – Quantidades de folhas frescas coletadas no período chuvoso e seco	31
Tabela I-2 – Peso das flores frescas coletadas no período chuvoso e seco, e seu peso depois de secas e moídas .	32
Tabela I-3 – Interpretação dos resultados do teste para antocianinas, antocianidinas e flavanóides	37
Tabela I-4 – Interpretação dos resultados do teste para leucoantocianidinas, catequinase flavanonas.	37
Tabela I-5 – Teor do óleo da flor de <i>Hyptis dilatata</i>	42
Tabela I-6 – Rendimento das extrações dos óleos essenciais da folha de <i>Hyptis dilatata</i>	43
Tabela I-7 – Resultados da base quaternária (Alcaloide) de <i>Hyptis dilatata</i>	47
Tabela I-8 – Teste de investigação para vários componentes químicos de <i>Hyptis dilatata</i> , coletada no período chuvoso e seco	49
Tabela I-9 – Porcentagens e concentrações inibitórias dos ensaios de atividades antioxidantes frente ao radical DPPH e ABTS.....	54
Tabela I-10 – Teores de flavonóides e Fenóis totais nos extratos das folhas e flores de <i>Hyptis dilatata</i>	55

CAPÍTULO II

Table II-1 – Chemical constituents in the essential oils of <i>H. dilatata</i> flower	66
Table II-2 – Antimicrobial activity of the flower essential oil of <i>H. dilatata</i> harvested in the rainy period	72
Table II-3 – Antimicrobial activity of the flower essential oil of <i>H. dilatata</i> harvested in the dry period.....	72

CAPÍTULO III

Tabela III-1 – Porcentagens dos constituintes identificados em óleos essenciais da folha de <i>Hyptis dilatata</i>	90
Tabela III-2 – Testes de inibição da acetilcolinesterase utilizando extratos e os óleos essenciais de <i>Hyptis dilatata</i> coletado no período seco.....	100
Tabela III-3 – Testes de inibição da acetilcolinesterase utilizando extratos e os óleos essenciais de <i>Hyptis dilatata</i> coletado no período chuvoso.....	100
Tabela III-4 – Valores de CL ₅₀ nos óleos essenciais de <i>Hyptis dilatata</i> contra larvas de <i>Artemia salina</i> na leitura de 24h.....	102
Tabela III-5 – Valores de CL ₅₀ dos extratos de <i>Hyptis dilatata</i> contra larvas de <i>Artemia salina</i> na leitura de 24h	103

Tabela III-6 – Valores da concentração inibitória (CI₅₀), dos ensaios antibacterianos e fungicidas com os extratos das folhas e flores de *Hyptis dilatata* coletadas no período seco e chuvoso 106

CAPÍTULO IV

Tabela IV- 1 – Valores de CL50 em mg/L dos óleos essenciais de *Hyptis dilatata* contra larvas de *Aedes aegypti* nos intervalos de observação de 24, 48 e 72 horas 132

Tabela IV- 2 – Valores de CL50% nos óleos essenciais de *Hyptis dilatata* contra larvas de *Anopheles darlingi* nos intervalos de observação de 24, 48 e 72 horas 134

Tabela IV- 3 – Média e desvio padrão da mortalidade de *Aedes aegypti*, por tempo de exposição do óleo essencial da folha de *Hyptis dilatata* coletada no período chuvoso, no horário da noite 138

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico)
AChE	Acetylcolinesterase
ATCC	American Type Culture Collection
ATCI	Cloreto de Acetilcolina
BHI	Brain Heart Infusion
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
°C	Grau Celsius
cm	Centímetro
CG-FID	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução
CG-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa
CEUA	Comitê de Ética de Uso Animal
CI ₅₀	Concentração Inibitória
CL ₅₀	Concentração Letal
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazila
DRG	Dragendoff
DTNB	5',5'-ditiobis- (2-ácido nitrobenzóico)
DMSO	Dimetilsufóxido
DP	Desvio Padrão
FEC	Extrato Etanólico da Folha do Período Chuvoso;
FES	Extrato Etanólico da Folha do Período Seco
FDP	Folha Dry Period
FHC	Extrato Hexânico da Folha do Período Chuvoso
FHS	Extrato Hexânico da Folha do Período Seco
FLEC	Extrato Etanólico da Flor do Período Chuvoso
FLES	Extrato Etanólico da Flor no Período Seco.
FLHC	Extrato Hexânico da Flor do Período Chuvoso
FLHS	Extrato Hexânico da Flor no Período Seco
FMS	Folha Manhã Seco
FMC	Folha Manhã Chuvoso
FNC	Folha Noite Chuvoso
FNS	Folha Noite Seco;
FTC	Folha Tarde Chuvoso
FTS	Folha Tarde Seco;
FRP	Folha Rain Period
g	Gramas
GL	Grau de Liberdade
IK	Índice de Kovats
IC	Intervalo de Confiança
IR	Índice de Retenção
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Km ²	Kilômetro quadrado
L	litro
LC	lethal concentration
mL	Mililitro
mg	miligrama
MPV	Matéria Prima Vegetal
MIR	Museu Integrado de Roraima

nm	Nanômetro
NPPGCT-UFRR	Núcleo de Pesquisa e Pós-graduação em Ciências e Tecnologia-
Universidade Federal de Roraima	
OE	Óleo Essencial
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial Hidrogeniônico
RP	Rain Period
SE	Erro padrão
SISBIO	Sistema de autorização e informação em biodiversidade
SUCEM	Superintendência de Controle de Endemias do estado de São Paulo
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais.
µg	Micrograma
µL	Microlitro

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xiv
1 INTRODUÇÃO	22
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
OBJETIVOS	25
CAPÍTULO I – PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA, POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DAS FOLHAS E FLORES DE <i>Hyptis dilatata</i> BENTH, COLETADAS NA SERRA DO TEPEQUÉM-AMAJARI / RORAIMA	26
1 INTRODUÇÃO.....	26
1.1 Gênero <i>Hyptis</i> (Lamiaceae).....	26
1.2 Classificação taxonômica e composição química de <i>Hyptis dilatata</i> Benth.....	27
1.2.1 Fatores que podem alterar constituintes químicos de plantas e a produção de óleos essenciais.....	29
2 MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1 Identificação botânica	30
2.2 Coleta e preparo do material vegetal.....	31
2.3 Extração do óleo essencial	32
2.4 Rendimento do óleo essencial	33
2.5 Obtenções, reparação dos extratos e marcha fitoquímica	35
2.5.1 Preparação dos extratos hexânico e etanólico.....	35
2.5.2 Preparação do extrato Hidroetanólico.....	36
2.5.3 Prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos, hexânicos e hidroetanólicos	36

2.5.4	Investigação de compostos fenólicos e esteroidais	36
2.5.4.1	Testes para taninos e fenóis	36
2.5.4.2	Teste para antocianinas, antocianidinas, chalconas e auronas	36
2.5.4.3	Teste para leucoantocianinas, catequinas e flavonas	37
2.5.4.4	Teste para flavanóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas (reação de Shinoda).....	37
2.5.4.5	Testes para saponinas	37
2.5.4.6	Teste confirmatório para saponinas.....	38
2.5.4.7	Teste para cumarinas	38
2.5.5	Teste de heterosídeos cianogênicos	38
2.5.6	Teste para base quaternária (Alcalóide).....	38
2.5.7	Glicosídeos cardioativos, esteroides e triterpenos	39
2.5.7.1	Identificação do núcleo lipídico	39
2.5.7.2	Identificação γ - lactona	39
2.5.7.3	Identificação das desoxioses	40
2.5.8	Ensaio do radical livre DPPH	40
2.5.9	Ensaio do radical livre ABTS	41
2.5.10	Teor de fenóis totais	41
2.5.11	Teor de flavonóides totais	41
2.5.12	Análise dos dados.....	42
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
3.1	Rendimento das extrações de óleos essenciais.....	42
3.2	Prospecção fitoquímica dos extratos	43
3.2.1	Testes para cumarinas	43
3.2.2	Teste para heterosídeo cianogênico	44
3.2.3	Teste para taninos e fenóis	44
3.2.4	Teste para Antocianinas, antocianidinas, chalconas e auronas	45
3.2.5	Teste para leucoantocianidina, catequinas e flavanonas	45

3.2.6	Teste para flavanóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas	45
3.2.7	Teste para Saponinas.....	45
3.3	Teste para base quaternária (alcaloide)	46
3.4	Glicosídeos cardioativos, esteroides e triterpenos.....	48
3.4.1	Identificação do núcleo lipídico.....	48
3.4.2	Identificação de γ -lactona	48
3.4.3	Identificação de desoxioses.....	48
3.5	Atividade oxidante: DPPH E ABTS	50
4	CONCLUSÕES.....	56
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
CAPÍTULO II - CHEMICAL COMPOSITION, ANTIACETYLCHOLINESTERASE		
INHIBITION AND TOXICITY ACTIVITIES OF ESSENTIAL OIL FROM <i>Hyptis</i>		
<i>dilatata</i> (LAMIACEAE) FLOWERS		
		60
1	INTRODUCTION	61
2	MATERIAL AND METHODS	62
2.1	GC-FID analysis.....	62
2.2	GC-MS analysis	63
2.3	Acetylcholinesterase (AChE) inhibition assay.....	63
2.4	Toxicity on <i>Artemia salina</i>	63
2.5	Antibacterial and yeast assay	64
3	RESULTS AND DISCUSSION	65
4	CONCLUSION	74
5	REFERENCES.....	75
CAPÍTULO III – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE <i>Hyptis dilatata</i> BENTH, TOXICIDADE		
PARA <i>Artemia salina</i> E O PONTENCIAL INIBITÓRIO NAS ATIVIDADES		
MICROBIANAS, E COM A ENZIMA ACETILCOLINESTERASE.....		
		78
1	INTRODUÇÃO.....	78
1.1	Óleos essenciais.....	79

1.2	Constituintes químicos dos óleos essenciais	80
1.2.1	Terpenos.....	81
1.3	Atividades biológicas	81
1.3.1	Atividade antimicrobiana e fungicida	81
1.3.2	Inibição de Acetilcolinesterase (Alzheimer).....	83
2	MATERIAL E MÉTODOS	84
2.1	Avaliação da Composição Química: CG-MS E CG-FID.....	84
2.2	Análise Química (CG-MS) - Cromatografia Gasosa Acoplada À Espectrometria de Massa	84
2.3	Análise química (CG-FID) - cromatografia gasosa de alta resolução	84
2.4	Atividade de inibição de acetilcolinesterase dos extratos de folhas e flores e do óleo essencial das folhas da <i>Hyptis dilatata</i> BENTH	85
2.4.1	Solução tampão Tris/HCL (50mM)	85
2.4.2	Solução estoque da enzima	85
2.4.3	Solução da enzima na concentração 0,222 U/mL	85
2.4.4	Solução trabalho.....	85
2.4.5	Preparação dos reagentes	85
2.5	Determinações da toxicidade dos extratos hexânicos e etanólicos e dos óleos essenciais das folhas de <i>H. dilatata</i> frente <i>Artemia salina</i>	86
2.5.1	Cálculo da CL ₅₀	87
2.6	Determinações da atividade antimicrobiana e fungicida do óleo das folhas e extratos das folhas e flores de <i>H. dilatata</i> Benth.....	87
2.6.1	Bioensaios-Bactérias e Leveduras	88
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
3.1	Análise química CG-MS e (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa) CG-FID (cromatografia de alta resolução)	89
3.2	Atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE)	100
3.3	Determinação da toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	102

3.4 Atividade antimicrobiana e fungicida do óleo essencial da folha e dos extratos da folha e flor <i>H. dilatata</i>	104
4 CONCLUSÕES	109
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
CAPÍTULO IV: ATIVIDADE LARVICIDA E ADULTICIDA DE EXTRATO E ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Hyptis dilatata</i> BENTH EM <i>Aedes</i> (<i>Stegomyia</i>) <i>aegypti</i> LINNAEUS, 1762 E <i>Anopheles darlingi</i> ROOT, 1926	115
1 INTRODUÇÃO	115
1.1 <i>Aedes aegypti</i> e transmissão de patógenos ao homem	115
1.2 <i>Anopheles darlingi</i> e transmissão da malária	117
1.3 Medidas de controle vetorial	118
2 MATERIAL E MÉTODOS	121
2.1 Bioensaio para avaliar a atividade inseticida dos óleos essenciais e extratos de <i>H. dilatata</i>	121
2.1.1 Manutenção de <i>Aedes aegypti</i> no insetário	121
2.1.2 Coleta e manutenção de larvas de <i>Anopheles</i> spp. e adultos de <i>Anopheles darlingi</i>	123
2.1.3 Bioensaios para avaliar atividade larvicida em <i>Aedes aegypti</i> e <i>Anopheles darlingi</i> . ..	125
2.1.4 Bioensaios seletivos com larvas de <i>Aedes aegypti</i> , da cepa Rockefeller e com larvas de <i>Anopheles</i> spp.	126
2.1.5 Bioensaios de Dose com larvas de <i>Aedes aegypti</i> e de <i>Anopheles</i> spp.	126
2.1.6 Análise dos dados	126
2.1.7 Teste da atividade adulticida com óleo essencial, pelo método de prova biológica com garrafas - padrão CDC	127
2.1.8 Protótipo do Produto com óleo essencial de <i>H. dilatata</i> para teste inseticida do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	128
2.1.8.1 Desenvolvimento do Protótipo do Produto	128
2.1.8.2 Avaliação da Eficácia do Protótipo do Produto	128
2.1.8.3 Análise Estatística	129
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	129

3.1 Avaliação da atividade larvicida	129
3.1.1 Bioensaio seletivo com larvas de <i>Aedes aegypti</i> , da cepa Rockefeller e de <i>Anopheles</i> spp.	129
3.1.2 Bioensaios de dose para <i>Aedes aegypti</i> e <i>Anopheles darlingi</i>	131
3.2 Teste adulticida com <i>Aedes aegypti</i>	137
3.2.1 Teste de prova biológica com garrafas padrão – CDC	137
3.2.2 Teste do protótipo do produto	138
4 CONCLUSÕES.....	143
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	144
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	151

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais apresentam uma grande variedade de compostos químicos e o homem sempre buscou conhecimentos das plantas, para uso medicinal. O Brasil tem uma flora rica em espécies, as quais são utilizadas pela sociedade por terem efeitos medicinais (BIESKI, 2005).

Robbers et al. (1997) destacaram a importância dos compostos de origem vegetal, enfatizando que estes desempenham importantes papéis na medicina moderna, bem como fornecem substâncias úteis, difíceis de produzir na forma sintética. Ressaltaram também que existem produtos naturais químicos que apresentam pequena atividade, mas que podem ser modificados por método químico ou biológico, para produzir drogas potentes, não obtidas facilmente por métodos sintéticos.

Destaca-se, ainda, a necessidade de intensificar as pesquisas direcionadas ao conhecimento de alterações, que podem resultar do uso prolongado dos quimioterápicos. Estes podem gerar intoxicações aos seres humanos que os utilizam, sem conhecimento de suas contraindicações. Além disso, a busca por novos fármacos, a partir de recursos naturais, é uma alternativa para combater muitos microrganismos patogênicos, como alguns fungos e bactérias, que já adquiriram resistência aos quimioterápicos, que se encontram disponíveis para comercialização. Rojas et al. (2003) analisaram 24 espécies de plantas utilizadas na medicina tradicional peruana, que inclui também espécies da família Lamiaceae, verificaram que os compostos antimicrobianos produzidos pelas plantas são ativos contra microrganismos patogênicos.

Vários estudos hoje com diferentes espécies comprovam cientificamente o que muitos anos atrás já se conhecia de forma empírica, as propriedades antimicrobianas encontradas em extratos de plantas, a partir do seu metabolismo (DUARTE et al., 2005; VIOLANTE, 2012).

O Brasil possui uma grande biodiversidade e, dentre ela, se encontra o bioma do cerrado, com diversas espécies de plantas com alto valor medicinal (SOUZA; FELFINI, 2006, VIOLANTE, 2008). Os dados da literatura evidenciam aumento no interesse de estudar plantas medicinais do cerrado, como fonte de novas substâncias ativas (GUARIN NETO; MORAIS, 2003).

As espécies da família Lamiaceae apresentam características de grande importância medicinal. Em algumas regiões de ocorrência dessas espécies é comum o uso, pelas populações, dos óleos essenciais e extratos como remédios e também como tempero. Essa família botânica apresenta alguns bioativos com ação antioxidante, anti-inflamatório, anti-hipertensivo,

antitumoral, gastroprotetor, inseticida, antibacteriano, antifúngico e anti-herpético, entre outros (BARROS et al., 2010; HUSSAIN et al., 2011).

A planta em estudo neste trabalho é a espécie *Hyptis dilatata* Benth, pertencente à família Lamiaceae. A pesquisa com óleo essencial envolve o período sazonal (seco e chuvoso) para avaliar a presença e/ou alterações qualitativas dos compostos químicos dos óleos essenciais, em cada período e horário (manhã, tarde e noite). O gênero *Hyptis* é bastante analisado devido ao óleo essencial de suas espécies conterem diversos compostos de grande interesse, como saponinas, terpenos, flavonóides e esteróides.

O interesse por esta planta resultou por ser de área serrana, coletada na Serra do Tepequém Município do Amajari no estado de Roraima e as coletas ocorreram no período seco (Janeiro a Março) e no período chuvoso (Junho a Agosto).

Neste trabalho, os estudos desenvolvidos com esta espécie foram relacionados com o período sazonal e o registro de compostos químicos dos óleos essenciais das folhas e flores e a realização de testes biológicos com extratos e óleos essenciais obtidos. O objetivo foi detectar atividade antimicrobiana, fungicida, inseticida e atividades com a enzima acetilcolinesterase, bem como antioxidante e a atividade tóxica, utilizando o microrganismo *Artemia salina*.

Desta forma, a Tese está estruturada em quatro capítulos, o primeiro apresenta o perfil fitoquímico e o potencial antioxidante dos extratos das folhas e flores de *H. dilatata*, analisando o rendimento dos óleos essenciais, comparando os resultados dos testes realizados com as amostras coletadas nos períodos seco e chuvoso.

O segundo capítulo aborda a composição química, a inibição da enzima acetilcolinesterase, atividade tóxica e antimicrobiana, testadas com o óleo essencial das flores de *H. dilatata*.

No terceiro capítulo apresenta a composição química do óleo essencial da folha de *H. dilatata*, bem como a atividade tóxica para o microrganismo *Artemia salina* e o potencial inibitório nas atividades antimicrobianas e com a enzima acetilcolinesterase.

O quarto capítulo envolve a atividade larvicida e adulticida de extratos e óleo essencial de *H. dilatata* em *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 e *Anopheles darlingi* Root, 1926. Neste capítulo também se apresenta a importância epidemiológica dos mosquitos e as medidas de controle vetorial, desenvolvidas a partir dos resultados dos bioensaios. Além disso, foi desenvolvido um **protótipo bioinseticida** a partir do óleo essencial da folha de *H. dilatata*.

Assim, com base nos estudos químicos e biológicos desenvolvidos neste trabalho, verifica-se que os resultados obtidos são relevantes para demonstrar a eficácia desta espécie em

estudo, tornando-se uma alternativa para o desenvolvimento de produtos terapêuticos, bem como de ação inseticida.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, L.; HELENO, S.A.; CARVALHO, A.M.; FERREIRA, I. Lamiaceae often used in portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: vitamins and phenolics. **LWT-Food Science and Technology**. 43: 544-550, 2010.

BIESKI, I.G.C.; **Plantas medicinais e aromáticas no Sistema Único de Saúde da Região Sul de Cuiabá – MT**. (Especialização em Plantas Mediciniais) – Depart. de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais. 2005.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G.; DELARMELINA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 97, p. 305-311, 2005.

GUARIM NETO, G.; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botânica Brasileira**, v.17, n.4, p. 561-584, 2003.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; VARRO, E.T.; **Farmacognosia**. Editorial Premier, São Paulo.372p,1997.

ROJAS, R.; BUSTAMANTE, B; BAUER, J.; FERNANDÉZ, I.; ALBÁN, J.; LOCK, O. Antimicrobial, Activity of Selected peruvian Medicinal Plants. **Journal Of Ehtnopharmacolgy**. Perú, v.88, p.199-04, Jun, 2003.

HUSSAIN, A.I.; ANWAR, F.; NIGAM, O.S.;SARKER, S.D.; MOORE, J.E.; RAO, J.R.; MAZUMDAR, A. Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. **LWT-Food Science and Technology**. 44:1199-1206, 2011.

SOUZA, C.D.; FELFINI, J.A. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v.20, n.1, p.135-142, 2006.

VIOLANTE, I.M.P. **Avaliação do potencial antimicrobiano e citotóxico de espécies vegetais do Cerrado da Região Centro-Oeste**. 2008.89p. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro Oeste) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2008.

VIOLANTE, I.M.P. **Avaliação das Atividades Biológicas e Estudo Químico de *Hyptis crenata* Pohle x Benth**. 2012. 210f. Tese (Doutorado em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2012.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Estudar os componentes químicos e atividades biológicas do óleo essencial e de extratos de folhas e flores *Hyptis dilatata* Benth (Lamiaceae) em períodos sazonais (seco e chuvoso), de espécimes procedentes da Serra do Tepequém, em Roraima.

Objetivos específicos

- (i) Comparar e identificar os constituintes químicos das folhas e flores de *H. dilatata*, coletadas no período chuvoso e no período seco;
- (ii) Avaliar e quantificar o óleo extraído das folhas coletadas nos horários: da manhã, da tarde e da noite, em cada período seco e chuvoso;
- (iii) Analisar as atividades antioxidantes e a atividade citotóxica com *Artemia salina*, dos extratos e óleos essenciais de *H. dilatata*;
- (iv) Avaliar a ação antimicrobiana, por meio de bioensaios, contra fungos e bactérias;
- (v) Avaliar atividade de inibição da enzima Acetilcolinesterase – em testes *in vitro* por meio do extrato bruto e óleo essencial, das folhas e flores da *H. dilatata*;
- (vi) Avaliar a ação inseticida contra larvas e adultos dos vetores da dengue/Chikungunya/*Aedes aegypti* e da malária-*Anopheles darlingi*.

CAPÍTULO I – PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA, POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DAS FOLHAS E FLORES DE *Hyptis dilatata* BENTH, COLETADAS NA SERRA DO TEPEQUÉM-AMAJARI / RORAIMA

1 INTRODUÇÃO

O Estado de Roraima está situado na Amazônia, região Norte, entre as 27 unidades federativas do Brasil, tem por limites a Guiana a Leste e a Venezuela ao Norte e a Noroeste, o Pará ao Sudeste, o Amazonas ao Oeste e ao Sul. Ocupa uma área aproximada de 224.301,080 km² (IBGE, 2017).

As áreas indígenas ocupam aproximadamente 104.018 km². A população de Roraima é de 522.400 habitantes (IBGE, 2017). Roraima apresenta alguns tipos de coberturas vegetais, sendo todas bem distintas. Ao sul do Estado, existe uma floresta tropical densa com ricas espécies de vegetais e animais, cortados por rios. Na região central roraimense, o domínio dos campos gerais, savanas, conhecida na região como lavrado, existindo ainda lagos e riachos. Em direção ao norte ocorrem mudanças na vegetação, se tornando menos espessa. A fronteira é uma região de serras, acima dos 1.000 metros de altitude, com um clima que varia de 10°C a 27°C (IBGE, 2013).

A Serra do Tepequém, onde está situada a Vila do Paiva e a Vila Cabo Sobral, no município do Amajari estado de Roraima, nesta região, encontra-se um grande acervo de espécies vegetais, no formato tabular do tipo tepui, que se destaca na paisagem regional. Predomina o clima quente e úmido, com temperaturas médias anuais, entre 22 a 24° C, segundo classificação de (KÖPPEN, 1948). O período mais chuvoso se concentra de abril a agosto, e o período mais seco de setembro a março do ano seguinte, predomina a vegetação de savanas e matas de galeria associada aos cursos d'água (IBGE, 2013).

O presente capítulo abordou o estudo da prospecção fitoquímica e da atividade antioxidante nos períodos climáticos, seco e chuvoso, bem como o rendimento do óleo essencial da espécie *H. dilatata*, identificação das classes de metabólitos, apresentado nos extratos avaliados.

1.1 Gênero *Hyptis* (Lamiaceae)

Conforme Dalmarco (2012), as plantas da família Lamiaceae são cada vez mais cobiçadas pela indústria alimentícia, devido ser plantas aromáticas, podendo ser utilizada não

só como aromatizantes e/ou conservantes, mas também no propósito terapêutico como antiinflamatórias e antioxidantes.

O gênero *Hyptis* pertence à família Lamiaceae, composto por ervas e arbustos constituídos por aproximadamente 580 espécies distribuídas, principalmente, na América tropical desde o Sul dos Estados Unidos até à Argentina (LIMA, 2010). No Brasil, se encontra principalmente nos estados de Minas gerais, Bahia, Goiás e Amazonas. Exemplos de espécies do gênero *Hyptis* são: *H. suaveolens*, *H. mutalibis*, *H. goyazensis* (FALCÃO; MENEZES, 2003).

Trata-se de um gênero rico em espécies de grande importância etnofarmacológica, utilizado pelas populações para fins medicinais, não só no Brasil, como no México, Colômbia, Panamá e outros (FALCÃO; MENEZES, 2003).

O efeito no crescimento, no desenvolvimento e teor de princípios ativos em plantas, refere-se ao conjunto de fatores ambientais, como luz, temperatura, vento, umidade e luz, que podem ocorrer de forma variável nos períodos climáticos (PINTO; BERTOLUCCI, 2002).

Costa (2013) comenta que as espécies deste gênero possuem uma constituição química bem variável, tendo demonstrado atividade citotóxica, antimalárica, antimicrobiana, expectorante e antiviral.

Todos esses aspectos são de fundamental importância quando se realiza o desenvolvimento de trabalhos de melhoramento de uma espécie medicinal, visando a aplicação fitoterapêutica, uma vez que a qualidade dos óleos essenciais está ligada à sua constituição química (MARTINS et al., 2006).

1.2 Classificação taxonômica e composição química de *Hyptis dilatata* Benth

Esta espécie é um subarbusto perene, aromático, conhecido na localidade onde a espécie foi coletada como hortelã do campo. Possuem haste ereta, folhas e flores sésseis, ápice agudo e nervuras central acentuada (FLORA BRASILIENSE, 2005; RIBEIRO, 2016). A classificação taxonômica é descrita da seguinte forma, de acordo com (CRONQUIST, 1981):

REINO Plantae

FILO Tracheophyta

CLASSE Magnoliopsida

ORDEM Lamiales

FAMÍLIA Lamiaceae

GÊNERO *Hyptis*

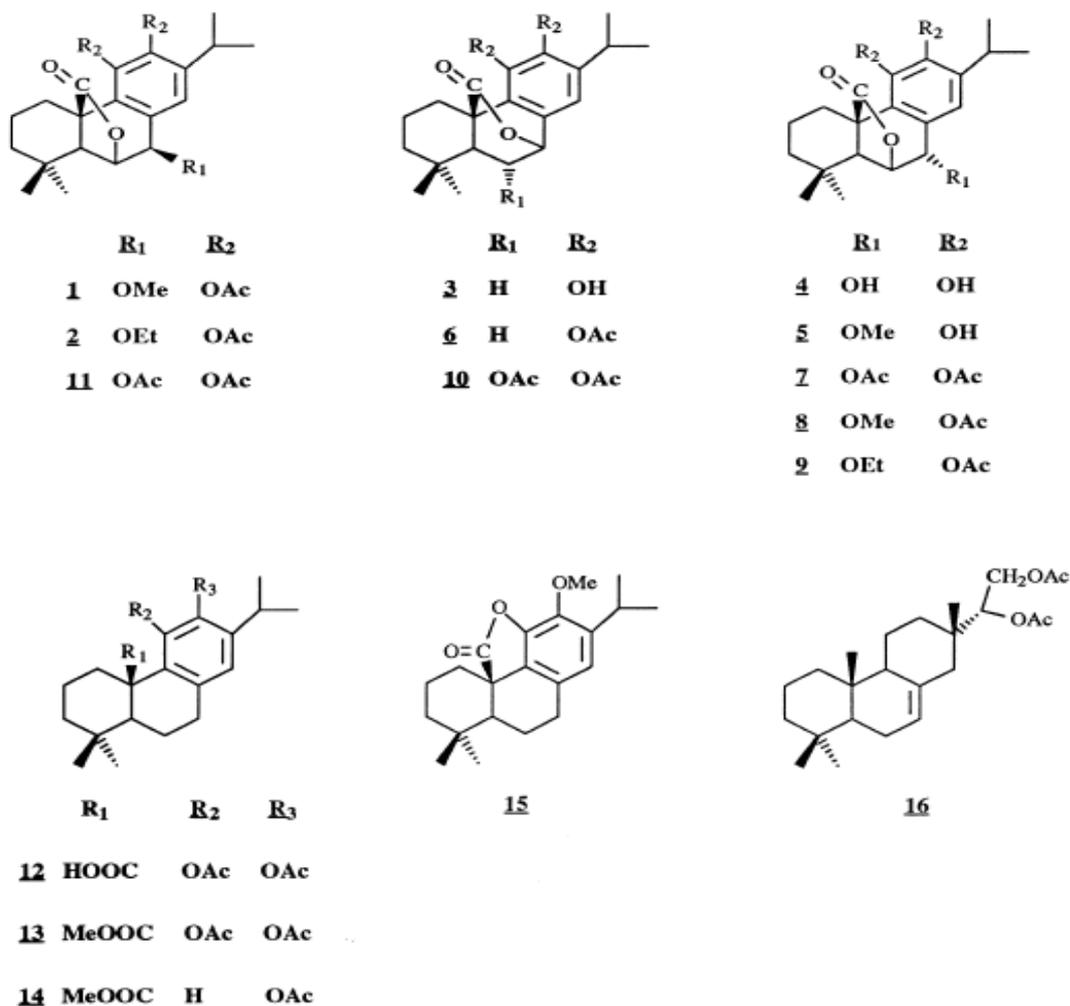
No Brasil encontrada na área de cerrado na Amazônia, Colômbia e no Panamá é distribuída nas províncias centrais, cujas folhas são usadas como tópica anti-parasitários em animais (URONES et al., 1998).

Os óleos essenciais das folhas e flores de *H. dilatata*, coletadas na Colômbia, foram extraídos por hidrodestilação e analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS). Caracterizadas pelo alto teor de monoterpenos oxigenados (50,2 % e 43,7 %), sendo os constituintes bicíclicos, o mais representativo deste grupo. Os sesquiterpenos bicíclicos e tricíclicos obtiveram quantidades consideráveis (27,8 % e 53,3 %) (TAFURT-GARCÍA et al., 2014).

No óleo essencial das folhas dessa espécie houve predominância de monoterpenos como cânfora (12,2 %), e δ -3-careno (0,5 %). Os óleos essenciais são constituídos também por misturas complexas de sesquiterpenos como: espatulenol, β -cariofileno para *H. suaveolens*; biciclogermacreno, espatulenol e germacreno D, δ -elemeno (MELO, 2003).

Das folhas de *H. dilatata*, coletadas e estudadas em Veraguas (Panamá) por Urones et al. (1998), e extraídas com acetona, foram isolados 14 diterpenos tricíclicos com o esqueleto abietano, onde o anel C é aromático, entre os quais foram identificados dois novos compostos 1 e 2, na forma de seus derivados acetilados (Figura I-1). Entre os derivados estava o carnosol (3), rosmanol (4), metil-rosmanol (5), estes constituintes químicos foram isolados e depois acetilados obtendo os derivados de carnosol (6), rosmanol (7): metilrosmanol (8), etilrosmanol (9), isorosmanol (10) e epirosmanol (11), ácido carnósico (12), e seu estér: estér metílico (13) e o estér metílico do ácido psiférico (14). Além desses foram isolados ainda uma lactona (15) e esquirolina B (16), compostos com o esqueleto pirano.

Figura I-1 – Estrutura dos compostos isolados.



Fonte: Urones et al. (1998).

1.2.1 Fatores que podem alterar constituintes químicos de plantas e a produção de óleos essenciais

A composição química de uma mesma espécie de planta, encontradas em diferentes localidades, pode mostrar variações de acordo com o tipo de solo, temperatura, clima e altitude (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; MIRANDA et al., 2016).

Outro aspecto fundamental que está relacionado à produção de óleos essenciais, trata-se do horário da coleta. Este fator pode influenciar durante o dia todo, assim como depende também da espécie de planta. Os estudos em campo demonstraram que em determinados horários do dia pode-se obter um rendimento maior, levando-se em conta as influências climáticas, a fisiologia da planta e as condições ambientais (OLIVEIRA, 2011). De acordo com Moraes (2009), as atividades metabólicas dos óleos essenciais podem ser redirecionadas por

meio de estímulos do ambiente, em que a planta se encontra, levando-a a síntese de diferentes compostos.

Segundo Oliveira (2011), plantas medicinais que têm princípios ativos, estes podem conferir a esta planta uma atividade terapêutica, tendo importância como fitoterápico. Plantas medicinais que produzem princípios ativos de óleos essenciais, com teor maior que 1%, são denominadas de plantas aromáticas (OLIVEIRA, 2011). O cultivo destas plantas é relevante por proceder à matéria prima produzida pelo metabolismo secundário destas plantas, originando os óleos essenciais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Identificação botânica

O material vegetal da espécie *H. dilatata*, para realização de exsicata (Figura I-2) foi coletado em agosto de 2014, na Vila do Paiva, margem da RR 203, na Serra do Tepequém, município do Amajari em Roraima. Esta serra se encontra a 210 km da capital de Roraima, Boa Vista. O local da serra onde foi coletado a *H. dilatata* está 634 m (metros sobre o nível do mar). A exsicata foi depositada no herbário do INPA com o número de registro 263.670. A outra amostra da exsicata foi depositada no museu integrado de Roraima, MIR 12754. SISBIO 44983-2.

Figura I-2 – Exsicata de *Hyptis dilatata* Benth



Fonte: Almeida, S.P. 2017

2.2 Coleta e preparo do material vegetal

Coletaram-se folhas e flores (Figura I-3) para estudos nos períodos chuvosos e secos. As folhas foram coletadas no horário da manhã, tarde e noite e as flores em horários aleatórios, para pesquisa no Laboratório do NPPGCT / UFRR.

Figura I-3 – Folhas e flores de *Hyptis dilatata*.



Fonte: Almeida, S.P. 2017

Após a coleta de *H. dilatata*, tanto no período chuvoso quanto no período seco, suas folhas e flores foram limpas a fim de retirar qualquer resíduo e as amostras foram pesadas. Em seguida, uma quantidade de folhas frescas foi separada para extrair-se o óleo essencial (Tabela I-1). Outra parte foi pesada e exposta ao sol para secagem, e utilizadas na obtenção de extrato hexânico e etanólico.

Tabela I-1 – Quantidades de folhas frescas coletadas no período chuvoso e seco.

	Chuvoso	Seco
Manhã	270,15 g	575,26 g
Tarde	517,87 g	507,53 g
Noite	632,42 g	763,08 g

A extração do óleo essencial das folhas frescas de cada horário e período foram realizados em forma de triplicata, bem como a extração do óleo essencial das flores secas de cada período climático. As amostras das flores coletadas como mostra a Tabela I-2, foram

postas para secagem em temperatura ambiente por uma semana. Após a secagem (eliminação de água), as amostras tanto das folhas, quanto das flores, foram novamente pesadas e moídas em um liquidificador doméstico. Logo após, o pó foi homogeneizado em peneira Tamis granulométrica em aço inox entre 20-40 Mesh, em seguida o pó pesado e armazenado (MATOS, 1988; SARKER; LATIF; GRAY, 2006).

Tabela I-2 – Peso das flores frescas coletadas no período chuvoso e seco, e seu peso depois de secas e moídas.

	Frescas	Secas	Moídas
Chuvoso	680 g	334,80 g	310,42 g
Seco	550 g	267,47 g	240,95 g

2.3 Extração do óleo essencial

As folhas frescas e as flores secas e moídas foram transferidas para balões de fundo redondo de 3L, acrescentado água, em seguida utilizando a manta de aquecimento e, foi acoplada à aparelhagem de Clevenger (Figura I-4), iniciando a extração do óleo volátil pelo método de hidrodestilação, arraste a vapor d'água, por duas horas. A extração do óleo da flor seca e moída e a extração do óleo da folha, foram realizadas em triplicatas, do período da manhã em que as folhas foram coletadas, tarde e noite, para a obtenção do rendimento do óleo.

O óleo essencial foi acondicionado em frascos de vidros esterilizados, os quais foram previamente identificados com etiqueta contendo a data da extração, o peso do frasco, o número da amostra e o horário da coleta. Em cada extração foram acrescentados sulfato de sódio anidro para separar a água do óleo, e utilizado também o clorofórmio para aproveitar o óleo que ficou retido na pipeta e no vidro. O clorofórmio foi evaporado em capela, ficando somente o óleo essencial. Após este procedimento, o óleo foi pesado para saber o rendimento. O frasco com óleo foi envolto com papel alumínio e mantido sobre refrigeração (CASTRO et al., 2006). Foi montada uma tabela indicando o rendimento do óleo essencial, tanto da flor, quanto das folhas, do período chuvoso e seco.

Figura I-4 – Extração do óleo essencial da flor.



Fonte: Almeida, S.P. 2017

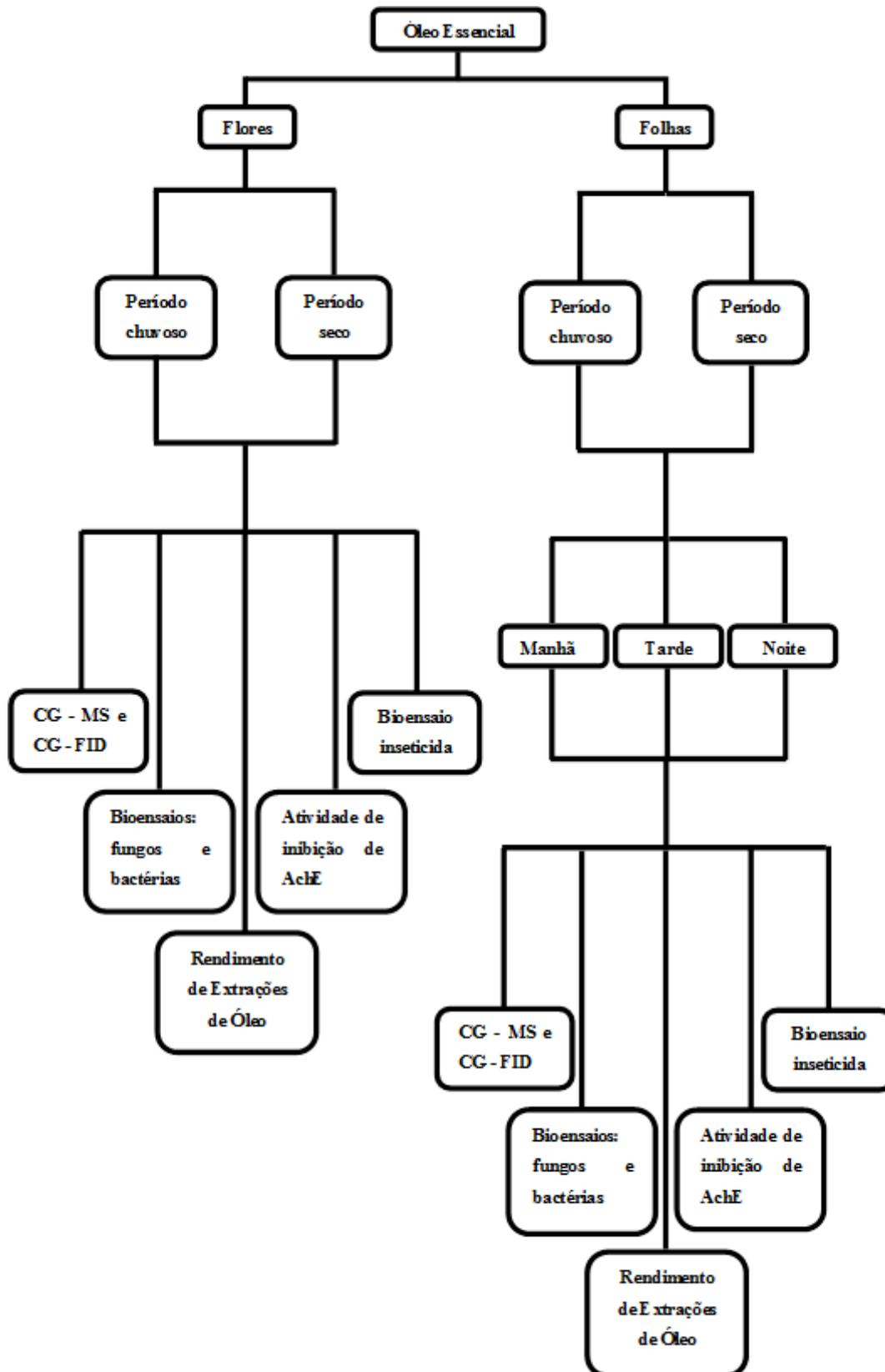
2.4 Rendimento do óleo essencial

No cálculo do rendimento de óleo essencial, de cada período de coleta, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{Massa de óleo essencial obtido (g)} \times 100}{\text{Massa do material vegetal (g)}}$$

O tratamento dos óleos essenciais obtido no período chuvoso foi a mesma metodologia que se realizou no período seco (Figura I-5). A variável analisada foi o rendimento de óleo essencial. Calculou-se a média do rendimento entre os meses dos períodos seco e chuvoso e o desvio padrão (GONÇALVES; MANCINELLI; MORAIS, 2009).

Figura I-5 – Fluxograma da parte experimental das folhas e flores de *Hyptis dilatata*.



