



**UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA
AFRO-BRASILEIRA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO ACADÊMICO EM SOCIOBIODIVERSIDADE E TECNOLOGIAS
SUSTENTÁVEIS – MASTS**

ANTÔNIA MAYARA DOS SANTOS MENDES

**ANÁLISE DA BIOATIVIDADE DOS EXTRATOS OBTIDOS DAS FOLHAS DO
CAMBARÁ DE CHUMBO (*LANTANA CAMARA*), FRENTE AS LARVAS DO
MOSQUITO *AEDES AEGYPTI*.**

REDENÇÃO-CE

2018



UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA
AFRO-BRASILEIRA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO ACADÊMICO EM SOCIOBIODIVERSIDADE E TECNOLOGIAS
SUSTENTÁVEIS – MASTS

ANTÔNIA MAYARA DOS SANTOS MENDES

ANÁLISE DA BIOATIVIDADE DOS EXTRATOS OBTIDOS DAS FOLHAS DO
CAMBARÁ DE CHUMBO (*LANTANA CAMARA*), FRENTE AS LARVAS DO
MOSQUITO *AEDES AEGYPTI*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Sociobiodiversidade e Tecnologias
Sustentáveis (MASTS) da Universidade da
Integração Internacional da Lusofonia Afro
brasileira (UNILAB), como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Aluísio Marques da
Fonseca.

REDENÇÃO-CE

2018

Dedico:

Primeiramente a Deus, por toda força que me dá nos
momentos difíceis.

Aos meus pais, pelo esforço, dedicação e apoio incondicional, Darci Mendes (*in memoriam*) Amilton Mendes.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que em sua infinita bondade e misericórdia me permitiu chegar até aqui e esteve ao meu lado em todas as lutas e provas, durante essa caminhada. A minha amada mãe, Darci Mendes, meu maior exemplo de força e determinação, por nunca ter medido esforços nem sacrifícios para que hoje eu pudesse estar desfrutando desta vitória. A ela, que através do imenso amor a mim dedicado, conduziu-me no caminho do bem e da honestidade, sendo a principal responsável pelo caráter que possuo hoje.

Ao meu pai, Amilton Mendes (*in memoriam*), que hoje não está mais presente para ver a o reflexo de amor, carinho e atenção a mim dedicado em vida. A ele, um dos meus maiores estímulos para que eu me dedicasse e me esforçasse na busca por meus objetivos, mesmo com todas as dificuldades que pudessem surgir.

A minha irmã, Edisley Mayra, que fez dos meus sonhos os seus. Por toda sua dedicação e compreensão e, principalmente, por ter me dado a mão ao longo dessa caminhada, tornando-a muito mais afável.

Ao meu primo e irmão Walderlano Almeida, por nunca ter medido esforços nem sacrifícios para que hoje eu pudesse dizer consegui.

Ao Rafael Braga, que a partir do momento que encontrou em minha vida, sempre me apoiou, não apenas como namorado, mas como amigo e confidente. É um exemplo para mim por ser esse homem honesto de coração e alma leve, por ter vencido tantas batalhas e mesmo assim não desistir.

Aos meus amigos, pela força, confiança e por tanto carinho durante toda minha vida, especialmente Marcyara Souza, uma amiga irmã que a vida me deu. Que juntas mais uma vez vencemos essa caminhada. Ambas sabemos o que passamos e os motivos por não termos desistido. E a todos os meus amigos, que sempre me motivaram a seguir em frente com leveza e sabedoria. Não posso deixar de agradecer ao Octávio Lisboa e Tainah da Silva, colegas de laboratório que não mediam esforços para realização dos métodos possíveis para as análises e testes, bem como os diversos momentos de descontração. Hoje, por inúmeros motivos se tornaram meus amigos para o resto da vida.

Ao Prof. Dr. Alúcio Marques, meu orientador, pela honra de acompanhá-lo e

poder absorver um pouco de seu conhecimento e de sua sabedoria ao longo desses anos e principalmente por acreditar que tudo seria possível.

Ao Prof. Dr. Airton Marques, (UFC/UECE) meu grande mestre, pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade a mim concedida ao longo dessa vida acadêmica que ainda não chegou ao fim. E espero que possamos continuar trabalhando e produzindo juntos.

A todos os meus professores do mestrado em Sociobiodiversidade e Tecnologias Sustentáveis da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira (UNILAB), pela troca de experiência, pelas oportunidades e por todos os ensinamentos transmitidos durante esses dois anos.

A todos os meus colegas de turma do mestrado, em especial aos que dividiram alojamentos, pela amizade, troca de experiências profissionais pelos papos descontraídos que me revigoravam depois de um dia cansativo de trabalho.