2.5 Obtenções, reparação dos extratos e marcha fitoquímica

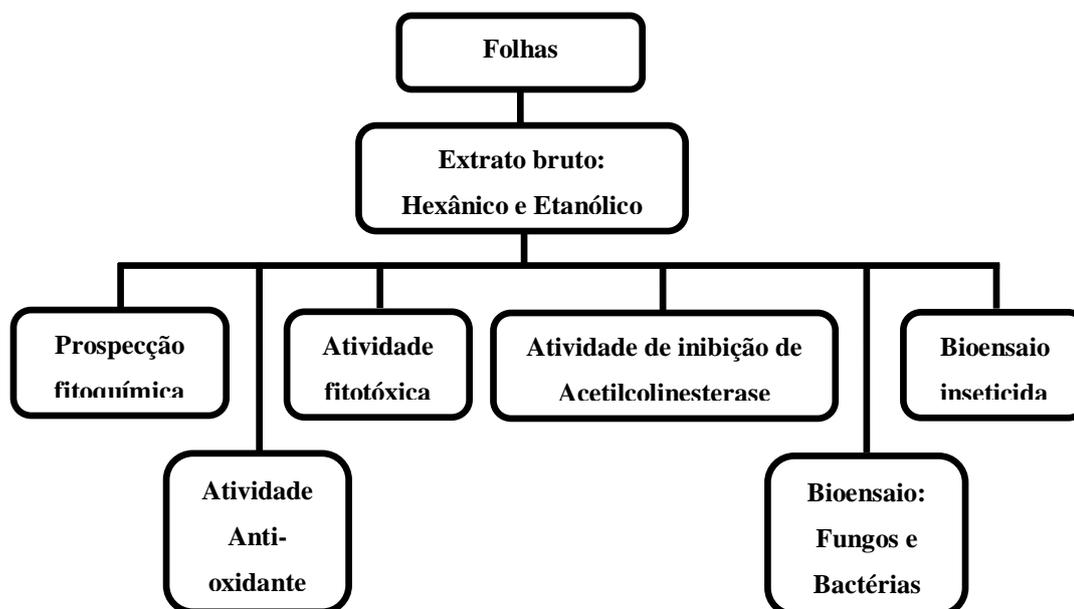
2.5.1 Preparação dos extratos hexânico e etanólico

Os extratos brutos das folhas secas de *H. dilatata*, por hexano e etanol, dos períodos chuvoso e seco (Figura I-6), foram realizados por extração exaustiva das folhas da planta com hexano e etanol, com filtração e recolhimento periódico do filtrado. As extrações foram realizadas no aparelho Soxhlet, por 6 horas.

Utilizou-se 500 mL do solvente hexano P.A e 500 mL do solvente etanol, cada extração foi feita em triplicata e após o término das extrações, as amostras foram reservadas em béqueres devidamente etiquetados e identificados com os códigos de cada extrato, depois filtrados. Após esse período, o extrato hexânico e etanólico foi eliminado por pressão reduzida, em rotaevaporador à temperatura de 30 °C e 45° C, para concentração dos extratos (MATOS, 1988).

Os extratos já concentrados por rotaevaporação foram transferidos para frascos de vidros etiquetados e com pesos previamente determinados em balança analítica, e posteriormente, foram armazenados aguardando o momento das análises.

Figura I-6 – Fluxograma das atividades biológicas dos extratos hexânico e etanólico das folhas de *H. Dilatata*.



2.5.2 Preparação do extrato Hidroetanólico

O extrato hidroetanólico foi preparado com 2,5 g de MPV (matéria prima vegetal das folhas e flores) e 50 mL de etanol a 70% por decocção por 10 minutos, o qual foi filtrado e após arrefecimento, transferido para um balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com etanol a 70 %. Uma alíquota de 10 mL do extrato foi transferida a um béquer e colocada para secar em banho-maria e outras alíquotas de 3 mL foram distribuídas em oito tubos de ensaios.

2.5.3 Prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos, hexânicos e hidroetanólicos

A partir dos extratos concentrados (Hexânicos e Etanólicos) e com os extratos hidroetanólico da MPV (matéria prima vegetal das folhas e flores), dos períodos de coletas, chuvoso e seco, realizou-se cuidadosamente, o roteiro de detecção dos constituintes químicos, como por exemplo, alcalóides, esteróides, fenóis, taninos, flavonóides, saponinas e triterpenoides, qualitativamente, conforme metodologia de (MATOS, 1988; 1997).

2.5.4 Investigação de compostos fenólicos e esteroidais

Os extratos hidroetanólicos colocados em oito tubos de ensaios foram utilizados para os testes descritos nos pontos 2.5.4.1 a 2.5.4.6, sendo que um desses oitos tubos, foi utilizado como controle. O preparo das soluções reagentes e toda a sequência dos testes foram realizados seguindo-se as recomendações de (MATOS, 1997). O mesmo procedimento ocorreu com os extratos hexânico e etanólico, obtidos a partir do aparelho Soxhlet.

2.5.4.1 Testes para taninos e fenóis

No tubo 1 foram adicionadas três gotas de solução alcoólica de cloreto férrico, agitando-se bem. Foi observado se houve a formação de precipitado de coloração azul, indicativo de taninos hidrolisáveis, ou verde, indicativo de taninos condensados.

2.5.4.2 Teste para antocianinas, antocianidinas, chalconas e auronas

O pH dos tubos 2, 3 e 4 (Tabela I-3) foram ajustados a 3, 5 e 11 por meio das adições de soluções de ácido sulfúrico, hidróxido de sódio e hidróxido de potássio, respectivamente, observando se houve mudanças na coloração das soluções.

Tabela I-3 – Interpretação dos resultados do teste para antocianinas, antocianidinas e flavanóides.

Constituintes	Tubo 2 (pH3)	Tubo 3 (pH5)	Tubo 4 (pH11)
Antocianinas e Antocianidinas	Vermelho	Lilás	Azul-púrpura
Flavanonas, Flavanóis e Xantonas	-	-	Amarelo
Chalcona e Auronas	-	-	Vermelho – púrpura
Flavanonas	-	-	De vermelho a laranja

Fonte: Matos (1997).

2.5.4.3 Teste para leucoantocianinas, catequinas e flavonas

O pH dos tubos 5 e 6 foram ajustados a 1 e 11 por meio da adição de soluções de ácido clorídrico e hidróxido de sódio, respectivamente, observando se houve mudanças na coloração das soluções. O resultado foi interpretado de acordo com a Tabela I - 4.

Tabela I - 4 – Interpretação dos resultados do teste para leucoantocianidinas, catequinase flavanonas.

Constituintes	Tubo 5 (pH1)	Tubo 6 (pH11)
Leucoantocianidinas	Vermelha	-
Catequinas (taninos catéquicos)	Pardo-Amarelada	-
Flavanonas	-	De vermelho a laranja

Fonte: Matos (1997).

2.5.4.4 Teste para flavanóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas (reação de Shinoda)

Ao tubo 7 foram adicionados alguns centigramas de magnésio granulado e 0,5 mL de ácido clorídrico P.A. Ao final da efervescência foi observado se houve aparecimento ou intensificação de cor vermelha.

2.5.4.5 Testes para saponinas

Ao resíduo insolúvel em clorofórmio, obtido no teste anterior, foram adicionados 10 mL de água destilada. A solução foi então filtrada para um tubo de ensaio e agitada fortemente,

por dois a três minutos, observando se houve formação de espuma persistente por pelo menos cinco minutos, indicativo da presença de saponinas – Heterosídeos saponínicos, seguindo - se Matos (1988).

2.5.4.6 Teste confirmatório para saponinas

Foram adicionados 2,0 mL de ácido clorídrico ao conteúdo do tubo do teste anterior, o qual foi deixado em banho-maria a 60 °C, por uma hora. Em seguida, o conteúdo do tubo foi neutralizado com solução de hidróxido de sódio, observando se houve ausência de espuma e formação de precipitado, que confirmariam a presença de saponinas (MATOS, 1988).

2.5.4.7 Teste para cumarinas

Duas gotas do extrato hidroetanólico foram despejadas separadamente sobre um pedaço de papel de filtro comum. Sobre uma delas (mancha-teste) foi gotejada solução de hidróxido de potássio a 10 %. Sob luz ultravioleta de 365 nm (UV λ 365) foi observado se a mancha de teste apresentava fluorescência amarelo-esverdeada em comparação com a outra (mancha-controle).

2.5.5 Teste de heterosídeos cianogênicos

Em um erlenmeyer de 250 mL com tampa esmerilhada foram reunidos 10,0 g da matéria-prima vegetal (MPV) das folhas seca, 50 mL de água e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. À tampa foi presa uma fita de papel de picrato de sódio. O erlenmeyer foi deixado em banho-maria a uma temperatura de 60 °C por duas horas. Foi observado se houve o aparecimento de coloração vermelha castanha na fita, que indica presença de heterosídeos cianogênicos (MATOS, 1997).

2.5.6 Teste para base quaternária (Alcalóide)

De acordo com os trabalhos de Matos (1997) foi preparado um extrato por decocção, a partir de 1g da MPV de folhas e flores secas e 20 mL de ácido clorídrico a 10 % e filtrado em um funil de separação. Alcalinizou-se o extrato obtido até um pH 11 com hidróxido de amônio e adicionou-se 10 mL de éter etílico, em seguida, foi agitado, permanecendo em repouso até a separação das fases. Na sequência, foi retirada a fase etérea e acidulou-se a fase aquosa com ácido clorídrico a 10 %. A fase aquosa foi distribuída em quatro tubos de ensaio de 10 mL e,

em seguida foram acrescentadas algumas gotas de reagentes de Mayer, Hager e Dragendorff. Em seguida foi observada a formação de precipitados.

2.5.7 Glicosídeos cardioativos, esteroides e triterpenos

Cerca de 2,0 g da MPV foram fervidas com 20,0 mL de etanol a 50 % e 10,0 mL solução de acetato neutro de chumbo a 10 % por dois minutos, foi centrifugado e transferido o sobrenadante para um funil de separação ao qual foram adicionados 20,0 mL de água destilada. Em seguida, a solução foi extraída com três porções de 15,0 mL de clorofórmio e as fases orgânicas foram reunidas. Porções de cerca de 5,0 mL do extrato clorofórmico final foram distribuídas em seis tubos de ensaio e uma cápsula de porcelana foi evaporada e seca em banho-maria, em capela. Os resíduos foram submetidos às reações para identificação de desóxi-açúcares, núcleo lipídico e γ -lactona (ALICE et al., 1985; COSTA, 2001) conforme especificado a seguir:

2.5.7.1 Identificação do núcleo lipídico

a) Reação de Libermann-Burchard (esteroides e triterpenos)

Nos tubos que continham extratos etanólico e extratos hidroetanólico MPV (matéria prima vegetal) das folhas e flores, foi dissolvido 1,0 mL do reativo de Libermann-Burchard e observado se houve aparecimento de cor castanho-avermelhada ou esverdeada na solução.

b) Reação de Salkowski

No tubo de extrato etanólico e no tubo contendo extrato hidretanólico, foram adicionados 3 mL de ácido sulfúrico concentrado ao resíduo orgânico e observado se houve o aparecimento de cor vermelha.

2.5.7.2 Identificação γ - lactona

a) Reação de Kedde

Aos resíduos orgânicos foram adicionados 2,0 mL reativo de Kedde e duas gotas de hidróxido de potássio em etanol. Após cinco minutos, foi observado se houve desenvolvimento de cor castanho-avermelhado a castanho-violeta, na solução.

b) Reação de Baljet

Em cada tubo dos resíduos orgânicos foram dissolvidos 2,0 mL do reativo de Baljet. Ao mesmo tubo foram acrescentadas duas gotas de hidróxido de potássio em etanol e observado se houve aparecimento de coloração alaranjada.

2.5.7.3 Identificação das desoxioses

a) Reação de Keller-Kiliani

Na preparação do reativo foi misturado 6 mL da solução de ácido acético glacial e 0,2 mL da solução de cloreto férrico, foi dissolvido o resíduo do tubo em 3 mL do reativo e transferido cuidadosamente o conteúdo desse tubo para outro que continha 3 mL de ácido sulfúrico concentrado sem ter agitado, e foram observados se houve a coloração vermelho-acastanhada na zona de contato e a coloração azul-esverdeada na camada acética.

b) Reação de Pessez

Aos resíduos orgânicos foram adicionados 5 mL de xantidrol 0,5 % em metanol, o qual foi aquecido em 100 °C por três minutos. Depois de frio, acrescentou 1 mL de ácido acético glacial e uma gota de ácido clorídrico. Após o procedimento foi observado se houve o aparecimento da coloração vermelha.

2.5.8 Ensaio do radical livre DPPH

Inicialmente, a absorvância da solução de DPPH (2,2'-difetil-1-picril-hidrazil) foi ajustada para 1,0 por meio de diluições com etanol a 50 %, seguidas de medidas de absorvância no comprimento de onda de 517 nm, o mesmo para todo o teste. Foram distribuídas alíquotas de 250,0 µL das diluições dos extratos e óleos essenciais em triplicata em microplaca, e as absorvâncias foram medidas. Essa leitura constituiu o branco nos cálculos. Em seguida, foram acrescentados 100,0 µL da solução de DPPH em todos os poços com extrato. Após 30 minutos de incubação no escuro e à temperatura ambiente, as absorvâncias foram novamente medidas. O controle negativo foi constituído de 250,0 µL de etanol a 50 % e 100,0 µL da solução de DPPH, em triplicata, também incubado nas mesmas condições. A atividade antioxidante, apresentada como concentração inibitória a 50 % (CI₅₀), foi calculada em relação ao controle negativo (GUILHON-SIMPLICIO et al., 2013).

2.5.9 Ensaio do radical livre ABTS

Primeiramente, fez-se uma diluição a 40% da solução de ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico) recém-preparada, com água mili-Q. Alíquotas de 250,0 µL das diluições dos extratos foram distribuídas em triplicata em microplaca e as absorbâncias foram medidas no comprimento de onda de 734 nm. Essa leitura constituiu o branco nos cálculos. Em seguida, foram acrescentados 100,0 µL da solução de ABTS em todos os poços com extrato. Após 15 minutos de incubação no escuro e à temperatura ambiente, as absorbâncias foram novamente medidas. O controle negativo foi constituído de 250,0 µL de etanol a 50 % e 100,0 µL da solução de ABTS, também incubado nas mesmas condições. A atividade antioxidante foi calculada em relação ao controle negativo (GUILHON-SIMPLICIO et al., 2013).

2.5.10 Teor de fenóis totais

Os extratos foram analisados pelo método de Folin-Ciocalteu com pequenas modificações (FOLIN; CIOCALTEU, 1927). Uma alíquota de 10 µL de cada uma das soluções das amostras e do padrão ácido gálico a 1 mg/mL em etanol foi transferida em triplicata para uma placa de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 50 µL solução de Folin-Ciocalteu (1:10 em água destilada), e a placa foi incubada em temperatura ambiente por 8 minutos. Ao final, foram adicionados 240 µL de carbonato de sódio 0,4 % e a placa foi novamente incubada por mais 3 minutos. A absorbância foi medida a 620 nm usando um espectrofotômetro. A quantidade de fenóis foi expressa em equivalente de ácido gálico por grama de amostra (GUILHON-SIMPLICIO et al., 2013).

2.5.11 Teor de flavonóides totais

Inicialmente, os extratos foram diluídos a 1 mg/mL em etanol, então 30 µL dessas soluções foram transferidas para uma placa de 96 poços, em triplicata. À mesma placa foram transferidos 30 µL de uma solução de quercetina a 1mg/mL em etanol 80%, padrão da análise. Depois disso foram adicionados 90 µL de etanol 95%, 6 µL de cloreto de alumínio a 10%, 6 µL de acetato de potássio 1M e 168 µL de água destilada em cada poço. A placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e a absorbância foi medida a 405 nm em um espectrofotômetro. A quantidade de flavonóides foi expressa em equivalente de quercetina por grama de amostra (GUILHON-SIMPLICIO et al., 2013).

2.5.12 Análise dos dados

No estudo das correlações lineares das atividades antioxidantes pelo método de captura de ABTS e DPPH, foi utilizado o programa Origin 8.0 e calculado o CI_{50} . Os resultados foram expressos em porcentagens e com o valor do desvio padrão, para os fenóis totais e flavonóides totais.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Rendimento das extrações de óleos essenciais

A extração do óleo em triplicatas das folhas frescas e das flores secas e moídas no período chuvoso e seco resultou nos teores descritos nas Tabelas I-5 e I-6. Foi comparado o rendimento por horário de coleta e por período sazonal: chuvoso e seco.

A maior produção de óleo da flor da espécie em estudo, conforme a Tabela I-5 foi no período seco. No Período chuvoso foi onde se obteve o menor teor de óleo da flor, com uma redução de 0,73 %, do teor encontrado no período seco.

Tabela I-5 – Teor do óleo da flor de *Hyptis dilatata*.

Período Chuvoso			Período Seco		
Material Seco (g)	Teor (%) Triplicata	DP	Material Seco (g)	Teor (%) Triplicata	DP
310,43	1,40	0,06	411,07	2,13	0

*DP= Desvio Padrão

A produção de óleo da folha de *H. dilatata* foi maior no período seco, como mostra a Tabela I-6, destacando-se que ocorreu uma diferença na parte da tarde, do período chuvoso. Registrou-se um melhor rendimento do óleo com uma diferença pequena de 0,02 % em relação ao período da tarde do período seco. As folhas desta espécie adquiriram um maior desenvolvimento no período chuvoso, embora a produção de óleo tivesse um menor rendimento comparando-se ao período seco.

Estes resultados do rendimento do óleo da flor e da folha estão de acordo com os obtidos por Botrel et al. (2010), que também encontraram o maior teor de óleo essencial no período do verão em *Hyptis marruboides*, pertencente ao mesmo gênero e família de *H. dilatata*.

Tabela I-6 – Rendimento das extrações dos óleos essenciais da folha de *Hyptis dilatata*.

Hora da Coleta	Período Chuvoso			Período Seco		
	Material Verde (g)	Teor % Triplicata	DP	Material Verde (g)	Teor % Triplicata	DP
Manhã	270,15	0,12	0,02	575,27	0,37	0,11
Tarde	517,88	0,28	0,03	507,57	0,26	0,12
Noite	632,42	0,24	0,04	763,08	0,31	0,07

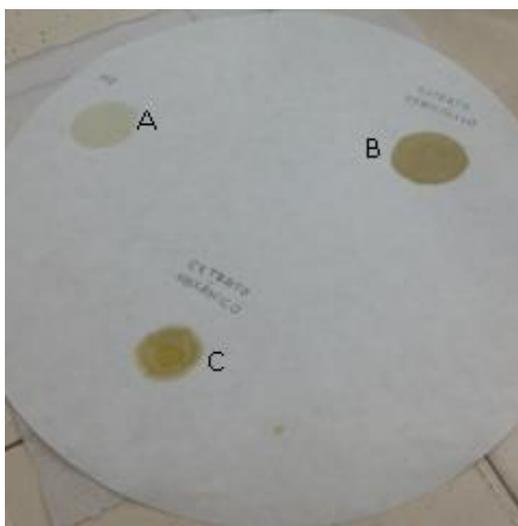
3.2 Prospecção fitoquímica dos extratos

Uma pesquisa qualitativa por grupos de metabólitos secundários foi realizada nos extratos hexânico e etanólico das folhas, e extrato hidroetanólico das folhas e flores, coletadas em diferentes períodos (seco e chuvoso). Todos os testes de prospecção fitoquímica foram repetidos para descartar qualquer tipo de dúvidas, nos resultados. As análises foram realizadas com base na metodologia de (MATOS, 1997).

3.2.1 Testes para cumarinas

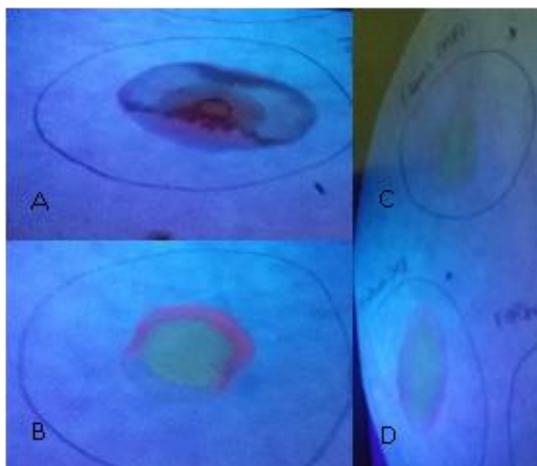
Somente o extrato hexânico das folhas, tanto do período seco quanto do período chuvoso, foi negativo nesta análise (Figura I-7 e I-8).

Figura I-7 – Período Chuvoso: Cumarina - Folha extrato hidroetanólico (A); Folha extrato etanólico (B); Folha extrato hexano (C).



Fonte: Almeida, S.P. 2017

Figura I-8 – Período Seco: Cumarina - Folha extrato hexano (A); Folha extrato etanólico (B); Flor extrato hidroetanólico (C); Folha extrato.

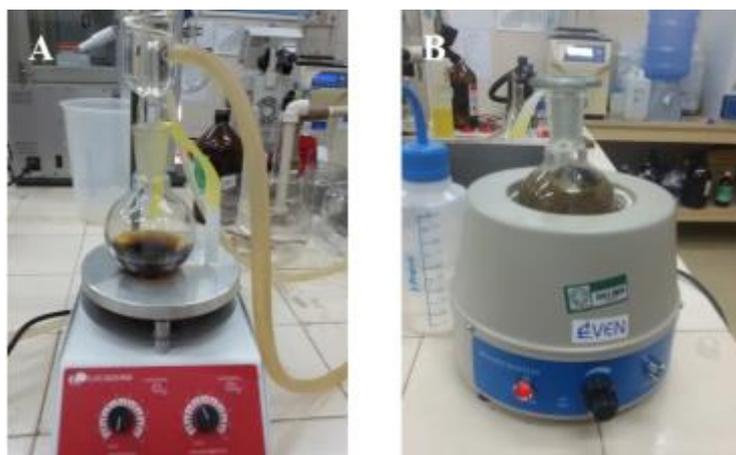


Fonte: Almeida, S.P. 2017

3.2.2 Teste para heterosídeo cianogênico

Foi observado que a fita de picrato de sódio fixada ao erlenmeyer, não indicou mudança de coloração, não apresentando traços de heterosídeos na planta coletada no período seco e chuvoso, conforme testes representados na Figura I-9.

Figura I-9 – Teste para Heterosídeo: Período seco (A); Período chuvoso (B).



Fonte: Almeida, S.P. 2017

3.2.3 Teste para taninos e fenóis

Os resultados mostraram que nos extratos hidroetanólico, etanólico e hexânico das folhas, do período seco e chuvoso, não apresentaram precipitado azul escuro (taninos

hidrossolúveis). Todos os extratos, tanto do período chuvoso como do período seco mostraram precipitado verde, indicativo de taninos condensados.

A presença da coloração entre vermelho e azul foi registrada, indicando a existência de fenóis no extrato hidroetanólico das flores e folhas, e nos extratos hexânico e etanólico das folhas, coletadas nos períodos seco e chuvoso.

3.2.4 Teste para Antocianinas, antocianidinas, chalconas e auronas

Os resultados dos testes com o extrato hidroetanólico das flores e folhas, com os respectivos pH 3,0 e 8,5, não mostraram a presença de antocianinas, antocianidinas, chalconas e auronas.

3.2.5 Teste para leucoantocianidina, catequinas e flavanonas

Observou-se nos períodos chuvoso e seco a ausência de leucoantocianidinas no extrato hidroetanólico da matéria prima das folhas. A presença da coloração parda amarelada, indicando catequinas presentes nos extratos hexânico, hidroetanólico e etanólico foi observada nos extratos das folhas do período chuvoso. Na análise dos extratos obtidos no período seco, não foi observada a coloração amarelada, indicando ausência de catequinas nestes extratos.

O registro da coloração entre vermelho e laranja, com o pH 11, indicou a presença de flavanonas nos tubos correspondentes aos períodos seco e chuvoso, do extrato hidroetanólico das flores e folhas e no extrato etanólico e hexânico das folhas.

3.2.6 Teste para flavanóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas

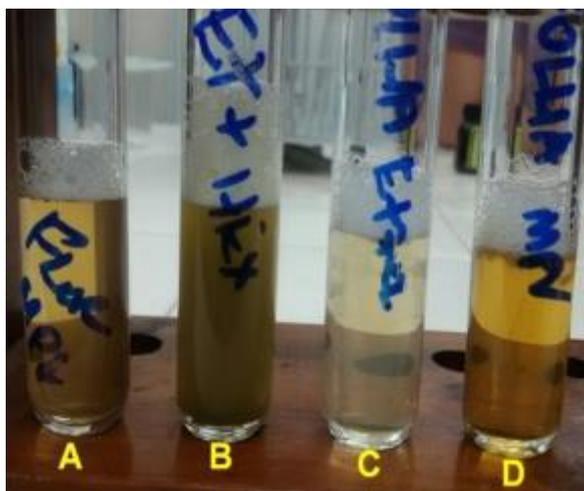
Após o término da reação foi observado que não houve aparecimento da cor vermelha no período chuvoso nos extratos hidroetanólico das folhas, etanólico e hexânico das folhas, indicando a ausência destes metabólitos. No período seco observou-se a presença destas substâncias no extrato hidroetanólico das flores e folhas e no extrato etanólico e hexânico das folhas.

3.2.7 Teste para Saponinas

Houve persistência e abundância de espumas após intensa agitação dos tubos contendo os extratos etanólico, hexânico e hidroetanólico das folhas e flores coletadas nos períodos chuvosos e secos, indicando a presença de saponinas, em todos os extratos.

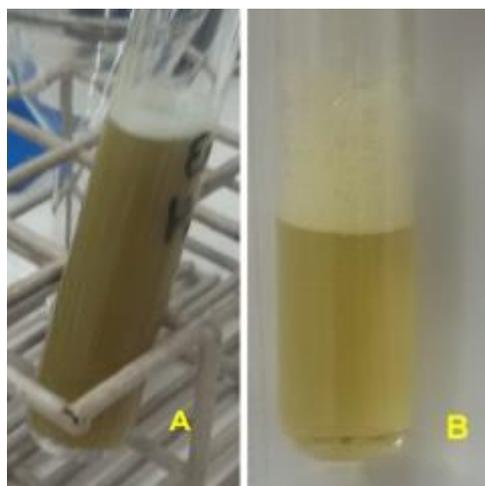
No teste confirmatório observou-se a formação de precipitados e espuma intensa, confirmando a presença de saponinas (Figura I-10 e I-11).

Figura I-10 – Teste para saponinas no período seco com extrato hidroetanólico da flor (A); extrato hexânico da folha (B); extrato etanólico; (C) extrato hidroetanólico da folha (D).



Fonte: Almeida, S.P. 2017

Figura I-11 – Teste para saponinas no período chuvoso com extrato hexânico da folha (A); extrato etanólico da folha (B).



Fonte: Almeida, S.P. 2017

3.3 Teste para base quaternária (alcaloide)

Na Tabela I-7 constam os resultados dos testes para a base quaternária realizados nos períodos seco e chuvoso, indicando a presença ou ausência de alcaloides nos extratos analisados, utilizando as reações de Dragendorff, Mayer e Hager.

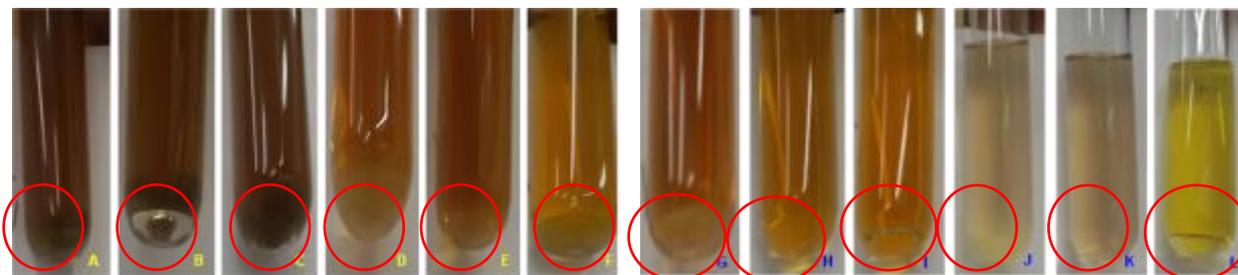
Tabela I-7 – Resultados da base quaternária (Alcaloide) de *Hyptis dilatata*

Extratos	Período Seco			Período Chuvoso		
	Reagentes			Reagentes		
	Mayer	Hager	Dragendoff	Mayer	Hager	Dragendoff
Flores/Hidroetanólico	+	+	+	+	+	+
Folhas/Hidroetanólico	-	+	+	-	-	+
Folha/hexano	-	-	+	-	-	+
Folha/etanol	-	-	+	-	-	+

* (+) presença da substância; * (-) ausência da substância.

Nos extratos das flores do período seco, houve maior formação de precipitados do que nos extratos das folhas, conforme mostra a Figura I-12. Tanto no período seco, quanto no período chuvoso, houve resultado positivo para Dragendoff, sugerindo a presença de alcalóide nos extratos hidroetanólico das folhas. Observa-se que no período seco o extrato da folha hidroetanólico ocorreu precipitado indicando a presença de alcaloide na reação de Hager, enquanto no período chuvoso não houve indicativo de alcalóides, nesta reação.

Figura I-12 – Teste Para alcaloides no período seco: Reação DRG - Dragendoff na flor com extrato hidroetanólico (A); Reação de Mayer na flor do extrato hidroetanólico (B); Reação de Hager na flor com extrato hidroetanólico (C); Reação DRG na folha com extrato hidroetanólico (D); Reação de Mayer na folha do extrato hidroetanólico (E); Reação de Hager na folha do extrato hidretanólico (F); Reação de DRG na folha com extrato etanólico (G); Reação de Mayer na folha com extrato etanólico (H); Reação de Hager na folha com extrato etanólico (I); Reação DRG na folha com extrato hexano (J); Reação de Mayer na folha do extrato hexânico (K); Reação de Hager na folha com extrato hexânico (L).



No período chuvoso, todos os extratos testados nas reações de Dragendorff mostraram a presença de precipitados, indicando a presença de alcalóides, não havendo indicadores da presença desta substância nas reações de Mayer e Hager.

Os resultados desta análise foram positivos, mas em várias espécies de plantas, ausência de alcaloides pode ser consequência da característica do solo da Região Amazônica, que é reconhecido por ser mais pobre em nutrientes do que solos de outras regiões do Brasil. Muitos trabalhos já demonstraram que há uma relação negativa entre a produção de alcaloides e pouca disponibilidade de nitrogênio e até mesmo de fósforo e potássio (GUILHON-SIMPLICIO, 2009). Com essas características a produção de compostos fenólicos parece ser aumentada em espécies oriundas desses tipos de solos e menores quantidades dessas substâncias são produzidas em solos com abundância de nitrogênio (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

3.4 Glicosídeos cardioativos, esteroides e triterpenos

3.4.1 Identificação do núcleo lipídico

Na reação de Libermann-Burchard confirmou-se a presença de esteróides e triterpenos nos extratos hidroetanólicos das folhas e flores dos períodos seco e chuvoso e nos extratos hexânico e etanólico das folhas, também nos dois períodos.

Na reação de Salkowsky houve a formação da cor vermelha, indicando presença de esteróides nos extratos hidroetanólicos das flores e folhas e nos extratos hexânico e etanólico das folhas, dos períodos seco e chuvoso.

3.4.2 Identificação de γ -lactona

Na reação de Kedde observou-se a coloração vermelho-violeta no extrato hidroetanólico das folhas e flores e no extrato etanólico do período chuvoso. A ausência dessa cor no extrato hexânico das folhas, no período chuvoso indica que não há presença do grupamento γ -lactona, típico de heterosídeos cardioativos. No período seco o resultado foi negativo para todos os extratos, tanto da flor quanto da folha.

Na reação de Baljet não houve o aparecimento da cor laranja, em nenhum dos extratos das folhas e flores dos períodos chuvosos e secos, demonstrando resultado negativo.

3.4.3 Identificação de desoxioses

Os resultados foram positivos na reação de Keller-Kiliani no período chuvoso e no período seco, no extrato hidroetanólico das folhas e flores e nos extratos etanólico e hexânico

das folhas. Durante a reação houve o aparecimento da cor vermelha acastanhada na zona de contato e coloração azul-esverdeada na camada acética.

Na reação de Pesez, os resultados foram negativos, pois não houve a formação da cor vermelha nas reações de todos os extratos, tanto do período chuvoso como do período seco.

Os resultados de diversos testes de prospecção fitoquímica realizados em período sazonal (seco e chuvoso), no extrato hidroetanólico das flores e folhas, e nos extratos hexânico e etanólico das folhas, constam da Tabela I-8.

Tabela I-8 – Teste de investigação para vários componentes químicos das folhas e flores de *Hyptis dilatata*, coletadas no período chuvoso e seco.

Constituintes	Período Chuvoso				Período Seco			
	Extratos							
	Hidroalcoólico	Hidroalcoólico	Etanólico	Hexânico	Hidroalcoólico	Hidroalcoólico	Etanólico	Hexânico
	Flores	Folhas	Folhas	Folhas	Flores	Folhas	Folhas	Folhas
Cumarinas	+	+	+	-	+	+	+	-
Heterosídeos	-	-	-	-	-	-	-	-
Cianogênicos	-	-	-	-	-	-	-	-
Taninos	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrosolúveis	-	-	-	-	-	-	-	-
Taninos Condensados	+	+	+	+	+	+	+	+
Fenóis	+	+	+	+	+	+	+	+
Antocianinas, Chalconas e Auronas	-	-	-	-	-	-	-	-
Leucoantocianidina	-	-	-	-	-	-	-	-
Catequinas	+	+	+	+	-	-	-	-
Flavonas	-	-	-	-	+	+	+	+
Flavanóis, Flavanonas, Flavanonóis, Xantonas	-	-	-	-	+	+	+	+
Saponinas	+	+	+	+	+	+	+	+
Confirmação de Saponinas	+	+	+	+	+	+	+	+

* (+) presença da substância; * (-) ausência da substância.

As diferenças dos componentes químicos presentes entre o período chuvoso e seco, observadas na Tabela 8, refere-se aos flavanóis, flavanona, flavanonóis e xantonas que estão ausentes nos extratos do período chuvoso e presentes nos extratos do período seco. As catequinas estão presentes só nos extratos do período chuvoso e ausentes nos extratos do período seco.

A prospecção fitoquímica tem grande importância para o conhecimento preliminar da constituição química de uma espécie em estudo. No entanto, trata-se de uma análise qualitativa de pouca sensibilidade, em que a presença de compostos em concentrações menores pode acabar sendo mascarada (GUILHON-SIMPLICIO, 2009). Portanto, não é prudente afirmar que os compostos não detectados nestas análises não estão presentes na espécie, mas é possível concluir que os que foram detectados são majoritários.

Os flavonóides constituem-se em um grande grupo de pigmentos vegetais, que serve para proteção das plantas de infecções bacterianas e fúngicas (ARANTES et al., 2005). De acordo com Silva et al. (2009), os compostos fenólicos podem apresentar atividade antibacteriana. Entretanto, a triagem fitoquímica da espécie *H. dilatata* mostrou a presença significativa de terpenos, em várias espécies do gênero *Hyptis*, como também dos flavonóides. A presença destes terpenos, bem como dos alcalóides, é de extrema importância nesta pesquisa, pois permite constatar a presença de metabólitos secundários. Estes podem estar relacionados com a atividade antibacteriana, fungicida e à atividade inseticida. Desta forma, favorece a ação sinérgica frente aos resultados de inibição dos testes, que foram e que serão realizados.

3.5 Atividade oxidante: DPPH E ABTS

As atividades oxidantes realizadas em óleos essenciais e extratos das folhas e flores de *H. dilatata*, coletadas no período seco e chuvoso, somente tiveram atividades os extratos hexânico e etanólicos das folhas coletadas no período seco e o extrato hexânico da folha coletada no período chuvoso, e das flores somente o extrato hexânico extraído da flor coletada no período seco.

Conforme mostram as Figuras I-13 e I-14, a maior porcentagem de inibição tanto com o método DPPH e ABTS, respectivamente, ocorreu com o extrato da flor coletada no período seco. Quanto à folha a maior atividade de inibição nos dois métodos foi mostrada com o extrato hexânico, da folha coletada no período chuvoso. O padrão utilizado foi o ácido gálico tanto para o DPPH, quanto para o ABTS, que obtiveram os seguintes CI_{50} respectivamente (2,8 $\mu\text{g/mL}$ e 2,1 $\mu\text{g/mL}$).

Portanto, nos extratos que houve inibição para atividade antioxidante, possivelmente possuem substâncias capazes de reagir com o radical livre DPPH e transformá-lo em 2,2-difenil-1-picril hidrazina. De acordo com o trabalho realizado por Tafurt-Garcia et al. (2015), em Arauca na Colômbia com a espécie *H. dilatata*, as atividades oxidantes, testadas nos extratos com esta espécie, possivelmente estavam relacionadas às substâncias químicas sequiterpenóides ou do grupo diterpenos presentes nas amostras. Estes fatores entram em conformidade com os resultados obtidos na espécie *H. dilatata* coletada na Serra do Tepequém, no estado de Roraima, devido à caracterização química desta planta com óleos essenciais, como mostra a análise cromatográfica nos capítulos II e III. Os constituintes tanto da folha como na flor, a sua maioria são constituído de monoterpenos e sequiterpenos, podendo ser uma das explicações da causa das inibições antioxidantes desta espécie.

Figura I-13 – Atividade do ensaio do radical livre DPPH, dos extratos hexânicos e etanólico das folhas e flores de *Hyptis dilatata*: A - *FHC - Extrato hexânico da folha do período chuvoso; B - FEC - Extrato etanólico da folha do período chuvoso; C - FLHC – Extrato hexânico da flor do período chuvoso; D - FHS – Extrato hexânico da folha do período seco; E - Padrão – Ácido Gálico.

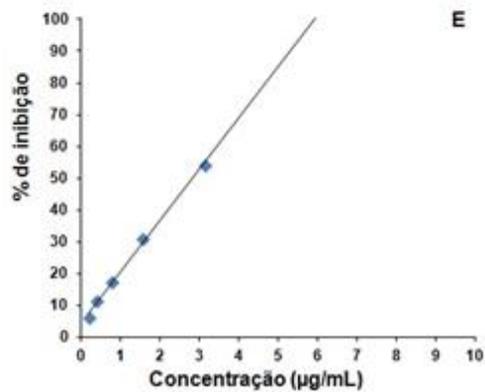
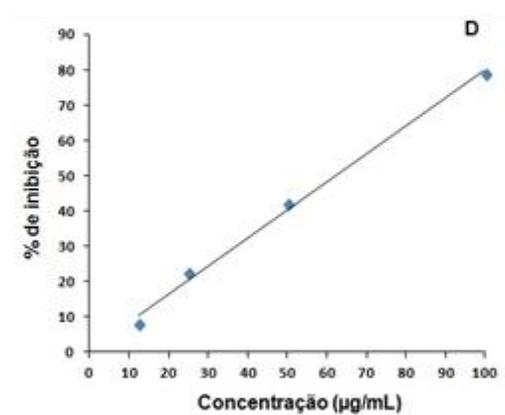
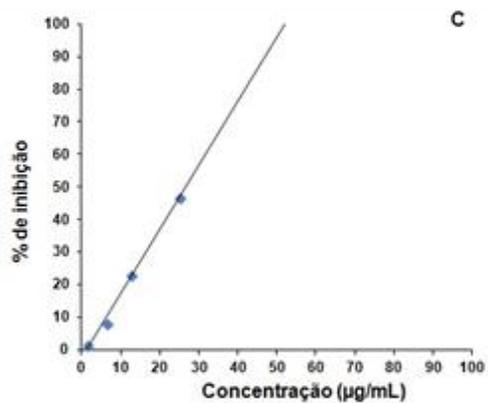
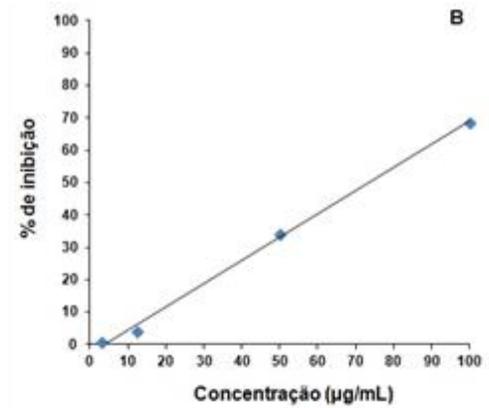
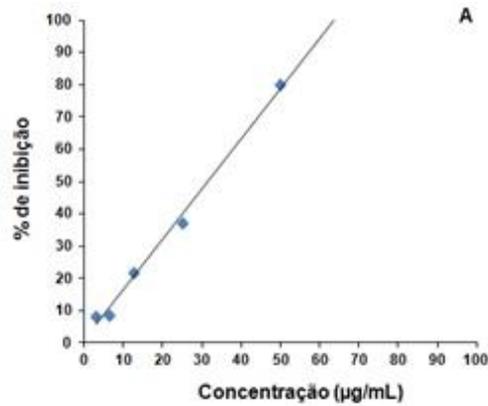
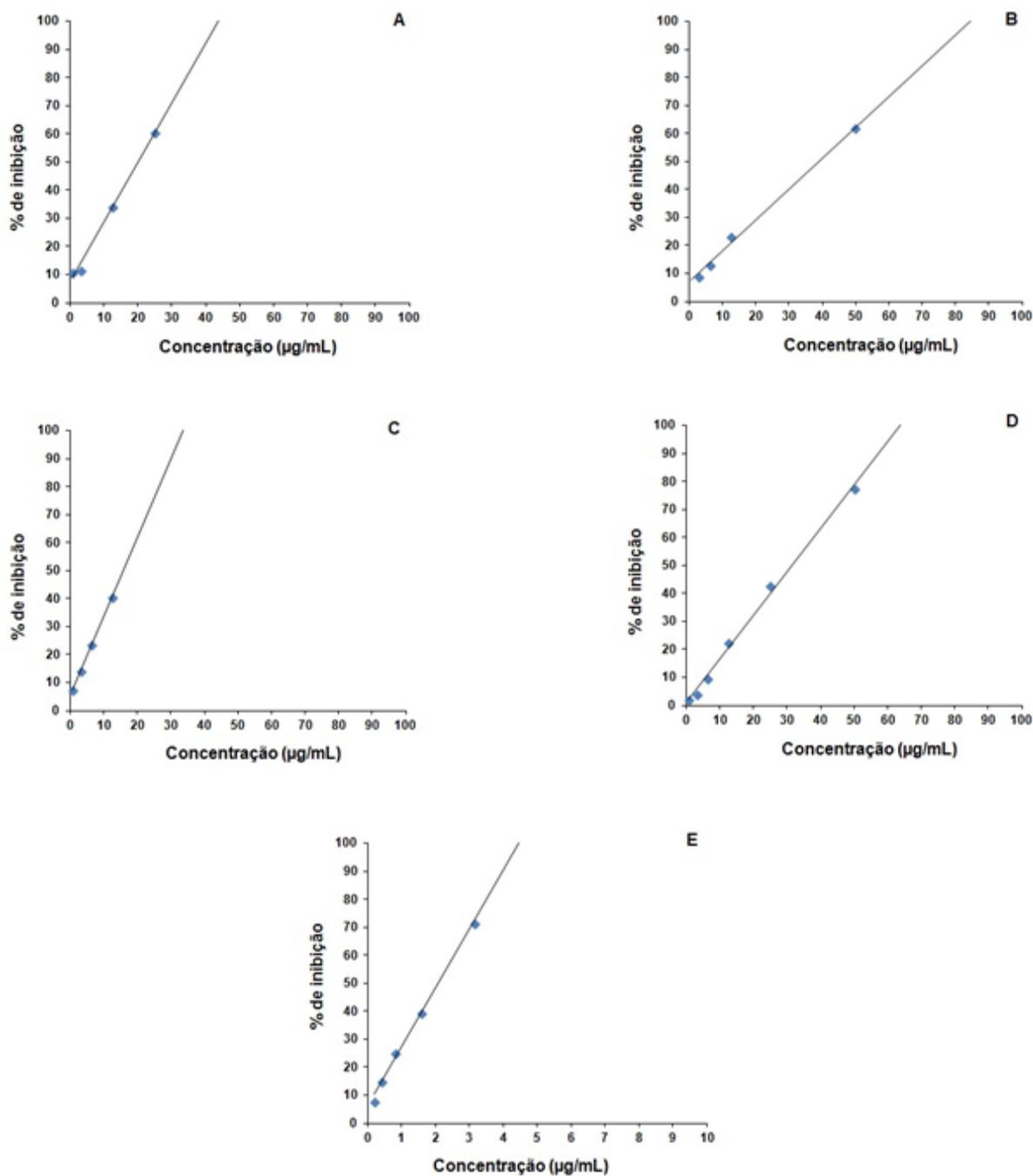


Figura I-14 – Atividade do ensaio do radical livre ABTS, dos extratos hexânicos e etanólicos das folhas e flores de *Hyptis dilatata*: A - *FHC - Extrato hexânico da folha do período chuvoso; B - FEC - Extrato etanólico da folha do período chuvoso; C - FLHC – Extrato hexânico da flor do período chuvoso; D - FHS – Extrato hexânico da folha do período seco; E - Padrão - Ácido Gálico.



Na Tabela I-9 os dados mostram que somente o extrato hexânico da flor coletada no período seco, mostrou atividade oxidante, enquanto na folha houve potencialidade tanto no extrato hexânico quanto no extrato etanólico. Conforme os resultados apresentados,

estatisticamente os valores dos diferentes antioxidantes nas amostras que tiveram inibição, não houve muita diferença.

Segundo Sousa et al. (2007), quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra testada, menor será sua CI_{50} e maior será a atividade antioxidante.

Inibição de extratos vegetais superior a 70 % são levados em consideração, que sua atividade antioxidante é elevada. Valores de 50 a 70 % de inibição são consideradas como moderada a sua atividade e os valores inferiores a esta porcentagem são considerados de baixa atividade antioxidante (MELO et al., 2006).

Tabela I-9 – Porcentagens e concentrações inibitórias dos ensaios de atividades antioxidantes frente ao radical DPPH e ABTS.

Amostras	DPPH	CI_{50}	ABTS	CI_{50} $\mu\text{g}/\text{mL}$
	Inibição %	$\mu\text{g}/\text{mL}$	Inibição %	
FHC	80,44 \pm 0,07	32 \pm 1,81	90,96 \pm 0,36	21,33 \pm 1,52
FEC	75,24 \pm 0,23	74 \pm 1	82,3 \pm 0,74	41,3 \pm 0,43
FIHC	81,93 \pm 0,16	21,85 \pm 1,20	92,0 \pm 0,91	24,9 \pm 0,85
FHS	79,89 \pm 0,21	59,7 \pm 4,07	83,83 \pm 2,18	32,03 \pm 0,92

*FHC- Extrato hexânico da folha do período chuvoso; FEC – Extrato etanólico da folha do período chuvoso; FLHC – Extrato hexânico da flor do período chuvoso; FHS – Extrato hexânico da folha do período seco.

A Tabela I-10 mostra a porcentagem de flavonóides e fenóis encontrada nas amostras dos extratos das folhas e flores de *H. dilatata*. Observa-se que não houve porcentagem de flavonóides, no extrato hexânico da flor coletada no período chuvoso. Na flor do extrato etanólico, coletada no período chuvoso e no extrato hexânico da folha coletada no período seco, não houve porcentagem para o ensaio de fenóis totais. Nos ensaios de flavonoides, o padrão utilizado foi a Quercetina e nos ensaios de fenóis o Ácido Gálico.

Tabela I-10 – Teores de flavonóides e Fenóis totais nos extratos das folhas e flores de *Hyptis dilatata*.

Amostras	Flavonoides (%)	Quercetina µg/mL	Fenóis (%)	Ácido Gálico µg/mL
FHC	5,44 ± 0,13	23,84 ± 0,70	20,45 ± 0,78	138,15 ± 5,45
FEC	34,77 ± 0,84	181,97 ± 4,53	15,23 ± 0,14	101,90 ± 0,98
FIHC	-	-	16,36 ± 0,79	109,72 ± 5,49
FIEC	8,22 ± 0,23	38,79 ± 1,26	-	-
FHS	4,85 ± 0,47	20,65 ± 2,55	17,84 ± 0,43	120,15 ± 3,00
FES	10,84 ± 0,59	52,91 ± 3,22	-	-

*FHC- Extrato hexânico da folha do período chuvoso; FEC - Extrato etanólico da folha do período chuvoso; FLHC – Extrato hexânico da flor do período chuvoso; FLEC – Extrato etanólico da flor do período chuvoso; FHS – Extrato hexânico da folha do período seco; FES – Extrato etanólico da folha do período seco.

Observou-se que a maior quantidade de flavonóide foi encontrada com os extratos etanólicos, enquanto nos fenóis totais, os maiores teores foram com os extratos hexânicos. Conforme Sobrinho et al. (2009), os teores destes metabólitos, pode variar de acordo com a época da coleta, devido a diferentes causas provocadas pela sazonalidade, temperatura, umidade e a luminosidade, dentre outros fatores.

Os compostos fenólicos possuem habilidade de seqüestrar radicais livres que se tornam prejudiciais à saúde do ser humano, portanto, o interesse pela busca de novos conhecimentos por estes compostos tem aumentado (ALVES et al., 2007; NEVES et al., 2009).

Nos períodos que se observaram os teores baixos de flavonóide, possivelmente está relacionado com o horário da coleta e pela época do ano, quando a temperatura e a umidade estão altas, podendo ser um fator indicativo se referindo a uma menor produção dessa substância pela planta (NASCIMENTO et al., 2011). Segundo Nascimento et al. (2011), na sua pesquisa com a espécie *Bauhinia variegata* L. utilizando extratos de folhas em diferentes épocas do ano o mês de junho, mês que apresentou menor temperatura e umidade e o mês de dezembro com maior temperatura e umidade apresentaram menores teores de flavonóides. Desta forma pode se explicar a variação de teores de flavonóides totais e fenóis totais, encontrados neste estudo com a espécie *H. dilatata*, em estações climáticas diferentes.

4 CONCLUSÕES

Considerando a pontencialidade dos extratos das folhas e flores coletadas em períodos climáticos diferentes, seco e chuvoso, pode - se concluir que:

- O maior rendimento do óleo essencial tanto nas folhas, quanto nas flores da espécie *H. dilatata*, ocorreu no período seco. Este resultado pode ser decorrente da variação das concentrações de constituintes químicos, encontrados na planta, os quais podem atuar na defesa contra predadores ou mesmo como proteção da própria planta.
- O planejamento experimental com extratos hexânico, etanólico e hidroetanólico das folhas e flores da espécie *H. dilatata* mostrou o perfil fitoquímico da planta tanto no período climático seco, quanto no período chuvoso.
- Registrou-se nas folhas e flores a presença dos constituintes químicos: cumarina, taninos condensados, fenóis e saponinas, com os extratos hexânico, etanólico e hidroetanólico, nos períodos seco e chuvoso, sendo que não houve presença de cumarina com os extratos hexânico nas folhas, em nenhum período climático.
- Quanto à atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS, a inibição foi registrada no extrato hexânico, extraído da flor coletada no período chuvoso. Considerando as folhas, a maior inibição com os dois métodos antioxidante ocorreu com o extrato hexânico, coletado no período chuvoso.
- Os estudos das propriedades fitoquímicas realizadas neste trabalho, mostraram resultados que evidenciaram o potencial fitoquímico, identificando os metabólitos presentes na planta, mostrando-se eficazes para atividade antioxidante, contribuindo deste modo para explicações das atividades biológicas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALICE, C.B.; SILVA, G.A.; SIQUEIRA, N.C.; MENTZ, L.A. Levantamento fitoquímico de alguns vegetais utilizados na medicina popular do Rio Grande do Sul: Parte I. **Caderno de Farmácia**, Porto Alegre, v. 1, n. 2, p. 83-94, 1985.
- ALVES, C.Q.; BRANDÃO, H.N.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; LIMA, L.S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. **Diálogos & Ciência**, Salvador, v. 5, n. 12, p. 83-94, 2007.
- ARANTES, V.P.; SATO, D.N.; VILEGAS, W.; SANTOS, L.C.; LEITE, C.Q.F. Plantas do cerrado brasileiro com atividade contra *Mycobacterium fortuitum*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 26, n.3, p. 195-198, 2005.
- BOTREL, P.P.; PINTO, J.E.B.P.; ARAÚJO, A.C.C.; BERTOLUCCI, S.K.V.; FIGUEIREDO, F.C.; FERRI, P.H.; COSTA, D.P. Variações no teor e na composição volátil de *Hyptis marruboides* EPL. cultivada no campo e em casa de vegetação. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n.1, p. 33-37, 2010.
- CASTRO, D.P.; CARDOSO, M.G.; MORAES, J.C.; SANTOS, N.M.; BALIZA, D.P. Não preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea mille folium* L. e *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4, pp. 27-32, 2006.
- COSTA, A.F. **Farmacognosia**. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, v. 3, 1032 p, 2001.
- COSTA, V.C.O. **Contribuição ao conhecimento químico de espécies de *Hyptis* com ocorrência no semiárido paraibano: *Hyptis macrostrachys* Benth. E *Hyptis umbrosa* Salzm. Ex Benth.** 2013. 162p. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, João Pessoa-PB, 2013.
- CRONQUIST, A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. New York Colombia University Press, p.1262,1981.
- DALMARCO, J.B. **Estudo das propriedades químicas e biológicas de *Rosmarinus officinalis* L.** 2012. 129p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemática, Florianópolis, 2012.
- FALCÃO, D.Q.; MENEZES, F.S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro v. 84, n. 3, p. 69 -74, 2003.
- FLORA BRASILIENSIS, Vol.VIII, Pat I, Fasc.22 Coluna 107-108, revisado em 2005.
- FOLIN, C.; CIOCALTEU, V. Tyrosine and tryptophan determination in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v.73, p. 627-650, 1927.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-81, 2007.
- GONÇALVES, G.G.; MANCINELLI, R.C.; MORAIS, L.A.S. Influência do horário de corte no rendimento de óleo essencial de alfavaquinha e alecrim. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 108-112, 2009.

GUILHON-SIMPLICIO, F. **Estudo Farmacognóstico e de atividade farmacológica da espécie *Byrsonima japurensis* A. Juss (Malpighiaceae)**. 2009. 163p. Dissertação (Pós-graduação em Patologia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas-UFAM, Manaus-AM, 2009.

GUILHON-SIMPLICIO, F.; SOUZA, T.P.; ALONSO, A.A.; ALMEIDA, P.D.O.; SANTOS, P.A.; OHANA, D.T.; LIMA, E.S.; PEREIRA, M.M. Antioxidant activity of a standardized extract of *Byrsonima japurensis* A. Juss. (Malpighiaceae) stem bark. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 26, p. 1926–1930, 2013.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Mapa de biomas brasileiros. 2013. Acesso em: 16 de Julho de 2013. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/default_prod.shtm#MAPAS/.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Roraima, informações completas. 2017. Acesso em: 19 de maio de 2017. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao>.

KOEPPEN, N.W. **Climatologia, Com um estudio de los climas de la tierra**. Fondo Cultural Económico, México. p.478, 1948.

LIMA, K.B. **Contribuição para o conhecimento químico de *Hyptis carvalhoi* Harley**. 2010. 155p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza - CE, 2010.

MARTINS, F.T.; SANTOS, M.H.; POLO, M.; BARBOSA, L.C.A. Variação química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., sob condições de cultivo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, p.1203-1209, 2006.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2.ed. Fortaleza: UFC, 1997.141p.

MATOS, F.J.A. **Introdução à Fitoquímica experimental**. Fortaleza: UFCE, 1988.

MELO, A.M. Estudo Fitoquímico e Biológico de *Hyptis mutabilis* SALZ (Lamiaceae). 2003, 103p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de produtos bioativos) - Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Recife-PE, 2003.

MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.A.G.; LEAL, F.L.L.; CAETANO, A.C.S.; NASCIMENTO, R.J. Capacidade Antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, p. 639-44, 2006.

MIRANDA, C.A.S.F.; CARDOSO, M.G. BATISTA, L.R.; RODRIGUES, L.M.A.; FIGUEIREDO, A.C.S. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Ciências Agrônomicas**, Fortaleza, v. 47, n. 1, p. 213-220, 2016.

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

NASCIMENTO, J.C.; LAGE, L.F.O.; SOUSA, A.N.; OLIVEIRA, F.Q. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 4, pp. 327-332, 2011.

NEVES, L.C.; ALENCAR, S.M.; CARPES, S.T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonóides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Braz. Journal of Food Technology**. IN: VII BMCFB, p.107-110, 2009.

OLIVEIRA, A.R.M.F. **Produção de óleo essencial de *Mentha x piperita* var. *citrata* sob diferentes condições de manejo**. 2011. 83p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, Ilheus-BA, 2011.

PINTO, J.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V. **Cultivo e processamento de plantas medicinais**. Lavras: UFLA, 47p, 2002.

SARKER, S.D.; LATIF, Z.; GRAY, A.I. **Natural products isolation**. 2nd ed. Totowa, N. J.: Humana Press, 2006. 515p.

SILVA, R.F.; GARCEZ, F.R. **Estudo químico e avaliação de atividade antibacteriana de *Hyptis cana* (Lamiaceae)**. Trabalho de Iniciação Científica (PIBIC). Departamento de Química, UFMS, 2009.

SOBRINHO, T.J.S.P.; CARDOSO, K.C.M.; GOMES, T.L.B.; ULYSSES, P.; ALBUQUERQUE, U.P.; AMORIM, E.L.C. Análise da pluviosidade e do efeito de borda sobre os teores de flavonóides em *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud., Fabaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 3, pp. 740-745, 2009.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA, G.M.; AYRES, M.C.C; COSTA, C.; ARAÚJO, D.S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

TAFURT-GARCÍA, G.; MUÑOZ-ACEVEDO, A.; CALVO, A.M.; JIMÉNES, L.F.; DELGADO, W. A. Componentes volátiles de *Eriope crassipes*, *Hyptis conferta*, *H. dilatata*, *H. brachiata*, *H. suaveolens* y *H. mutabilis* (Lamiaceae): Volatil e compounds of analysis of *Eriope crassipes*, *Hyptis conferta*, *H. dilatata*, *H. brachiata*, *H. suaveolens* y *H. mutabilis* (Lamiaceae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**. v. 13, n. 3, p: 254 – 269. ISSN 0717 7917, 2014.

TAFURT-GARCÍA, G.; JIMÉNEZ-VIDAL, L.F.; CALVO-SALAMANCA, A.M. Antioxidant capacity and total phenol content of *Hyptis* spp., *P. heptaphyllum*, *T. panamensis*, *T. rhoifolia* and *Ocotea* sp. **Revista Colombiana de Química**, v. 44, n. 2, p. 28-33, 2015.

URONES, J.G; MARCOS, I. S.; DIEZ, D.; CUBILLA, L. R. Tricyclic diterpenes from *Hyptis dilatata*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 48, n. 6, pp. 1035-1038, 1998.

CAPÍTULO II - CHEMICAL COMPOSITION, ANTIACETYLCHOLINESTERASE INHIBITION AND TOXICITY ACTIVITIES OF ESSENTIAL OIL FROM *HYPTIS DILATATA* (LAMIACEAE) FLOWERS

Artigo publicado em Journal of Medicinal Plants Research, vol. 11, n. 14, p. 275-283, abril, 2017

Sirley Pereira Almeida^{1*}, Diana Maruja Sangama Mozombite², Antonio Alves de Melo Filho^{3,7}, Andreina G. de Andrade Laranjeira³, Ana Cristina Gonçalves Reis de Melo³, Regildo M. G. Martins⁴, Jacqueline A. Takahashi⁵, Vany P. Ferraz⁶, Otoniel Ribeiro Duarte⁸ and Wanderli Pedro Tadei⁹

Abstract

The content and chemical composition of the essential oil may vary in certain species according to the climatic period. The aim of this study was to evaluate the influence of seasonality on the chemical composition of the essential oil from *Hyptis dilatata* flowers, to perform biological activities such as antimicrobial, inhibition of acetylcholinesterase enzyme and to evaluate the toxicity of the essential oil using for the test as indicator *Artemia salina*. *H. dilatata* flowers were collected in rainy and dry periods and extracted by hydrodistillation using extractor of Clevenger condenser double Spell model. Analysis of essential oil resulted in 22 chemical components. The major constituents for dry and rainy periods were α -pinene (26.2%, 10.9%), 3-Carene (12.2%, 3.7%), fenchone (17%, 14.8%) and β -cariofillene (16.36%, 30.9%), respectively. The essential oil *in vitro* inhibited the acetylcholinesterase enzyme in 93.4% (rainy period) and 92.4% (dry period). Between the dry and rainy periods, the best LC₅₀ in microbial activity *in vitro* was obtained in the rainy period tested in *Staphylococcus aureus* bacterium (LC₅₀ 49.8 mg mL⁻¹). The cytotoxic activity of *Artemia salina* in *H. dilatata* essential oil proved LC₅₀ results below of 100 μ g mL⁻¹. Therefore, the chemical characterization and testing of biological activities of essential oils showed promising results in the search for new active substances and development of bioproducts of vegetable origin.

Keywords: *H. dilatata*, α -pinene, fenchone, β -cariofillene, 3-carene.

1 INTRODUCTION

The genus *Hyptis* belongs to Lamiaceae family, consisting of approximately 580 species, many of them with great ethnopharmacological importance. They are distributed mainly in tropical America, southern United States, Caribe and Argentina. In Brazil, it is mainly found in Minas Gerais, Bahia, Goiás and Amazonas states (Lima, 2010). In this family of plants is common the use of essential oil by the population in folk medicine as coding and remedy and they have been used as antioxidant, anti-inflammatory, antihypertensive, antitumoral, gastroprotective, insecticide, antibacterial, antifungal and antiherpetic (Barros et al., 2010; Hussain et al., 2011). Some biological activities have been associated to the content of phenolic compounds, present in the plant (Zgórká and Glowniak, 2001; Valant-Vetschera et al., 2003). In addition, owing to the diversity of volatile constituents found in essential oils of various species of the Lamiaceae family, these essential oils have aroused the interest of the perfume, cosmetics, food and pharmaceutical industries (Fernández-Alonso and Rivera-Díaz, 2002). Species of genus *Hyptis* are mostly aromatic with great economic potential, due to its essential oil and presents important pharmacological action, such as anesthetic, anti-inflammatory (Botrel et al., 2010). Defense mechanisms of plants can vary in distinct environmental conditions, leading, consequently, to the production of different secondary metabolites. Factors such as cultivation conditions, soil type and parts of the plant analyzed, may influence the content and chemical composition of essential oils (Botrel et al., 2010). Botrel et al. (2009) studied the chemical composition and content of the essential oils of *H. marrubioides* Epling flowers of two genotypes, white and purple. In this research, they identified that the content of some of the major principal compounds of the white genotype, such as β -caryophyllene, γ -muurolene and caryophyllene oxide, was higher compared to the purple genotype, and also observed that the essential oil content was highest in the inflorescence of the white genotype. Researchers like Santos et al. (2008) studied the essential oils of *H. pectinata* leaves and identified calamusenona as the major compound, which possess antimicrobial activity. Niero and Malheiros (2009) studied the essential oils of *H. suaveolens* leaves and identified the antimicrobial compound sabinene as major constituent (antimicrobial activity) while from *H. crenata*, α -pinene was the majoritary one (antioxidant activity). Urones et al. (1998), isolated, from a *Hyptis dilatata* species collected in Veraguas (Panama), the well known compounds carnosol, rosmanol and methyl-rosmanol. Tafurt-García et al. (2014) studying the flowers of *Hyptis dilatata* from Arauca (Colombia) identified δ -3-carene, camphor, bornyl acetate, E-caryophyllene and palustrol as the principal constituents. According to Lang and Buchbauer (2012), the δ -3-carene, camphor and bornyl

acetate compounds have antimicrobial activity and (Lang and Buchbauer, 2012; Misharina et al., 2009), α -humuulene, caryophyllene and fenchone have antimicrobial and antioxidant activities. *H. dilatata* species is a perennial sub-bush known as field mint, in Tepequem saw, where it was collected in the municipality of Amajari, Roraima state, Brazilian Amazon rainforest. This species is usually used by the population for medicinal purposes, such as intestinal problems, influenza, and as insecticide. The aim of this work was to evaluate concentration of the chemical compounds present in the essential oil of *H. dilatata* flowers in two seasonal periods and to realize the biological tests for antimicrobial activity, fungicide, activity with acetylcholinesterase enzyme, as well as the cytotoxic activity using *Artemia salina* with essential oils.

2 MATERIAL AND METHODS

Plant material and essential oil extraction

The flowers of *H. dilatata* were collected during the dry period (January to March) and in the rainy period (June to August) in 2015 in Paiva village at 634 m (meters above sea level), in Tepequem saw (RR 203), municipality of Amajari in Roraima state, Brazil. A voucher specimen was deposited in the INPA herbarium with registration number 263670 and another voucher specimen was deposited in the integrated museum of Roraima state (MIR 12754). The essential oil was extracted by hydrodistillation method, drag the water vapor for 2 hours using extractor of Clevenger condenser double Spell model. The percentage of essential oil collected in the dry and rainy periods was measured in triplicate. The essential oil was placed in amber flask, weighed, and stored under nitrogen in a freezer until further analysis (Castro, 2006).

2.1 GC-FID analysis

The composition of the chemical constituents present in the essential oils was determined by gas chromatography after preparation of the methyl esters. The analyses were performed on a Gas Chromatograph HP7820A (Agilent). Column: HP5 30 m x 0.32 mm x 0.25 μ m (Agilent). Temperature: Column: 50 °C (0 min), 0 °C min⁻¹, up to 230 °C. Injector: 250 °C Split (1:30). Detector FID: 250 °C. Vector gas: H₂ at 3.0 mL min⁻¹. Injection volume: 1 μ L. Data acquisition software: EZChrom Elite Compact (Agilent). Samples diluted at 1 % in chloroform.

2.2 GC-MS analysis

Identification of the chemical constituents was performed on GCMS-QP2010 ULTRA (Shimadzu) apparatus. Column: Rxi-1MS 30 m x 0.25mm x 0.25 μ m (Restek). Temperature Column: 50 °C (3 min), 3 °C min⁻¹, up to 230 °C. Injector: 250 °C Split (1:10). Interface CG-MS a 250 °C. Detector MS (electronic Impact at 70 eV) up to 250 °C. Vector gas: He at 2.0 mL min⁻¹. Injection volume: 1 μ L. Samples diluted at 1 % in chloroform. Data acquisition software: GCMS Solution (Shimadzu). Spectral library: NIST11.

2.3 Acetylcholinesterase (AChE) inhibition assay

Quantitative evaluation of acetylcholinesterase (AChE) inhibition activity was performed according to the methodology of Ellman (1961), modified by Rhee et al. (2001). This bioassay was performed on microplates of 96 wells. Eserine and galantamine (10 mg mL⁻¹) were used as positive controls while the negative control was performed without inhibitor. In each well were added 25 μ L of acetylcholine iodide (15 mM); 125 μ L of 5.5'-dithiobis (2-nitro benzoic acid) (DTNB); 50 μ L of tris-HClpH8 0.1 % w/v buffer of bovine serum albumin and 25 μ L of extract (10 mg mL⁻¹) solubilized in Tween/DMSO (30:70). The tests were performed in triplicate. The plates were read nine times at 405 nm over a period of 10 minutes. Immediately after the first reading, 25 μ L of acetylcholinesterase enzyme (*Electrophorus electricus*, Sigma Aldrich) (0.222 U mL⁻¹) was added and nine readings were performed over a period of 10 minutes at 405 nm. The interference of spontaneous hydrolysis of the substrate was corrected from the subtraction of the average of the absorbance measured before the addition of the enzyme. The percentage inhibition of the enzyme was calculated from the following mathematical formula:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[(C - A) \times 100]}{C}$$

Where: C = control containing enzyme and substrate; A = assay containing the extract, enzyme and substrate.

2.4 Toxicity on *Artemia salina*

The toxicity on *A. salina* was carried out through the methodology adapted from Mayer et al. (1982). Artificial saline solution (40 g of coarse salt in 1 L of distilled water) was added in an aquarium that was used as an incubator. The pH of this solution was adjusted between 8 and 9 with sodium carbonate (Na₂CO₃ at 10 %). The incubator was divided into two

environments: an uncovered environment was artificially illuminated with a fluorescent lamp with aeration and the other environment was placed, approximately 100 mg of *A. salina* eggs, and covered with aluminum foil so that organisms at birth remained isolated due to the difference in illumination, during an incubation period of 48 hours. After hatching, the *A. salina* eggs were added in each test tube, 10 nauplii, containing serial concentrations (1000; 500; 250; 125; 62.5; 31.25 and 15.62 $\mu\text{L mL}^{-1}$). After a period of 24 hours, the number of live and dead nauplii in each test tube was counted, using macroscopic visualization. The tests were done, in triplicate, for each concentration. As a positive control, DMSO and also saline water were used without the essential oil. The probability of mortality was calculated using the Abbot formula.

$$M (\%) = \left(\frac{\text{Amount of dead organisms}}{\text{Total number of organisms in the tube}} \right) \times 100$$

A calibration curve was used to obtain the LC_{50} was the toxicity assessment test. Low toxicity was considered when the LC_{50} is greater than 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; moderate when the LC_{50} was between 100 and 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and very toxic when the LC_{50} was less than 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Amarante, 2010).

2.5 Antibacterial and yeast assay

The microorganisms used in the tests were two Gram-negative bacteria: *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311) and *Citrobacter freundii* (ATCC8090), two gram-positive bacteria: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Bacillus cereus* (ATCC 11778) and a fungus (yeast) *Candida albicans* (ATCC 18804). The concentrations of essential oils in the tests were: 250, 125, 62.5, 31.25, 15.6, 7.8, 3.9 and 1.95 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Zacchino and Gupta, 2007). The samples were weighed, dissolved in DMSO (500 mg mL^{-1}) and added to BHI broth (Brain Heart Infusion) for bacteria and Sabouraud for yeasts to produce a solution with final concentration of 20 mg mL^{-1} . A pre-inoculum was prepared in which the bacteria and yeast were transferred with a platinum ring to test tubes containing 3 mL of BHI broth. The tubes were incubated at 37 °C for 24 h. The pre-inoculum (500 μL) was transferred to tubes containing 4.5 mL of distilled water. The tubes were homogenized and the concentration adjusted to 0.5 McFarland turbidity standard (10^8 UFC mL^{-1}), thus obtaining the inocula used in the bioassays. The tests were performed on 96 microwell plates, in duplicate. Two controls were performed, one to monitor the growth of the microorganism, in which there was no addition of the working solution (to verify cell viability) and another one, in which the microbial inoculum was not added (in order to eliminate the

effect of extracts color of the working solution). A control plate containing 100 μL of BHI culture medium and 100 μL of sterile distilled water was added to the experiment to control the sterility of BHI culture medium. Another control was prepared, containing the standard antibiotics: ampicillin (antibacterial), miconazole and nystatin (antifungals) to observe the activity of these antibiotics on the microorganisms. The microplates were incubated in an oven at 37 °C and after 24 hours the Elisa plates (492 nm) were read. The results were calculated as percent inhibition using the formula:

$$\% \text{ Inhibition} = 100 - \frac{AC1 - AC2}{AH - AM} \times 100$$

AC1 = absorbance of the sample; AC2 = absorbance of control sample; AH = absorbance in the control of microorganism and AM = absorbance of the control of the culture medium.

3 RESULTS AND DISCUSSION

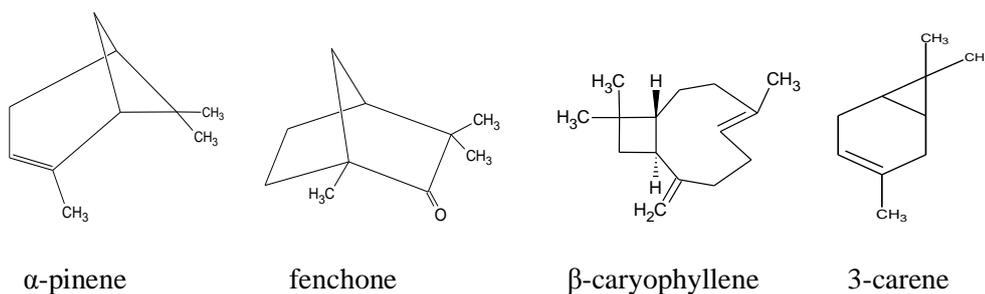
Analyses of GC-FID for quantification and GC-MS for identification of the essential oil components of *H. dilatata* flowers showed the presence of 22 constituents (Table II-1).

Table II-1 – Chemical constituents in the essential oils of *H. dilatata* flower

Peak	*KI	*RT min	* FDP %	* FRP %	Compounds
1	973	3.75	26.2	10.9	α -pinene
2	980	4.03	1.5	0.7	Camphene
3	993	4.53	0.2	0.0	Sabinene
4	996	4.65	2.6	1.5	β -pinene
5	1008	5.07	0.4	0.2	Myrcene
6	1015	5.37	0.3	0.2	α -felandrene
7	1019	5.52	12.2	3.7	3-carene
8	1024	5.70	0.3	0.2	α -terpinene
9	1031	5.94	0.4	0.2	p-cymene
10	1033	6.04	2.4	0.7	Limonene
11	1058	6.96	0.4	0.3	g-terpinene
12	1083	7.90	17.0	14.8	Fenchone
13	1110	8.95	0.3	0.2	Menthenol
14	1133	9.80	2.0	2.4	Camphor
15	1170	11.20	0.8	0.9	Fenchol
16	1190	11.96	0.6	0.4	terpinen-4-ol
17	1212	12.77	1.4	2.2	α -terpineol
18	1413	20.39	16.3	30.9	β -caryophyllene
19	1432	21.10	1.2	1.9	Aromadendrene
20	1447	21.66	1.2	2.2	Humulene
21	1491	23.31	0.7	1.2	D-germacrene
22	1574	26.47	0.7	1.1	Caryophyllene oxide
			10.9	23.2	Others
			89.1	76.8	Identified
			100.0	100.0	Total

* FDP – Essential oil from dry period; FRP - * Essential oil from rainy period; * KI = Kovats index calculated by GC using an *n*-alkane series under the same conditions as for samples; * TR = Retention Time.

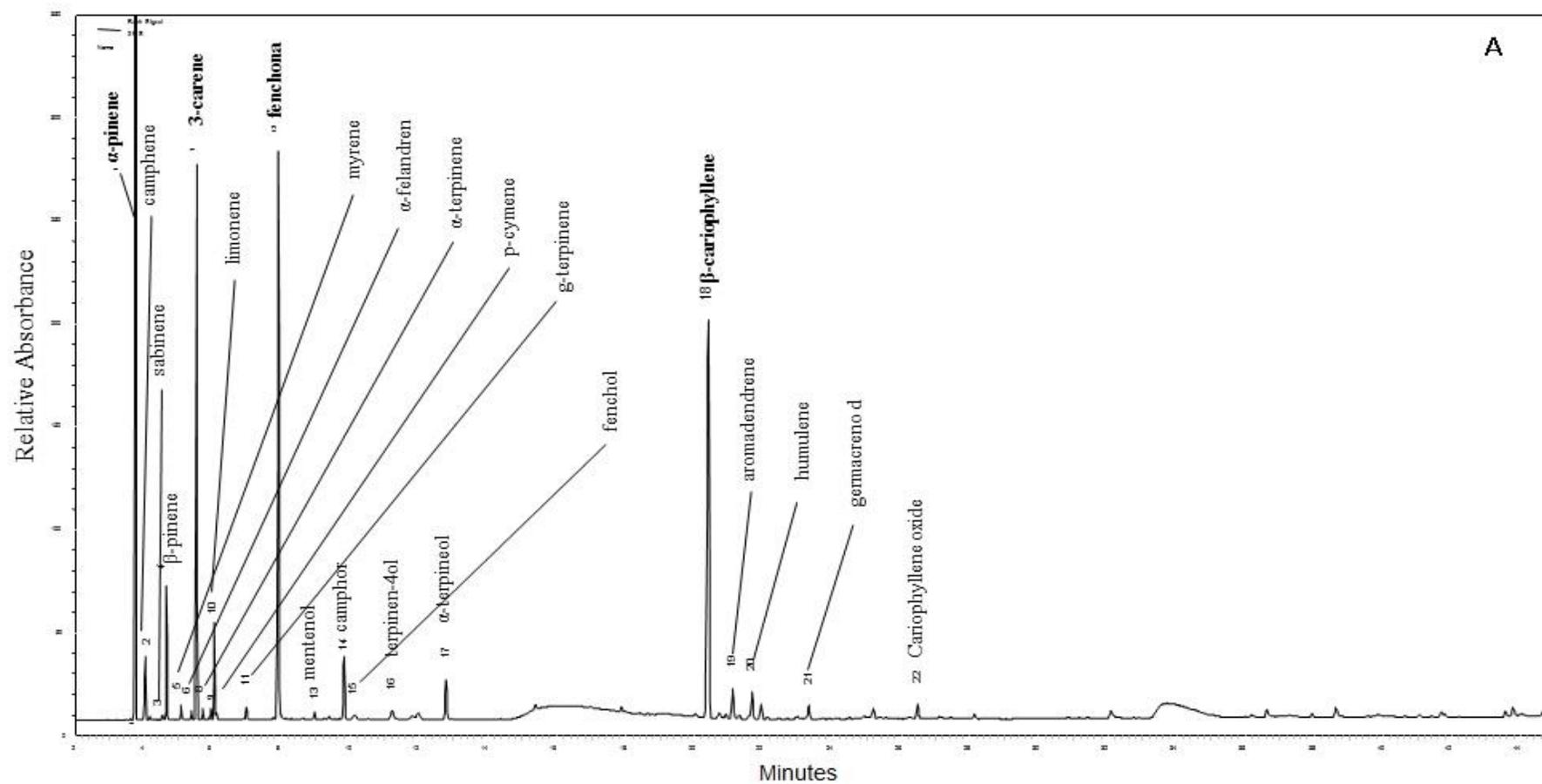
The main compounds and their respective concentrations in the essential oil of dried flowers harvested during the dry period (DP) and rainy period (RP) were α -pinene (26.2 %), fenchone (17 %), β -caryophyllene (16.3 %), 3-carene (12.2 %) for DP and α -pinene (10.9 %), 3-Carene (3.7 %), fenchone (14.8 %), β -caryophyllene (30.9 %) for RP (Figure II-1).

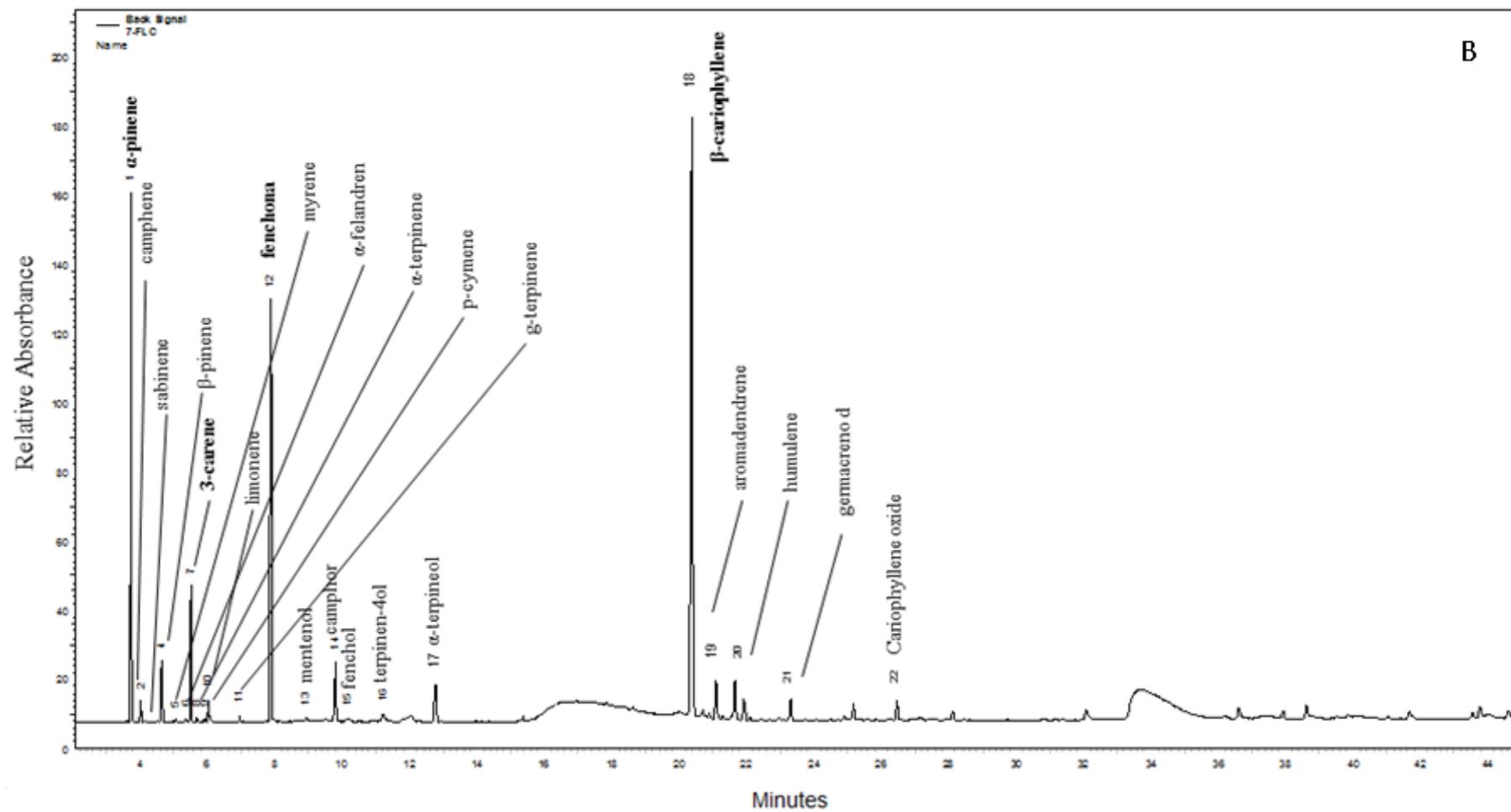
Figure II-1 – Chemical structures of the major constituents of the essential oils of *H. dilatata* flowers

Figures II-2 (A and B) shows the chromatographic profile for *H. dilatata* essential oil. Twenty-two components corresponding to 89.1 % and 76.8 % of essential oil composition of the flower collected in the dry and rainy period, respectively, were identified. Four major compounds gave 71.7 % of the essential oil collected in the dry period and 60.3 % of the essential oil collected in the rainy period.

The chemical composition of the essential oils of *H. dilatata* was mainly constituted by monoterpenes, being fenchone, a bicyclic monoterpene compatible with literature data for volatile constituents of species of genus *Hyptis* (Martins et al., 2006). The values of α -pinene (0.07 %) in the flowers of this species collected in Colombia (Tafurt-García et al., 2014) were much lower than those collected in the Tepequem saw in Roraima state, Brazil, according to Table 1. In the work of Melo, (2013), the 3-carene (9.5 %) and camphor (16 %) levels were above of the levels found in the present work results of our research 3-carene (3.7 %) and camphor (2.4 %) respectively, but lower than the concentration of 3-carene (12.2 %) obtained from *Hyptis* essential oil collected in dry period in this work. Brant et al. (2008) reports that in different environments there are differences in chemical composition of plant species due to different efficiencies in the production of active principles. They also emphasizes that the periods where there is greater production of oil usually do not match the largest production of chemical constituents.

In this research, the content of monoterpenes in essential oil of *Hyptis* flower presented in the dry and rainy periods were 69 % and 39.5 %, respectively. According to Passos et al. (2009) monoterpenes, present in volatile oils have potential activities on the GABAergic neurotransmitters (gamma-aminobutyric acid), which are a good tool for the development of anxiolytic and anticonvulsant drugs.