Ao Prof. Afonso Jampierry, por sempre acreditar em mim profissionalmente, por demonstrar com seu zelo pelo trabalho bem feito que tudo, realizado com amor e carinho vale a pena. E que como costuma dizer “que nunca percamos a capacidade de se emocionar.”

Aos meus ex e atuais alunos, por ser uma das fontes que gera energia para continuar minha busca por conhecimento.

Por fim a Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira (UNULAB), que de forma direta e indireta me proporcionará o título de Mestre.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

RESUMO

A busca por metodologias para a eliminação das larvas do mosquito *Aedes aegypti* é uma estratégia utilizada por vários pesquisadores. Extratos ou óleos essenciais de plantas surgem como uma alternativa aos inseticidas sintéticos, a fim de diminuir a velocidade de seleção de populações resistentes aos inseticidas químicos, organofosforados e piretróides. Diversos estudos já foram realizados e descritos na literatura, demonstrando os efeitos dos extratos obtidos com vegetais do gênero *Lantana* sobre vários organismos, incluindo mosquitos e suas larvas. Entretanto, estudos com a espécie *Lantana camara* sobre o efeito larvicida em larvas do mosquito *A. aegypti* não foi ainda descrito. Portanto, o objetivo deste trabalho foi de avaliar experimentalmente o efeito larvicida do extrato etanólico de *L. camara* em larvas de terceiro/quarto estágio de mosquitos *A. aegypti*. Assim, no intuito de investigar os possíveis metabólitos secundários encontrados no extrato etanólico das folhas de *L. camara* por meio da prospecção fitoquímica preliminar, a avaliação das atividades antioxidante pelo método

do sequestro de radicais livres DPPH, citotóxica pelo bioensaio *in vitro* pela *Artemia salina* para obtenção de resultados. O extrato de *Lantana camara* analisado em concentração de 600ppm, causou mortalidade média superior a 90% das larvas testadas e uma análise total de 95% de mortalidade, até 48 horas de exposição das larvas ao extrato, mostrando uma ação larvicida eficaz. Com relação à toxicidade do extrato etanólicos de *Lantana camara*, apresentou uma concentração letal (LC₅₀) de 35,699 ppm, apontando uma alta toxicidade, permanecendo ativa por mais de 48 horas. Para o óleo essencial por hidrodestilação, foram identificados 9 componentes, sendo três considerados mais relevantes, pois são responsáveis pela caracterização de seu forte aroma: cariofileno (7,3%), germacreno B (37,5%) e o germacreno D (21,7%). Uma outra parte do trabalho consistiu no estudo, de procedimentos cromatográficos do extrato etanólico de *Lantana camara*, iniciado por uma filtrante e posteriormente, cromatografia em coluna (CC), o que resultou no isolamento de um biosídeo da flavona. A estrutura foi definida através da análise dos espectros de ressonância magnética nuclear (NMR) de ¹H e de ¹³C (1D e 2D) e espectrometria de massas, vale ressaltar que o flavonóide glicosilado isolado do extrato etanólicos das folhas de *L. camara* é inédito nessa espécie.

Palavra-chave: *Aedes aegypti*; *Lantana camara*; atividade larvicida

ABSTRACT

The search for methodologies for the elimination of *Aedes aegypti* mosquito larvae is a strategy used by several researchers. Extracts or essential oils from plants appear as an alternative to synthetic insecticides in order to decrease the rate of selection of populations resistant to chemical insecticides, organophosphates and pyrethroids. Several studies have already been carried out and described in the literature, demonstrating the effects of extracts obtained with plants of the genus *Lantana* on various organisms, including mosquitoes and their larvae. However, studies with the *Lantana camara* species on the larvicidal effect in *A. aegypti* mosquito larvae have not been described. Therefore, the objective of this work was to evaluate experimentally the larvicidal effect of *L. camara* ethanolic extract on larvae of third / fourth stage of *A. aegypti* mosquitoes. Thus, in order to investigate the possible secondary metabolites found in the ethanol extract of the leaves of *L. camara* by means of the preliminary phytochemical prospection, the evaluation of the antioxidant activities by the free radical sequestration method DPPH, cytotoxic by the *in vitro* bioassay by *Artemia salina* obtaining results. *Lantana camara* extract analyzed at a concentration of 600ppm caused an average mortality of over 90% of the larvae tested and a total analysis of 95% of mortality, up to 48 hours of exposure of the larvae to the extract, showing an effective larvicidal action. With respect to the toxicity of the ethanolic extract of *Lantana camara*, it presented a lethal concentration (LC₅₀) of 35,699 ppm, indicating a high toxicity, remaining active for more than 48 hours. For the essential oil by hydrodistillation, 9 components were identified, being three considered more relevant, since they are responsible for the characterization of its strong aroma: cariophilene (7.3%), germacrene B (37.5%) and germacrene D (21,7%). Another part of the work consisted of in the study, of chromatographic procedures of the ethanolic extract of *Lantana camara*, initiated by a filter and afterwards, column chromatography (CC), which resulted in the isolation of a flavone bioside. The structure was defined by the analysis of ¹H and ¹³C (1D and 2D) nuclear magnetic resonance (NMR) spectra and mass spectrometry, it is worth mentioning that the glycosylated flavonoid isolated from the ethanolic extract of *L. camara* leaves is unheard of in in this species.