Figure II-2 – Chromatogram of the essential oil from *H. dilatata* flowers, harvested in the rainy period (A) and dry period (B)

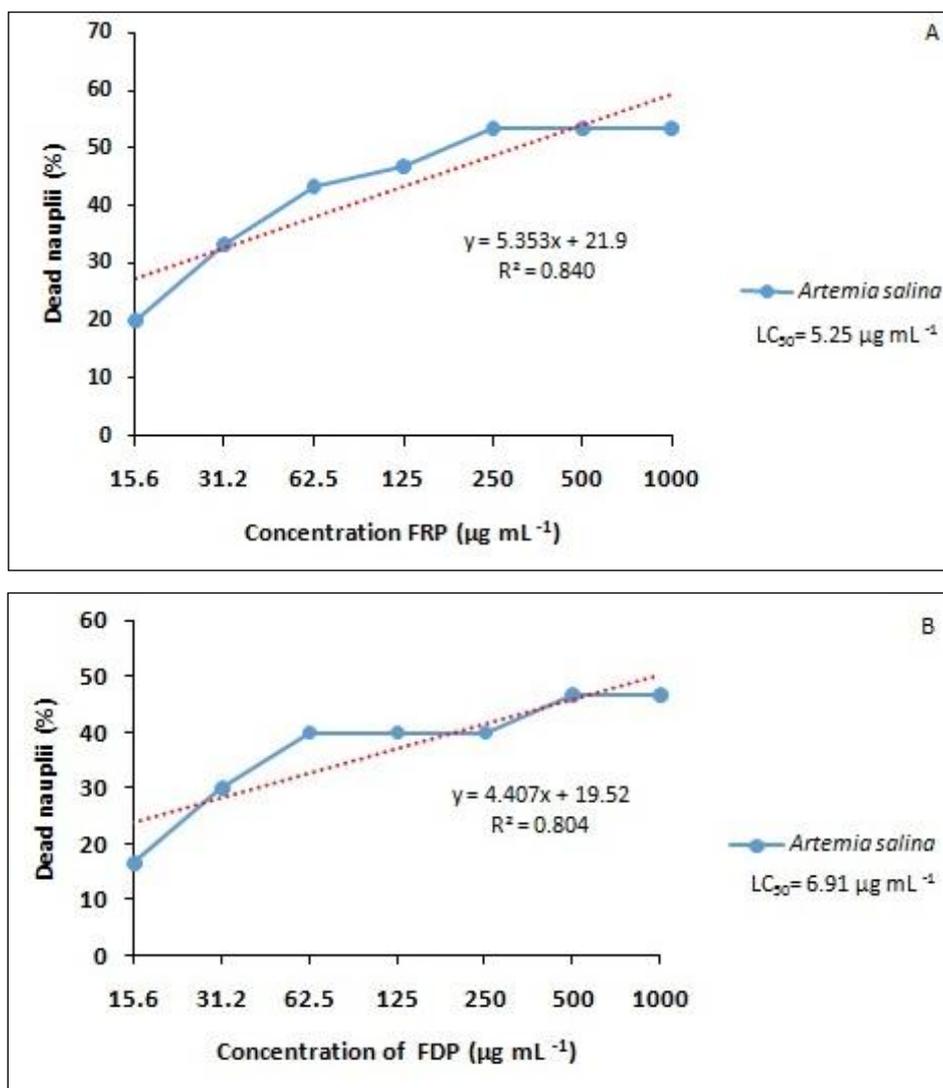


B

The essential oils of *H. dilatata* showed high inhibition of acetylcholinesterase enzyme in the rainy (93.4 %) and dry (92.4 %) periods when compared with the standard drug used eserine (91.72 %) and galatamine (94.36 %) inhibitions. Extracts above 50 % enzyme inhibition are indicated for isolation as potentially inhibitory substances of the enzyme; extracts ranging from 30-50 % are considered moderate inhibitors and below 30 % are weak inhibitors (Trevisan and Macedo, 2003; Vinutha, 2007). Inhibition of the acetylcholinesterase enzyme has demonstrated efficiency in the clinical treatment of Alzheimer's disease, which is associated with deficits of various brain neurotransmitters, such as acetylcholine, noradrenaline and serotonin. Symptomatic treatment of the disease primarily involves restoration of cholinergic function. It is suggested, therefore, that an increase in the level of acetylcholine could be useful to improve patients health (Trevisan and Macedo, 2003; Vinutha, 2007). Monoterpenes and sesquiterpenes, such as elemol, linalool and α -pinene have been reported to inhibit acetylcholinesterase enzyme (Miyazama et al., 1998; Perry et al., 2000). In the study by Miyazama and Yamafugi (2005), some bicyclic monoterpenes such as α -pinene and 3-carene showed inhibitory effect on acetylcholinesterase. The results obtained for essential oil of *H. dilatata* flowers, in the present work, show that this oil is a potent acetylcholinesterase inhibition.

In the toxicity assay on *A. salina*, the samples were tested at concentrations of 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2 and 15.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Survivors larval were counted after 24 hours. The found for mortality percentages FRP ($\text{LC}_{50}=5.25$) and FDP ($\text{LC}_{50}=6.91$) are shown in, Figure II-3.

Figure II-3 – Curve of essential oil activity of *Hyptis dilatata* essential oil against *Artemia salina*. A - Essential oil obtained in rainy period; B -Essential oil obtained in dry period



According to the percentage of dead nauplii, in the lethality assay against *A. salina*, samples can be considered toxic when $LC_{50} < 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Amarante, 2010). In this assay, the control with DMSO (solvent) did not influence the results, because no larvae died in the presence of this solvent, in the same way as the control performed with salt water.

In the antimicrobial activity assay, essential oil of the *H. dilatata* flowers collected in both rainy and dry periods, were active against the pathogenic microorganisms. The controls used in the yeast test, showed LC_{50} of $7.73 \mu\text{g mL}^{-1}$ and the miconazole with $LC_{50} < 1.95 \mu\text{g mL}^{-1}$. The essential oil of the flowers collected in the dry period showed, greater effectiveness in relation to the inhibition of this microorganism by the essential oil harvested in the dry period, in the concentrations of 250 and $125 \mu\text{g mL}^{-1}$, with respective inhibitions of 51.9 % and 59.7 % as shown in Tables II-2 and II-3.

It was observed that inhibited more than greater 50% at concentrations of 250 and 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ both essential oils of all bacteria (Table II-2). These results are very important and suggest future studies *in vivo*, which will contribute to a better knowledge of the potential of this species for producing bioproducts of medicinal interest.

Table II-2 and II-3 presents the percentage of bacterial and yeast inhibition by essential oils of *H. dilatata* harvested in the rainy and dry period.

Table II-2 – Antimicrobial activity of the flower essential oil of *H. dilatata* harvested in the rainy period

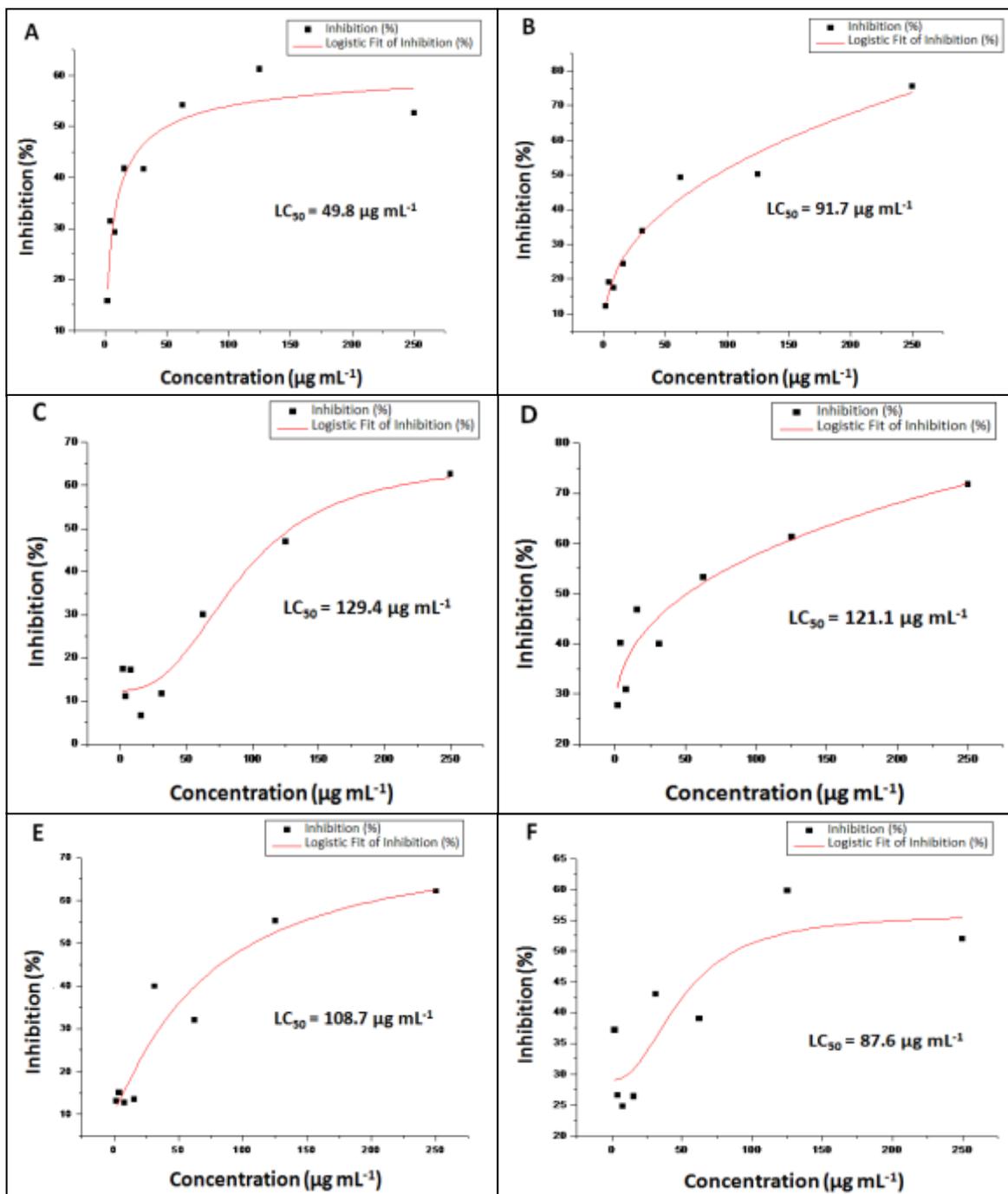
Microorganisms	% inhibition of growth ($\mu\text{g mL}^{-1}$)							
	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95
<i>C. albicans</i>	43.3	45.7	41.3	20.5	10.1	17.7	6.1	23.4
<i>B. cereus</i>	75.4	50.2	49.3	33.8	24.2	17.4	18.9	12.1
<i>S. aureus</i>	52.6	61.2	54.1	41.6	41.7	29.2	31.4	15.8
<i>S. typhimurium</i>	75.0	61.2	70.1	76.6	76.5	76.3	84.1	74.1
<i>C. freundii</i>	62.6	47.0	30.0	11.6	6.4	17.1	11.0	17.4

Table II-3 – Antimicrobial activity of the flower essential oil of *H. dilatata* harvested in the dry period

Microorganisms	% inhibition of growth ($\mu\text{g mL}^{-1}$)							
	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95
<i>C. albicans</i>	51.9	59.7	38.9	42.9	26.4	24.7	26.5	37.1
<i>B. cereus</i>	62.1	55.2	31.9	39.9	13.4	12.7	15.0	13.0
<i>S. aureus</i>	71.8	61.3	53.1	39.9	46.7	30.9	40.2	27.6
<i>S. typhimurium</i>	75.9	61.2	62.0	70.6	78.7	80.6	81.3	66.5
<i>C. freundii</i>	88.2	56.5	37.7	23.3	45.8	39.4	35.3	27.5

The LC_{50} values of the essential oils were calculated using software origin 8.0 (Figure II-4). The control used in the bacterial assays was ampicillin that showed a LC_{50} value $< 1.95 \mu\text{g mL}^{-1}$. Although the inhibition of *S. aureus* bacterium was higher when the oil was collected during the dry period, the values of 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, the of LC_{50} were better for the essential oil collected in the rainy period with $\text{LC}_{50} = 49.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ while, when harvested in the dry period furnished a $\text{LC}_{50} = 121.1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Figure II-4 – Curve of LC₅₀ for essential oil of *H. dilatata*: Rainy Period: A - *Staphylococcus aureus*; B - *Bacillus cereus*; C - *Citrobacter freundii*. Dry period: D - *Staphylococcus aureus*; E - *Bacillus cereus*; F - *Candida albicans*



According to Alvarez et al. (2015), a *H. dilatata* species, collected in San Jose Del Graviane (Colombia), presented monoterpene hydrocarbons represented by 2- β -pinene (12.29 %), camphor (5.67 %) and 1- β -pinene (4.21 %) and between sesquiterpenoids, aromadendrene (6.48 %) the main components. However, working with complex extracts, it is not possible to attribute the antimicrobial effects to a single

component, since the major components can make a significant contribution to the biological activity. In this research, some of the chemical constituents of essential oil of *H. dilatata* collected in Tepequem saw, Amajari, Roraima, Brazil, in the dry and rainy periods were the same than those detected by Alvarez et al. (2015), but with different concentrations, such as β -pinene (2.6 %, 1.5 %), camphor (2.0 %, 2.4 %) and aromadendrene (1.2 %, 1.9 %). On the other side, there are some differences in the percentages of some major constituents such as α -pinene, 3-carene, fenchone and β -caryophyllene.

4 CONCLUSION

There were observed differences on the components of the essential oil of *H. dilatata* flowers, harvested in rainy and dry periods, as well as in the biological activities towards acetylcholinesterase enzyme, bacteria and yeast inhibitions in addition, the bioassays results showed that the species under study has potential to be used in the development of alternative medicine for treatment of neurodegenerative diseases and against pathogenic microorganisms.

Conflicts of interest

The authors have not declared any conflict of interests.

5 REFERENCES

- Alvarez F, Tello E, Bauer K, Diaz LE, Rodriguez J, Jimenz C (2015). Cytotoxic and antimicrobial diterpenes isolated from *Hyptis dilatata*. *Current bioactive compounds*. 11(3): 189-197.
- Amarante, CB (2010). Phytochemical study biomonitoring by toxicity tests front of *Artemia salina* and antiplasmodial activity aninga stem (*Montrichardia linifera*). *Acta Amaz.* 41(3):431 – 434.
- Barros L, Heleno SA, Carvalho AM, Ferreira I (2010). Lamiaceae often used in portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: vitamins and phenolics. *LWT-Food Sci. Technol.* 43: 544-550.
- Botrel PP, Pinto JEBP, Figueiredo FC, Bertolucci SKV, Ferri PH (2009). Essential oil content and chemical composition in *Hyptis marruboides* Epl. of different genotypes. **Federal University of Lavras, Department of Agriculture, Lavras-MG. Rev. Bras.Plant.Med.** 11(2).
- Botrel PP, Pinto JEBP, Araujo ACC, Bertolucci SKV, Figueiredo FC, Ferri PH, Costa DP (2010). Variations in the content and volatile composition of *Hyptis marruboides* EPL. Cultivated in the field and in greenhouse. *New Chem.* 33(1): 33-37.
- Brant RS, Pinto JEBP, Bertolucci SKV, Albuquerque CJB (2008). Water content of the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hér.) Britton as a function of the seasonal variation. Federal University of Lavras, Department of Agriculture, Lavras-MG. *Rev. Bras.Plant. Med.* 10(2):83-88.
- Castro DP (2006). No preference of *Spodoptera frugiperda* (*Lepidoptera Noctuidae*) for essential oils of *Achillea mille folium* L. and *Thymus vulgaris* L. *Braz. J. Med. Plants.Botucatu.* 8(4):27-32.
- Ellman GL (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Bioch. Pharm.* 7:88-95.
- Fernandez-Alonso JL, Rivera-Diaz O (2002). The lipped. Red book of flowering plants of Colombia. Bromeliads, lipids and laspasi floras. The lipped. Alexander von Humboldt Biological Resources Research Institute. Inst. Nat. Sci-University of Colombia-Bogotá. 3:385-679.
- Hussain AI, Anwar F, Nigam OS, Sarker SD, Moore JE, Rao, JR, Mazumdar A (2011). Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. *LWT-Food Sci Technol.* 44:1199-1206.
- Lang G, Buchbauer G (2012). A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour Fragr J* 27: 13 - 39.
- Lima KSB (2010). Contribution to the chemical knowledge of *Hyptis carvalhoi* Harley. Federal University of Ceará, Graduate Program in Chemistry. Fortaleza - CE Brazil.

Martins FT, Santos MH, Polo M, Barbosa LCA (2006). Chemical variation of the essential oil of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit, under cultivation conditions. *New Chem.* 29: 1203-1209.

Melo JLM (2013). Bioprospecting of the Antimicrobial and Anticholinesterase Activity of essential oils of species occurring in western Amazonia: Title of the project: Botanical, Chemical and Biological Evaluation of Plants. Bachelor's Degree in Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Institute of Biological Sciences-PA. Summaries of the XXIV Scientific Initiation Seminar of UFPA: ISSN 2176-1213.

Miyazama M, Watanabe H, Umemoto K, Kameoka H (1998). Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oils of *Mentha* species. *J. of Agric. and Food Chem.* 46 (9): 3431-3434.

Miyazawa M, Yamafuji C (2005). Inhibition of acetylcholinesterase Activity by Bicyclic Monoterpenoids. *J. of Agric. and Food Chem.* 53: 1765-1768.

Niero R, Malheiros A (2009). Main chemical and biological aspects of terpenes: Chemistry of natural products, new drugs and modern pharmacognosy. *Itaj. Univ.* 2: 259-278.

Passos CS, Arbo MD, Rates SMK, Poser LV (2009). Terpenóides with activity in the Central Nervous System (SNC). *Braz. J. Pharm.* 19 (1A): 140-149.

Perry NSL, Houghton J, Theobald A, Jenner P, Perry EK, 2000. In-vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia Lavandula efolia* essential oil and constituents terpenes. *J. of Pharm. and Pharmacol.* 52 (7): 895-902.

Rhee IK, Van der Meen M, Ingkaninan K, Verpoorte R (2001). Screening for acetylcholinesterase inhibitors from *Amararyllidaceae* using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J. of Chromat. A.* 915: 217-223

Santos PO, Costa MJC, Alves JAB, Nascimento PFC, Melo DLFM, Barbosa-Junior AM, Trindade RC, Blanki AF, Arrigoni-Blank MF, Alves PB, Nascimento, MPF (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. *New Chem.* 31(7): 1648-1652.

Tafurt-García G, Muñoz-Acevedo A, CALVO AM, Jiménez LF, Delgado WA (2014). Volatile componentes of *Eriope crassipes*, *Hyptis conferta*, *H. dilatata*, *H. brachiata*, *H. suaveolens* y *H. mutabilis* (Lamiaceae): Volatil e compounds of analysis of *Eriope crassipes*, *Hyptis conferta*, *H. dilatata*, *H. brachiata*, *H. suaveolens*, *H. mutabilis* (Lamiaceae). *Latin American and Caribbean Bulletin of Med. and Aromatic Plants* 13 (3): 254 – 269.

Trevisan MTS, Macedo FVV (2003). Selection of Plants with Anti-Acetylcholinesterase Activity for Treatment of Alzheimer's Disease. *New Chem. Fortaleza-Brazil.* 26(3):301-304.

Urones JG, Marcos IS, Diez D Cubilla LR (1998). Tricyclic diterpenes from *Hyptis dilatata*. *Phytochem.* 48 (6): 1035-1038.

Zacchino AS, Gupta MP (2007). *Manual of in vitro techniques for the detection of antifungal compounds*. Corpus Editorial and Distributor: Rosario. 85.

Zgórka G, Glowniak K (2001). Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *J Pharm. Biom.* 26: 79-87.

Valant-Vetschera KM, Roitman JN, Wollenweber E (2003). Chemo diversity of exudate flavonoids in some members of the Lamiaceae. *Biochem. Syst. Ecol.* 31: 1279-1289.

Vinutha B (2007). Screening of Selected Indian Medicinal Plants for Acetylcholinesterase Inhibitory Activity. *J. Ethnopharm.* 109(2): 359-363.

CAPÍTULO III – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE *Hyptis dilatata* BENTH, TOXICIDADE PARA *Artemia salina* E O PONTENCIAL INIBITÓRIO NAS ATIVIDADES MICROBIANAS, E COM A ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

1 INTRODUÇÃO

A pesquisa etnofarmacológica, vertente relativamente nova no estudo de plantas medicinais, vem sendo reconhecida como um dos melhores caminhos para a descoberta de novas drogas, orientando no direcionamento de uma determinada ação terapêutica (ALMEIDA, 2011).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 25% dos medicamentos hoje utilizados são derivados direta ou indiretamente do legado sobre o uso de plantas medicinais, sendo esta porcentagem ainda maior atingindo 60 % se consideradas classes específicas de medicamentos como antimicrobianos e antitumorais. Parte das propriedades farmacêuticas descritas para plantas medicinais são creditadas aos óleos essenciais, que podem ser extraídos de frutas, flores, cascas, ou de plantas inteiras, como especiarias e ervas medicinais (PROBST, 2012).

Estima-se que existam 3000 óleos essenciais e destes 300 são de extrema utilidade para as indústrias farmacêuticas, para agricultura e para a utilização como remédios naturais. Segundo Bakkali et al. (2008), os óleos essenciais são bastante utilizados em virtude de suas propriedades, tais como: atividades antifúngicas, antibacteriana e inseticida. Além destas, possuem ainda substâncias anticolinesterásica de suma importância no controle da doença Alzheimer, doença neurodegenerativa que atinge principalmente pessoas idosas (SOUZA et al., 2012).

A estrutura química destes óleos abrange compostos aromáticos que abrangem os aldeídos, álcool como cinâmico, fenóis, derivados de metoxi e dióxido metileno. Estes compostos possuem como fontes principais as plantas das famílias: Lamiaceae, Myrtaceae e Rutaceae (BAKKALI et al., 2008). A família Lamiaceae possui várias espécies nas quais foram estudadas as propriedades antimicrobianas, antimicótica, antiinflamatória e citotóxica de grande interesse para a sociedade, tais como: *Hyptis pectinata*, *Hyptis suaveolens*, *Hyptis crenata* e outras (PEREIRA, 2014). Muitas espécies da família Lamiaceae, em especial as do gênero *Hyptis*, apresentam grande variabilidade de metabólitos secundários, com destaque para os óleos essenciais, que têm grande valor junto a diversas comunidades devido as suas propriedades terapêuticas (OLIVEIRA,

2011).

A espécie estudada neste trabalho foi *Hyptis dilatata* Benth da família Lamiaceae que anteriormente foi analisada em alguns países, como Colômbia e Panamá, demonstrando possuir importância química com potencial para fins inseticidas e farmacológicos. No Brasil, alguns estudos realizados com esta espécie observaram que sua constituição química pode se diferenciar dependendo da região onde se encontra, sofrendo influência de fatores ambientais principalmente clima e temperatura (OLIVEIRA, 2011).

Os óleos essenciais produzidos variam em quantidade durante o ano e em certas plantas a composição dos óleos essenciais variam também durante o dia, onde, por exemplo, o seu teor é maior nas primeiras horas da manhã e da noite, devido à exposição do sol que facilita a perda do óleo na planta (SIMÕES et al., 2004; CUNHA et al., 2012).

Desta forma, objetivou-se realizar a caracterização química do óleo da folha de *H. dilatata* e o teste de citotoxicidade utilizando o micro crustáceo *Artemia salina*. Posteriormente, testes biológicos foram realizados com o objetivo de avaliar o potencial de inibição destes óleos essenciais, frente à atividade com a enzima acetilcolinesterase e a atividade antimicrobiana e fungicida das espécies coletadas em diferentes períodos sazonais em uma região de cerrado, área serrana, Serra do Tepequém no estado de Roraima. Foram avaliadas também as atividades biológicas para verificar a eficácia dos extratos etanólicos e hexânicos das folhas e flores.

1.1 Óleos essenciais

Óleos essenciais são substâncias voláteis lipossolúveis e raramente coloridos, possuem um aroma forte e muito concentrado. A forma de extração, geralmente realizada é através da destilação a vapor d'água de determinadas partes da planta (BAKKALI et al., 2008).

Alguns estudos afirmam que fatores como clima (fotoperíodo, temperatura, umidade, precipitação e intensidade de radiação solar), solo em que a planta se desenvolve, idade da planta e as partes que constituem a morfologia corpórea da mesma, influenciam na quantidade e qualidade do óleo essencial (PAULUS et al., 2013).

Conhecidos por suas propriedades anti-sépticas (bactericida, antiviral e fungicida) e também por sua fragrância geralmente agradável, os óleos essenciais eram usados no embalsamento, conservação dos alimentos e como antimicrobianos,

analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, e anestésicos locais. Até agora são utilizados para os mesmos fins, porém agora são conhecidos alguns dos seus mecanismos de ação, particularmente em nível de atividade antimicrobiana (PEREIRA, 2010).

Conforme Figueiredo et al. (2008), os óleos essenciais por serem naturais e biodegradáveis, geralmente possuem uma toxicidade baixa aos mamíferos, podendo atuar sobre várias moléculas alvo ao mesmo tempo, podendo assim ser substâncias ideais para estudo de novos fármacos, devido suas propriedades químicas.

Outro aspecto importante sobre o óleo essencial é ser biodegradável, ou seja, não há acúmulo no ambiente, com isso diminui o risco de desenvolvimento de estirpes patogênicas, permitindo desta forma ser utilizado na proteção de culturas agrícolas, contra doenças e pragas (FIGUEIREDO et al., 2007).

Há, pelo menos, 300 óleos essenciais de interesse comercial no mundo e, entre os 18 mais importantes, o Brasil lidera a produção de dois: laranja (*Citrus sinensis*) e lima destilada (*Citrus aurantifolia*). De acordo com dados da Contrade (United Nations Commodity Trade Statistics Data base), os maiores consumidores de óleos essenciais no mundo são os EUA (40 %) e a União Europeia (30 %), sendo a França o país líder em importações. O mercado mundial movimenta US\$ 15 bilhões/ano, apresentando crescimento aproximado de 11% por ano (SNA, 2017).

Bizzo et al. (2009) cita os principais óleos essenciais no mercado mundial tais como: Laranja (*Citrus sinensis* L.) Osbeck; Menta japonesa (*Mentha arvensis* L. f. *piperascens*); Eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill); Citronela (*Cymbopogon winterianus*); Hortelã-pimenta (*Mentha x piperita* L.); Limão (*Citrus limon* L.); Cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.); Cedro (*Juniperus virginiana* L.); Cânfora (*Cinnamomum camphora* L.); Coentro (*Coriandrum sativum* L.); Grapefruit (*Citrus paradisi* Macfady); Patchouli (*Pogostemon cablin*).

1.2 Constituintes químicos dos óleos essenciais

Em grande parte dos óleos essenciais, os terpenóides predominam sua constituição, mas também existem outros como fenilpropanóides. Ressalta-se que o óleo essencial extraído de uma espécie de planta pode conter variações na composição química de acordo com o solo, a época do ano e condições climáticas (SIMÕES et al., 2004; CUNHA et al., 2012).

1.2.1 Terpenos

Os terpenos são compostos formados por unidades de isopreno contendo 5 átomos de carbonos. Dentre eles, o mais abundante nos óleos essenciais, são os monoterpenos com duas unidades de isopreno e sesquiterpenos com 3 unidades de isopreno, contendo respectivamente, (C=10; C=15). O grupo dos diterpenos possui C=20 (CEBORSKA et al., 2015).

De acordo com Mendes (2012), os monoterpenos atuam na defesa contra predadores e doenças, em grande parte possuem um bom aroma e são os fundamentais para os óleos essenciais. Alguns monoterpenos apresentam atividade antifúngica contra *Candida albicans* como é o caso do acetato de linalila, citral e citronela (ZORE et al., 2011).

Nas plantas podem ainda ser encontrados os sesquiterpenos, como por exemplo, o cariofileno que é um sesquiterpenóide encontrado com frequência nos óleos essenciais, ocorrendo no ambiente na forma de misturas de isômero: isocariofileno, β -cariofileno e α -cariofileno (α -humuleno) (VALLILO et al., 2006).

Os sesquiterpenos são os maiores grupos de isoprenóides, sua principal atuação é no sistema de defesa, e juntamente com os monoterpenos são os mais frequentes em processos alelopáticos (MENDES, 2012). Alguns sesquiterpenos possuem efeito citotóxico a células cancerosas, como é o caso do óxido cariofileno, e segundo Domingues et al. (2010), outros sesquiterpenos possuem atividades antibacteriana e antifúngica, como é o caso do 8-hidróxi-calameneno que apresentou atividade antifúngica contra *Candida albicans*, e inibição antibacteriana em *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*.

1.3 Atividades biológicas

1.3.1 Atividade antimicrobiana e fungicida

As bactérias são microrganismos unicelulares procariotos, encontradas em todos os ecossistemas da terra, apresentam grande importância para saúde e para o ambiente. Possuem parede celular constituída de uma substância química chamada mureína (ácido n-acetilmurâmico) e são classificadas em gram-positivas ou gram-negativas (GUERRA, 2015).

As bactérias gram-positivas e negativas apresentam características diferenciadas devido aos diferentes graus de virulência (VIOLANTE, 2012). A Gram-positiva

apresenta maior fator de virulência, constituída por uma endotoxina que é o lipopolissacarídeo, que lhes confere significativa patogenicidade. Enquanto que as bactérias Gram-positivas são constituídas por uma exotoxina, composta pelo ácido lipoteicoico, com característica principal de aderir-se às membranas celulares, particularmente de linfócitos e macrófagos (SCHAECHTER et al., 2002; RIBEIRO-FURTINI; ABREU, 2006).

As bactérias gram negativas são mais resistentes aos antibióticos, sendo que estes medicamentos podem agir sobre a parede celular e membrana destes procaríotos, além de interferir em determinadas reações ou até mesmo na síntese de enzimas, podendo causar a destruição destes microrganismos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; DIFFEN, 2016).

Segundo Ribeiro (2000), mesmo com uma variedade de antibióticos produzidos pelas indústrias farmacêuticas e químicas, as bactérias têm criado resistência a muitos antibióticos, por isso a importância de estudos utilizando espécies vegetais para avaliar as atividades antimicrobianas.

Outro grupo que possui espécies com estrita relação com as plantas são os fungos. Trata-se de seres eucaríotes e heterótrofos, representados por bolor de pão, mofo e orelha de pau, entre outros. Segundo Luz (2011), os fungos possuem uma parede celular rígida que determina a forma e garante a integridade da célula fúngica, protegendo-a de choques osmóticos. É composta por várias camadas de quitina embebidas em uma matriz de polissacarídeos complexos, glicoproteínas, sais inorgânicos e pigmentos, que variam de acordo com a espécie.

Existem várias substâncias químicas com ação antifúngicas para diversas enfermidades, como é o caso do dilapiol utilizado em infecções de pele, sendo necessário que as drogas antifúngicas tenham aplicação clínica adequada com o mínimo de efeitos colaterais (SILVA, 2000; MULLER et al., 2013).

Pesquisas utilizando os óleos essenciais de espécies vegetais são de suma importância para obter a potencialidade dos princípios ativos objetivando sua aplicabilidade para diversas doenças causadas por fungos, ou ainda evitando - se assim os efeitos colaterais do uso de drogas, em doses elevadas de substâncias químicas. Segundo Ferreira (2013), estudos *in vitro* e *in vivo* constataram que os óleos essenciais com suas propriedades antifúngicas são potenciais no controle de microrganismos.

1.3.2 Inibição de Acetilcolinesterase (Alzheimer)

A inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) é muito importante em tratamentos de doenças neurodegenerativas, como é o caso da doença Alzheimer (DA). A doença de Alzheimer é uma enfermidade que se agrava com o tempo, ainda não existe um fármaco para curar essa doença, mas possui tratamento. É causada pela morte de células cerebrais, e tem como sintomas, a demência ou perda de funções cognitivas (memória, orientação, atenção e linguagem) (DAVIGLUS et al., 2011; DE FELICE, 2013).

De acordo com Mattson (2012), a doença de Alzheimer está associada com déficits dos diversos neurotransmissores cerebrais, como a acetilcolina, a noradrenalina e a serotonina. A partir da modernização de ensaios, de acordo com os avanços tecnológicos, permitiu a utilização de enzimas receptoras, DNA, entre outros alvos, como é o caso dos bioensaios rápidos e sensíveis. A utilização da enzima acetilcolinesterase é uma alternativa para detecção e seleção de amostras com ação anticolinesterase.

Segundo Queiroz et al. (2003), é necessário entender a ação dos inibidores e a importância em saber como o impulso é gerado na fenda sináptica. A transmissão do impulso nervoso requer a presença da acetilcolina na fenda sináptica ou entre a fibra nervosa e a célula efetora. Em seguida, a acetilcolina se liga a um receptor colinérgico, gerando, desta forma, um potencial pós-sináptico e a propagação do impulso nervoso.

A acetilcolina é imediatamente liberada e hidrolisada pela acetilcolinesterase liberando colina e acetato. O tratamento objetiva inibir a ação dessa enzima fazendo com que a acetilcolina permaneça mais tempo na fenda melhorando a transmissão do impulso (ALONSO et al., 2003; DE FELICE, 2013).

As pesquisas em produtos naturais apresentam bons resultados na inibição da enzima acetilcolinesterase. Mattson (2012) relata que testes *in vitro* apenas auxiliam na otimização da seleção e não eliminam de forma alguma os testes *in vivo*.

Devido aos altos preços de fármacos produzidos pelas indústrias químicas é necessária a busca por métodos alternativos para o tratamento da doença Alzheimer, sendo o uso de plantas medicinais específicas boas candidatas para este fim, proporcionando à população facilidade de acesso a medicamentos alternativos e eficientes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Avaliação da Composição Química: CG-MS E CG-FID

As análises químicas e quantitativas foram realizadas através de um espectrômetro de massas acoplado a um cromatógrafo gasoso (CG-MS) e (CG-FID). No laboratório de Cromatografia do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. Para estas análises foram utilizados os óleos essenciais das folhas de *H. dilatata* dos seguintes horários: manhã, tarde e noite; e nos períodos: chuvoso e seco.

2.2 Análise Química (CG-MS) - Cromatografia Gasosa Acoplada À Espectrometria de Massa

Estas análises dos óleos essenciais das folhas de *H.dilatata*, foram realizadas em um equipamento CGMS-QP2010 ULTRA (Shimadzu). Coluna: Rxi-1MS 30m x 0,25 mm x 0,25 µm (Restek). Temp coluna: 50 °C (3min), 3 °C /min, até 230°C. Injetor: 250 °C Split (1:10), Interface CGMS a 250 °C. Detector MS (Impacto eletrônico a 70eV) a 250 °C. Gás de arraste: Hélio a 2.0 mL/min. Vol. de injeção: 1µL. Amostras diluídas a 1 % em clorofórmio. Software de aquisição de dados: CGMS Solution (Shimadzu). Biblioteca espectral: NIST11. Arquivos *.qgd.

2.3 Análise química (CG-FID) - cromatografia gasosa de alta resolução

A composição dos constituintes químicos presentes nos óleos das folhas de *H. dilatata* foi determinada por cromatografia gasosa após a preparação dos ésteres metílicos. As análises foram realizadas em um Cromatógrafo a Gás HP7820A (Agilent). Coluna: HP530 m x 0,32 mm x 0,25 µm (Agilent). Temp.: Coluna: 50 °C (0min), 0 °C /min, até 230 °C. Injetor: 250 °C Split (1:30). Detector FID: 250 °C. Gás de arraste: H₂ a 3 mL/min. Vol. de injeção: 1 µL. Software de aquisição de dados: EZChrom Elite Compact (Agilent). Amostras diluídas a 1 % em cloroformio.

2.4 Atividade de inibição de acetilcolinesterase dos extratos de folhas e flores e do óleo essencial das folhas da *Hyptis dilatata* BENTH

2.4.1 Solução tampão Tris/HCL (50mM)

Para preparar uma solução de 2 mL de Tris/HCl, pesou-se 398,08 mg do sal Utrapure Tris Hydrochloride e adicionou-se 25 mL de água destilada. Conferiu-se o pH em 8.

2.4.2 Solução estoque da enzima

Foi diluído 0,77 mg da enzima no volume de 500 μ L da solução tampão Tris/HCl pH 8 no próprio frasco da enzima, para adquirir uma solução de concentração de 1000 U/mL. A enzima ficou em solução por 20 minutos e depois, sob agitação, por um período de 10 a 15 minutos, no próprio frasco da enzima, para adquirir uma solução de concentração de 1000 U/mL.

2.4.3 Solução da enzima na concentração 0,222 U/mL

Adicionou-se 1 μ L da solução estoque (1000U/mL) em 4,5 mL da solução Tris/HCl (50 mM). Depois se agregou albumina sérica bovina 0,1 % (p/v): 4,5 mg.

2.4.4 Solução trabalho

Preparou-se uma solução do óleo essencial em tampão Tris/HCl, DMSO, ou solvente adequado, na concentração 10 mg/mL.

2.4.5 Preparação dos reagentes

Para a Solução de ATCI (Cloreto de Acetilcolina) (15 mM): Preparou-se 1 mL de solução, pesou-se 4,08 mg de iodeto de acetilcolina e dissolveu-se em 1mL de água destilada. Para Solução de DTNB (5',5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico) (3mM): Pesou-se 2,38 mg de DTNB e dissolveu-se em 2mL de solução tampão Tris/HCl pH 8. Posteriormente, adicionou-se 11,69mg de NaCl (0,1M) e 8,132 mg de MgCl₂6H₂O à solução. Estas análises foram realizadas no laboratório da UFMG, com os extratos e óleos obtidos através das folhas e flores coletadas no período chuvoso e seco, a seguinte técnica foi utilizada:

A avaliação quantitativa da atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi realizada de acordo com a metodologia de Ellman (1961). Este bioensaio foi realizado em microplacas de 96 poços. Como controle positivo da atividade foi utilizado a eserina e galantamina (10 mg/mL) e como controle negativo foi realizado o ensaio sem a presença de inibidor.

Os testes foram realizados em triplicata e em cada poço foram dispensados 25 µL de iodeto de acetilcolina (15 mM); 125 µL de 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB); 50 µL de tampão tris-HCl pH8 0,1% p/v de albumina sérica bovina e 25 µL de extrato e do óleo essencial (10 mg/mL) solubilizados em Tween/DMSO/30%. A leitura das placas foi realizada em 405 nm por 9 vezes em um período de 10 minutos. Logo após a primeira leitura foi adicionado 25 µL da enzima acetilcolinesterase (*Electrophorus electricus*, Sigma Aldrich) (0,222 U/mL) e realizada 9 leituras em um período de 10 min em 405nm. A interferência da hidrólise espontânea do substrato foi corrigida a partir da subtração da média da absorbância medida antes da adição da enzima. A porcentagem de inibição da enzima foi calculada a partir da seguinte fórmula matemática:

$$\% \text{ inibição} = [(C-A) \times 100]/C$$

Onde:

C = controle contendo enzima e substrato

A = ensaio contendo o extrato, enzima e substrato

Os dados obtidos foram tratados utilizando-se o software Microsoft Origin 6.1.

2.5 Determinações da toxicidade dos extratos hexânicos e etanólicos e dos óleos essenciais das folhas de *H. dilatata* frente *Artemia salina*

Os testes de toxicidade sobre *A. salina* foram realizados por meio da metodologia adaptada do trabalho de Mayer et al. (1982). Foi adicionado em um aquário que se utilizou como incubadora, uma solução salina artificial (40g de sal grosso em 1L de água destilada), ajustando o pH entre 8 e 9 com uma solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃ a 10 %).

A incubadora foi dividida em dois ambientes, um iluminado artificialmente com uma lâmpada fluorescente com aeração, e o outro ambiente foi colocado aproximadamente 100 mg de ovos de *A. salina* e coberto com papel alumínio para que os

ovos ao eclodirem, os espécimes permanecessem isolados em um dos lados do aquário devido à diferença de iluminação durante o período de incubação de 48 horas.

Após a eclosão, 10 espécimes (náuplios de *A. salina*) foram selecionados e expostos aos diferentes extratos e óleo essencial dentro de tubos de ensaios com as seguintes concentrações: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,62 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

Os testes foram realizados em triplicata, para cada concentração, foi utilizada uma solução salina sem extrato e outro tubo com DMSO, como controle positivo.

Este sistema foi incubado em temperatura ambiente por 24 horas, sem aeração sendo os frascos mantidos sob iluminação. Após o período de 24 horas de incubação foram verificados, contados o número de larvas mortas e vivas em cada frasco, através da visualização macroscópica. Após 24 horas, realizou-se a contagem do número de náuplios vivos e mortos/imobilizados.

Os valores em porcentagem da probabilidade de mortalidade foram corrigidos levando-se em consideração a porcentagem de mortalidade no teste controle negativo de acordo com a Fórmula de Abbot (ABBOT, 1925).

Fórmula de Abbot

$$\% \text{ Probabilidade de Mortalidade} = \frac{100 \times (\%T - \%C)}{100\% - \%C}$$

Onde: % T representa a mortalidade de *Artemias* testadas com a amostra de interesse; % C, a mortalidade de *Artemias* utilizadas no controle.

2.5.1 Cálculo da CL₅₀

Para estimativa da CL₅₀ com intervalo de confiança 95 %, os dados foram analisados pelo método de Probit, utilizando o programa POLO PLUS® (LEORA, 2003).

2.6 Determinações da atividade antimicrobiana e fungicida do óleo das folhas e extratos das folhas e flores de *H. dilatata* Benth

Na verificação de atividade antimicrobiana dos extratos brutos das folhas e flores e dos óleos essenciais das folhas de *H. dilatata*, foram utilizados microrganismos patogênicos como bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 11778); gram-negativas *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311),

Citrobacter freundii (ATCC 8090); Levedura: *Candida albicans* (ATCC 18804); cujas concentrações foram: 250; 125; 62,5; 31,25; 15,6; 7,8; 3,9 e 1,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ZACCHINO; GUPTA, 2007).