Keywords: *Aedes Aegypti*; *Lantana camara*; larvicidal activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do <i>Aedes Aegypti</i>	
27 Figura 2 - 1 – Abdome da fêmea do <i>Aedes aegypti</i> durante a saída de ovos, (Acervo do OSWALDO CRUZ). 2 – Formato dos ovos	28
Figura 3- Fases Evolutivas do <i>Aedes aegypti</i> : do ovo, aos quatro estádios da larva até a pupa.	29
Figura 4 - Pupa de <i>Aedes aegypti</i>	30
Figura 5 - Aspectos da morfologia externa do adulto fêmea de <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	31
Figura 6 - Cambará de Chumbo, <i>Lantana Camara</i> (<i>Verbenaceae</i>)	36
Figura 7 - Cambará de Chumbo, <i>Lantana Camara</i> (<i>Verbenaceae</i>)	37
Figura 8 - Cambará de Chumbo, <i>Lantana Camara</i> (<i>Verbenaceae</i>), processo de desidratação folhas.	38
Figura 9 - Filtração da solução etanólica em repouso	39
Figura 10 - (A) Processo de rotaevaporação do extrato etanólicos bruto. (B) Extrato etanólicos final.....	40
Figura 11 - Extração do óleo essencial da folha de <i>L. camara</i> por hidrodestilação do tipo <i>Cleavenger</i>	41
Figura 12 - Recipiente contendo cistos de <i>Artemia salina</i> (A) durante um período de 48h, submetidos a iluminação artificial e eclosão da larvas para eclosão (B).....	43
Figura 13 - Coloração verde, após a reação com FeCl ₃ , indicando a presença de Taninos Condensados no extrato etanólico das folhas de <i>Lantana camara</i> ... Erro! Indicador não definido.	
Figura 14 - Coloração alterada, após a reação com Magnésio e HCl, indicando a presença positiva de flavonoides no extrato etanólico das folhas de <i>Lantana camara</i> Erro! Indicador não definido.	
Figura 15 - Coloração verde indicando a presença de Esteroides/Triterpenoides nas folhas de <i>L. camara</i> Erro! Indicador não definido.	
Figura 16 - Estrutura do flavonóide glicosilado	58
Figura 17 - Partes seguímentadas do flavonóide glicosilado.	58
Figura 18 - Espectrometria de	

massas de alta resolução com ionização por electrospray (HRESIMS).

..... 59 Figura 19 -
Fragmentação proposta para a estrutura isolada. 60 Figura 20
- Espectro de RMN 1H (500 MHz, em MeOD) de 1..... 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Percentagem do sequestro do radical livre DPPH para 50% de atividade (IC50) do óleo essencial de CC.
50 Tabela 2 - Mortalidade média de *Artêmia Salina* de acordo com as concentrações do extrato etanólico do Cambará de *Chumbo (Latana Camara)*.....
52 Tabela 3 - Resultados das análises fitoquímicas para reconhecimento dos metabólitos secundários distintos obtidos a partir da amostra de extrato etanólico das folhas de *L. camara*..... 53
Tabela 4 - Alterações observadas na coloração do meio avaliadas no teste para antocianidinas, antocianinas e flavonoides..... 55
Tabela 5 - Ensaio larvicida com extrato etanólico da folha do Cambará de Chumbo (Lantana câmara) em 48 horas.....
56 Tabela 6 - Constituintes do óleo volátil de Cambará de Chumbo por CG/EM.....
57 Tabela 7 - Dados espectroscópicos da estrutura (1) e um modelo (Mo-01) da literatura (WIDYOWATI et al, 2016)..... 60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - - Curva concentração-resposta da mortalidade de *artêmia salina* ao extrato etanólico do Cambará de chumbo após 24 horas.
51 Gráfico 2 - Curva concentração-resposta da mortalidade de *Artêmia salina* ao extrato Etanólicos do Cambará de Chumbo (*Latana Camara*) após 48 horas.
51

LISTA DE ABREVIATURAS

(CD₃)₂CO Deuterated Acetone/Acetona B.t.i Bacillus Thuringiensis

Israelensis BB Broad Band

BHC Hexaclorociclo-Hexano. C₂H₄O₂ Ácido Etanoico

C₂H₆O Etanol

C₅D₅N Piridina

C₈H₈O₃ Metanol

CC Camará De Chumbo CD₃OD Deuterated Metanol/Metanol

CG-DICromatografia Gasosa Acoplada A Detector De Ionização De Chama

CG/EMCromatografia Gasosa Acoplada A Espectrometria De Massa

CH₂Cl₂ Diclorometano

CH₃ Metil

CONASEMSConselhos Nacionais De Secretários Municipais

CONASSConselhos Nacionais De Secretários Estaduais

COSY Correlated Spectroscopy d Dubleto

dd Duplo Dubleto

ddd Duplo Dubleto Dubleto DDT Diclorodifeniltricloroetano DEPTDistortionless
Enhancement By Polarization Transfer

DMSO Dimetilsulfóxido

DPPH 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazila ee Excessos Enantioméricos

EEFALCExtrato Etanólicos Da Fração Acetato De Etila De *Lantana Camara*

EM Espectro Em Massa

EtOAc Acetato De Etila

EtOH Etanol

Fe²⁺ Ferro (II)

Fe³⁺ Ferro (III)

FeCl₂ Cloreto De Ferro (II) FeCl₃ Cloreto De Ferro

FHD Febre Hemorrágica Da Dengue FUNASA Fundação Nacional De

Saúde HCl Ácido Clorídrico

HClO₄ Ácido Perclórico

Hep Hepteto

HSQC Coerência Heteronuclear Quântica IGR Insect Growth Regulator INMET

Instituto Nacional De Meteorologia LBPNLaboratório De Biotransformações E
Produtos Naturais

LC *Lantana Camara*

LC₅₀ Concentração Letal

m Multiplete

Mg Magnésio

mmHg Milímetro De Mercúrio Na₂SO₄ Sulfato De Sódio Anidro

NaOH Hidróxido De Sódio

OMS Organização Mundial Da Saúde OPAS Organização Pan-Americana Da

Saúde Ppm Parte Por Milhão

RI Índice De Retenção

RMN Espectroscopia De Ressonância Magnética Nuclear

RMN ¹³C Espectroscopia De Ressonância Magnética Nuclear Do Carbono 13

RMN ¹H Espectroscopia De Ressonância Magnética Nuclear Do Hidrogênio

RPM Rotação Por Minuto

s Singleto

SCD Síndrome Do Choque Do Dengue SUS Sistema Único De Saúde t

Tripleto

UFC Universidade Federal Do Ceará UNILAB Universidade Da Integração

Internacional Da Lusofonia Afro-Brasileira

UV Irradiação Ultravioleta μm Micrômetro

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	
19 2 – OBJETIVOS.....	
22 2.1 - Objetivo Geral	
22 2.2 - Objetivos Específicos.....	
22 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	
23 3.1 - Ocorrência do <i>Aedes aegypti</i> no Brasil.....	
23 3.2 - Mosquito vetor – <i>Aedes aegypti</i>	
24 3.3 - Vírus e Sorotipos.....	
25 3.4 - Transmissão.....	
26 3.5 - Ciclo de vida.....	
26 3.5.1 - Ovos.....	27
3.5.2 - Larvas.....	28
3.5.3 - Pupas.....	29
3.5.4 - Adulto	30 3.6
- Controle do <i>Aedes aegypti</i>	32 3.7 -

Controle alternativo: Inseticidas naturais.....	34	3.8 -
Cambará de Chumbo (<i>Lantana Camara</i>).....	35	3.8.1 -
Características Botânica.....	36	4 -
MATERIAIS E MÉTODOS	37	
4.1 - Planta	37	
4.1.1 - Coleta e identificação do material botânico – Cambará de Chumbo (<i>Lantana Camara</i>)	37	
4.1.2 - Processamento do material vegetal.....	38	
4.2 - Preparação do extrato etanólico das folhas de <i>Lantana camara</i>	39	
4.3 - Extração do Óleo Essencial das folhas de <i>Lantana Camara</i>	40	
4.4 - Atividade Antioxidante do óleo essencial do <i>Cambará de Chumbo (Lantana camara)</i> por DPPH	41	
4.5 - Atividade da toxicidade do extrato etanólico do <i>Cambará de Chumbo (Lantana camara)</i> por meio do bioensaio com <i>Artêmia Salina (Branchipus stagnalis)</i>	43	
4.6 - Prospecção fotoquímico do extrato etanólicos da folha do Cambará de chumbo (<i>L. camara</i>)	44	
4.6.1 - Teste para Fenóis e Taninos.....	44	
4.6.2 - Teste para flavonoides (flavonóis, flavonas e xantonas)	45	
4.6.3 - Teste para flavonoides (antocianidinas, antocianinas e flavonóis).....	45	
4.6.5 - Teste para saponinas.....	46	
4.7 - Composição volátil do óleo essencial do cambará de chumbo (<i>Lantana Camara</i>) - Espectro em Massa (EM)	46	
4.8 - Avaliação da atividade larvicida o extrato etanólico das folhas e flores Cambará de Chumbo (<i>Lantana Camara</i>) Frente Ao <i>Aedes Aegypti</i>	46	
5 - MÉTODOS FÍSICOS DE ANÁLISES.....	48	
5.1 - Cromatografia Líquida gravitacional em Coluna Aberta (CC).....	48	
5.2 - Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	48	
5.3 - Ponto de fusão (pf)	48	
5.4 - Espectrometria de massa (EM).....	49	
5.5 - Cromatografia Gasosa acoplada a Detector de Ionização de Chama (CG-DIC)	49	
5.6 - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear		