2.6.1 Bioensaios-Bactérias e Leveduras

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios do Instituto de Ciências Exatas do Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. As amostras foram pesadas até 0,0125mg e dissolvidas em 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO) resultando em uma concentração de 12,5 mg/mL para obtenção do óleo essencial.

Em seguida adicionou-se 124 μL desta solução a um frasco de eppendorf, contendo 2976 μL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) (solução de trabalho) para bactéria e 2976 μL de Sabouraud para leveduras. Posteriormente preparou-se um pré-inóculo no qual as bactérias e a levedura, armazenadas sob refrigeração, foram transferidas com um anel de platina para tubos de ensaio contendo 3 mL de caldo de BHI.

Os tubos foram incubados a 37°C durante 24 h depois o pré-inóculo (500 μL) foi transferido para tubos contendo 50 mL de água destilada estéril. O inóculo foi padronizado no intervalo de transmitância de 74-75% para bactérias e 75-76% para levedura em espectrofotômetro de 600 nm. Posteriormente foram homogeneizados e a concentração ajustada para 0,5 de padrão de turbidez McFarland (10^8 UFC.mL^{-1}), obtendo-se assim os inóculos utilizados nos bioensaios.

Os testes foram realizados em placas de Elisa de 96 micropoços, em triplicata. Em cada poço adicionou-se 100 μL do meio de cultura BHI. No poço 1 foram inseridos também 100 μL da solução de trabalho. Homogeneizou-se a solução e 100 μL foram transferidos para o próximo poço e assim sucessivamente.

Foi desprezado 100 μL finais e testadas 8 concentrações para cada amostra, em seguida 100 μL do inóculo do micro-organismo testado, foram adicionados a cada poço. Utilizou-se dois controles, um para acompanhar o crescimento do micro-organismo, no qual não houve adição da solução de trabalho (para verificar a viabilidade celular) e o branco, em que não se adicionou o inóculo bacteriano (para se eliminar o efeito da coloração da solução de trabalho).

Uma placa controle, contendo 100 μL de meio de cultura BHI e 100 μL de água destilada estéril, foi adicionada ao experimento para controle da esterilidade do meio de

cultura BHI. Outro controle foi preparado, contendo os antibióticos padrões: Ampicilina (antibacteriano), Miconazol e Nistatina (antifúngicos) para observar a atividade desses antibióticos sobre os microorganismos.

As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C e, posteriormente, após 24 horas foi realizada a leitura das placas de Elisa (492 nm). Os resultados foram calculados como inibição percentual utilizando a fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = 100 - \frac{AC1 - AC2}{AH - AM} \times 100$$

AC1 = absorvância da amostra; AC2 = absorvância da amostra de controle; AH = absorvância no controle de microorganismo e AM = absorvância do controle do meio de cultura.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise química CG-MS e (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa) CG-FID (cromatografia de alta resolução)

Análises de GC-FID para quantificação e CG-MS para identificação dos componentes químicos do óleo essencial (OE) das folhas de *H. dilatata* mostraram 22 constituintes presentes nos óleos extraídos da folha, obtidas nos períodos seco e chuvoso em diferentes horários (manhã, tarde e noite). Os constituintes majoritários são mostrados conforme a (Tabela III-1).

Tabela III-1 – Porcentagens dos constituintes identificados em óleos essenciais da folha de *Hyptis dilatata*.

Picos	Componentes	*IK	*TR min	FMS (%)	FMC (%)	FTS (%)	FTC (%)	FNS (%)	FNC (%)
1	α -pineno	973	3,75	10,0	10,2	5,8	12,9	18,7	11,9
2	Canfeno	980	4,03	0,8	0,6	0,5	0,7	1,1	0,6
3	Sabineno	993	4,53	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1
4	β -pineno	996	4,65	2,0	2,5	1,5	2,9	2,9	3,1
5	Mirceno	1008	5,07	0,8	0,7	0,8	0,8	1,3	0,9
6	α -felandreno	1015	5,37	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2
7	3-careno	1019	5,52	16,2	15,1	13,6	18,6	26,5	19,9
8	α -terpineno	1024	5,70	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2
9	p-cimeno	1031	5,94	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,5
10	Limoneno	1033	6,04	3,5	2,6	2,8	2,9	4,9	3,2
11	g-terpineno	1058	6,96	0,5	0,4	0,5	0,4	0,7	0,5
12	Fenchona	1083	7,90	43,0	33,7	36,3	29,6	27,0	30,8
13	Mentenol	1110	8,95	0,6	0,6	0,4	0,8	0,5	0,7
14	Cânfora	1133	9,80	3,1	2,6	3,0	2,1	1,7	2,1
15	Fenchol	1170	11,20	0,7	1,1	1,4	1,0	0,7	1,2
16	terpinen-4-ol	1190	11,96	0,7	1,0	1,0	1,1	0,7	0,9
17	α -terpineol	1212	12,77	0,1	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0
18	β -cariofileno	1413	20,39	4,6	6,1	9,1	5,8	4,5	4,2
19	Aromadendreno	1432	21,10	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2
20	Humuleno	1447	21,66	0,4	0,6	0,7	0,6	0,4	0,4
21	D-germacrene	1491	23,31	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1
22	Óxido Cariofileno	1574	26,47	1,1	1,7	1,7	1,6	0,6	1,3
Total identificados				89,1	79	80,8	82,9	76,5	73
Monoterpenóides				34,5	32,8	26,4	40	40,1	31,1
Monoterp. Oxig.				48,2	39,1	42,3	34,6	30,6	35,7
Sesquiterpenóides				6,4	7,1	12,1	8,3	5,8	6,2

*FMS – Folha manhã seco; FMC- Folha manhã chuvoso; FTS - Folha tarde seco; FTC - Folha tarde chuvoso; FNS - Folha noite seco; FNC - Folha noite chuvoso. *IK= índice de Kovats; *IR=índice de retenção.

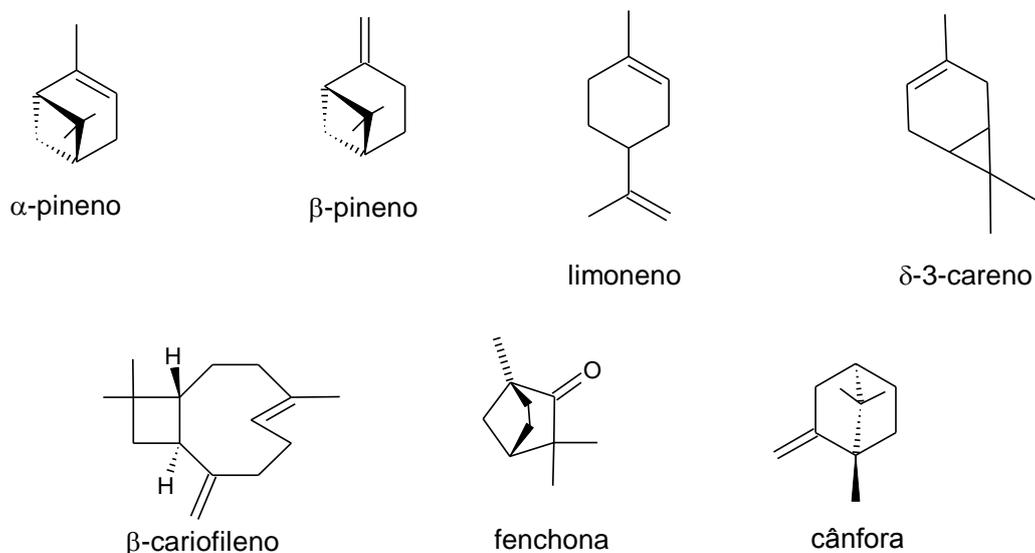
Dentre os constituintes encontrados na caracterização química dos óleos essenciais da folha de *H. dilatata*, destaca-se os majoritários: fenchona, 3-careno, α -pineno, β -cariofileno, Limoneno, β -pineno e cânfora. No período seco houve maior concentração dos constituintes químicos majoritários, sendo que somente o β -pineno foi da amostra coletada no período chuvoso.

Fenchona (1,3,3-trimetilbicyclo-[2,2,1]-heptan-2-ona) foi o constituinte químico com a maior concentração nos óleos das folhas. 43% obtido no óleo da folha coletada no horário da manhã durante o período seco e no período chuvoso, na coleta da manhã, a

segunda maior concentração com 33,7%. O segundo majoritário o 3-careno, 26,5% encontrado no óleo da folha coletada no período seco, no horário da manhã e no horário da noite da coleta do período chuvoso, a concentração de óleo foi 19,9%.

A Tabela III-1 indica as porcentagens de todos os constituintes majoritários da espécie em estudo e a porcentagem do total de monoterpenos e sesquiterpenos presentes nos óleos essenciais. Verifica-se que o maior número de monoterpenóide (40,1%), foi encontrado no óleo essencial da folha coletada no horário da noite no período seco, e os monoterpenóides oxigenados (48,2%), no período seco na parte da manhã. A porcentagem de sesquiterpenóides encontrados nos óleos da folha coletadas no período seco, horário da tarde (12,1%) e a menor no período seco, horário da noite. Na Figura III-1, estão presentes as estruturas químicas dos constituintes majoritários encontrados, nas folhas de *H. dilatata*.

Figura III-1 – Componentes químicos dos constituintes majoritários dos óleos essenciais da folha de *Hyptis dilatata*.



Observam-se nos cromatogramas (Figura III-2 a III-7), os diferentes picos das substâncias dos óleos essenciais da folha de cada período e horário. Concentrações menores e maiores dos constituintes dos óleos essenciais foram observadas, devido os horários e épocas diferentes em que a folha desta espécie foi coletada.

Figura III-2 – Perfil cromatográfico do óleo essencial da folha *Hyptis dilatata* coletada no período seco, horário da manhã. 1- α -pineno, 2-Canfeno, 3-Sabineno, 4- β -pineno, 5-Mirceno, 6- α -felandreno, 7- 3-careno, 8- α -terpineno, 9- p-cimeno, 10- Limoneno, 11- g-terpineno, 12- Fenchona, 13- Mentenol, 14- Cânfora, 15- Fenchol, 16- terpinen-4-ol, 17- α -terpineol, 18- β -cariofileno, 19- Aromadendreno, 20- Humuleno, 21- D-germacrene, 22- Óxido Cariofileno.

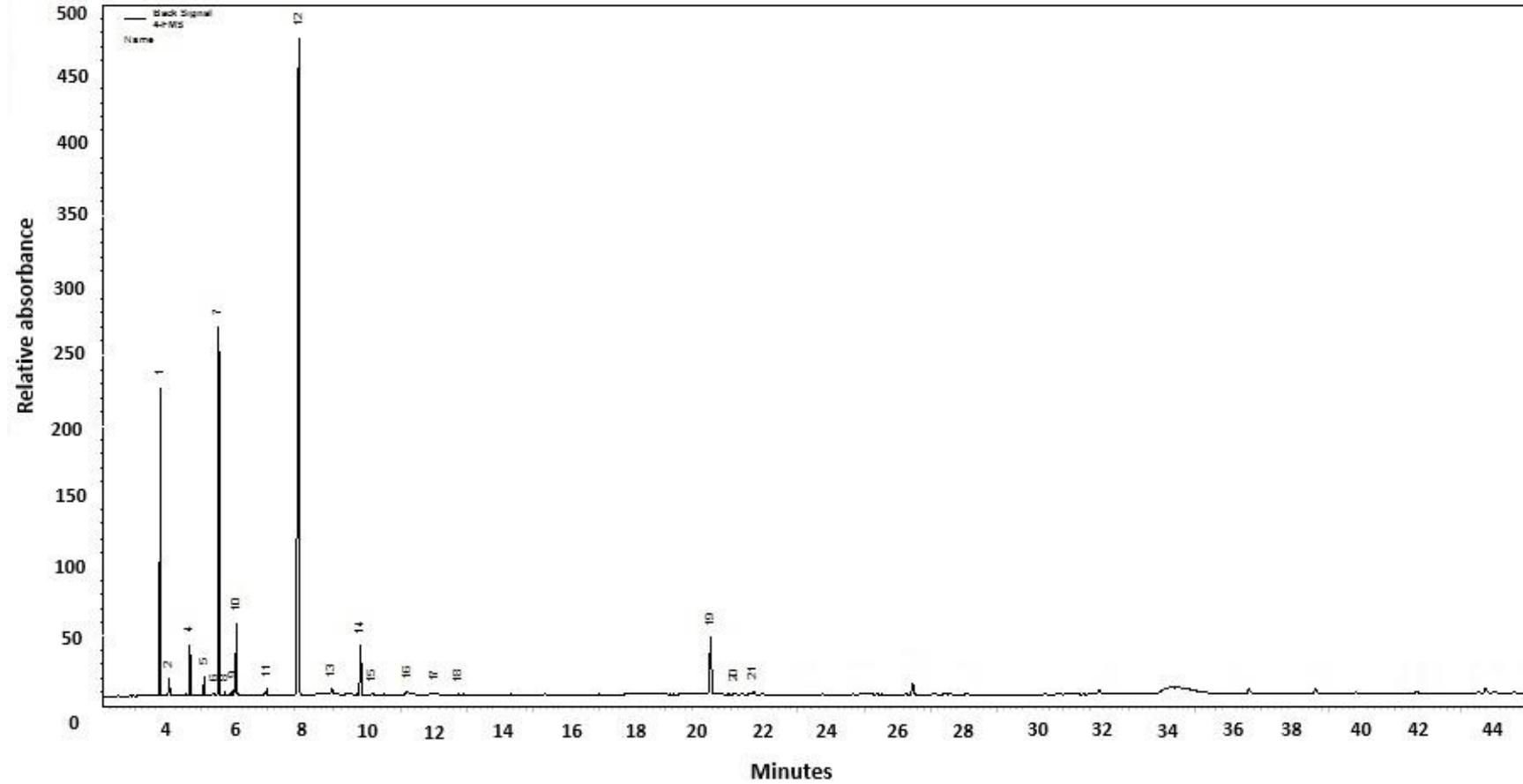


Figura III-3 – Perfil cromatográfico do óleo essencial da folha *Hyptis dilatata* coletada no período seco, horário datarde. 1- α -pineno, 2-Canfeno, 3-Sabineno, 4- β -pineno, 5-Mirceno, 6- α -felandreno, 7- 3-careno, 8- α -terpineno, 9- p-cimeno, 10- Limoneno, 11- g-terpineno, 12- Fenchona, 13-Mentenol, 14- Cânfora, 15- Fenchol, 16- terpinen-4-ol, 17- α -terpineol, 18- β -cariofileno, 19- Aromadendreno, 20- Humuleno, 21- D-germacrene, 22- Óxido Cariofileno.

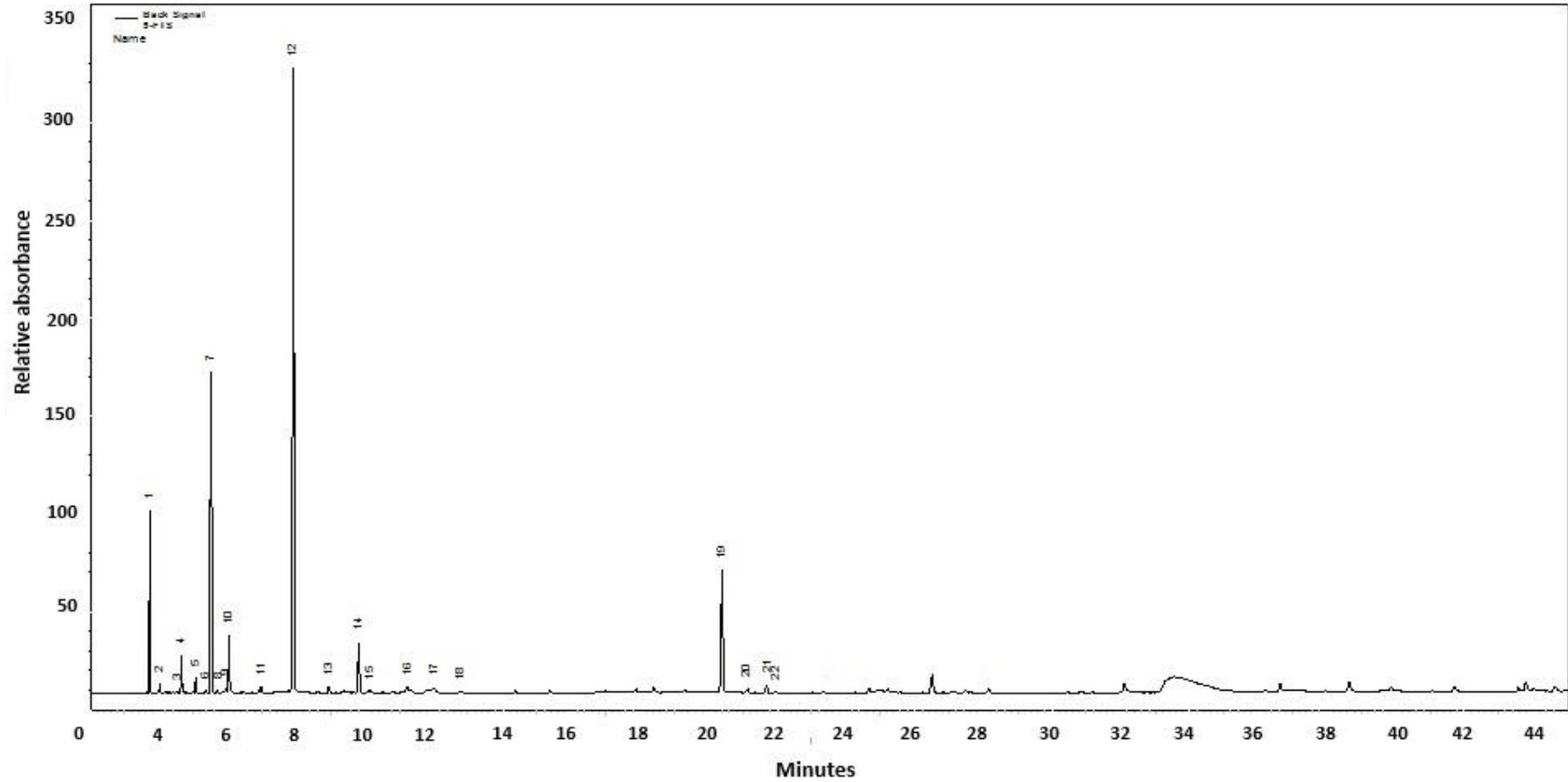


Figura III-4 – Perfil cromatográfico do óleo essencial da folha *Hyptis dilatata* coletada no período seco, horário da noite. 1- α -pineno, 2- Canfeno, 3- Sabineno, 4- β -pineno, 5- Mirceno, 6- α -felandreno, 7- 3-careno, 8- α -terpineno, 9- p-cimeno, 10- Limoneno, 11- g-terpineno, 12- Fenchona, 13- Mentenol, 14- Cânfora, 15- Fenchol, 16- terpinen-4-ol, 17- α -terpineol, 18- β -cariofileno, 19- Aromadendreno, 20- Humuleno, 21- D-germacrene, 22- Óxido Cariofileno.

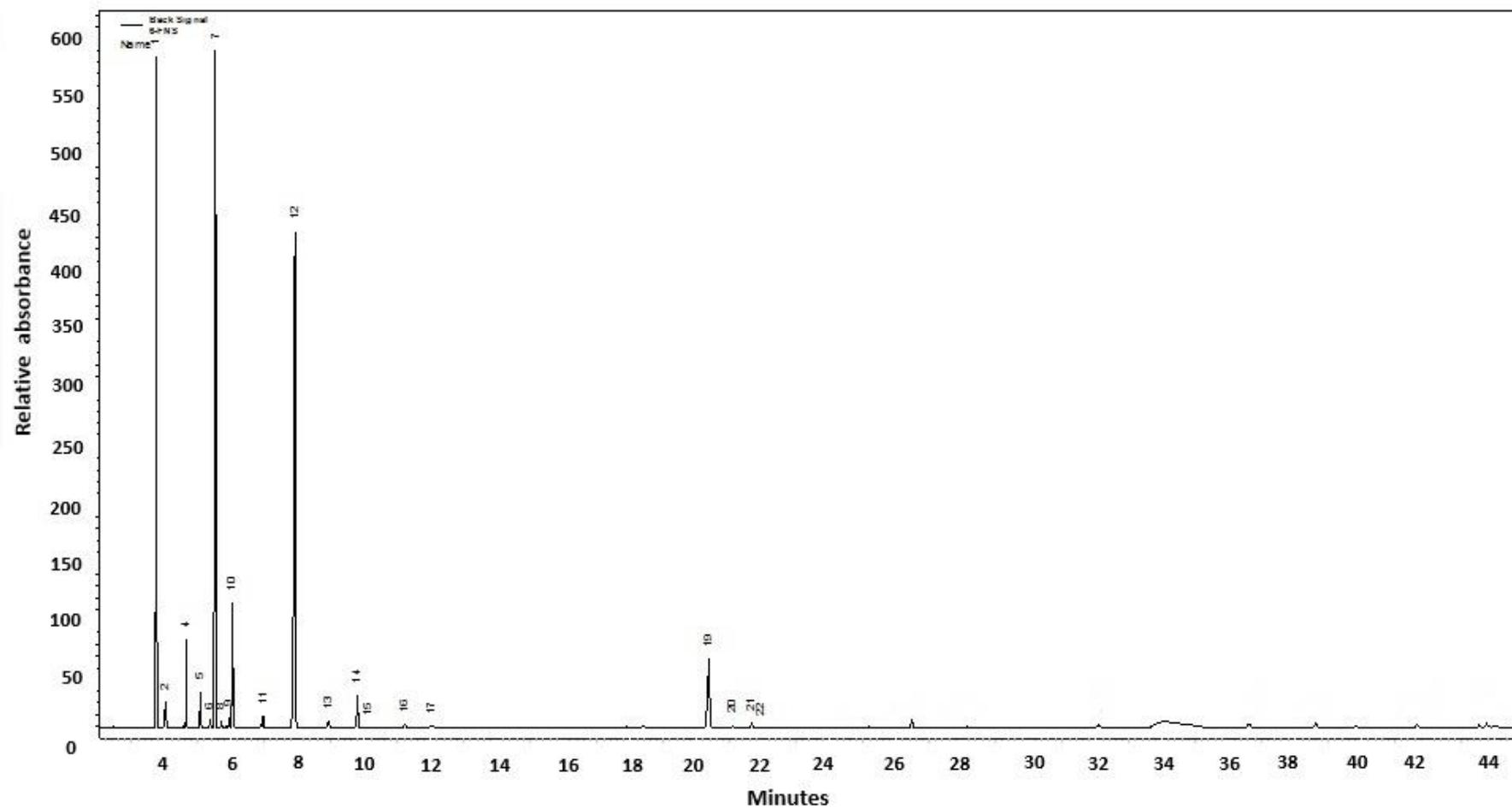


Figura III-5 – Perfil cromatográfico do óleo essencial da folha *Hyptis dilatata* coletada no período chuvoso, horário da manhã. 1- α -pineno, 2- Canfeno, 3- Sabineno, 4- β -pineno, 5- Mirceno, 6- α -felandreno, 7- 3-careno, 8- α -terpineno, 9- p-cimeno, 10- Limoneno, 11- g-terpineno, 12-Fenchona, 13- Mentenol, 14- Cânfora, 15- Fenchol, 16- terpinen-4-ol, 17- α -terpineol, 18- β -cariofileno, 19- Aromadendreno, 20- Humuleno, 21- D-germacrene, 22- Óxido Cariofileno.

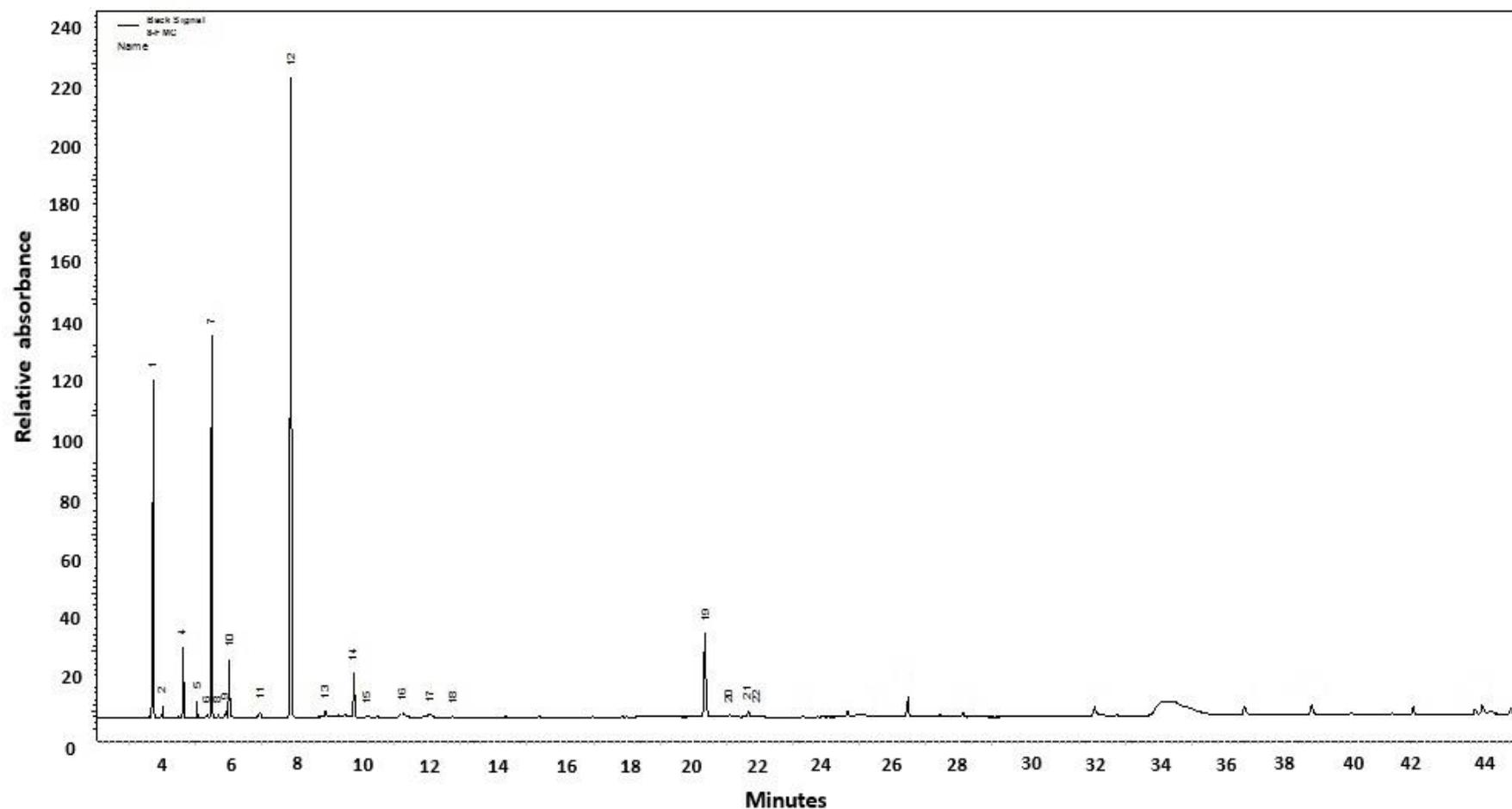


Figura III-6 – Perfil cromatográfico do óleo essencial da folha *Hyptis dilatata* coletada no período chuvoso, horário da tarde. 1- α -pineno, 2- Canfeno, 3- Sabineno, 4- β -pineno, 5- Mirceno, 6- α -felandreno, 7- 3-careno, 8- α -terpineno, 9- p-cimeno, 10- Limoneno, 11- g-terpineno, 12- Fenchona, 13- Mentenol, 14- Cânfora, 15- Fenchol, 16- terpinen-4-ol, 17- α -terpineol, 18- β -cariofileno, 19- Aromadendreno, 20- Humuleno, 21- D-germacrene, 22- Óxido Cariofileno.

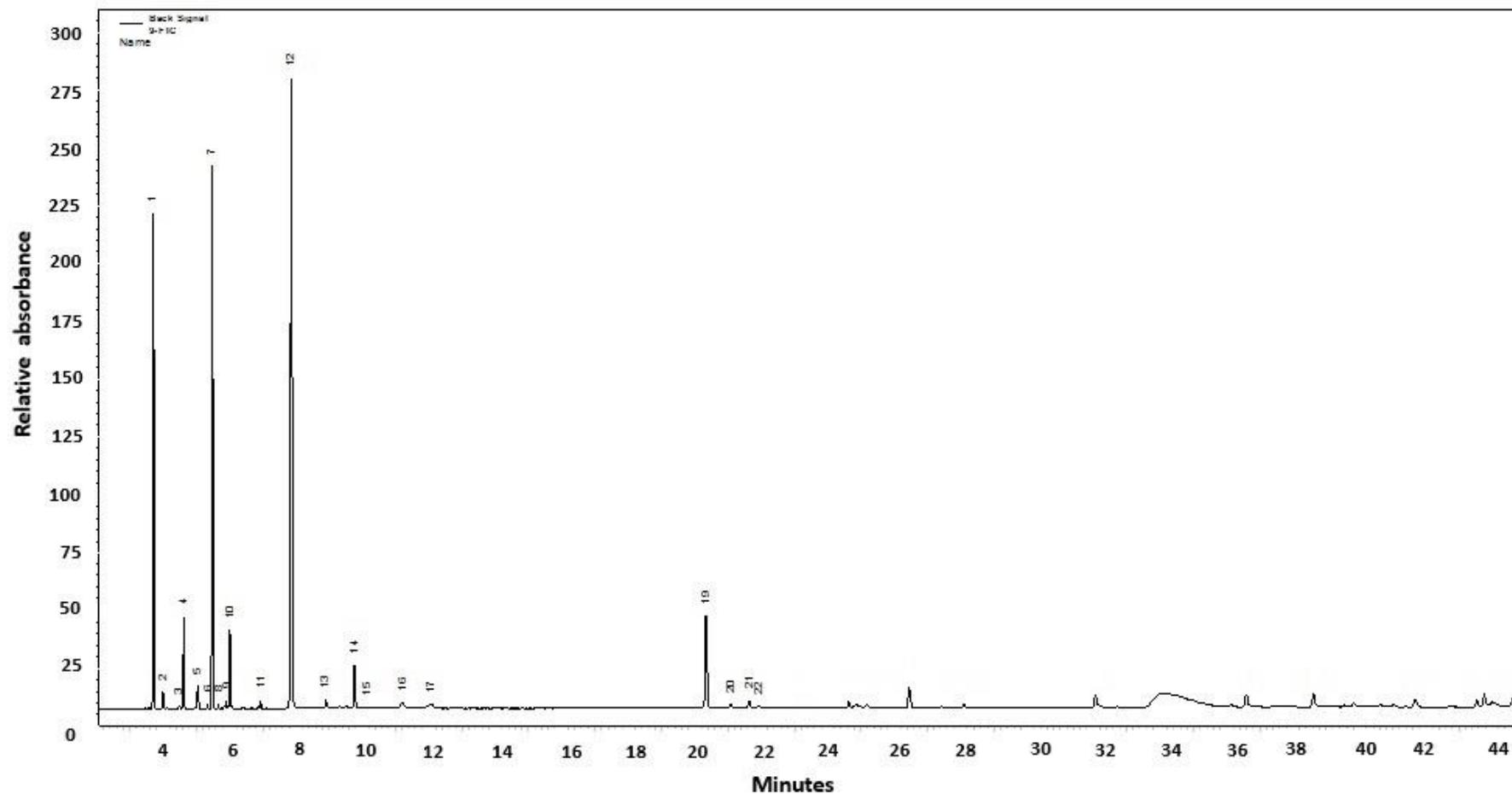
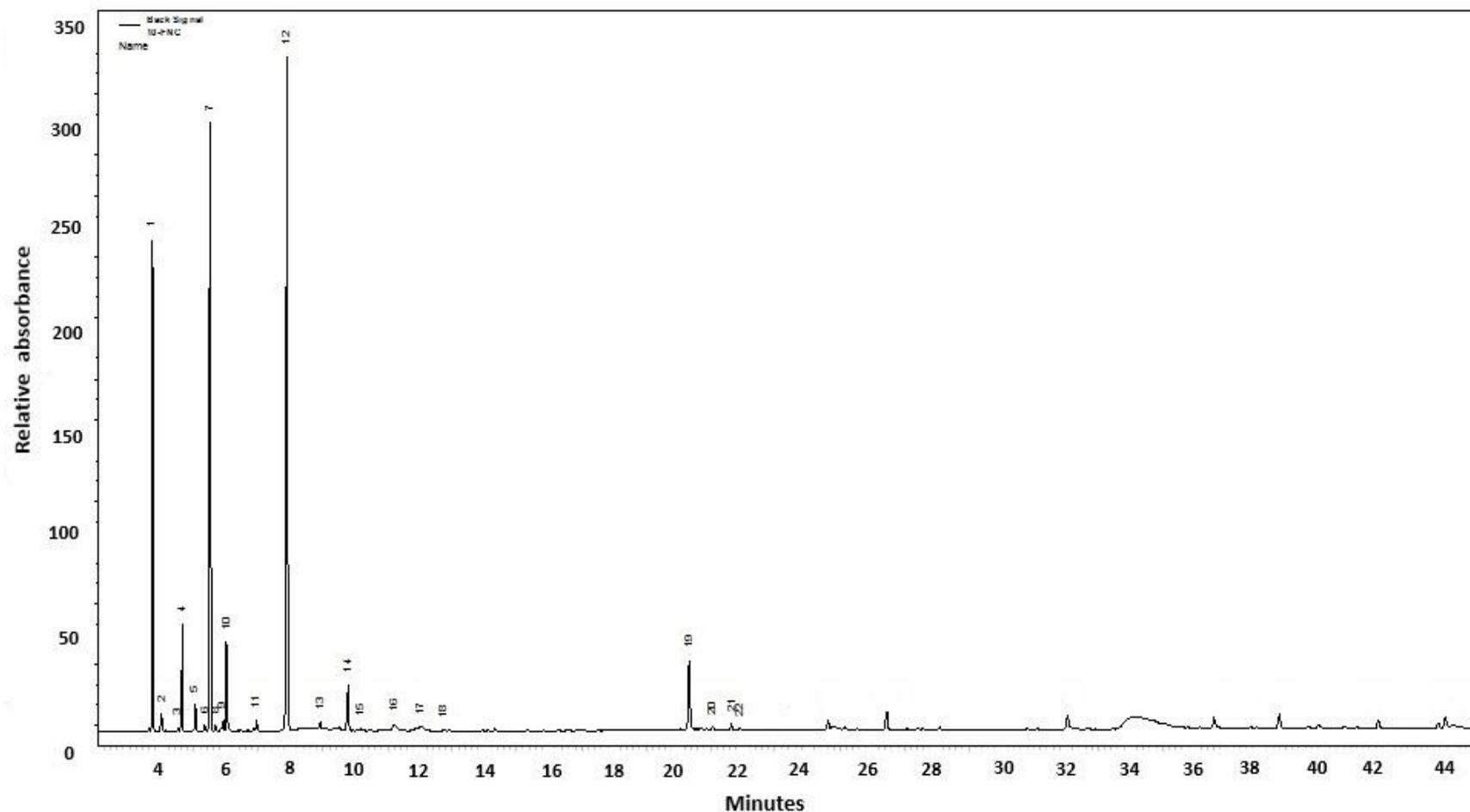


Figura III-7 – Perfil cromatográfico do óleo essencial da folha *Hyptis dilatata* coletada no período chuvoso, horário da noite. 1- α -pineno, 2- Canfeno, 3- Sabineno, 4- β -pineno, 5- Miraceno, 6- α -felandreno, 7- 3-careno, 8- α -terpineno, 9- p-cimeno, 10- Limoneno, 11- g-terpineno, 12- Fenchona, 13- Mentenol, 14- Cãfora, 15- Fenchol, 16- terpinen-4-ol, 17- α -terpineol, 18- β -cariofileno, 19- Aromadendreno, 20- Humuleno, 21- D-germacrene, 22- Óxido Cariofileno.



A constituição química dos óleos essenciais de *H.dilatata* foi majoritariamente de monoterpenos e sesquiterpenos. Conforme Rocha (2013), as condições ambientais podem causar variações significativas na composição do óleo, sendo os constituintes dos óleos essenciais determinados geneticamente, mas específicos para determinado órgão.

Comparando os constituintes do óleo essencial da folha de *H. dilatata* coletada na Serra do Tepequém no estado de Roraima com o óleo essencial da folha coletada em Arauca na Colômbia Tafurt-Garcia et al. (2014), observou-se que alguns constituintes possuem o mesmo valor de concentração, mas diferem quando se compara os diferentes horários da planta coletada em Roraima. Nas plantas coletadas em Arauca na Colômbia o 3-Careno (11 %), Limoneno (4,9 %), β -Pineno (0,7 %), α -Pineno (2,2 %), e a porcentagem da concentração do Fenchona foi (< 0,05) (TAFURT-GARCIA et al., 2014)

Enquanto os constituintes do óleo essencial da folha coletada em período sazonal na Serra do Tepequém em Roraima obtiveram as seguintes concentrações em relação aos mesmos constituintes dos óleos essenciais encontrado na folha coletada na Colômbia: 3- Careno no período seco no horário da noite (26,5 %), Limoneno no período seco a noite (4,9 %), β -Pineno a noite no período chuvoso (3,1 %), α -pineno no horário da noite e no período seco (18,7 %) e Fenchona no horário da manhã período seco (43 %).

Quando se compara os valores de concentração dos constituintes do óleo essencial da folha no período sazonal com os constituintes do óleo essencial extraído da folha na Colômbia, se observou que a espécie em estudo em Roraima obteve valores maiores. Verificou-se que a mesma espécie, dependendo do local em que se encontram, alguns fatores ambientais interferem na concentração e nos tipos de constituintes de uma mesma espécie.

Mendes (2012) relata que o ambiente, a umidade relativa e os tipos de cultivos da planta podem sofrer interferência na formação dos constituintes químicos dos óleos essenciais. Reis et al. (2010), reforça que a variação de princípios ativos nas espécies poderá ocorrer tanto em diferentes épocas do ano, ou ao longo de um dia, e podem apresentar épocas específicas que contenha uma maior quantidade de princípios ativos.

De acordo com Mendes (2012), as condições de cultivo diferenciadas de uma espécie, podem resultar de forma normal em variações de constituintes, dependendo do processamento e local de armazenamento das plantas.

Na composição química da espécie *H. marruboides*, pertencente ao mesmo gênero de *H. dilatata*, levando em consideração a sua constituição química no decorrer das estações do ano, demonstrou que não houve diferença qualitativa, havendo sim diferenças nas concentrações dos constituintes, apresentando maior teor no verão (BOTREL et al., 2010).

O mesmo ocorreu com o óleo da folha *H. dilatata*, coletada na Serra do Tepequém em Roraima, as variações ambientais foram poucas expressivas, havendo variações somente nos valores calculados em porcentagens nas concentrações dos fitoconstituintes dos óleos essenciais.

Na avaliação da composição química do óleo essencial da espécie *Aniba parviflora* da família Lauraceae de acordo com o período sazonal (período seco e chuvoso), sessenta e três componentes voláteis foram avaliados. Os componentes mais abundantes como germacreno-A, β -selineno, (E)-cariofileno e epóxido de humuleno, foram encontrados no período seco, inferindo que ocorreu a influência da sazonalidade na composição química desta espécie *A. Parviflora* estudada na Amazônia (PEREIRA, 2013).

Castro et al. (2008) estudou os constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook em municípios de Minas Gerais, observando que em diferentes épocas e locais os dados cromatográficos da espécie indicavam alterações nas concentrações químicas. O mês de fevereiro apresentou resultados superiores nas concentrações dos constituintes, no caso do composto citroneal.

Enquanto que em outros estudos com *Eucalyptus citriodora*, os resultados apresentaram diferenças, e a maior concentração do composto citroneal nos óleos essenciais ocorreu nos meses mais secos do ano (abril e setembro) (VITTI; BRITO, 2003).

Respostas diferenciadas quanto as alterações da constituição química dos óleos essenciais podem ocorrer nos trabalhos envolvendo microorganismos. Blank et al. (2005) afirmam que dependendo do tipo de coleta, horário e época o composto responsável pela inibição da atividade biológica pode sofrer alterações na sua concentração.

Os resultados observados da composição química da espécie em estudo no presente trabalho corroboram com os autores citados acima, mostrando as variações dos constituintes químicos de acordo com a sazonalidade, envolvendo a época e o local da colheita.

Nos estudos na Colômbia com os gêneros da mesma espécie de *H. dilatata*, realizado por Tafurt-Garcia et al. (2014), se observou diferenças tanto de forma quantitativa, como qualitativa em relação aos constituintes em diferentes espécies da família Lamiaceae, diferenciando também dos compostos encontrados nos espécimes em estudo deste trabalho.

Desta forma o estudo realizado sobre a caracterização química nesta pesquisa reforça a importância do estudo de uma espécie, em período sazonal.

3.2 Atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE)

Nas Tabelas III-2 e III-3 constam os percentuais de inibição da AChE pelos extratos hexânico e etanólico das folhas e dos óleos essenciais das flores e das folhas de *H. dilatata*, coletadas no período chuvoso e seco.

Tabela III-2 – Testes de inibição da acetilcolinesterase utilizando extratos e os óleos essenciais de *Hyptis dilatata* coletado no período seco.

Amostra	Tipo de Extrato/Óleo	Percentual de Inibição (%)	Intensidade de Inibição	Desvio Padrão
Hd folha	Etanólico	90,33	Potente	3,02
Hd folha	Hexânico	93,47	Potente	3,82
Hd folha	Óleo Manhã	96,46	Potente	2,11
Hd folha	Óleo Tarde	85,94	Potente	1,51
Hd folha	Óleo Noite	79,09	Potente	1,34
Padrão	Galantamina	94,36	Potente	1,14
Padrão	Eserina	91,93	Potente	1,30

Tabela III-3 – Testes de inibição da acetilcolinesterase utilizando extratos e os óleos essenciais de *Hyptis dilatata* coletado no período chuvoso.