(RMN).....	49
6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
6.1 - Atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH.....	50
6.2 - Resultado da avaliação do bioensaio de toxicidade com <i>Artemia salina</i> dos extratos etanólicos das folhas de cambará de chumbo (<i>L. camara</i>)	50
6.3 - Resultado dos estudos fotoquímicos do extrato etanólico da folha do Cambará de chumbo (<i>L. camara</i>)	52
6.3.1 - Resultado para o teste de Fenóis e Taninos.....	53
6.3.2 - Resultado para o teste de flavonoides (flavonóis, flavonas e xantonas).....	54
6.3.3 - Resultado para o teste de flavonoides (antocianidinas, antocianinas e flavonóis).....	54
6.3.4 - Resultado para o teste de Esteroides/Triterpenoides	55
6.3.5 - Resultado para o teste de saponinas.....	55
6.4 - Resultado da atividade larvicida do extrato etanólico das folhas do Cambará de Chumbo (<i>Lantana Camara</i>), frente Ao <i>Aedes Aegypti</i>	56
6.5 - Resultado da composição volátil do óleo essencial do cambará de chumbo (<i>Lantana Camara</i>)	57
6.6 - CARACTERIZAÇÃO DE EEFALC-1 - Substância Isolada em <i>Lantana camara</i>	58
7 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
8 - REFERÊNCIAS.....	64

1 - INTRODUÇÃO

A espécie vegetal *Lantana camara* da família das *Verbenaceae* é uma importante planta daninha tropical, presente em áreas cultiváveis, pastagens e terrenos abandonados, tanto em regiões secas quanto úmidas e que, frequentemente, cresce em vales e encostas (PEREIRA, 2005). Na literatura é citada como planta tóxica, capaz de provocar fotossensibilização (doença causada por toxinas) em bovinos ou ovinos, embora nem

todas as espécies possuam esta propriedade (BRITO et al 2004; TOKARNIA et al. 1999). São reconhecidos também propriedades alelopáticas, substâncias liberadas pela planta e solúveis em água (GORLA & PEREZ, 1997), e atualmente destaca-se com importantes efeitos repelentes contra larvas de mosquitos *Aedes* (IANNACONE & LAMAS, 2003).

Uma vez que o uso dos inseticidas químicos convencionais ou sintéticos vem se tornando cada vez mais problemático, mesmo havendo a morte dos artrópodes (mosquitos) suscetíveis às dosagens aplicadas, os que sobrevivem tornam-se mais resistentes, transferem essa capacidade a seus descendentes e, portanto, populações cada vez mais tolerantes são selecionadas. Aqui deve ser destacado o fato de que o uso indiscriminado dos inseticidas torna possível o estabelecimento da resistência mais rapidamente (DONALÍSIO & GLASSER, 2002).

Pois desde a década de 70, temos relatos de resistências das formas adultas de *A. aegypti*, devido à ação residual dos inseticidas BHC, DDT e Dieldrin (BROGDON & MCALLISTER, 1998). Pesquisas comprovam a resistência desse vetor aos atuais inseticidas, em vários locais do mundo, tais como: Tailândia (JIRAKANJANAKIT *et al.*, 2007), Cuba, Peru e Venezuela (RODRÍGUEZ *et al.*, 2007). No Brasil, a resistência foi verificada em Campo Grande-MS (CAMPOS & ANDRADE, 2003); São Paulo (LUNA *et al.*, 2004); Distrito Federal (CARVALHO *et al.*, 2004); Alagoas, Rio de Janeiro e Sergipe. (BRAGA *et al.*, 2004).

Portanto, uma das alternativas para evitar o desenvolvimento de resistência em mosquitos é a utilização de produtos obtidos a partir de plantas com poder inseticida. Insetos expostos a bioinseticidas apresentam lento processo de desenvolvimento de resistência, pois essas substâncias, diferentemente dos inseticidas químicos sintéticos, são compostas pela associação de vários princípios ativos (ROEL, 2001).

Assim, o desenvolvimento de novas substâncias inseticidas biodegradáveis para o controle de mosquitos tem se tornado de grande relevância no Brasil. Os óleos essenciais

20

e extratos a base de solventes orgânicos obtidos de plantas são considerados fontes potenciais de substâncias biologicamente ativas contra esses insetos. Esses artrópodes, da Ordem *Diptera*, Família *Culicidae*, estão distribuídos por todas as regiões do globo. A área Neotropical é a que detém o maior nível de endemidade. São conhecidos por diversos nomes populares, como pernilongos, muriçocas, mosquitos-pregos, zancudos, carapanãs e sovelas, dependendo da região. Os adultos alados, na grande maioria, são

hematófagos e nas suas fases imaturas, aquáticos. (WARD *et. al.*, 1982; CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; MARCONDES, 2001). A Família *Culicidae* apresenta grande interesse em Saúde Pública, por apresentar o maior número e os mais importantes insetos hematófagos entre todo o *Filo Arthropoda*. (EIRAS, 2005). Principlamente um dos protagonista mais presentes, o *Aedes aegypti*. O mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) é originário da África, possivelmente da região da Etiópia, e acompanhou a migração humana pelo mundo desde as primeiras alterações antrópicas acontecidas em seu ambiente natural. Entre os *culicídeos*, é conhecido como a espécie mais integrada ao ambiente do ser humano. (NATAL, 2002; FERNANDES, 2006) e é o mais importante vetor dos agentes etiológicos da dengue e da febre amarela urbana. Trata-se de uma espécie cosmopolita, de hábitos diurnos, sendo muito bem adaptada ao domicílio humano. (PINA, 1999). As fêmeas de *A. aegypti* não ovipõem em ambiente aquático, e sim em áreas de prováveis criadouros. Seus criadouros são transitórios, dependentes diretos das chuvas, pois suas larvas e pupas são aquáticas. Em função disso, a população de mosquitos adultos sofre flutuação grande e abrupta de densidade durante o ciclo anual, ou seja, seu ciclo anual é controlado pela quantidade de chuvas e pela temperatura ambiente. (LORENÇO DE-OLIVEIRA, 1995; FORATTINI, 2002).

Cabe salientar, que a fase larval é o período de maior alimentação e crescimento, quando estes passam grande parte do tempo alimentando-se principalmente de material orgânico e microplâncton presentes na água. (BERGO *et. al.*, 1990). Todo o processo digestivo das larvas ocorre no canal alimentar (sistema digestório ou intestino), que é responsável por todas as etapas do processamento do alimento: digestão, absorção, formação e eliminação das fezes. (TERRA & FERREIRA, 2009).

O intestino representa uma grande interconexão entre o inseto e o seu ambiente e a compreensão das funções e modos de operação do intestino são essenciais para avaliar os métodos de controle, pois exibem uma grande diversidade na morfologia e bioquímica. (LAW *et al*, 1992).

21

Entre as estratégias já utilizadas para controle e prevenção ao *A. aegypti*, também e não menos importante, porém preocupante, a utilização de inseticidas sintéticos, piretróides e organofosforados. (AUGUSTO & CÂMARA NETO, 2005).

E o motivo principal é que esses inseticidas sintéticos não são seletivos, agridem o meio ambiente e apresentam efeitos tóxicos agudos e crônicos sobre invertebrados e vertebrados. (DULOUT *et al* 1985; DEGRAEVE *et al* 1984; DEGRAEVE;

MOUTSCHEN, 1984; DEFERRARI et al 1991; GARRETT, 1992; EYER, 1995; CAVALIERE *et al.*, 1996; MELO *et al.*, 2008).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho consistiu em investigar não apenas a ação larvívica dos extratos etanólicos e do óleo essencial de *Lantana camara*, como também à presença de toxicidade, antioxidante e antibacterívica, bem como identificar os metabólitos secundários, pertencentes a classes distintas, como os flavonóides, que apresentam atividades anti-inflamatória e antioxidante, esteróides/triterpenóides que apresentam atividade anti-inflamatória, terpenóides/terpenos, taninos. Assim como possíveis isolados do vegetal e composição do óleo essencial de *L. camara*.

Tais estudos são importantes, pois permitem visualizar a abrangência e especificidade dos mecanismos envolvidos neste processo, possibilitando estimar os possíveis impactos ambientais e ecológicos da sua utilização.

Portanto, estudos nesta área darão subsídios para o aperfeiçoamento e desenvolvimento de novos bioinseticidas, com a vantagem de se conhecer seus mecanismos de ação, espectro de ação ambiental e propriedades físico-químicas.

22

2 – OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Avaliar o efeito larvívica, toxicidade, antioxidante e antibacterívica em larvas de *Aedes aegypti*, expostas a solução etanólica e óleo essencial, avaliando os potenciais fitoquímicos do Cambará de chumbo (*Lantana camara*).