Amostra	Tipo de Extrato/Óleo	Percentual de Inibição (%)	Intensidade de Inibição	Desvio Padrão
Hd folha	Etanólico	90,33	Potente	3,02
Hd folha	Hexânico	90,50	Potente	1,96
Hd folha	Óleo Manhã	91,26	Potente	2,69
Hd folha	Óleo Tarde	99,29	Potente	1,63
Hd folha	Óleo Noite	51,50	Potente	4,26
Hd flor	Etanólico	95,19	Potente	2,3
Hd flor	Hexânico	92,96	Potente	1,52
Padrão	Galantamina	94,36	Potente	1,14
Padrao	Eserina	91,93	Potente	1,30

Os dados das tabelas mostraram que há uma variação do potencial de inibição da enzima Acetilcolinesterase nos extratos e nos óleos aplicados. Verifica-se que o extrato hexânico da folha coletada no período seco apresentou um valor percentual mais elevado de inibição do que no extrato no período chuvoso, respectivamente 93,47 % e 90,50 %. Valor relativamente elevado também foi observado para o óleo da folha coletado no período chuvoso

horário da tarde, atingindo aproximadamente 99,29%, enquanto no período seco, a maior inibição ocorreu com óleo da folha coletada no período seco no horário da manhã 96,46% (Tabela III-2 e III-3).

Em *H. dilatata*, coletada em Roraima, o extrato etanólico da folha coletada no período seco sobre a AChE apresentou o mesmo percentual de inibição do extrato etanólico da folha coletada no período chuvoso, apresentaram atividade inibitória potente (90,33 %). No entanto, quando se considera a classificação do potencial de inibição dos extratos e óleos, seguindo os critérios de Vinutha et al. (2007), encontramos três níveis de classificação: inibidores potentes - valor acima de 50 %; moderados - entre 30 % e 50 % e fracos - abaixo de 30 %. Neste estudo, todos os óleos e extratos apresentaram-se potentes.

A inibição da enzima acetilcolinesterase através do óleo essencial da folha de *H. dilatata*, provavelmente resultou da ação do monoterpene fenchona, juntamente com os outros principais constituintes majoritários: α -pineno, 3-careno, limoneno, cânfora, β -pineno e β -cariofileno, pela ação do sinergismo, podendo explicar a relação dos mesmos, nos ensaios de inibição.

Alguns constituintes como o α -pineno, β -cariofileno e 3-careno, já foram isolados nos óleos essenciais de algumas espécies pertencentes à família Lamiaceae como é o caso da espécie *Salvia fruticosa*, e mostraram atividades inibitória in vitro sobre AChE (SAVELEV et al., 2003, 2004). Estes constituintes encontrados também nos óleo e extratos da espécie *H. dilatata*, poderão estar relacionados com as elevadas inibições que esta espécie obteve frente a enzima AChE.

Segundo Souza et al. (2012), as espécies da família Lamiaceae, foram estudadas a fim de investigar a atividade inibitória da AChE e o monoterpene α -pineno presente em sua constituição química têm mostrado atividade inibitória quando testado de forma isolada.

O extrato etanólico de *H. dilatata* foi o que apresentou os menores valores de inibição da AChE corroborando com os resultados encontrados por Mota et al. (2012), estudando algumas espécies de plantas, utilizando o extrato etanólico de *Hyptis fruticosa* sobre a enzima acetilcolinesterase, concluiu que a inibição desse extrato sobre enzima era fraco (11 %).

O óleo essencial de *H. dilatata*, da folha coletada no período seco sobre a AChE apresentou inibição (79,9 %), considerada potente, enquanto o óleo essencial da folha coletada no período chuvoso, mostrou atividade inibitória potente (51,50 %), esta diferença, pode estar relacionada com a produção dos metabólitos secundários, nos diferentes períodos.

O sesquiterpene óxido cariofileno segundo a literatura é um composto indicado como inibidores da AChE (FUJIWARA et al., 2010). Este constituinte é encontrado em *H. dilatata*

tanto no período seco no horário da tarde, como no período chuvoso presente no óleo da folha coletada pela manhã, com a mesma porcentagem de concentração (1,7 %), o que pode, portanto, contribuir na ação do sinergismo para a inibição da enzima acetilcolinesterase.

A espécie utilizada neste estudo demonstra ter potencial paraser uma candidata em trabalhos mais específicos objetivando o tratamento de doenças neurodegenerativa como é o caso da doença Alzheimer, devido aos constituintes químicos presentes na constituição do óleo essencial.

De acordo Trevisan e Macedo (2003), os extratos que apresentam percentual de inibição da enzima maior ou igual a 50%, são importantes para a continuidade dos estudos, uma vez que é possível realizar a partição dos extratos e a purificação das frações, isolando as substâncias potencialmente inibitórias da acetilcolinesterase.

3.3 Determinação da toxicidade frente à *Artemia salina*

A partir dos ensaios de toxicidade realizados com óleos essenciais e extratos de *H. dilatata*, em *A. salina*, se observou após 24 horas a porcentagem de náuplios mortos, possibilitando o cálculo da CL₅₀, mostrando o potencial tóxico dessa espécie.

A menor CL₅₀ ocorreu com o óleo essencial extraído da folha coletada no horário da manhã no período chuvoso, CL₅₀= 23,4 µg mL⁻¹, grau de confiabilidade (10,9 – 33,5), o segundo mais tóxico foi o óleo essencial da folha coletada a noite no período chuvoso com intervalo de confiança (IC) CL₅₀= 44,3 (33,0 - 57,2), a Tabela III-4 mostra os valores da CL₅₀ e a confiabilidade de todos os óleos testados.

Tabela III-4 – Valores de CL₅₀ nos óleos essenciais de *Hyptis dilatata* contra larvas de *Artemia salina* na leitura de 24h.

Óleo	CL ₅₀ (IC 95%)	Slope± SE	χ ²	GL
FMC	23,4 (10,93 -37,53)	1,13 (0,19)	2,13	5
FMS	76,3 (45,16 -121,99)	1,75 (0,21)	8,17	5
FTC	112,2 (73,85 -180,80)	1,08 (0,20)	0,25	4
FTS	69,5 (42,34- 103,95)	1,05 (0,16)	4,74	5
FNC	44,3 (33,08-57,20)	2,02 (0,26)	3,33	5
FNS	126,0 (83,81-189,08)	1,08 (0,16)	1,88	5

* FMC - Folha manhã chuvoso; FMS - Folha manhã seco; FTC - Folha tarde chuvoso; FTS - Folha tarde seco; FNC - Folha noite chuvoso; FNS - Folha noite seco. * IC- Intervalo de confiança; *SE –desvio padrão; * GL – Grau de liberdade.

Acerca dos valores da CL₅₀ dos extratos encontrados, o menor resultado ocorreu com o extrato hexânico da flor no período chuvoso CL₅₀ = 27,5 µg mL⁻¹, com o intervalo de

confiança (18,4-36,8). Com relação aos extratos das folhas a menor $CL_{50} = 45,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ (32,7-60,9) foi encontrado extrato hexânico do período chuvoso (Tabela III-5).

Tabela III-5 – Valores de CL_{50} dos extratos de *Hyptis dilatata* contra larvas de *Artemia salina* na leitura de 24h.

Extrato	CL_{50} (IC 95%)	Slope \pm SE	χ^2	GL
FLHC	27,5 (18,43-36,83)	1,91 (0,28)	1,06	5
FLEC	87,3 (50,64-139,44)	0,89 (0,15)	1,13	5
FHC	45,9 (32,73 – 60,92)	1,73 (0,22)	2,86	5
FHS	62,8 (29,15- 107,83)	0,75 (0,15)	2,91	5
FEC	75,5 (48,54-109,97)	1,13 (0,16)	2,47	5
FES	49,4 (24,89-79,86)	1,24 (0,18)	5,22	5

* FLHC- Flor hexânico chuvoso; FLEC - Flor etanólico chuvoso; FHC - Folha hexânico chuvoso; FHS- Folha hexânico seco; FEC - Folha etanólico chuvoso; FES-Folha etanólico seco.

Amarante (2011) considera após os cálculos de mortalidade, baixa toxicidade quando a CL_{50} for superior a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, moderada para CL_{50} entre 100 a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e muito tóxico quando a CL_{50} foi inferior a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Todos os extratos das flores e folhas obtiveram resultados da CL_{50} abaixo de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, portanto considerados potencialmente tóxico, enquanto os resultados dos óleos essenciais da folha mostraram alta toxicidade e toxicidade moderada nos óleos essenciais da folha coletada no período chuvoso nos horários da tarde e noite, como demonstra as Tabelas III-4 e III-5.

Nos controles negativos não houve mortalidade, não sendo necessário aplicar a fórmula de Abbott. Entretanto, o solvente usado não interfere nos resultados, portanto as atividades apresentadas estão relacionadas com as amostras testadas.

Conforme o teste de citotoxicidade realizado por Rosa (2016), com o óleo essencial de *Myrcia sylvatica*, coletada no município de Carolina - MA, demonstrou neste ensaio uma forte toxicidade $<100 \mu\text{g mL}^{-1}$, indicando possível potencial para o desenvolvimento biotecnológico de formulações farmacêuticas.

Em outro ensaio citotóxico com a espécie *Hyptis fruticosa* foi observado letalidade com as amostras de extratos metanólicos sobre *A. salina*, apresentando valores de $CL_{50} < 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (MORENO et al., 2005). Enquanto, os óleos essenciais (folhas) e extratos (folhas e flores) da espécie *H. dilatata* estudada neste trabalho, apresentaram toxicidade para *A. salina*, respectivamente $<100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $< 500 \mu\text{g mL}^{-1}$.

El Mensshavi et al. (2010), afirma que os ensaios efetivos de substâncias sobre *A. salina* é um forte indicador para a pré-implantação destas substâncias em estudos de atividade

terapêutica contra tumores sólidos. Batista et al. (2013) reforça a teoria que as atividades biológicas: toxicológicas, antibacterianas, antioxidante entre outras, são decorrentes dos metabólitos secundários encontrados nas plantas. McLaughlin e Rogers (1998), explica que os testes com *A. salina* são utilizados em uma dosagem dez vezes superior a concentração necessária para inibição de 50% no crescimento celular em testes antitumorais. Entretanto se pode verificar com os resultados de *H. dilatata* que sua atividade tóxica pode ser empregada em alguns testes biológicos.

3.4 Atividade antimicrobiana e fungicida do óleo essencial da folha e dos extratos da folha e flor *H. dilatata*

O Potencial antimicrobiano e fungicida dos óleos essenciais das folhas e extratos das folhas e flores de *H. dilatata* foram avaliados sobre as bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (SA), *Bacillus cereus* (BC), Gram-negativas: *Salmonella typhimurium* (ST), *Citrobacter freundii* (CF); Levedura: *Candida albicans* (CA).

Os resultados dos ensaios microbianos e fungicida dos óleos essenciais da folha e dos extratos hexânicos e etanólicos das folhas e flores de *H. dilatata* se mostrou efetivos obre as bactérias e a levedura *C. albicans*, porém não houve inibição dos óleos essenciais da folha no ensaio com este fungo, somente com os extratos das folhas e flores.

A inibição das bactérias com óleos essenciais das folhas coletadas no período seco e chuvoso foram observadas tanto nas bactérias Gram negativas, como nas Gram positivas (Figuras III-8 e III-9).

Os valores de inibição dos óleos das folhas coletadas no período seco no horário da tarde nas bactérias, observando que o menor valor de CI_{50} foi a melhor inibição, ocorreu com a bactéria Gram positiva *B.cereus* $CI_{50} = 112,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura III-8).

Em relação aos óleos essenciais da folha coletada no período chuvoso, só ocorreu inibição das bactérias Gram positivas testadas (Figura III-9). A menor inibição ocorreu com o óleo da folha coletada pela manhã $CI_{50} = 78,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ na bactéria *S. aureus*.

O controle utilizado nos ensaios bacterianos foi à penicilina $CI_{50} < 1,95 \mu\text{g mL}^{-1}$. A porcentagem de inibição variou da maior concentração $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ (94,0 %), para a menor concentração $1,95 \mu\text{g mL}^{-1}$ (92,8 %).

Figura III-8 – Curva de atividade de óleo essencial das folhas coletadas no período seco/tarde: (A) *Staphylococcus aureus*, (B) *Bacillus cereus*, (C) *Citrobacter freundii*; período seco/noite: (D) *Staphylococcus aureus*, (E) *Bacillus cereus* e (F) *Citrobacter freundii*.

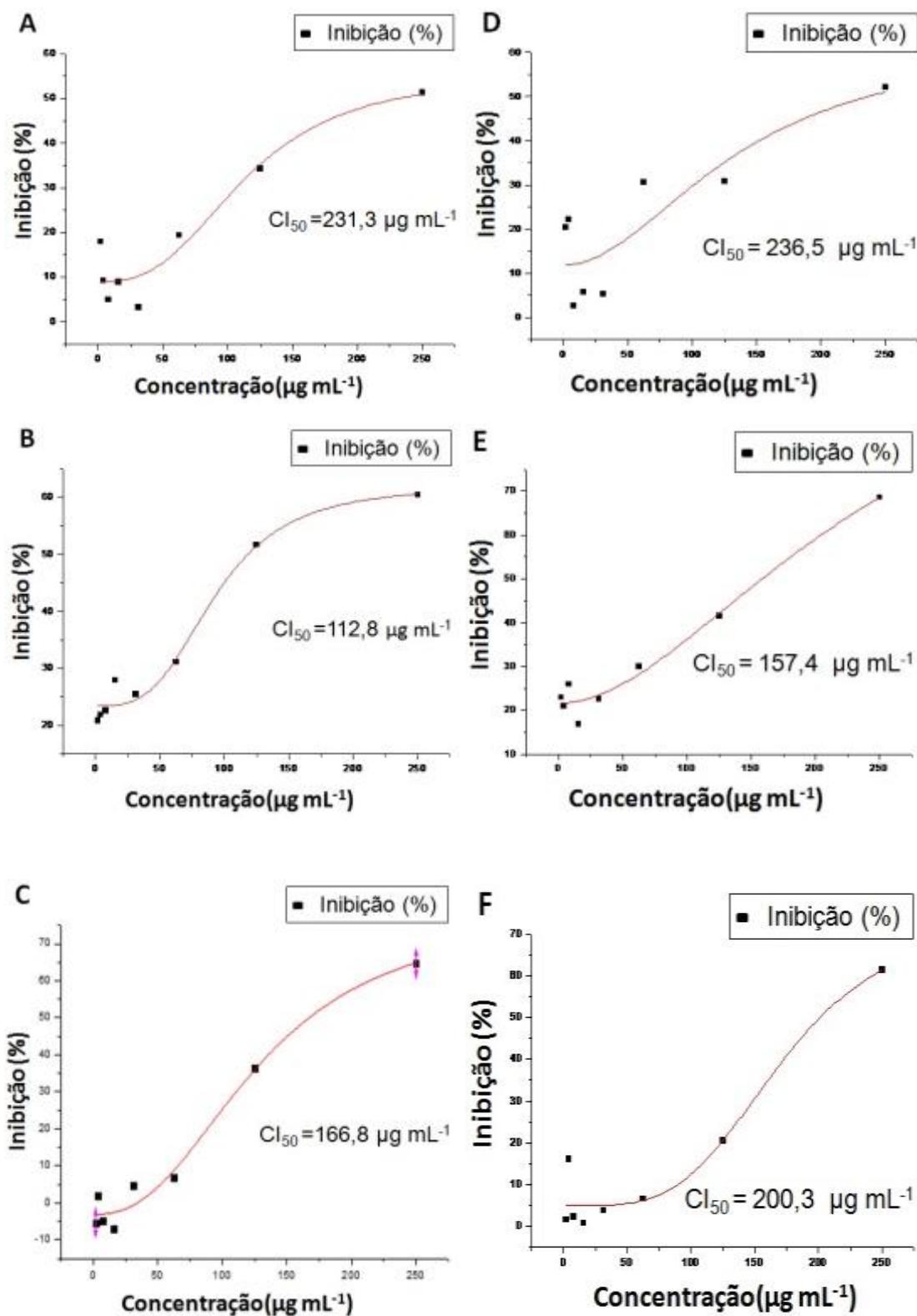
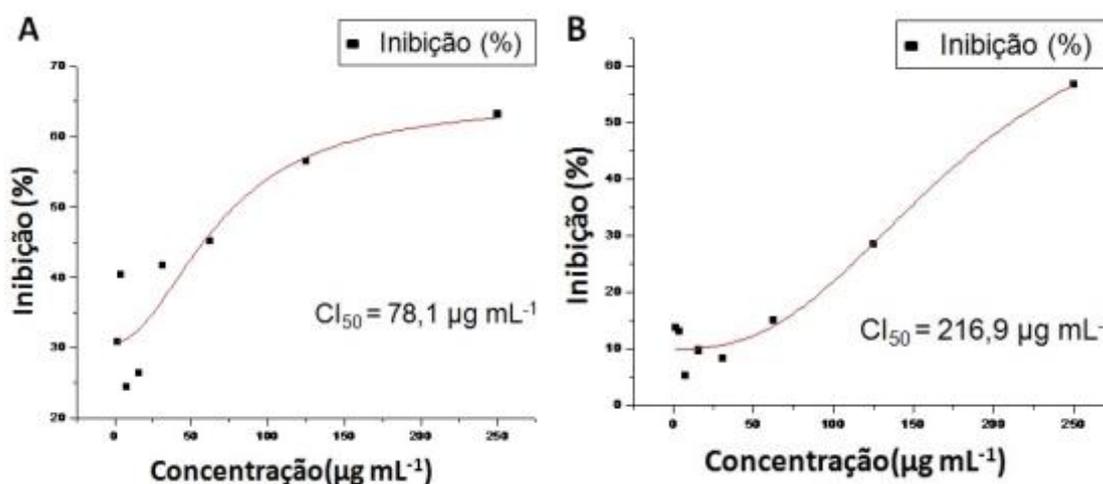


Figura III-9 – Curva de atividade de óleo essencial das folhas coletadas no período chuvoso/ manhã: (A) *Staphylococcus aureus*; e período chuvoso/tarde; B) *Bacillus cereus*.



Nos extratos o menor valor de CI_{50} foi inferior aos valores encontrados, considerando os óleos essenciais da folha. No extrato hexânico da folha no período chuvoso com $CI_{50} = 43,4 \mu\text{g mL}^{-1}$, ocorreu sobre a bactéria *Salmonella typhimurium* e sobre *S. aureus* $CI_{50} = 58,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, observando-se que essas bactérias tiveram melhores inibições com extratos do que com óleos essenciais. Comparando os resultados de inibição dos testes bacterianos com extratos e óleos em relação ao período climático, se observou que a quantidade de bactérias no óleo essencial da folha no período seco, obteve um número maior de inibição do que nos extratos. Neste último, a inibição predominou no período chuvoso tanto na flor como na folha (Tabela III-6).

Tabela III-6 – Valores da concentração inibitória (CI_{50}), dos ensaios antibacterianos e fungicidas com os extratos das folhas e flores de *Hyptis dilatata* coletadas no período seco e chuvoso.

Amostra/ Extratos	CI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>C. freundii</i>
FHS	22,5	-	-	-	-
FES	14,1	161,4	-	-	-
FHC	136,5	58,5	101,1	43,4	130,4
FEC	72,6	-	-	-	-
FLHC	27,4	72,2	86,8	-	130,9
FLEC	113,6	129,7	148,1	-	-
FLHS	-	-	-	84,4	-
FLES	-	-	-	-	-

*FHS- Folha hexânico seco; FES-Folha etanólico seco; FHC - Folha hexânico chuvoso; FEC - Folha etanólico chuvoso; FLHC- Flor hexânico chuvoso; FLEC - Flor etanólico chuvoso; FLHS - Flor hexânico seco; FLES – Floretanólico seco. (-) - não houve inibição.

Os resultados utilizando fungos demonstram que houve inibição da levedura *C. albicans*, onde os controles utilizados foram: a Nistatina com $CI_{50}=7,73 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o Miconazol com $CI_{50}< 1,95 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os menores valores de CI_{50} na levedura ocorreram utilizando os extratos da folha e da flor. O extrato etanólico da folha no período seco apresentou melhor inibição ($CI_{50}= 14,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) no mesmo período com extrato hexânico ($CI_{50}= 22,5 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Na flor o menor IC_{50} ocorreu com o extrato hexânico de período chuvoso $CI_{50}= 27,4 \mu\text{g mL}^{-1}$. Comparando os resultados sobre *C. albicans* considerando os extratos da flor e folha, os extratos da folha obtiveram melhores inibições.

Tratando-se de ensaios biológicos com bactérias neste estudo, os óleos essenciais das folhas e os extratos da folha e flor sobre as bactérias Gram positivas, foram mais eficazes. Vaara (1992), explica que as bactérias Gram negativas possuem resistência em diversos tipos de antibióticos, isto ocorre devido uma membrana externa que envolve a parede celular, dificultando o transporte de substâncias hidrofóbicas. Entretanto, em outras pesquisas com óleos essenciais de algumas espécies de plantas a eficácia ocorre na maioria com as bactérias Gram negativa, como é o caso da espécie *Zataria multiflora* estudada por Sharififar et al. (2007). Isto ocorre, devido a afinidade deste óleo a estrutura lipídica da membrana que a envolve, fazendo com que o material genético da bactéria se torne inativo ou até mesmo ocasionar sua destruição (KIM et al., 1995).

Constantin et al. (2001) analisando os constituintes químicos da espécie *Piper cernuum*, observaram que o biciclo germacreno e β -cariofileno foram os majoritários, mostrando atividade com a levedura *C. albicans* e sobre a bactéria *S. aureus*, atribuindo as inibições a estes compostos.

Bakkali et al. (2008) relata que as atividades antimicrobianas e fungicidas não estão associadas somente aos compostos majoritários de uma planta, mas pode ser atribuída a uma ação de sinergismo. No caso de *H. dilatata* utilizada neste estudo, o β -cariofileno é o composto majoritário no óleo da flor, encontrado também no óleo da folha em épocas e horários diferente, com variadas concentrações. Concordando com o autor acima e relacionando a espécie em estudo, os diversos constituintes presentes nas partes desta planta, como limoneno, α -pineno, fenchona, 3-careno, cânfora, óxido cariofileno dentre outros, mesmo com pequenas concentrações, poderá está agindo de forma sinérgica.

O ácido carnósico já estudado na espécie *H. dilatata* como relata Urones et al. (1998) e Oluwatuyi et al. (2004), possui atividade contra cepas de *S. aureus* bastante resistentes. Portanto essa mesma espécie coletada na área de cerrado em uma serra, em diferentes horários

e períodos poderão ter produzidos metabólitos secundários e terpenos, relacionados com a inibição das bactérias utilizadas por esta pesquisa, bem como na levedura *C. albicans*.

4 CONCLUSÕES

Considerando o potencial do óleo essencial da folha e dos extratos hexânicos, etanólicos da folha e da flor, extraídos de épocas diferentes, pode-se concluir que:

- Dentre os 22 constituintes químicos identificados na caracterização química dos óleos essenciais das folhas de *H. dilatata*, em diferentes períodos climático seco e chuvoso, destacaram-se os majoritários: fenchona, 3-careno, α -pineno, β -cariofileno, Limoneno, β -pineno e cânfora.
- Não houve diferença quanto ao tipo dos constituintes nos períodos seco e chuvoso, somente em relação à porcentagem de concentração dos mesmos.
- Tanto nos períodos seco e chuvoso os extratos hexânico e etanólicos, tiveram inibição potente na enzima acetilcolinesterase e a maior toxicidade testado com o microcrustáceo *A. salina* foi com o extrato hexânico da flor coletada no período chuvoso.
- Quanto à atividade antimicrobiana a maior inibição ocorreu nos extratos hexânicos da folha coletada no chuvoso.
- Os resultados das atividades biológicas com a enzima acetilcolinesterase, ensaios bacterianos, fungicidas e a citotoxicidade indicam que podem está relacionados com a ação dos constituintes químicos apresentados na caracterização química dos óleos essenciais coletados nos períodos secos e chuvosos em horários diferentes, em concentrações variadas dos compostos químicos presentes.
- A espécie *H. dilatata* tem potencial para a utilização e elaboração de produtos terapêuticos e desta maneira contribuir para o tratamento de doenças neurodegenerativas, bactericidas e fungicidas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**. v. 18, n. 2, p. 265-267, 1925.

ALMEIDA, M.Z. **Plantas Mediciniais**. EDUFBA. 3ed. pp. 221, 2011.

ALONSO, H.G.A.; CORRÊA, C.L. PRAGUICIDAS. In: Oga, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, p.437-458, 2003.

AMARANTE, C.B.; MULLER, A.H.; PÓVOA, M.M.; DOLABELA, M.F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**. Manaus, v. 41, n. 3, p. 431 – 434, 2011.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, B.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, p. 446-475, 2008.

BATISTA, J.A.N. **Potencial antioxidante dos extratos de *Moringa oleifera* Lamark em sistemas lipídicos de baixa estabilidade oxidativa**. 2013. 96p. Tese (Doutorado em Química e Bioquímica de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

BIZZO, H.R.; HOVELL, A.M.C.; REZEND, C.M. Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**. São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BLANK, A.F.; FONTES, S.M.; CARVALHO FILHO, J.L.S.; ALVES, P.B.; SILVA-MANN, R.; MENDENÇA, M.C.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; RODRIGUES, M.O. Influência do horário de colheita e secagem de folhas no óleo essencial de melissa (*Melissa officinalis* L.) cultivada em dois ambientes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v. 8, n. 1, p. 73-78, 2005.

BOTREL, P.P.; PINTO, J.E.B.P.; ARAUJO, A.C.C.; BERTOLUCCI, S.K.V.; FIGUEIREDO, F.C.; FERRI, P.H.; COSTA, D.P. Variações no teor e na composição volátil de *Hyptis marruboides* Epl. cultivada no campo e em casa de vegetação. **Química Nova**. São Paulo, v.33, n.1, p.33-37, 2010.

CASTRO, N.E.A.; CARVALHO, G.J.; CARDOSO, M.G.; PIMENTEL, F.A.; CORREA, R.M.; GUIMARÃES, L.G.L. Avaliação de rendimento e dos constituintes químicos do óleo essencial de folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook. colhidas em diferentes épocas do ano em municípios de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.10, n.1, p.70-75, 2008.

CEBORSKA, M.; SZWED, K.; ASZTEMBORSKA, M.; RYLIK, M.W.; KICINSKA, E.; SUWINSKA, K. Study of β -cyclodextrin inclusion complexes with volatile molecules geraniol and α -terpineol enantiomers in solid state and in solution. **Chemical Physics Letters**. v. 641, p. 44-50, 2015.

CONSTANTIN, M. B.; SARTORELLI, P.; LIMBERGER, R.; HENRIQUES, A.T.; STEPPE, M.; FERREIRA, M.J.; OHARA, M.T.; EMERENCIANO, V.P.; KATO, M. J. Essential oils

from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: antimicrobial activities and analysis by GC/MS and ¹³CNMR. **Planta Médica**. v. 67, n. 8, p.771-773, 2001.

CUNHA, A.P.; NOGUEIRA, M.T.; ROQUE, O.R.; BARROSO, J.M.G. **Plantas Aromáticas e Óleos Essenciais Composição e Aplicações**, Lisboa, 2012.

DAVIGLUS, M.L.; PLASSMAN, B.L.; PIRZADA, A.; BELL, C.C.; BOWEN, P.E.; BURKE, J.R.; PATEL, D. Risk factors and preventive interventions for Alzheimer disease: state of the science. **Archives of neurology**. v. 68, n. 9, p. 1185-1190, 2011.

DE FELICE, F.G. Alzheimer's disease and insulin resistance: translating basic science into clinical applications. **The Journal of clinical investigation**. v. 123, n. 2, p. 531, 2013.

DIFFEN. Mold vs. Yeast. Disponível em: http://www.diffen.com/difference/Mold_vs_Yeast. Acessado em: 31/10/2016.

DOMINGUES, E.A.; NAKAMURA, C.V.; SOUZA, M.C.; TEIXEIRA, T.S.; PEIXTO, J.L.B.; SARRAGIOTTO, M.H.; VIDOTTI, G.J. Estudo fitoquímico e avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina* e da atividade antimicrobiana de *Calycorectes psidiiflorus* (O. Berg) Sobral, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20, n.1, p. 23-27, 2010.

ELLMAN, G.L. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**. v.7, n. 2, p. 88-90, 1961.

FERREIRA, T.P.S. **Óleos essenciais: Influência de métodos de secagem sobre o rendimento, composição e atividades fungitóxicas**. 2013. 89f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal de Tocantins, Palmas, 2013.

FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G. Plantas Aromáticas e Mediciniais. Fatores que afetam a produção. p. 1-18. In: FIGUEIREDO, A.C., BARROSO, J.G., PEDRO, L.G. (Eds). **Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Mediciniais**. Curso Teórico-Prático, 3.^a Ed., Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal, 2007.

FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; SCHEFFER, J.J. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v.23, n.4, p. 213-26, 2008.

FUJIWARA, M.; YAGI, N.; MIYAZAWA, M. Acetil - cholinesterase Inhibitory Activity of Volatile Oil from *Peltophorum dasyrachis* Kurz ex Bakar and Bisabolane-Type Sesquiterpenoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 58, 2824-2829, 2010.

GUERRA, J.R.N.P. **Identificação de perigos na cadeia de produção e distribuição de produtos comercializados por uma Empresa do ramo alimentar**. 2015. 104f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e segurança alimentar) – Faculdade de Ciências e Tecnologia/ Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, 2015.

KIM, J.M.; MARSHALL, M.R.; CORNELL, J.A; PRESTON, J.F.; WEI, C.I. Antibacterial Activity of carvacrol, citral and geraniol against *Salmonella typhimurium* in Culture Medium and on Fish Cubes. **Journal of Food Science**. v. 60, n. 6, p. 1364-68, 1995.

LeOra Software Company PoloPlus: Probit and Logit Analysis. User's Guide, Version 2.0. LeOra Software Company, Petaluma, CA, p. 39.2003.

LUZ, W. C. **Taxonomia de Fungos Anamórficos – I. Hifomicetos. Micologia avançada.** Passo fundo. RS, Brasil, Vol. IIIA RAPP, 2011.

MATTSON, M.P. Energy intake and exercise as determinants of brain health and vulnerability to injury and disease. **Cell metabolism.** v. 16, n. 6, p. 706-722, 2012.

McLAUGHLIN, J.L.; ROGERS, L.L. The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals. **Drug Information Journal.** v. 32, p. 513-24, 1998.

MENDES, C. E. **Avaliação Sazonal e composição química do óleo essencial de *Dalbergia frutescens* (Vell) Britton (Fabaceae).** 2012, 180f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Comunitária da Região de Chapecó, Chapecó, 2012.

MORENO, M.P.N.; Floresta, S.V.; Campos, D.A.; Blank, F.; Zavar, C.; Simote, S.; Alves, P.B.; Cavalcanti, S.C.H.; Antonioli, Â.R.; Vieira, P.C.; Filho, E.R.; Silva, M.F.G.F.; Fernandes, J.B. **Avaliação fitoquímica e potencial farmacológico da *Hyptis fruticosa* L.** In: 28a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ) – 30 de maio a 02 de Junho de 2005.

MOTA, W.M.; BARROS, M.L.; CUNHA, P.E.L.; SANTANA, M.V.A.; STEVAM, C.S.; LEOPOLDO, P.T.G., FERNANDES, R.P.M. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai.** Botucatu, v.14, n.4, p.624-628, 2012.

MULLER G.G.; KARA-JOSE, N.; CASTRO, R.S. Antifúngicos em infecções oculares: drogas e vias de administração. **Revista Brasileira de Oftalmologia.** Campinas, v. 72, n. 2, p. 132-141, 2013.

OLIVEIRA, A.D.L. **Estudo químico e avaliação biológica do óleo essencial de *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae).** 2011. 80f. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) - Universidade Regional do Cariri – URCA, 2011.

OLUWATUYI, M.; KAATZ, G.W.; GIBBONS, S. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. **Phytochemistry.** Oxford, v. 65, p. 3249-3254, 2004.

PAULUS, D.; VALMORBIDA, R.; TOFFOLI, E.; NAVA, G. A. Teor e composição química de óleo essencial de cidró em função da sazonalidade e horário de colheita. **Horticultura Brasileira.** Brasília, v.31, n. 2, pp. 203-209, 2013.

PEREIRA, I.C. **Influência da Sazonalidade na composição química do óleo essencial de *Aniba parviflora* – Lauraceae.** In: VII SBOE – Simpósio Brasileiro de óleos essenciais Ciência e Tecnologia e Inovação na Amazônia ISBN 978-85-66-836-05-09. Universidade Federal do Oeste do Pará, PPGRNA- Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. 2013.

PEREIRA, J.L. **Composição química dos óleos essenciais de espécies de *Eucaliptus* L Herit (Myrtaceae).** 2010. 60f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG, 2010.

PEREIRA, L.C.O. **Caracterização química de óleos essenciais de quatro espécies da família Lamiaceae: *Hyptis suaveolens* (L.) Poit, *Hyptis pectinata* (L.) Poit, *Hyptis martiusii* Benth. e *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart.) Schauer.** 2014. 56f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa-PB, 2014.

PROBST, I.S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico.** 2012. 112f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"- UNESP, Botucatu-SP, 2011.

QUEIROZ, F.M.; NASCIMENTO, M.A.; SCHWARZ, A. Estudo preliminar in vitro da atividade antiacetilcolinesterásica de extratos etanólicos de plantas: Possíveis alternativas no tratamento da doença Alzheimer. **Biofar.** v. 6, n. 01, 2003.

REIS, E.S.; PINTO, J.E. B.P.; BERTOLLUCCI, S.K.V.; CORRÊA, R.M.; PAULA, J.R.; ANDRADE, S.T.; FERRI, P.H. Seasonal variation in essential oils of *Lichnophora pinaster* Mart. **Journal of Essential Oil Research.** v. 22, n. 2, p. 147-149, 2010.

RIBEIRO, M.T.F. A redefinição das agendas dos Centros de P&D: os limites do mercado na sinalização das áreas estratégicas. **Revista de Administração Contemporânea.** v. 4, p. 87-107, 2000.

RIBEIRO-FURTINI, L.L.; ABREU, L.D. Utilização de APPCC na indústria de alimentos. **Ciência Agrotécnica.** v. 30, n. 2, p. 358–363, 2006.

ROCHA, B.C.A. **Extração e caracterização do óleo de tomilho-*Thymus vulgaris*.** 2013. 150f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Soropédica, 2013.

ROSA, C.S. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.** Campinas, v. 18, n. 1, p.19-26, 2016.

SAVELEV, S.; OKELLO, S.E.; PERRY, N.S.L.; WILKINS, R.M.; PERRY, E.K. Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulae folia* essential oil. **Pharmacology Biochemistry and Behavior.** v.75, p. 661-668, 2003.

SAVELEV, S.; EDWARD, U.; OKELLO, J.; ELAINE, K.; PERRY, E.K. Butyryl – and Acetylcholinesterase Inhibitory Actives in Essential Oils of *Salvia Species* and Their Constituents. **Phytotherapia Reserch.** v. 18, p.315-324, 2004.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. **Microbiologia: Mecanismos das doenças infecciosas.** 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 642p.

SHARIFIFAR, F.; MOSHAFI, M.H.; MANSOURI, S.H.; HODASHENAS, M.; KHOSHNOODI, M. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora*. **Biological Food Control.** v.18, n.7, p.800-805, 2007.

SILVA, P. **Farmacologia.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 870p.

SIMÕES, C.M.O. SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia – Da Planta ao Medicamento**. 5ª ED. VER. AMPL. 1ª Reimpressão- Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 2004.

SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA (SNA). Disponível em: <http://sna.agr.br/oleos-essenciais-uma-fonte-de-divisas-a-ser-mais-explorada-no-brasil/> Acesso em: 30.01.2017.

SOUZA, S.P.; VALVERDE, S.S.; SILVA, R.L.N.R.; LIMA, A.L.S. Óleos essenciais como inibidores da acetilcolinesterase Essential oils as acetylcholinesterase inhibitors. **Revista Fitos**. v. 7, n. 4, 2012

TAFURT-GARCÍA, G.; MUÑOZ-ACEVEDO, A.; CALVO, A.M.; JIMÉNES, L.F.; DELGADO, W. A. Componentes volátiles de *Eriope crassipes*, *Hyptis conferta*, *H. dilatata*, *H. brachiata*, *H. suaveolens* y *H. mutabilis* (Lamiaceae): Volatil e compounds of analysis of *Eriope crassipes*, *Hyptis conferta*, *H. dilatata*, *H. brachiata*, *H. suaveolens* y *H. mutabilis* (Lamiaceae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**. v. 13, n. 3, p: 254 – 269. ISSN 0717 7917, 2014.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUN, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2008, 780p.

TREVISAN, M.T.S.; MACEDO, F.V.V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**. São Paulo, v. 26, n. 3, p. 301-304, 2003.

URONES, J.G; MARCOS, I.S.; DIEZ, D.; CUBILLA, L.R. Tricyclic diterpenes from *Hyptis dilatata*. **Phytochemistry**. Oxford, v. 48, n. 6, p. 1035-1038, 1998.

VAARA, M. Agents that increase the permeability of outer membrane. **Microbiological Reviews**. v. 56, n. 3, p. 395-411, 1992.

VALLILO, M.I.; BUSTILLOS, O.V.; AGUIAR, O.T. de Identificação de terpenos no óleo essencial dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg – Myrtaceae. **Revista Instituto Florestal**. São Paulo, v. 18, n. único, p. 15-22, dez. 2006.

VINUTHA, B.; PRASHANTH, D.; SALMA, K.; SREEJA, S. L.; PRATITI, D.; PADMAJA, R.; RADHIKA, S.; AMIT, A.; VENKATESHWARLU, K.; DEEPAK, M. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal Ethnopharmacology**. v. 109, n. 1, 359–363, 2007.

VIOLANTE, I.M.P. **Avaliação das Atividades Biológicas e Estudo Químico de *Hyptis crenata* Pohle x Benth**. 2012. 210f. Tese (Doutorado em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2012.

VITTI, A.M.S.; BRITO, J.O. **Óleo essencial de eucalipto**. Piracicaba: ESALQ, 2003.

ZACCHINO, A.S.; GUPTA, M.P. **Manual de técnicas in vitro para La detección de compuestos antifúngicos**. Corpus Editorial y Distribuidora: Rosario, 85: 2007.

ZORE, G.B.; THAKRE, A.D.; MOHANKARUPPAYIL, S.S. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. **Phytomedicine**. v.18, n.13, p.1181-1190, 2011.

CAPÍTULO IV: ATIVIDADE LARVICIDA E ADULTICIDA DE EXTRATO E ÓLEO ESSENCIAL DE *Hyptis dilatata* BENTH EM *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* LINNAEUS, 1762 E *Anopheles darlingi* ROOT, 1926

1 INTRODUÇÃO

Os mosquitos são insetos de pequeno porte e também conhecidos popularmente pernilongos e carapanãs. Pertencem à família Culicidae, para a qual são conhecidas aproximadamente 3.500 espécies, classificadas em 95 gêneros e distribuídas em todo planeta (CANTUÁRIA, 2012; WRBU, 2017). Muitas espécies de mosquitos são transmissoras de agentes etiológicos de diferentes doenças, causando sérios problemas de saúde pública em todo o mundo (FORATTINI, 2002; WHO, 2017).

As doenças cujos agentes etiológicos são transmitidos por mosquitos vetores, representam uma grande ameaça para a saúde das sociedades em todo o mundo. Essas doenças em conjunto representam cerca de 17% das enfermidades que acometem o homem e estima-se que cerca de 80% da população mundial vive em áreas com risco de pelo menos uma dessas doenças, sendo que a metade em risco de duas ou mais (WHO, 2017).

Diversas espécies de mosquitos são consideradas vetores de agentes patogênicos, contudo, considerando as principais doenças que acometem a população brasileira, duas espécies ganham notoriedade científica, *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Anopheles darlingi* Root, 1926.

1.1 *Aedes aegypti* e transmissão de patógenos ao homem

Aedes aegypti é uma das principais espécies de mosquitos de importância epidemiológica, pois têm causado grandes problemas de saúde pública em diferentes países onde são encontrados, por ser transmissor de diferentes patógenos ao homem (CONSOLI; LOURENÇO-DE OLIVEIRA, 1994; WHO, 2017).

Aedes aegypti é amplamente distribuído no globo terrestre, presente nas regiões tropical e subtropical, possui hábito diurno, é altamente antropófilo e considerado uma das espécies de mosquito mais associado à espécie humana (LOPES et al., 1993; FORATTINI, 2002; PRADO et al., 2017). As fêmeas desse vetor realizam o repasto sanguíneo preferencialmente no homem, é nesse momento que pode ocorrer a transmissão de agentes patogênicos à espécie humana. Após o repasto, as fêmeas dessa espécie realizam posturas de seus ovos, o que é feito diretamente nas paredes úmidas dos criadouros com água, que podem ser diferentes tipos de

recipientes artificiais, como também criadouros naturais (SOARES-DA-SILVA et al., 2012; OLIVEIRA; NETO, 2017).

O *Aedes aegypti* possui desenvolvimento holometábolo, compreendendo os estágios de ovo, quatro instar larval, pupa e adultos, em condições naturais, seu ciclo de vida pode durar em torno de 10 dias (FORATTINI, 2002). Os ovos é o estágio mais importante para a disseminação da espécie pois, em condições adversas, podem permanecer viáveis por até mais de um ano, o que favorece a permanência da espécie no ambiente (SOARES-PINHEIRO et al., 2016).

A presença desse vetor em áreas urbanas tem preocupado os órgãos de saúde pública pois, comprovadamente, esse mosquito é transmissor dos agentes etiológicos da Dengue, Zika, Chikungunya e febre amarela urbana. Essas doenças têm ocupado uma posição de destaque em relação à saúde pública, em vários países das Américas, principalmente no Brasil, onde se registra a ocorrência de todas essas arboviroses simultaneamente, desde 2015 (BRASIL, 2017; DONALÍSIO et al., 2017).