2.2 - Objetivos Específicos

- Verificar a atividade larvívica dos extratos etanólico obtidos das folhas do Cambará de Chumbo (*Lantana Camara*).
- Realizar estudos cromatográficos dos extratos e isolamentos de substâncias do Cambará de Chumbo (*Lantana Camara*).
- Avaliar a atividade antioxidante do óleo essencial do Cambará de Chumbo (*Lantana Camara*).
- Avaliar a toxicidade dos extratos etanólicos das folhas do *Lantana camara* por

meio dos cistos de *Artemia salina*.

- Analisar a composição volátil das folhas do Cambará de Chumbo (*Lantana Camara*).
- Identificar os metabólitos secundários, pertencentes a classes distintas de alcaloides, compostos fenólicos e terpenos, nas diversas subclasses, em especial, os flavonoides, antocianinas, antocianidinas, xantonas, esteroides/triterpenoides, através da triagem preliminar fotoquímica;

23

3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - Ocorrência do *Aedes aegypti* no Brasil

A partir do século XX, o combate ao *A. aegypti* foi institucionalizado no Brasil devido a diversas epidemias de febre amarela urbana que ocorriam no país. A primeira campanha pública foi iniciada por Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro (1902-1907), o que instituiu as brigadas sanitárias, detectando casos de febre amarela e eliminando os focos do mosquito (LÖWY, 1990; DONALÍSIO, 2002).

Entre 1928 e 1929, ocorreu outra epidemia, iniciada na cidade do Rio de Janeiro, disseminando-se para outros municípios do Estado (DONALÍSIO, 2002). Nas décadas de 1930 e 1940, com o incentivo da Fundação Rockefeller, foram executadas campanhas de erradicação do *A. aegypti* nas Américas. No Brasil, entre os anos de 1923 e 1924, essa Fundação atuou contra a febre amarela nas cidades litorâneas do Nordeste. Um acordo com o Departamento Nacional de Saúde Pública (DNSP) conferiu a esta organização norte-americana a responsabilidade exclusiva de eliminação do mosquito (LÖWY, 1999).

Em 1947, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) decidiram coordenar a erradicação do *A. aegypti* no continente por intermédio do Programa de erradicação do *A. aegypti* no Hemisfério Oeste (SOPER, 1965; DONALÍSIO, 2002).

Entre o final da década de 1940 e 1950, eficientes programas de erradicação do vetor foram implantados em todos os países latino-americanos, sendo o mesmo eliminado em quase toda a América, com exceção dos Estados Unidos, Suriname, Venezuela, Cuba, Jamaica, Haiti, República Dominicana e uma pequena parte da Colômbia (SOPER, 1965).

O último foco do mosquito no Brasil foi eliminado no dia 2 de abril de 1955, na zona rural do Município de Santa Terezinha, Bahia (FRANCO, 1969). Em 1958, na XV Conferência Sanitária Pan-Americana, em Porto Rico, foi oficialmente declarado que o País conseguiu erradicar o vetor (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

Em 1967, confirmou-se a reintrodução do *A. aegypti* no País, no Estado do Pará, e em 1969, no Estado do Maranhão. Mas, em 1973, um último foco foi eliminado e o vetor foi novamente considerado erradicado no território brasileiro (NOBRE, et al, 1994).

Entretanto, em função de falhas na vigilância epidemiológica e de mudanças sociais e ambientais decorrentes da urbanização acelerada, em 1976 o *A. aegypti* retorna

24

ao Brasil (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2003), sendo confirmadas reinfestações nos Estados do Rio Grande do Norte e do Rio de Janeiro e, desde então, o Ministério da Saúde tem implementado programas de controle.

Na época, como não havia o registro de casos de dengue, todas as ações eram direcionadas para a erradicação do vetor. Em abril de 1990, a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) foi criada para coordenar as ações de controle de dengue (BRAGA & VALLE, 2007).

Em julho de 2001, a FUNASA abandonou oficialmente a meta de erradicar o vetor do País e iniciou trabalhos com o objetivo de controlar o mosquito em municípios com maior transmissão da doença (FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE, 2001; SILVA JÚNIOR *et. al.*, 2001).

Ao longo dos anos as políticas públicas no Brasil sobre dengue foram evoluindo. Anteriormente discutia-se a erradicação do mosquito, entretanto, percebeu-se que era impossível sendo somente possível devido a sua rápida proliferação. Então, como forma de controlar a doença o Ministério da Saúde elaborou planos e campanhas para combater esse vetor. Assim, dessas políticas públicas resultaram as Diretrizes Nacionais para Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue, formuladas em 2009 pelo Ministério da Saúde em parceria com os Conselhos Nacionais de Secretários Estaduais (CONASS) e Municipais (CONASEMS) de Saúde. Tais diretrizes fornecem elementos para que os planos de prevenção tenham a mesma ideia em todo país. O documento traz as responsabilidades de cada esfera do Sistema Único de Saúde (SUS), e ainda, contempla elementos para auxiliar estados e municípios na organização de suas atividades de prevenção e controle, em períodos de baixa transmissão ou em situações epidêmicas

(BRASIL, 2012).