No caso da dengue, essa doença aumentou 30 vezes nos últimos 50 anos, se ampliando para novos países. É uma doença emergente e re-emergente em vários países e vem preocupando as autoridades em saúde, em quase todo o mundo, devido os casos graves e letais que já ocorreram (BRASIL, 2017).

No Brasil, em 2017, até a semana 33 epidemiológica foram registrados 214.990 casos prováveis de dengue, com uma incidência de 104,3 casos/100 mil habitantes. Na região norte foi registrado 20.428 casos, até a presente data (BRASIL, 2017). No estado do Amazonas foram registrados 3.722 casos até a semana epidemiológica 33 (BRASIL, 2017).

Em relação aos casos de vírus Zika no país, até a semana epidemiológica 33, os levantamentos de dados registraram 15.518 casos prováveis, sendo 383 notificados para o Amazonas (BRASIL, 2017). Em relação ao Chikungunya, até o mesmo período, foram registrados 167.813 casos. No estado do Amazonas, o número de casos prováveis foi de 242 (BRASIL, 2017).

A febre amarela, por outro lado, que embora seja possível a vacinação da população humana contra essa doença, tem se tornado assunto preocupante na saúde pública, pois surtos dessa doença acontecem no Brasil em extensão variável. Entre dezembro de 2016 e Julho do ano de 2017, foram confirmados 777 casos e 261 óbitos no país (BRASIL, 2017).

1.2 *Anopheles darlingi* e transmissão da malária

O mosquito *An. darlingi* é o mais importante vetor da malária nas Américas (ZIMMERMAN 1992; HIWAT; BRETAS, 2011; NARANJO-DIAZ et al., 2013; TADEI et al., 2017). A sua distribuição estende-se desde América Central até a América do Sul, sendo considerado o principal vetor sul-americano da malária humana (ACHEE et al., 2006; MORENO et al., 2007). No Brasil, está presente em todo território nacional, com exceção das regiões secas e locais de alta altitude, contudo, é encontrado em maior abundância na região amazônica, local que concentra 99% dos casos de malária atualmente (TADEI et al., 1998; 2017).

Entre os anofelinos, *An. darlingi* é considerada uma das espécies mais antropófila (NARANJO-DIAZ et al., 2013; BARBOSA et al., 2016). As larvas dessa espécie são predominantemente encontradas em coleções de água com limites de fluxo perto do ambiente humano (RUFALCO-MOUTINHO et al., 2016). As fêmeas são hematófagas, têm preferência em realizar repasto no homem e possuem o hábito de adentrar às habitações humanas para realizar repasto sanguíneo, o que é feito geralmente no período crepuscular e noturno (TADEI et al., 1998; 2017; OLIVEIRA et al., 2012).

A transmissão do agente etiológico da malária ao homem pelo *An. darlingi*, ocorre quando as fêmeas dessa espécie são infectadas com os protozoários do gênero *Plasmodium* e, posteriormente, picam um indivíduo sadio. A doença tem um período de incubação de 10 a 15 dias, o plasmódio multiplica-se no fígado do homem e infectam as hemácias (REY, 2002; NEVES, 2010). No Brasil, *An. darlingi* já foi encontrado infectado *P. vivax*, *P. malariae* e *P. falciparum*, este último provoca a forma mais grave de malária em humanos, com mais de meio milhão de mortes por ano (ROCHA et al., 2008; SANTOS et al., 2009; WASSMER; GRAU, 2017).

A malária é considerada umas das principais doenças parasitárias do Mundo e nos últimos anos, o número de casos da doença reduziu em proporções consideráveis. Entre os anos de 2010 e 2015 a taxa de novos casos caiu em 21% e a mortalidade pela doença reduziu 29%, no mesmo período (WHO, 2017; SIQUEIRA, et al., 2017).

No Brasil, o Ministério da Saúde lançou plano de eliminação da malária, atingindo bons resultados. No ano de 2016, o número de casos notificados da doença no país, atingiu 129.195, representando uma redução de 9,7%, quando se compara com o número de caso registrado no ano de 2015 (143.161). Do total de casos notificados no país, 501 foram

registrados fora da Região Amazônica. No estado do Amazonas em 2016, foram registrados 49.198 casos, em Roraima (8.969), Acre (33.175) (BRASIL, 2017).

Apesar do avanço considerável no combate à malária, a transmissão dos agentes etiológicos continua e a doença ainda é uma ameaça à saúde pública no Brasil (BRASIL, 2017). Nessa situação de redução da malária no país, é importante considerar que alterações nos ecossistemas locais podem aumentar a proliferação dos mosquitos vetor da malária e, conseqüentemente, pode levar ao aumento da incidência desta doença. Estes podem ser provocados por alterações no meio ambiente, como desmatamentos, implantação de assentamentos agrícolas, atividades de exploração de minérios, entre outras, circunstâncias comuns no cotidiano na região amazônica (TADEI et al., 1988, 1998, 2010).

A principal ferramenta que levou a redução da malária no mundo foi o combate aos vetores. Nesse contexto, é importante considerar as diferentes estratégias de controle de vetores, pois o combate aos mosquitos é preconizado como instrumento para prevenir com sucesso a transmissão de agentes etiológicos. O objetivo é reduzir minimamente ou interromper o contato entre as populações humanas e as populações de mosquitos vetores (BARBOSA, 2010).

1.3 Medidas de controle vetorial

Historicamente, o controle de mosquitos vetores de agentes patogênicos é realizado com a utilização dos produtos químicos (MARCOMBE et al., 2012; LIU, 2015; ROCHA et al., 2015). Estes inseticidas químicos asseguram o controle populacional desses vetores, de forma imediata. No entanto, o seu uso contínuo pode levar à formação de resistência das espécies de mosquitos em curto prazo, fato recorrente em diversas regiões no mundo (DABIRÉ et al., 2008; ALOU et al., 2010; DU et al., 2016; SMITH et al., 2016).

No Brasil, tanto para o controle *Ae. aegypti* quanto para o controle de *An. darlingi*, prevalece ainda o uso de inseticidas químicos nos programas, conforme dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017). Portanto, as eficiências dos inseticidas utilizados nos programas de controle desses mosquitos têm que ser avaliadas, no sentido de verificar o nível de resistência desenvolvido por esses vetores, para assegurar a eficácia das ações implementadas (MACORIS et al., 2014; SILVA et al., 2014).

Um exemplo clássico de resistência desenvolvida pelo *Ae. aegypti* aos inseticidas químicos, trata-se do larvicida “Temefós”. Este foi amplamente utilizado no tratamento focal em criadouros desses mosquitos no Brasil, logo no início da implantação do programa de controle do *Ae. aegypti*. No entanto, o uso prolongado deste produto levou a formação de resistência, em diferentes localidades do país (DINIZ et al., 2014). Resistência aos inseticidas

organofosforados e piretróides em *Ae. aegypti* têm apresentado desde os anos 1980/1990 e foi demonstrado impacto sobre o controle desse vetor (CAMPOS; ANDRADE, 2001; MARCOMBE et al., 2012).

Levando-se em conta *An. darlingi*, principal vetor da malária na Amazônia, o primeiro registro de resistência desta espécie aos inseticidas foi verificado em amostras coletadas em Quibdo e Chocó, nordeste da Colômbia (QUIÑONES et al., 1984; SUAREZ et al., 1990). Entretanto, neste país já houve casos de resistência cruzada entre os inseticidas DDT e lambdacialotrina (FONSECA-GONZÁLEZ et al., 2009).

Considerando os vetores da malária no Brasil, trabalhos relativos à avaliação do grau de resistência aos inseticidas químicos do programa de controle, são relativamente escassos. De acordo com Silva (2014), o fato de não ter sido ainda estabelecidas em laboratório colônias destas espécies, é o fator limitante para o cálculo da dose diagnóstico. Este fator torna-se uma barreira para a realização dos bioensaios, fundamentais para padronizar procedimentos que permitam definir a susceptibilidade das populações de *Anopheles darlingi*, aos inseticidas (SANTOS et al., 1999; SILVA et al., 2014).

No Brasil não há registro de resistência aos inseticidas do *An. darlingi*, na região Amazônica atualmente, conforme dados do Laboratório de Malária e Dengue do INPA, em colaboração com a SUCEM - Superintendência de Controle de Endemias do estado de São Paulo (Tadei, comunicação pessoal). Testes realizados nos municípios do estado do Amazonas – São Gabriel da Cachoeira, Coari e Manaus; no estado de Rondônia – Candeias e Bate Estaca e no estado do Tocantins – Cantão e Anajá (controle), utilizando o KIT da OMS e papéis impregnados pela gerência da SUCEM (Superintendência de Controle de Endemias do estado de São Paulo), possibilitaram avaliar a resistência dos anofelinos quanto aos produtos Deltametrina, Cipermetrina e Alfacipermetrina. Considerando-se os resultados obtidos naquele período, observa-se:

1. Deltametrina: duas categorias: susceptível (duas localidades) e susceptibilidade diminuída (sete localidades).
2. Cipermetrina: duas categorias: susceptível (uma localidade) e susceptibilidade diminuída (oito localidades).
3. Alfacipermetrina: duas categorias: susceptibilidade diminuída (oito localidades) e risco de resistência (uma localidade).
4. Os dados de Caseara, no estado do Tocantins, foram tomados como controle pelo fato de não haver, naquele estado atualmente, atividades de controle com inseticidas.

Desta forma, verificou-se que há variação na susceptibilidade entre cidades do mesmo estado e entre os estados. Porém, considerando os resultados obtidos constatou-se que os níveis indicaram a necessidade de vigilância contínua para acompanhamento da evolução dos níveis de resistência, constatados naquela primeira amostragem.

Diante da problemática do controle de ambos os vetores e da resistência que pode ser desenvolvida pela intensa aplicação dos inseticidas, torna-se relevante introduzir medidas que contribuam para o controle vetorial, mas que sejam produtos naturais, como extratos e óleos essenciais. Desta forma, são relevantes estudos que priorizam componentes biológicos e com potencial larvicida e adulticida, no sentido de contribuir para o controle dos vetores, sem desencadear resistência, por serem produtos naturais (MEDEIROS, 2007; ROSA et al., 2016).

A prospecção de substâncias com propriedades inseticidas em plantas possibilita detectar substâncias bioativas, originadas do metabolismo secundário, as quais são menos agressivas ao meio ambiente. Muitas espécies de plantas são de extrema importância para as indústrias farmacêuticas e para a produção de fitofármacos. Os óleos essenciais, produtos originados do metabolismo secundário das plantas, são misturas de terpenos, principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos, em algumas espécies. Devido à ação em diversas atividades biológicas, como larvicida, inseticida, ovicida, antibacteriana dentre outras, os estudos com óleos essenciais foram ampliados em diversas Instituições de Pesquisa (ROSA et al., 2016).

No Brasil, muitas espécies de plantas foram analisadas para avaliar o potencial larvicida, considerando os constituintes químicos presentes nos extratos e óleos essenciais. Praticamente em todas as plantas registram-se constituintes químicos que apresentam atividade larvicida, como é o caso da espécie *Magonia pubescens* (Sapindaceae), que atua nas fases do desenvolvimento do *Ae. aegypti* (SILVA et al., 2004).

A família Lamiaceae passou a ser um dos alvos de estudos devido à composição química presente no óleo essencial de suas espécies, como é o caso de: *Hyptis mutabilis*, *Hyptis suaveolens*, *Protium heptaphyllum*, *Hyptis conferta*. As substâncias extraídas de vegetais são fontes naturais de produtos de ação inseticida, pois são produzidas pelo vegetal, em resposta aos ataques patogênicos de alguns insetos e microrganismos (TAFURT-GARCIA et al., 2015).

Considerando as espécies desta família se destaca a *Hyptis dilatata* Benth, objeto de estudo desta pesquisa, conhecida como hortelã do campo, encontrada em área de cerrado. Conforme Tafurt-Garcia et al. (2015), os óleos e extratos dessas espécies estão entre os fatores que determinam sua atividade de ação inseticida.

O presente trabalho objetivou analisar a eficiência dos óleos essenciais extraídos das folhas e flores de *H. dilatata* coletadas nos períodos seco e chuvoso, testados em ensaios

larvicidas e adulticidas de *Ae. Aegypti* e também em ensaios com larvas de *An. darlingi*. Em relação ao desenvolvimento do protótipo do produto com óleo essencial, este foi avaliado quanto a sua eficácia no controle de adultos de *Ae. aegypti*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Bioensaio para avaliar a atividade inseticida dos óleos essenciais e extratos de *H. dilatata*

2.1.1 Manutenção de *Aedes aegypti* no insetário

Foi realizada coleta de ovos de *Ae. aegypti* em residências nos bairros da zona Leste da cidade de Manaus-AM (SISBIO/21264-3), para isso foram utilizados 20 armadilhas de oviposição, denominadas ovitrampas. Essas armadilhas são constituídas de vasos plásticos de coloração preta, medindo nove cm de altura, com capacidade de 500 mL (Figura IV-1). No interior das ovitrampas foram colocadas palhetas do tipo *Duratree* com cinco mm de espessura, 15 cm de comprimento por três cm de largura, colocadas verticalmente, com o lado áspero voltado para cima, de modo a propiciar substrato para atividade de oviposição das fêmeas. Como atrativo para as fêmeas, foi adicionado nas armadilhas 300 mL de infusão de gramíneas, preparadas a partir de 34g de capim Colômbio (*Megathyrsus maximus*) em oito litros de água, fermentado por sete dias, em temperatura ambiente.

Figura IV- 1 – Ovitrapas utilizadas para a captura de ovos de *Aedes aegypti*.



Fonte: Almeida, S.P. 2017

Após sete dias de permanência nos domicílios as armadilhas foram recolhidas e transportadas para o insetário de *Ae. aegypti* do Laboratório de Malária e Dengue, no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). As palhetas foram colocadas para secar e, em seguida, foram verificadas em microscópio estereoscópico, com o objetivo de observar a

presença de ovos. As palhetas contendo ovos foram colocadas em bacias contendo água para eclosão das larvas. Em seguida, as larvas foram transferidas para recipientes de plásticos contendo água, as mesmas foram alimentadas diariamente com a ração para rato (Teklad Global 18 %) e ração para gato (Whiskas), na proporção de 1:1 (Figura IV-2). A cada dois dias foi feita a troca de água, seguindo a metodologia de rotina do Laboratório de Malária e Dengue (PINHEIRO; TADEI, 2002). As larvas foram mantidas até atingirem o estágio de pupa, as quais foram transferidas para gaiolas de criação, para emergência dos adultos.

Figura IV- 2 – Criação das larvas de *Aedes aegypti* em laboratório.



Fonte: Almeida, S.P. 2017

Os adultos obtidos foram identificados com auxílio de chaves específicas (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; WRBU, 2017) e, posteriormente, os indivíduos identificados como *Ae. aegypti* foram transferidos para gaiolas, sendo colocados indivíduos machos e fêmeas para reprodução e obtenção da geração F₁. Os adultos foram alimentados com solução açucarada à 10%, contida em *erlenmeyer* com algodão umedecido e, para as fêmeas, duas vezes por semana foi oferecido repasto sanguíneo com a utilização do hamster (*Mesocricetus auratus*) devidamente anestesiado (CEUA-026/2016), colocado em cima da gaiola de criação dos mosquitos por aproximadamente 30 minutos (Figura IV-3).

Figura IV- 3 – Repasto sanguíneo das fêmeas de *Aedes aegypti* em laboratório.



Fonte: Almeida, S.P. 2017

Nas gaiolas de criação dos mosquitos foi colocado um copo plástico de 100 mL, contendo água e uma fita de papel de filtro em sua parede interna, para servir como substrato de oviposição para as fêmeas. Os ovos colocados foram transferidos para as bacias de plásticos, as larvas obtidas (larvas geração F₁) foram mantidas até atingirem o terceiro instar e, neste momento, foram separadas para utilização em bioensaios. As demais larvas continuaram mantidas nas bacias de poliestireno e seguiram o mesmo processo de criação mencionado anteriormente (PINHEIRO; TADEI, 2002). As fêmeas da geração F₁ foram utilizadas nos testes de prova em garrafas para avaliar a atividade inseticida dos óleos essenciais, realizados com a espécie em estudo.

Também foram obtidos ovos da cepa Rockefeller, linhagem utilizada como referência de susceptibilidade para comparação das mortalidades de *Ae. aegypti*, mantidos no laboratório de Malária e Dengue do INPA, para os quais seguiu-se o mesmo procedimento de criação já descrito acima.

No insetário onde foi realizada a criação dos mosquitos, as condições foram controladas, temperatura de 27 °C, umidade relativa em torno 70- 80 % e fotoperíodo de 12 horas (SCARPASSA; TADEI, 1990).

2.1.2 Coleta e manutenção de larvas de *Anopheles* spp. e adultos de *Anopheles darlingi*.

Foram realizadas coletas de larvas de *Anopheles* spp. e adultos de *An. darlingi* na cidade de Manaus/AM (SISBIO/21264-3). As coletas das larvas foram realizadas em criadouros naturais da Zona Leste de Manaus, bairro Puraquequara - Km 9 (Km 9 03°03'09.1"S 59°52'12.6"W), com a utilização de conchas entomológicas. As larvas de *Anopheles* ssp.

coletadas foram transferidas para bacias de poliestireno contendo água e transportadas para insetário de *Anopheles* do Laboratório de Malária e Dengue no INPA. No insetário, três vezes por semana foram realizadas trocas de água e as larvas foram alimentadas com ração de peixe (Tetramim® e Goldfish®), na proporção 1:1, seguindo a metodologia de criação do Laboratório de Malária e Dengue (SANTOS et al., 1981, SCARPASSA; TADEI, 1990). As larvas foram mantidas até atingirem o terceiro instar, posteriormente selecionadas para a realização de bioensaios.

Os espécimes de *An. darlingi* foram obtidos por meio de coletas de adultos, em residências situadas na Zona Leste da cidade de Manaus, Ramal do Brasileirinho (Cristo Vive 03°01'33.1"S 59°51'07.7"W). As coletas foram realizadas entre 18h e 21h, pelo método de atração humana com proteção, os adultos coletados foram acondicionados em copos parafinados de 1000 mL cobertos com filó preso com liga de borracha e transportados para o insetário do Laboratório de Malária e Dengue no INPA. No insetário, para as fêmeas foi ofertado repasto sanguíneo em hamster *Mesocricetus auratus* (CEUA-026/2016), sendo que as fêmeas totalmente ingurgitadas foram colocadas para ovipositar em copos individuais, coberto com filó e preso com liga de borracha, contendo no fundo do copo um papel filtro umedecido com água destilada e acondicionado em isopor por três dias (Figura IV-4), seguindo-se o protocolo de manutenção de anofelinos do Laboratório.

Figura IV- 4 – Oviposição das fêmeas de *Anopheles darlingi*.

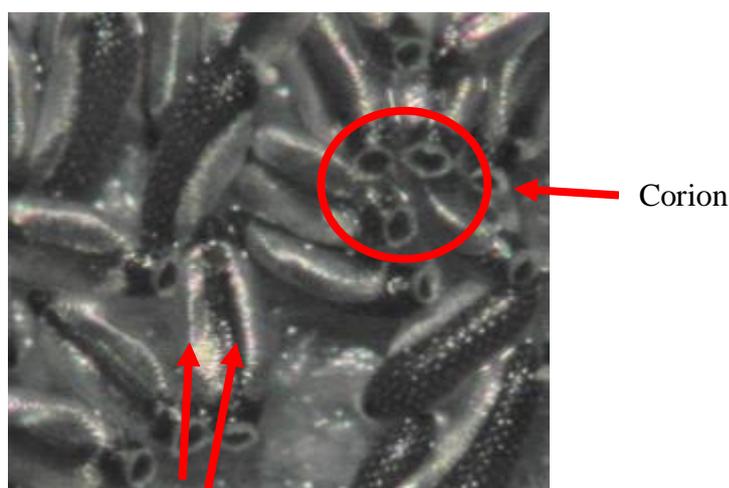


Fonte: Almeida, S.P. 2017

Os ovos identificados com a utilização de chaves específica Faran (1981), após a confirmação da espécie *An. darlingi*, foram colocados em bandejas de plásticos com as laterais

contendo papel filtro para aderência dos ovos. As larvas que eclodiram receberam os mesmos cuidados mencionadas anteriormente para os imaturos coletados diretamente nos criadouros e, quando atingiram o terceiro instar, foram utilizadas nos bioensaios. Na figura abaixo se observa as características principais dos ovos de *An. darlingi*, com desta na demonstração do córion, em forma de coroa e o do flutuador (Figura IV-5).

Figura IV- 5 – Estrutura dos ovos de *Anopheles darlingi*.



Fonte: Almeida, S.P. 2017

Flutuadores

2.1.3 Bioensaios para avaliar atividade larvicida em *Aedes aegypti* e *Anopheles darlingi*.

Os bioensaios para avaliar atividade larvicida seguiram o protocolo de Dulmage et al., (1990), com modificações. Foram realizados bioensaios seletivos com o objetivo de detectar toxicidade acima de 50 % de óleos essenciais e extratos de folhas e flores de *H. dilatata*, contra larvas de *Ae. Aegypti* e *An. darlingi*.

Foram testados óleos e extratos das folhas e flores de *H. dilatata* obtidos nos períodos seco e chuvoso, nos horários da manhã, tarde e noite, da seguinte forma: para as folhas, foram testados seis óleos essenciais, três obtidos de coletas do período seco, sendo um de cada horário (manhã, tarde e noite), três coletas no período chuvoso (manhã, tarde e noite) e quatro extratos, sendo dois do período seco (hexânico e etanólico) e dois do período chuvoso (hexânico e etanólico). Em relação às flores foram testados dois tipos óleos essenciais, um obtido no período seco e outro de coleta do período chuvoso e quatro extratos, sendo dois do período seco (hexânico e etanólico) e dois do período chuvoso (hexânico e etanólico).

2.1.4 Bioensaios seletivos com larvas de *Aedes aegypti*, da cepa Rockefeller e com larvas de *Anopheles* spp.

Os bioensaios seletivos foram realizados com larvas de terceiro instar de *Aedes aegypti* da geração F1, da cepa Rockefeller e com larvas de *Anopheles* spp. Na realização dos bioensaios seletivos, para cada óleo ou extratos foram preparadas a concentração de 500 µg/mL. As respectivas massas foram pesadas em balança analítica (modelo BP210D e marca Sartorius®) e diluídas a 1000 µL em solvente DMSO.

Cada amostra foi testada em triplicata e, em cada uma, foi utilizado um copo descartável com capacidade de 50 mL, contendo 10 mL de água destilada, 10 larvas de terceiro instar, alimento em pó e 100 µL da concentração testada. As leituras de mortalidade ocorreram nos intervalos de 24 horas, 48 horas e 72 horas e como controles negativo foram utilizados DMSO e água destilada.

As amostras que apresentaram mortalidade igual ou superior a 50 % foram utilizadas nos bioensaios de dose para cálculo da concentração letal mediana (CL₅₀).

2.1.5 Bioensaios de Dose com larvas de *Aedes aegypti* e de *Anopheles* spp.

Os bioensaios de dose foram preparados de acordo com os resultados obtidos nos bioensaios seletivos. Em cada dose testada, foram montadas réplicas de três copos plásticos com capacidade de 50 mL, contendo 10 mL de água destilada, alimento, 10 larvas de terceiro instar de *Ae. aegypti* e de *An. darlingi*. Os tratamentos tiveram diferentes concentrações e nos controles negativos continham somente água destilada com DMSO. O controle positivo utilizado foi o inseticida químico Temefós, realizado em três réplicas, em uma concentração de 0,012 µg/mL. Todos os tratamentos tiveram três repetições, em dias alternados.

Após a aplicação dos extratos e do óleo essencial ocorreram as avaliações dos bioensaios, por meio da contagem das larvas vivas e mortas, nos intervalos de 24 horas, 48 horas e 72 horas.

Os índices de mortalidade observados nos controles negativos serviram como base para verificar a mortalidade natural das larvas que, segundo Dulmage et al. (1990), não pode ultrapassar 10%.

2.1.6 Análise dos dados

Os dados da mortalidade obtidos dos bioensaios de dose foram utilizados para determinação das concentrações letais medianas (CL₅₀) e realizada pela análise de *probit*

(FINNEY, 1971) considerando o nível de significância de 95%, calculada com auxílio do programa POLO PLUS® (LEORA, 2003) por meio de regressão linear dose-resposta.

2.1.7 Teste da atividade aduicida com óleo essencial, pelo método de prova biológica com garrafas - padrão CDC

O óleo essencial da folha coletada no período chuvoso no horário da noite foi avaliado quanto à atividade inseticida em mosquitos adultos, pois para esse óleo foi obtido menor valor de CL_{50} para larvas de *Ae. aegypti*. Para isso foi utilizado o teste de prova biológica de garrafa, seguindo-se a metodologia descrita por Brogdon e McAllister (1998), com modificações.

Na realização do teste foram utilizadas garrafas com capacidade de 250 ml, contendo uma tampa de rosca, previamente lavadas com sabão neutro e água, autoclavadas e secas em estufa a 60°C, por 40 minutos. Após este procedimento, as garrafas foram identificadas e etiquetadas conforme cada concentração a ser avaliada, e foram testadas cinco concentrações-1000, 500, 250, 125, 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

As concentrações foram preparadas a partir de 1mL de cada solução do óleo essencial de *H. dilatata*, solubilizada em acetona, sendo posteriormente utilizadas para impregnar a parede das garrafas, que foram deixadas deitadas e cobertas com papel toalha, por 24 h para evaporação do solvente.

Cada concentração foi testada em quadruplicata e, em cada garrafa, foi colocada 15 fêmeas dos mosquitos adultos que foram alimentadas 12 horas antes do teste (Figura IV-6). Como controle positivo foi utilizado o inseticida Lambdacialotrina na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e como controle negativo foi colocada uma garrafa contendo apenas 1 mL de acetona.

O teste foi realizado em três repetições, em dias alternados, em condições de temperatura 28 \pm 2°C e umidade relativa do ar 80%. As leituras foram realizadas de 15 em 15 minutos até completar 90 minutos, sendo registrado o número de indivíduos mortos e sob o efeito *Knockdown* (imobilidade de movimentos), em cada concentração.

Figura IV- 6 – Garrafas impregnadas contendo as fêmeas de *Aedes aegypti*.



Fonte: Almeida, S.P. 2017

2.1.8 Protótipo do Produto com óleo essencial de *H. dilatata* para teste inseticida do mosquito *Aedes aegypti*.

2.1.8.1 Desenvolvimento do Protótipo do Produto

O protótipo e o teste de eficácia do inseticida para mosquito foi desenvolvido segundo o protocolo da ANVISA (BROGDON; CHAN, 2013), com modificações.

O protótipo do produto foi realizado na concentração de 5% para o volume de 10 mL. Contendo 0,5 mL do óleo essencial da folha *H. dilatata* coletada no período chuvoso no horário da noite, 7,5 mL de álcool etílico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), 1 mL de acetona (CH_3COCH_3) e 1mL de água destilada.

2.1.8.2 Avaliação da Eficácia do Protótipo do Produto

No desenvolvimento do teste utilizou-se 5 gaiolas de papelão novas (Figura IV-7), com medidas aproximadamente de 17 cm de diâmetro e 17 cm de altura, cobertas com tela. Quatro gaiolas foram impregnadas com o protótipo do produto e uma foi utilizada como controle negativo. Após a aplicação do produto, em cada gaiola foram colocadas 15 fêmeas de *Ae. aegypti* com cinco dias de idade. As fêmeas foram previamente alimentadas por meio de repasto sanguíneo de hamster *Mesocricetus auratus* (CEUA-026/2016) 24 horas antes do teste. Como controle negativo foi utilizado 1 mL de acetona e 9 mL de álcool etílico.

Logo depois da soltura das fêmeas foi realizada leitura nos tempos de 1, 5, 10, 15 e 20 minutos e também nos tempos de 4, 8, 12 e 24 horas, para avaliar o efeito *knockdown* (posição

em que o inseto se encontra sobre o efeito do produto aplicado, tombado na superfície do fundo da gaiola). O teste foi realizado em temperatura de 25,7 °C, com umidade do ar de 56%.

Figura IV- 7 – Testes de atividade inseticida do protótipo do produto do óleo essencial de *Hyptis dilatata* para o controle de adultos de *Aedes aegypti*.



Fonte: Almeida, S.P. 2017

2.1.8.3 Análise Estatística

A mortalidade e o efeito *knockdown* das fêmeas no teste aduicida do óleo essencial foram analisados por meio do teste de Kruskal Wallis, e em seguida pelo teste de Dunn. O efeito *Knockdown* do protótipo do produto foi analisado nos diferentes intervalos de tempo, submetidos à análise de Variância (ANOVA). As análises foram realizadas no programa estatístico BioEstat versão 5.0 for Windows, com nível de significância de 5 % ($\alpha = 0,05$) (AYRES et al., 2007).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da atividade larvicida

3.1.1 Bioensaio seletivo com larvas de *Aedes aegypti*, da cepa Rockefeller e de *Anopheles* spp.

Nos óleos essenciais das folhas da espécie *H. dilatata*, foi verificada mortalidade de 100 % para o *Ae. aegypti* e para a cepa Rockefeller as duas linhagens de mosquitos de *Ae.*

aegypti. No entanto, os extratos hexânicos e etanólicos dos períodos seco e chuvoso, não mostraram toxicidade tanto para *Ae. aegypti* como para a cepa as duas linhagens de Rockefeller.

Quanto às flores, os óleos essenciais dos períodos seco e chuvoso também apresentaram atividade larvicida de 100% tanto para o *Ae. aegypti* como para a cepa Rockefeller. Em relação aos extratos, o etanólico também não indicou toxicidade para o *Ae. aegypti* como para a cepa Rockefeller, enquanto que o extrato hexânico mostrou atividade nos dois períodos climáticos, sendo os valores de mortalidade para *Ae. aegypti* (seco: 83,3%; chuvoso: 76,7%) e para cepa Rockefeller (seco:90%; chuvoso:80%).

Os percentuais de mortalidade de larvas de *Ae. aegypti* e da cepa Rockefeller obtidos com a utilização de óleos e extratos de *H. dilatata* foram semelhantes, conforme descritos acima. Levando em consideração que a cepa Rockefeller é referência em susceptibilidade (WHO, 2006), esses dados evidenciam que a linhagem de *Ae. aegypti* utilizada para os testes de toxicidade não tinham resistência natural aos óleos essenciais e extratos de *H. dilatata*.

Em relação aos testes com *Anopheles* spp. foram avaliados os óleos essenciais extraídos das folhas e flores, coletadas no período seco e chuvoso nos três horários. Todos os óleos essenciais utilizados apresentaram toxicidade acima de 50 % e foram utilizados para determinar as concentrações letais da CL₅₀. Nos controles negativos (DMSO, H₂O), os testes com óleos essenciais e com extratos para *Ae. aegypti* e *Anopheles* spp., a mortalidade foi inferior a 10%.

Na literatura encontram-se referências sobre plantas que mostram atividade inseticida para mosquitos e se constituem em material valioso para a obtenção de novos inseticidas. Os resultados obtidos nesse trabalho evidenciam o potencial que *H. dilatata* apresenta para o controle de larvas de mosquitos de *Ae. aegypti* e de espécies do gênero *Anopheles*.

Na literatura há descrições de espécies de plantas que apresentam atividade larvicida, seja na forma de extratos, seja na forma de óleo essencial, extraídos de diferentes estruturas das plantas (GOMES, 2016; PORTO et al., 2017). Estudo realizado com extrato aquoso de sementes da espécie *Caesalpinia ferrea* Mart, conhecida como Jucá ou pau de ferro, apresentou 85% de mortalidade para larvas de *Ae. aegypti* (CAVALHEIRO et al., 2009). No entanto, em relação à espécie em estudo neste trabalho - *H. dilatata*, o extrato hexânico da flor coletada no período seco, mostrou percentual mais elevado – 95% de mortalidade, tanto para *Ae. aegypti* como para a cepa Rockefeller.

Extratos das folhas com baixa toxicidade para mosquitos foi relatado também por Coelho et al. (2009), em estudos com duas espécies *Guarea guidonia* (L.) Sleumer e *Guarea kunthiana* A. Juss, para as quais não foi observada atividade larvicida. Dados semelhantes

foram obtidos neste trabalho, pois extratos das folhas de *H. dilatata* não foram tóxicos para larvas de *Ae. aegypti*, para a cepa Rockefeller e *Anopheles* spp., como relatado anteriormente.

Óleos essenciais com elevada toxicidade para larvas de mosquitos foi relatado também por França (2015), que testou óleos essenciais de folhas e flores da espécie *Piper capitarianum* Yunck 1966. Os resultados mostraram índice de mortalidade de aproximadamente 100% para as larvas de *Ae. aegypti*, da cepa Rockefeller de *Anopheles* spp.

3.1.2 Bioensaios de dose para *Aedes aegypti* e *Anopheles darlingi*.

Considerando os valores da CL_{50} obtidos para óleos extraídos das folhas coletadas nos períodos seco e chuvoso, verifica-se que os óleos essenciais do horário da noite, nos dois períodos climáticos foram mais tóxicos para as larvas de *Ae. aegypti*. Na avaliação de 24 horas foram obtidas a CL_{50} de 47,02 $\mu\text{g/mL}$ e $CL_{50} = 55,69$ para os óleos extraídos das folhas coletadas no horário da noite, nos períodos chuvoso e seco, respectivamente. Nas leituras de 48 e 72 horas, os valores da CL_{50} , respectivamente no horário da noite no período chuvoso foram 45,71 $\mu\text{g/mL}$ e 40,10 $\mu\text{g/mL}$ e no horário da noite do período seco nas leituras de 48 horas – 44,26 $\mu\text{g/mL}$ e em 72 horas- 40,35 $\mu\text{g/mL}$. Óleo da folha coletado no horário da tarde, no período seco foi o que apresentou menor toxicidade com valor de CL_{50} 83,74 $\mu\text{g/mL}$ (TabelaIV-1).

Tabela IV- 1 – Valores de CL50 em mg/L dos óleos essenciais de *Hyptis dilatata* contra larvas de *Aedes aegypti* nos intervalos de observação de 24, 48 e 72 horas.

Óleo	24h (IC 95 %)	χ^2	Slope \pm SE	48h (IC 95 %)	χ^2	Slope \pm SE	72h (IC 95 %)	χ^2	Slope \pm SE	GL
FMC	68,75 (57,88-76,17)	7,45	7,81 (0,78)	64,63 (53,15-71,50)	5,86	7,38 (0,81)	59,92 (41,16-68,53)	6,28	6,15 (0,78)	3
FMS	59,56 (55,34 -62,90)	1,02	9,33 (0,97)	58,26 (53,82-61,71)	1,84	9,33 (1,01)	57,32 (52,62 -60,92)	2,22	9,12 (1,02)	4
FTC	59,70 (53,85-67,16)	4,70	6,34 (0,52)	59,47 (54,35-65,93)	3,07	5,62 (0,49)	56,84 (53,86-60,16)	2,57	5,69 (0,48)	3
FTS	83,74 (74,79- 99,37)	2,56	4,07 (0,58)	76,67 (68,78-89,11)	0,66	3,72 (0,47)	69,94 (63,52- 79,12)	0,26	3,87(0,46)	3
FNC	47,02 (37,99-55,75)	6,79	5,87 (0,43)	45,71 (38,91-52,50)	4,24	6,02 (0,45)	40,10 (32,56-47,83)	5,04	5,21 (0,38)	4
FNS	55,69 (44,20-61,78)	3,19	8,74 (1,27)	44,26 (32,84-53,63)	6,36	5,56 (0,46)	40,35 (27,64-51,57)	9,28	4,98 (0,38)	3
FLC	56,55 (45,46-61,48)	4,32	12,00 (1,66)	55,57 (51,08-58,35)	0,65	13,82 (2,23)	55,57 (51,08-58,35)	0,65	13,82 (2,23)	3
FLS	79,16 (65,55-93,24)	13,42	8,06 (0,66)	69,34 (59,49-78,84)	7,70	6,85 (0,53)	66,29 (55,62-76,27)	8,15	6,29 (0,50)	3
Extratos										
FLHC	216,18 (193,96-236,42)	0,54	5,96 (0,53)	167,83 (128,99-210,42)	6,26	4,64 (0,32)	167,56 (106,63-240,70)	14,74	5,14 (0,37)	3
FLHS	238,17 (223,31-253,48)	1,17	4,67 (0,47)	198,67 (181,72-213,59)	1,98	4,10 (0,38)	152,21 (128,02-170,40)	1,17	3,61 (0,49)	
Temefós										
	NC			0,002 (0,001-0,003)	15,07	2,82 (0,02)	0,002 (0,001-0,00)	8,76	2,80 (0,22)	3

* FMC- Folha manhã chuvoso; FMS – Folha manhã seco; FTC – Folha tarde chuvoso; FTS – Folha tarde seco; FNC – Folha noite chuvoso; FNS – Folha noite seco; FLC –Flor do período chuvoso; FLC – Flor do período seco; Flor: extrato hexano chuvoso; Flor: extrato hexano seco; χ^2 – Qui-quadrado; * SE-Erro padrão; * IC- Intervalo de confiança; GL- *Grau de liberdade.

Em relação à flor, o óleo essencial mais tóxico foi o extraído do período chuvoso, com valor de $CL_{50} = 56,55 \mu\text{g/mL}$ na leitura de 24 horas e $55,57 \mu\text{g/mL}$ nas leituras de 48 e 72 horas. Os extratos hexânicos foram os menos tóxicos, para os quais os valores de CL_{50} foram três vezes maiores que o obtido para os óleos essenciais (Tabela IV-1). Para os extratos hexânicos os valores da CL_{50} foram $216,18 \mu\text{g/mL}$ e $238,17 \mu\text{g/mL}$, na leitura de 24 horas, com 48 horas os valores foram de $167,83 \mu\text{g/mL}$ e $198,67$, nos períodos seco e chuvoso, respectivamente (Tabela IV-1).

O inseticida temephós, usado como controle positivo, apresentou $CL_{50} = 0,0024 \mu\text{g/mL}$ na leitura de 48 horas, e $CL_{50} = 0,012 \mu\text{g/mL}$ na leitura de 72 horas e o controle negativo DMSO/H₂O mostraram mortalidade $\leq 5\%$. Considerando as leituras de 24, 48, 72 horas, todas as amostras de óleos essenciais e extratos hexânicos testados nos ensaios com *Ae. aegypti*, se adequaram à análise de probit em pelo menos um intervalo de leitura.

Comparando-se a espécie da planta em estudo, com outra espécie do mesmo gênero *Hyptis*, em relação ao resultado da CL_{50} para as larvas de *Ae. aegypti*, a *Hyptis pectinata* L. Poit apresentou CL_{50} de 366mg/L para os óleos essenciais da folha (ROSA et al., 2106). No entanto a CL_{50} dos óleos essenciais das folhas de *H. dilatata* apresentou uma toxicidade maior frente às larvas de *Ae. aegypti*. Outra espécie estudada que apresentou a CL_{50} do óleo essencial maior do que a encontrada nos óleos essenciais das folhas e flores de *H. dilatata* foi a espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi mostrando $CL_{50} = 173,34 \mu\text{g/mL}$, no óleo do fruto (COLE, 2008).

Nos bioensaios com as larvas de *An. darlingi*, o óleo essencial da flor coletada no período seco foi o que mostrou maior toxicidade - $CL_{50} = 169,68 \mu\text{g/mL}$ na leitura de 24 horas, seguido do óleo essencial da folha coletada no horário da manhã, período seco, para o qual o valor de CL_{50} foi $189,28 \mu\text{g/mL}$. Na leitura de 48 horas as CL_{50} foram $154,36 \mu\text{g/mL}$ e $151,83 \mu\text{g/mL}$ para ambos os óleos essenciais, respectivamente. O óleo essencial da flor coletada no período chuvoso foi o menos tóxico e o valor obtido foi $CL_{50} = 290,87 \mu\text{g/mL}$ (Tabela IV-2). Na avaliação da atividade larvicida com os óleos essenciais para *An. darlingi*, tomando como base os valores de CL_{50} , verifica-se que todos os óleos essenciais se adequaram à análise de *probit*, pelo menos em uma leitura com intervalo de confiança de 95% (Tabela IV-2). O controle positivo Lambdacialotrina 5CE resultou em 100% de mortalidade das larvas, portanto não foi possível calcular a CL_{50} , e o controle negativo apresentou mortalidade $\leq 5\%$.

Tabela IV- 2 – Valores de CL50% nos óleos essenciais de *Hyptis dilatata* contra larvas de *Anopheles darlingi* nos intervalos de observação de 24, 48 e 72 horas.

* FMC- Folha manhã chuvoso; FMS – Folha manhã seco; FTC – Folha tarde chuvoso; FTS – Folha tarde seco; FNC – Folha noite chuvoso; FNS – Folha noite seco; FLC –

Óleo	24h (IC 95%)	χ^2	Slope \pm SE	48h (IC 95%)	χ^2	Slope \pm SE	72h (IC 95%)	χ^2	Slope \pm SE	GL
FMC	274,71 (258,81 - 288,64)	2,374	8,72 (1,16)	220,17 (207,46 - 233,57)	2,94	5,79 (0,44)	196,97 (185,19 - 209,09)	0,56	5,71 (0,45)	3
FMS	189,28 (164,23 - 213,94)	3,31	4,38 (0,38)	151,83 (135,95 - 166,00)	2,73	3,88 (0,39)	141,05 (126,43 -153,76)	2,12	4,34 (0,45)	3
FTC	244,77 (199,68 - 279,57)	5,28	5,92 (0,54)	222,95 (148,92 - 268,49)	8,43	5,51 (0,56)	221,76 (176,40 - 254,04)	4,95	6,17 (0,62)	3
FTS	217,95 (170,47 - 273,43)	4,82	2,84 (0,26)	160,21 (121,76 - 191,60)	5,90	4,08 (0,39)	177,90 (156,96 - 197,32)	1,27	2,88 (0,32)	3
FNC	280,85 (254,29 - 303,95)	0,44	6,86 (0,79)	219,88 (149,72 - 347,82)	20,28	4,75 (0,35)	NC	NC	-	3
FNS	210,95 (191,81 - 230,44)	2,95	4,82 (0,43)	207,16 (129,36 - 427,60)	13,60	2,50 (0,23)	137,46 (81,47-225,57)	14,83	2,87 (0,20)	3
FLC	290,87 (275,32 - 307,69)	1,56	6,65 (0,53)	252,66 (227,86 - 281,17)	10,27	6,88 (0,51)	NC	NC	-	5
FLS	169,68 (119,51 - 213,92)	8,45	3,98 (0,32)	154,36 (108,45 - 193,73)	7,62	4,00(0,34)	151,04 (108,79 - 187,56)	7,11	4,16 (0,35)	3

Flor do período chuvoso; FLC –Flor do período seco; * χ^2 – Qui-quadrado; * SE-Erro padrão; * IC- Intervalo de confiança; GL- *Grau de liberdade.

Outros autores têm demonstrado atividade larvicida de substâncias extraídas de plantas, para larvas de *An. darlingi*, obtendo-se valores variáveis da CL₅₀ (MESQUITA, 2012). Estudo de atividade larvicida de substâncias derivadas do neonicotinoides mostrou que as larvas de *An. darlingi* foram susceptíveis à substância sintetizada 3- hidroxipiridina 6-cloro 2- aminotiemetil hidrazina, para qual o valor da CL₅₀= 503 ppm, no intervalo de 48 horas (MESQUITA, 2012). O óleo essencial extraído da flor de *H. dilatata* coletada no período seco, testado nas larvas de terceiro instar, mostrou maior toxicidade em comparação e apresentando a CL₅₀=169,68µg/mL, no intervalo de 24 horas, valor este menor do que a substância derivada dos neonicotinoides. Portanto, sendo promissor como inseticida natural para as larvas de *An. darlingi*.

Resultados semelhante também foram demonstrados com o óleo essencial da folha de *P. capitarianum*, que apresentou CL₅₀ de 141,45 µg/mL sobre as larvas de *Anopheles* ssp., em 24 horas de exposição (FRANÇA, 2015). Esses dados corroboram com o encontrado nesse estudo para os óleos essenciais das flores, coletadas no período seco, em larvas de *An. darlingi*.

O horário de coleta das folhas e flores das plantas pode estar relacionado com o período de maior concentração das substâncias com ação inseticida, produzidas pelas plantas. Considerando *H. dilatata*, objeto de análise deste trabalho, os óleos essenciais da folha e flor, coletados no período chuvoso, foram os mais tóxicos. Quanto aos óleos essenciais da folha, é importante considerar ainda que o horário da noite mostrou melhores resultados para *Ae. aegypti*. Por outro lado, para *An. darlingi*, os óleos da folha e flor do período seco mostraram maior toxicidade. Em relação ao horário, constatou-se que as folhas coletadas pela manhã foram as que apresentaram maior atividade inseticida.

A maior toxicidade da folha ou flor está relacionada com os tipos e percentuais de constituintes químicos, presentes nos óleos essenciais das plantas. No geral as substâncias presentes nesses vegetais estão relacionadas com mudanças da temperatura e umidade, ao longo do dia (MELO et al., 2011).

Em relação do período da coleta das folhas e flores, com a presença de constituintes químicos de ação larvicida, é de extrema importância para indicar os melhores horários e períodos para proceder a coleta de material para a realização dos bioensaios, com larvas de mosquitos. Estudos realizados com o óleo essencial das folhas da goiabeira *Psidium guajava* L., coletadas em diferentes horários do dia, mostraram que não houve diferença na constituição química, de forma qualitativa em relação ao horário,

mas verificou-se que houve maior porcentagem de sesquiterpeno e monoterpeno em diferentes horários, grupos que apresentam ações inseticidas (SILVA et al., 2016).

Santos et al. (2006) estudaram os óleos essenciais das espécies da família Boraginaceae e verificaram que os constituintes monoterpenos e sesquiterpeno estão relacionados com a elevada atividade larvicida destas plantas, contra larvas de *Ae. aegypti*.

Em relação ao óleo essencial de *H. dilatata*, como demonstrado neste trabalho (Capítulo 3), a caracterização química permitiu verificar que nos óleos essenciais, a porcentagem de monoterpenos é maior que os sesquiterpenos, contudo não foi verificada diferença entre os constituintes, em relação ao período de coleta. Por outro lado, é importante ressaltar que o óleo da folha coletado em horário noturno e no período chuvoso, selecionado para o teste adulticida, apresentou uma maior toxicidade nas larvas de *Ae. aegypti*.

Em várias espécies de plantas, Maciel et al. (2010) relataram que em testes fitoquímicos foi possível constatar a presença de fenóis, flavonóides, cumarinas, alcalóides, que contribuem como ação tóxica, em diversas espécies de artrópodes. Estes metabólitos são substâncias que podem estar relacionadas com a mortalidade nos ensaios larvicidas, pois por meio da triagem fitoquímica, com os extratos hexânicos e etanólicos da espécie *H. dilatata*, (capítulo 1), estes metabólitos citados acima se mostram presentes na espécie.

Os estudos em *Hyptis fruticosa* e *Lippia gracillis* com larvas de *Ae. aegypti* mostraram a CL₅₀ de 502 ppm e 98 ppm, respectivamente. As análises dos resultados permitiram verificar que a espécie *L. gracillis* foi a mais tóxica, apresentando na constituição do seu óleo 80,25% de monoterpenos e 18,14% de sesquiterpenos, enquanto a *H. fruticosa* mostrou 36,58% de monoterpenos e sesquiterpeno 54,70% (SILVA et al., 2008).

A ação sinérgica dos constituintes químicos é outro fator importante na atividade larvicida (DIAS; MORAES, 2014; ROSA et al., 2016). Nas espécies *Guatteria friesina* e *Guatteria blephorophylla* os constituintes do óleo essencial β -eudesmol e óxido cariofileno não apresentaram atividade larvicida quando foram testados isoladamente, por outro lado, o óleo essencial com todos os seus compostos teve toxicidade (CHENG et al., 2009).

Os óleos essenciais de *H. dilatata* testados contra as larvas de *Ae. aegypti* e *An. darlingi* apresentaram diferentes constituintes químicos, sendo que o composto fenchona

foi detectado em maior quantidade. Outros constituintes também foram detectados nos óleos, mesmo em menor quantidade, como α -pineno e 3-careno. Para estes constituintes já foram comprovadas a atividade inseticida e estes compostos podem ter atuado em sinergismos, na toxicidade dos óleos essenciais testados (VIEGAS-JÚNIOR, 2003).

3.2 Teste adulticida com *Aedes aegypti*

3.2.1 Teste de prova biológica com garrafas padrão – CDC

O óleo essencial extraído da folha de *H. dilatata* coletada no período chuvoso horário da noite foi utilizado para avaliar a atividade adulticida em *Ae. aegypti* e também para teste como protótipo do produto. Esse óleo apresentou maior toxicidade nos bioensaios de atividades larvicida, obtendo a menor CL_{50} .

O óleo essencial foi ativo após 15 minutos de exposição em todas as concentrações, causando mais de 50% de mortalidade (Tabela IV-3). Nesse intervalo de leitura, mesmo na menor concentração 62,5 $\mu\text{g/ml}$ houve mortalidade (54,4%) com média ($8,2 \pm 1,3$), nas demais concentrações, entre 125 a 500 $\mu\text{g/mL}$ a mortalidade variou entre 62% a 86% (Tabela 3).

Os demais tempos tiveram mortalidade entre 50 a 70,6%, contudo, a mortalidade observada em 15 minutos de exposição não mostrou diferença significativa em relação aos tempos de 60, 75 e 90 minutos ($H=40,99$; $GL=5$; $P=0.0001$).

A maior porcentagem de mortalidade ocorreu na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, no tempo de 90 minutos (91,1%), não havendo nesta concentração diferença significativa nos tempos de 15 a 45 minutos, e entre 60 a 90 minutos. É importante ressaltar que a mortalidade na concentração de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ foi muito semelhante ao obtidos para as concentrações mais altas, em todos os tempos de leitura (Tabela IV-3). Não houve mortalidade no controle negativo acetona e o controle positivo Lambdacialotrina 5CE registrou-se 100% de mortalidade das larvas.

Tabela IV- 3 – Média e desvio padrão da mortalidade de *Aedes aegypti*, por tempo de exposição do óleo essencial da folha de *Hyptis dilatata* coletada no período chuvoso, no horário da noite.

Concentração µg/Ll	Tempo (Minuto)						P
	15	30	45	60	75	90	
62,5	8,2 ± 1,3 ^a	8,7 ± 0,6 ^a	9,6 ± 0,6 ^{ab}	10,0±0,6 ^b	10,2 ±0,5 ^b	10,6 ± 1,0 ^b	0,0001
125	9,4 ± 1,0 ^a	9,8 ± 0,8 ^a	10,5 ± 0,8 ^{ab}	10,9 ± 0,7 ^{ab}	11,5 ± 0,5 ^b	11,7 ± 0,4 ^b	0,0001
250	9,5 ± 0,8 ^a	10,6 ± 0,8 ^{ab}	11,0 ± 0,7 ^{ac}	11,6 ± 0,9 ^{bc}	12,2 ± 0,6 ^c	12,3 ± 0,5 ^c	0,0001
500	9,8 ± 1,5 ^a	10,7± 0,5 ^a	11,4 ± 0,7 ^{ab}	12,2 ±0,8 ^{bc}	12,6 ± 0,6 ^{bc}	12,9 ± 0,7 ^c	0,0001
1000	10,8 ±0,7 ^a	11,5±0,8 ^{ab}	12,1±0,7 ^{ac}	12,5±0,8 ^{bc}	13,1 ± 0,5 ^c	13,7 ±0,8 ^{cd}	0,0001

*Letras diferentes na horizontal indicam diferença para o teste de contraste de médias pelo procedimento de Dunn.

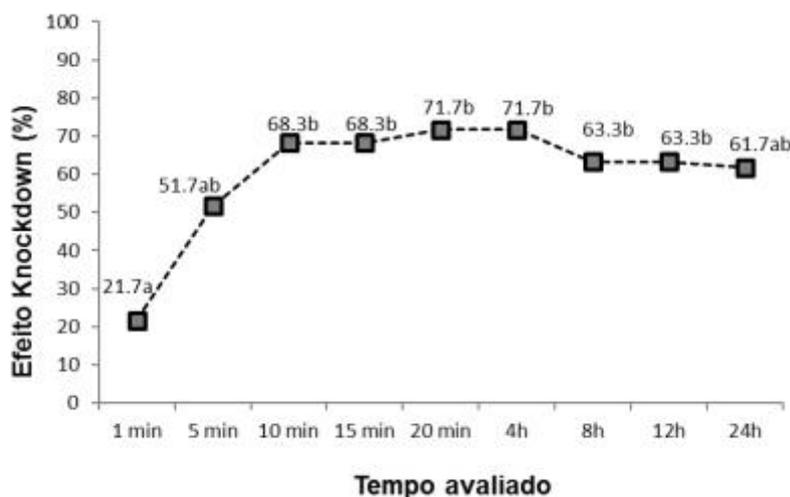
3.2.2 Teste do protótipo do produto

Observou-se que o produto teve ação para os mosquitos logo nos minutos iniciais de exposição (Figura IV-8). Houve variação do efeito *knockdown* entre 1 a 20 minutos, verificou-se que houve a diferença significativa entre os tempos de 1 minuto (21,7%) e 10 minutos (68,3%) (F=3,30; GL=27; P= 0,0093).

Contudo, entre a leitura de 10 minutos para os demais tempos não houve diferença significativa, ou seja, o tempo inicial de 10 minutos de exposição das fêmeas ao protótipo do produto foi eficiente para que as fêmeas ficassem sobre o efeito *knockdown*, o que foi verificado nas leituras de 20 minutos e 4 horas com 71,7% das fêmeas em *knockdown*, 8 e 12 horas com 63,3%, e 24h (61,7%), como mostra a Figura 8. Em relação ao controle do teste, a mortalidade foi menor que 5%.

Em relação ao número de mosquitos em *knockdown* ocorreu decréscimo, a partir da leitura de 8 horas, pois nesse intervalo o número de mosquitos em *knockdown* foi diminuindo, as fêmeas foram se recuperando, o que acontece provavelmente devido ao fato do óleo essencial ser volátil.

Figura IV- 8 – Ação inseticida do óleo essencial de *Hyptis dilatata* em mosquitos *Aedes aegypti*.



Analisando o óleo essencial extraído da folha de *H. dilatata* coletada no período chuvoso horário da noite no teste de prova biológica com garrafas-CDC e no teste do protótipo do produto, verificou-se a sua potencialidade em atividade inseticida. O efeito inseticida do óleo avaliado possivelmente está relacionado com a presença de constituintes químicos no óleo essencial. De acordo com Viegas-Júnior (2003), vários monoterpenos isolados de plantas, destacando o α -pineno, β -pineno, 3-careno, limoneno, mirceno, α -terpineno e canfeno já demonstraram toxicidade a diferentes insetos.

Os monoterpenos α -pineno, β -pineno, 3-careno, limoneno, mirceno, α -terpineno e canfeno mostrou ação inseticida no óleo essencial de *H. dilatata*, utilizado no teste, como mostra a caracterização química (cap. 3). A presença desses constituintes provavelmente está relacionada com atividade inseticida verificada nos testes adulticida, com os mesmos.

Óleo essencial da folha de *H. dilatata* demonstrou eficácia contra as fêmeas de *Ae. aegypti*, pois o efeito de *Knockdown* foi verificado nos primeiros 15 minutos de contato do óleo com as fêmeas, o que foi registrado pela observação dos sintomas como agitação e hiperatividade, o que demonstrou potencialidade do óleo para o controle do mosquito, no estágio adulto.

A atividade adulticida de óleos essenciais de plantas para mosquitos foi constatada por outros autores (GOMES, 2012; MESQUITA, 2012). Mesquita (2012) testou as substâncias 3-hidroxipiridina-6-cloro-2-aminotiometil-hidrazina e 5-nitrobenzoil-3-ácido piridinacarboxílico-6-cloro-2-carbotioamida-hidrazina, derivadas

de neonicotinóides. Os resultados demonstraram que as fêmeas de mosquitos não apresentaram susceptibilidade aos dois compostos testados, pois mesmo após 24 horas de exposição não houve mortalidade. Estes compostos a princípio demonstraram não serem eficazes no controle de adultos, resultado diferente ao obtido para *H. dilatata*, que demonstrou eficácia com o óleo essencial da folha, ocorrendo a mortalidade dos mosquitos, logo nos minutos iniciais de exposição, ou seja, efeito rápido.

Gomes (2012) realizou teste de repelência utilizando a substância dilapiol, isolado do óleo essencial extraído das folhas de *Piper aduncum*. Os resultados mostraram que o dilapiol isolado evidenciou capacidade de repelência pelo menos uma hora e meia após a aplicação do composto. Assim, como o óleo essencial da folha de *H. dilatata* também mostrou potencial para controle de adulto, contudo, neste trabalho o óleo testado mostrou efeito adulticida. O óleo essencial da folha de *H. dilatata* apresentou atividade no período de 90 minutos, no teste biológico de garrafa, por outro lado para o protótipo do produto a ação inseticida permaneceu por 4 horas.

Nos óleos dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Radd, manifestou ação inseticida sob adultos de *Ae. aegypti* com valor de CL₅₀= 20,80 µl, não havendo diferença significativa entre as concentrações testadas (COLE, 2008). Resultados semelhantes ocorreram com a espécie *H. dilatata*, que também não evidenciou diferença entre as concentrações utilizadas nos testes.

Na eficácia do protótipo do produto de ação inseticida possivelmente está relacionada com a ação do sinergismo atribuída pela ação dos constituintes químicos, presentes na planta. Conforme Viegas-Júnior (2003), compostos químicos atuam na fisiologia e no comportamento dos insetos, como é o caso dos limonóides que serve de proteção para as plantas contra insetos.

Substâncias que apresentam efeito sinérgico relacionado aos inseticidas químicos são fatores importantes no controle dos mosquitos transmissores de agentes etiológicos, como *Ae. aegypti* e *An. darlingi*, portanto vários estudos sobre o modo de atuação dessas substâncias, estão sendo realizadas atualmente com vários tipos de insetos (GOMES, 2012).

Devido os produtos sintéticos causar resistências aos insetos, ocasionado pelo seu uso prolongado, os setores agrícolas, os órgãos de saúde e os órgãos de legislação e proteção ambiental têm buscado estimular a substituição dos produtos sintéticos por

métodos de controle biológico, que possam atender às necessidades, sem agredir o meio ambiente (COLE, 2008).

Considerando essas condições, o desenvolvimento do protótipo do produto nesta pesquisa com substâncias extraídas de plantas, é um meio alternativo para substituição de produtos sintéticos. O óleo essencial utilizado nos testes contra adultos de mosquitos, também mostraram inibição da acetilcolinesterase, essa enzima é responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina, quando presente na fenda sináptica, o que promove a propagação dos impulsos nervosos. Portanto, quando a enzima é inibida impede a interrupção da propagação do impulso elétrico e, desta forma, o sistema nervoso continuará sendo estimulado, causando um processo de paralisia que pode ocasionar na morte do inseto (CABRINI, 2013).

O óleo essencial da folha de *H. dilatata* tem como constituinte químico majoritário a fenchona, que de acordo com a literatura mostra eficiência na inibição da acetilcolina, bem como o α -pineno e β -pineno (COSTA, 2013). Este processo de inibição da acetilcolinesterase poderá está relacionado com a ação do protótipo do produto com o óleo essencial da folha *H. dilatata*, devido à presença de constituintes químicos β -cariofileno, 3-careno, limoneno e cânfora, os quais são capazes de inibirem a acetilcolinesterase.

A eficácia do protótipo do produto contra adultos *Ae. aegypti* foi de até 8 horas de exposição, resultado semelhantes ao encontrado por Lima et al. (2009), que verificaram que larvas de Lepidoptera expostas ao óleo essencial *Piper hispidinervum*, voltaram suas atividades após 8 horas de exposição com óleo essencial. A recuperação do efeito *knockdown* foi semelhante ao verificado nas fêmeas de *Ae. aegypti*.

Constituintes presentes nos óleos essenciais extraídos das folhas, flores, sementes, como os normais terpenóides e fenilpropanóides, têm potencial de bloquear a octopamina, um neurotransmissor de inseto (LIMA et al., 2009). Importantes componentes químicos presentes no óleo essencial da folha de *H. dilatata*, portanto, esses constituintes químicos podem ter agido em *Ae. aegypti*, bloqueando a octopamina causando o efeito *knockdown* observado.

Os resultados do presente trabalho demonstram o potencial dos óleos essenciais de *H. dilatata* no controle dos mosquitos *Ae. aegypti* e *An. darlingi*, tanto nos estágios de larvas como adultos. A análise da atividade inseticida de óleos essenciais é de extrema

importância na descoberta de novas moléculas, e para a produção de produtos alternativos que não causam danos ao ambiente (BAKKALI et al., 2008).

Considerando o controle das duas espécies em estudo, para *Ae. aegypti*, os inseticidas são utilizados diretamente em recipientes artificiais, mantidos dentro dos domicílios humanos. Em relação ao *An. darlingi* o controle é realizado nos criadouros naturais, que são habitat de muitas espécies e, nesse sentido, a utilização de inseticidas naturais é importante do ponto de vista ambiental e segurança, o que demonstra a importância do estudo.

4 CONCLUSÕES

Entre os óleos essenciais e extratos de folhas e flores de *H. dilatata* testados em larvas de *Ae. aegypti* e *An. darlingi*, coletadas nos dois períodos chuvoso e seco, concluiu-se que:

- Todos os óleos essenciais das folhas e flores mostraram toxicidade para larvas de *Ae. aegypti*, porém o óleo essencial da folha coletada no período chuvoso no horário da noite, é o mais eficaz para o controle de larvas desse mosquito.
- Em relação à *Anopheles* spp. também se verificou que todos os óleos essenciais das folhas e flores mostraram atividade larvicida, contudo, o óleo da folha coletado no período seco e no horário da manhã, apresentou maior toxicidade para *An. darlingi*.
- O óleo essencial da folha coletada no período chuvoso e no horário da noite, também foi eficiente para o efeito de imobilidade de adultos de *Ae. aegypti*.
- O protótipo do produto evidenciou atividade inseticida do óleo essencial da folha coletada no período chuvoso no horário da noite para adultos *Ae. aegypti*, apresentando atividade nos minutos iniciais de contato com o mosquito.

Os resultados relatados evidenciaram o potencial dos óleos essenciais de *H. dilatata* para o controle de larvas e adultos de *Ae. aegypti* e para larvas de *An. darlingi*. Desta forma, a partir dos resultados obtidos neste estudo, os óleos essenciais da folha de *H. dilatata* é uma alternativa para o desenvolvimento de produtos, com ação inseticida para ambos os mosquitos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHEE, N.L.; GRIECO, J.P.; REJMANKOVA, E.; ANDRE, R.G.; VANZIE, E.; POLANCO, J.; ROBERTS, D.R. Biting patterns and seasonal densities of *Anopheles* mosquitoes in the Cayo District, Belize, Central America with emphasis on *Anopheles darlingi*. **Journal of Vector Ecology**. v. 31, n. 1, p. 45-57, 2006.

ALOU, L.P.A.; KOFFI, A.A.; ADJA, M.A.; TIA, E.; KOUASSI, P.K.; KONÉ, M.; CHANDRE, F. Distribution of ace-1 R and resistance to carbamates and organophosphates in *Anopheles gambiae* ss populations from Côte d'Ivoire. **Malaria Journal**. v. 9, n. 1, p. 167, 2010.

AYRES, M.; AYRES, Jr. M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. **BioEstat versão 5.3: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências Biológicas e médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília: MCT/CNPQ, Belém, Pará, Brasil, 2007.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, B.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**. v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BARBOSA, A. A. Histórico e Alternativas para o Controle da População de Mosquitos. **Saúde em Foco**. v. 1, pp. 1-14, 2010.

BARBOSA, L.M. C.; SOUTO, R.N.P.; ANJOS FERREIRA, R.M.; SCARPASSA, V.M. Behavioral patterns, parity rate and natural infection analysis in anopheline species involved in the transmission of malaria in the northeastern Brazilian Amazon region. **Acta tropica**. v. 164, p. 216-225, 2016.

Brasil. Ministério da Saúde (MS). 2017. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-dengue>>. Acesso: 14 de S de 2017.

Brasil. Ministério da Saúde (MS). 2017. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/28222-ministerio-da-saude-lanca-campanha-para-combate-a-malaria>>. Acesso: 01 de Junho de 2017.

BROGDON, W.G.; CHAN, A. Diretrizes para avaliar a resistência a inseticida em vetores usando o bioensaio com garrafa do CDC. 2013.

BROGDON, W.G.; MCALLISTER, J.C. Insecticide resistance and vector control. **Emerging infectious diseases**. v. 4, n. 4, p. 605, 1998.

CABRINI, I.; GRELLA, M.D.; ANDRADE, C.F.; THYSSEN, P. J. Richness and composition of Calliphoridae in an Atlantic Forest fragment: implication for the use of dipteran species as bioindicators. **Biodiversity and Conservation**. v. 22, n. 11, p. 2635-2643, 2013.

CAMPOS, J.; ANDRADE, C.F.S. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. **Revista de Saúde Pública**. v. 35, p. 232-236, 2001.

CANTUÁRIA, M. **Ecologia de culicídeos (Diptera: Culicidae) da área de proteção ambiental do rio Curiaú, Macapá, Amapá.** 2012. 64p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical) - Universidade Federal do Amapá, Macapá-AP, 2008.

CAVALHEIRO, M.G.; FARIAS, D.F.; FERNANDES, G.S.; NUNES, E.P.; CAVALCANTI, F.S.; VASCONCELOS, I.M.; CARVALHO, A.F. Biological and enzymatic activities of aqueous extract of seeds from *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 19, n. 2B, p. 586-591, 2009.

CHENG, S.S.; HUANG, C.G.; CHEN, Y.J.; YU, J.J.; CHEN, W.J.; CHANG, S.T. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. **Bioresource technology.** v. 100, n. 1, p. 452-456, 2009.

COELHO, A.A.M.; DE PAULA, J.E.; ESPÍNDOLA, L.S. Atividade larvívica de extratos vegetais sobre *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), em condições de laboratório. **BioAssay,** v. 4, 2009.

COLE, E.R. **Estudo fitoquímico do óleo essencial dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e sua eficácia no combate ao dengue.** 2008. 68p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Espírito Santo-UFES, Vitória-ES, 2008.

CONSOLI, R.A.G.B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** Fiocruz, Rio de Janeiro, 1994. 228p.

COSTA, V.C.O. **Contribuição ao conhecimento químico de espécies de *Hyptis* com ocorrência no semiárido paraibano: *Hyptis macrostrachys* Benth. E *Hyptis umbrosa* Salzm. Ex Benth.** 2013. 162p. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, João Pessoa-PB, 2013.

DABIRÉ, K.R.; DIABATÉ, A.; DJOGBENOU, L.; OUARI, A.; N'GUESSAN, R.; OUÉDRAOGO, J.B.; BALDET, T. Dynamics of multiple insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in a rice growing area in South-Western Burkina Faso. **Malaria Journal.** v. 7, n. 1, p. 188, 2008.

DIAS, C.N.; MORAES, D.F.C. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides. **Parasitology research.** v. 113, n. 2, p. 565-592, 2014.

DINIZ, M.M.C.S.L.; HENRIQUES, A.D.S.; LEANDRO, R.S.; AGUIAR, D.L.; BESERRA, E.B. Resistência de *Aedes aegypti* ao temefós e desvantagens adaptativas. **Revista de Saúde Pública.** v. 48, n. 5, p. 775-782, 2014.

DONALISIO, M.R.; FREITAS, A.R.R.; ZUBEN, A.P.B.V. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de saude publica.** v. 51, 2017.

DU, Y.; NOMURA, Y.; ZHOROV, B.S.; DONG, K. Sodium channel mutations and pyrethroid resistance in *Aedes aegypti*. **Insects.** v. 7, n. 4, p. 60, 2016.

DULMAGE, H.T.; YOUSTEN A.A.; SINGER S.; LACEY, L.A. *Guidelines for production of Bacillus thuringiensis H-14 and Bacillus sphaericus*. UNDP/World Bank/WHO, Steering Committee to Biological Control of Vectors, Geneva. p. 59, 1990.

FARAN, M.E.; LINTHICUM, K.J. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). **Mosquito Systematics**. v. 13, pp. 1-81, 1981.

FINNEY, D.J. *Probit analysis*. 3 ed. S. Chand & Company Ltd, Ram Nagar, New Delhi. 333p. 1971.

FONSECA-GONZÁLEZ, I.; QUIÑONES, M.L.; MCALLISTER, J.; BROGDON, W.G. Mixed-function oxidases and esterases associated with cross-resistance between DDT and lambda-cyhalothrin in *Anopheles darlingi* Root 1926 populations from Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 104, n. 1, p. 18-26, 2009.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. São Paulo: Editora USP, São Paulo-SP. 860p, 2002.

FRANÇA, L.P. **Avaliação da atividade larvicida de extratos e óleo essencial de *Piper capitarianum* Yunck, 1966 (Piperaceae) sobre *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 e *Anopheles* sp (Culicidae) em laboratório**. 2015. 107p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM, 2015.

GOMES, E.O. **Efetividade de Formulações Nanoestruturadas com dilapiol (*Piper aduncum* Linnaeus, 1753) e piretróides no controle de *Anopheles darlingi* Root, 1926, principal vetor da Malária na Amazônia**. 2012. 105p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus-AM, 2012.

GOMES, P.; SILVA, A.; PINHEIRO, H.; CARVALHO, L.; LIMA, H.; SILVA, E.; OLIVEIRA, M. Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial do *Zingiber officinale* Roscoe (gingibre) frente ao mosquito *Aedes aegypti*. **Revista brasileira de plantas medicinais**. v. 18, n. 2, p. 597-604, 2016.

HIWAT, H.; BRETAS, G. Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: a review. **Parasites & vectors**. v. 4, n. 1, p. 177, 2011.

LeOra Software Company. PoloPlus: **Probit and Logit Analysis**. User's Guide, Version 2.0. LeOra Software Company, Petaluma, CA. 2003, 39p.

LIMA, R.K.; CARDOSO, M.G.; MORAES, J.C.; MELO, B.A.; RODRIGUES, V.G.; GUIMARÃES, P.L. Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Acta amazônica**. v. 39, n. 2, p. 377-382, 2009.

LIU, N. Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. **Annual review of entomology**. v. 60, p. 537-559, 2015.

LOPES, J.; SILVA, M.A.; BORSATO, A.M.; OLIVEIRA, V.D.; OLIVEIRA, F.J.D.A. An ecological study of the mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. and associated culiciflora in an urban area of southern Brazil. **Revista de Saúde Pública**. v. 27, n. 5, p. 326-333, 1993.

MACIEL, M.V.; MORAIS, S.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; AMÓRA, S.S.A. Plant extracts used in the control of dipteran vectors of zoonosis. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 1, p. 105-112, 2010.

MACORIS, M.L.G.; ANDRUGHETTI, M.T.M.; WANDERLEY, D.M.V.; RIBOLLA, P.E.M. Impact of insecticide resistance on the field control of *Aedes aegypti* in the state of Sao Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 47, n. 5, p. 573-578, 2014.

MARCOMBE, S.; MATHIEU, R.B.; POCQUET, N.; RIAZ, M.A.; POUPARDIN, R.; SÉLIOR, S.; DAVID, J.P. Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors. **PLoS One**. v. 7, n. 2, p. e30989, 2012.

MEDEIROS, V.F.D. **Potencial larvicida de extratos de plantas regionais no controle de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. 2007. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, 2007.

MELO, A.M. **Estudo Fitoquímico e Biológico de *Hyptis mutabilis* SALZ (Lamiaceae)**. 2003, 103p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de produtos bioativos) - Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Recife-PE, 2003.

MESQUITA, R.S. **Avaliação da atividade inseticida de novos derivados de neonicotinóides em *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae)**. 2012. 102p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus-AM, 2012.

MORENO, J.E.; RUBIO-PALIS, Y.; PÁEZ, E.; PÉREZ, E.; SÁNCHEZ, V. Abundance, biting behaviour and parous rate of anopheline mosquito species in relation to malaria incidence in gold-mining areas of southern Venezuela. **Medical and veterinary entomology**. v. 21, n. 4, p. 339-349, 2007.

NARANJO-DIAZ, N.; ROSERO, D.A.; RUA-URIBE, G.; LUCKHART, S.; CORREA, M. M. Abundance, behavior and entomological inoculation rates of anthropophilic anophelines from a primary Colombian malaria endemic area. **Parasites & vectors**. v. 6, n. 1, p. 61, 2013.

NEVES, D.P. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Editora Atheneu, São Paulo-SP. 428p, 2010.

OLIVEIRA, C.D.; TADEI, W.P.; ABDALLA, F.C.; PAOLUCCI PIMENTA, P.F.; MARINOTTI, O. Multiple blood meals in *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector Ecology**. v. 37, n. 2, p. 351-358, 2012.

OLIVEIRA, V.C.D.; ALMEIDA NETO, L.C.D. Ocorrência de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em bromélias cultivadas no Jardim Botânico Municipal de Bauru, São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 33, n. 1, 2017.

PINHEIRO, V.C.S.; TADEI, W.P. Evaluation of the residual effect of temephos on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae in artificial containers in Manaus, Amazonas State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 18, n. 6, p. 1529-1535, 2002.

PORTO, K.R.; MOTTI, P.R.; YANO, M.; ROEL, A.R.; CARDOSO, C.A.; MATIAS, R. Screening of plant extracts and fractions on *Aedes aegypti* larvae found in the state of Mato Grosso do Sul (linnaeus, 1762)(culicidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 2, p. 895-906, 2017.

PRADO, G.P.; MACIEL, J.S.; LEITE, G.R.; SOUZA, M.A.A. Influence of shading and pedestrian traffic on the preference of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) for oviposition microenvironments. **Journal of Vector Ecology**. v. 42, n. 1, p. 155-160, 2017.

QUIÑONES, M.L.; SUÁREZ, M.F.; RODRÍGUEZ, A.; FLEMING, G.; GALVIS, L.E. Comportamiento de *Anopheles (Kerteszia) lepidotus* Zavortink 1973 y su incriminación como posible vector de la malaria en el departamento del Tolima, Colombia. **Biomédica**. v. 4, n. 1, p. 5-13, 1984.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. Guanabara Koogan, 2002.

ROCHA, J.A.M.; OLIVEIRA, S.B.; PÓVOA, M.M.; MOREIRA, L.A.; KRETTLI, A.U. Malaria vectors in areas of *Plasmodium falciparum* epidemic transmission in the Amazon region, Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**. v. 78, n. 6, p. 872-877, 2008.

ROCHA, H.D.R.; PAIVA, M.H.S.; SILVA, N.M.; ARAÚJO, A.P.; MOURA, A.J.F.; GÓMEZ, L.F.; MELO SANTOS, M. A.V. Susceptibility profile of *Aedes aegypti* from Santiago Island, Cabo Verde, to insecticides. **Acta tropica**. v. 152, p. 66-73, 2015.

ROSA, C.S.; VERAS, K.; SILVA, P.R.; LOPES NETO, J.J.; CARDOSO, H.; ALVES, L.; MORAES, D. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.18, n.1, p.19-26, 2016.

RUFALCO-MOUTINHO, P.; SCHWEIGMANN, N.; BERGAMASCHI, D.P.; SALLUM, M.A.M. Larval habitats of *Anopheles* species in a rural settlement on the malaria frontier of southwest Amazon, Brazil. **Acta tropica**. v. 164, p. 243-258, 2016.

SANTOS, J. M. M.; CONTEL, E. P. B.; KER, W. E. **Biologia de Anofelinos Amazônicos**. Ciclo biológico, postura e estádios larvais de *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae) da Rodovia Manaus/ Boa Vista. **Acta Amazonica**. v. 11, n. 4, pp. 789-797, 1981.

SANTOS, R. P.; NUNES, E. P.; NASCIMENTO, R. F.; SANTIAGO, G. M. P.; MENEZES, G. H. A.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the Northeast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 17, n. 5, pp. 1027-1030, 2006.

SANTOS, R. L.; PADILHA, A.; COSTA, M. D.; COSTA, E. M.; DANTAS-FILHO, H. C.; POVOA, M. M. Malaria vectors in two indigenous reserves of the Brazilian Amazon. **Revista de saude publica**. v. 43, n. 5, pp. 859-868, 2009.

SCARPASSA, V. M.; TADEI, W. P. Biologia de Anofelinos Amazônicos. XIII. Estudo do ciclo biológico de *Anopheles nuñez-tovari* Gabaldon, 1940 (Diptera, Culicidae). **Acta Amazonica**. v. 20, pp. 95-117, 1990.

SILVA, A.P.B.; ALVES, W.S.; JUNIOR, A.J.M.; TADEI, W.P.; SANTOS, J.M. M. Adaptação de um Bioensaio Simplificado para Avaliação do Status de Susceptibilidade em Larvas de *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara* ao Piretroide Deltametrina. **BioAssay**. v. 9, 2014.

SILVA, H.H.G.; SILVA, I.G.; SANTOS, R.M.G.; RODRIGUES FILHO, E.; ELIAS, C.N. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magoniua puybescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 37, p. 396-399, 2004.

SILVA, W.J.; DÓRIA, G.A.A.; MAIA, R.T.; NUNES, R.S.; CARVALHO, G.A.; BLANK, A.F.; CAVALCANTI, S.C.H. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource technology**. v. 99, n. 8, p. 3251-3255, 2008.

SILVA, S.L.C.E.; GUALBERTO, S.A.; CARVALHO, K.S.; FRIES, D.D. Avaliação da atividade larvicida de extratos obtidos do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Biotemas**. v. 27, n. 2, pp. 79-85, 2014.

SILVA, E.A.J.D.; SILVA, V.P.D.; ALVES, C.C.F.; ALVES, J.M.; SOUCHIE, E.L.; BARBOSA, L.C.D.A. Harvest time on the content and chemical composition of essential oil from leaves of guava. **Ciência Rural**. v. 46, n. 10, p. 1771-1776, 2016.

SIQUEIRA, A.M.; BASSAT, Q.; RODOVALHO, S.; LACERDA, M.V. Raising the red flag for malaria elimination and integrated fever surveillance in the Brazilian amazon. **The Lancet Global Health**. v. 5, n. 3, p. 257-258, 2017.

SMITH, L.B.; KASAI, S.; SCOTT, J.G. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. **Pesticide biochemistry and physiology**. v. 133, p. 1-12, 2016.

SOARES-PINHEIRO, V. C.; DASSO-PINHEIRO, W.; TRINDADE-BEZERRA, J. M.; TADEI, W. P. Eggs viability of *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) under different environmental and storage conditions in Manaus, Amazonas, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**. n. AHEAD, pp. 0-0, 2016.

SUAREZ, M.F.; QUIÑONES, M.L.; WIRTZ, R.A. *Anopheles rangeli* - A suspected vector of *Plasmodium vivax* in southern Colombia. In: **Proceedings of the 39th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. p. 158, 1990.

TADEI, W.P.; SCARPASSA, V.M.; SOUZA, A.C. Estudo das adaptações de anofelinos e outros culicídeos na UHE de Tucuruí. In: **Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, São Paulo. Ciência e Cultura**. v. 40, p. 665-665, 1988.

TADEI, W.P.; THATCHER, B.D.; SANTOS, J.M.; SCARPASSA, V.M.; RODRIGUES, I. B.; RAFAEL, M.S. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. **The American journal of tropical medicine and hygiene**. v. 59, n. 2, p. 325-335, 1998.

TADEI, W.P.; SANTOS, J.M.M.; RODRIGUES, I.B.; RAFAEL, M.S. Malária e Dengue na Amazônia: Dinâmica de Transmissão, Vetores e Controle. In: **Pesquisa Científica e Tecnológica em Saúde nos Institutos do Ministério de Ciência e Tecnologia – MCTI**. p. 113-125, 2010.

TADEI, W.P.; RODRIGUES, I.B.; RAFAEL, M.S.; SAMPAIO, R.T.M.; MESQUITA, H.G.; PINHEIRO, V.C.S.; ZEQUI, J.A. C.; ROQUE, R.A.; SANTOS, J.M. M. Adaptive processes, control measures, genetic background, and resilience of malaria vectors and environmental changes in the Amazon region. **Hydrobiologia**. v. 789, n. 1, p. 179-196, 2017.

TAFURT-GARCÍA, G.; JIMÉNEZ-VIDAL, L.F.; CALVO-SALAMANCA, A.M. Antioxidant capacity and total phenol content of *Hyptis* spp., *P. heptaphyllum*, *T. panamensis*, *T. rhoifolia* and *Ocotea* sp. **Revista Colombiana de Química**. v. 44, n. 2, p. 28-33, 2015.

VIEGAS-JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, São Paulo, p. 390-400, 2003.

WASSMER, S.C.; GRAU, G.E.R. Severe malaria: what's new on the pathogenesis front? **International journal for parasitology**. v. 47, n. 2, p. 145-152, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, Guidelines for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets. Document No. WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.3. 60 pp. Geneva, 2006.

WHO - World Health Organization. Draft global vector control response 2017-2030, 2017..

WRBU - Walter Reed Biosystematics Unit. 2017. **Mosquito identification resources**. Disponível em: <http://www.wrbu.org/VecID_MQ.html. Acesso: 01 de Junho de 2017.

ZIMMERMAN, R.H. Ecology of malaria vectors in the Americas and future direction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 87, p. 371-383, 1992.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia desenvolvida, com base no perfil fitoquímico dos extratos das folhas e flores da espécie *Hyptis dilatata* Benth, evidenciaram seu potencial com a identificação dos metabólitos secundários presentes. Com isso foi possível a caracterização química dos óleos essenciais das folhas e flores da espécie em estudo. Contudo, a pesquisa realizada em diferentes períodos climáticos, demonstrou que o maior rendimento do óleo essencial extraídos das folhas e flores ocorreu no período seco. Isto pode ser consequência das variações na concentração dos constituintes químicos, encontrados nas amostras das folhas e flores, e também ainda, ser influência do clima, temperatura, tipo de solo, dentre outros.

A partir dos resultados obtidos neste estudo, verificou-se que as ações dos constituintes químicos podem ter influenciado nos resultados das atividades biológicas com a enzima acetilcolinesterase, antimicrobiana, fungicida e com o teste de toxicidade utilizando o microcrustáceo *Artemia salina*. Resultados relevantes se obtiveram também em relação à ação inseticida, testando os óleos essenciais e extratos de folhas e flores de *H. dilatata*, coletados nos períodos seco e chuvoso, em larvas e adultos de *Aedes aegypti*, bem como os óleos essenciais que também foram testados nas larvas dos mosquitos de *Anopheles darlingi*.

Os resultados foram promissores para elaboração de um protótipo do produto como bioinseticida para o vetor *Ae. Aegypti*, com o óleo essencial extraído da folha de *H. dilatata* coletada no período chuvoso, no horário da noite. Este óleo mostrou-se mais eficiente nos testes larvicidas de *Ae. Aegypti*. Outros estudos e testes poderão ser desenvolvidos para aperfeiçoar a formulação do produto, o qual demonstrou ter potencial para ação inseticida.

Os dados deste trabalho são inéditos, pois são as primeiras informações desta natureza sobre *H. dilatata*, obtida na área da Serra do Tepequém, no Estado de Roraima. Trata-se de dados importantes que possibilitam comparar parâmetros da atividade biológica da espécie, obtidos em períodos climáticos diferentes, considerando as estações seca e chuvosa.

As informações deste estudo denotam o valor científico dos dados etnofarmacológicos da espécie pesquisada, pertencente à flora do cerrado da Amazônia Brasileira. Ressalta-se a caracterização química dos óleos essenciais, que exibem

expressiva ação nas atividades biológicas, particularmente a antimicrobiana, fungicida, inseticida e nos testes *in vitro* com a enzima acetilcolionesterase.