3.2 - Mosquito vetor – *Aedes aegypti*

Os mosquitos são insetos dípteros, pertencentes à Família *Culicidae*, conhecidos também como pernilongos, muriçocas ou carapanãs. Os adultos são alados, possuem pernas e antenas longas e na grande maioria são hematófagos, enquanto as fases imaturas são aquáticas. Seu ciclo biológico compreende as seguintes fases: ovo, quatro estágios larvais, pupa e adultos (CONSOLI *et al.*, 1994).

As três primeiras espécies de mosquito foram descritas em meados do século XVIII, e alguns aspectos gerais de seu ciclo biológico também foram conhecidos.

25

Pensava-se que a única inconveniência desses insetos era o incômodo causado por sua picada. Somente nas últimas décadas do século XIX, quando se descobriu que a filariose bancroftiana, doença parasitária provocada pelo nematelminto *Wuchereria bancrofti* e a malária são transmitidas pelos mosquitos, que os cientistas passaram ao estudo mais detalhado de sua biologia. A partir da descoberta do papel desses insetos na veiculação de arboviroses, como a febre amarela, a dengue e as encefalites, o caso recebeu mais a atenção (CONSOLI *et al.*, 1994).

Ae. aegypti é um mosquito diurno, de coloração preta, com listras e manchas brancas, adaptado ao ambiente urbano (TAVEIRA *et al.*, 2001). Essa espécie possui um curto ciclo biológico com duração de 15 a 30 dias, em regiões tropicais (BESERRA *et al.*, 2006). As fêmeas se alimentam preferencialmente do ser humano e por isso apresentam alto grau de antropofilia (sociabilidade.). Os picos de atividade hematofágica (hábito de se alimentar com sangue) ocorrem durante o período matutino e vespertino (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

A alimentação sanguínea, se dá entre 48 e 72 horas, as fêmeas procuram locais ou recipientes que acumulam água, geralmente pobre em matéria orgânica, onde depositam seus ovos nas paredes internas próximos à d'água (CLEMENTS, 1999)

3.3 - Vírus e Sorotipos

O vírus da dengue é transmitido pelo mosquito *Aedes aegypti*, pertence ao grupo dos arbovírus e classificado como um *Flavivirus*. O vírus tem formato esférico e simetria

icosaédrico, com diâmetros de aproximadamente 55 nanômetros, constando em seu material genético uma fita de RNA (Ácido Ribonucleico). (KUHN et al. 2002). A família *Flaviviridae* é composta por três gênero; o *Pestivirus*; *Hepacivirus* e o *Flavivirus*, no qual estão agrupados os quatro sorotipos dos Vírus Dengue (DENV-1; DENV-2, DENV

3, DENV-4), Vírus da Febre Amarela, Vírus do Oeste do Nilo e da Encefalite Japonesa (GUBLER, 1998; HALSTEAD, 1988). Em 2013 foi isolado o quinto sorotipo o DENV 5 na Tailândia de um paciente com o quadro clínico grave de dengue. A caracterização do quinto sorotipo da dengue o DENV-5, foram feitas por análises do genoma e pela sorologia (NORMILE, 2013, MAMANI, 2014). Além do *Aedes aegypti* como principal vetor da dengue, existe também outra espécie transmissora do vírus, conhecido como *Aedes albopictus* um vetor secundário da dengue, encontrado com frequência em regiões rurais, silvestres e periurbanos, vetor competente para pelo menos 22 arbovírus, incluído

26

o sorotipo 4 do DENV. (GRATZ, 2004; CECÍLIO et al., 2009; SERUFO et al. 1993; CHIARAVALLOTI-NETO et al. 2002, SANTOS 2003; MARTINS et al. 2012). O quadro clínico da dengue tradicional de febre alta, dor e manchas vermelhas no corpo, vômitos, fortes dores de cabeça, podem evoluir para a febre hemorrágica da dengue (FHD) ou síndrome do choque do dengue (SCD). A incubação do vírus nos pacientes é de aproximadamente de 4 a 7 dias, os sintomas podem mudar de acordo com cepa do vírus, ou seja, sofre mutações significativas, como se adaptar a novas condições ambientes. (GIBBONS E VAUGHN, 2002, HALSTEAD 2002, WHO, 2009).

3.4 - Transmissão

A transmissão do vírus da dengue ao ser humano ocorre pela picada da fêmea do *Aedes aegypti*, que alimenta-se de seivas, flores e frutos, mas preferencialmente por sangue humano em dois períodos do dia, durante o amanhecer e ao entardecer, para completar seu ciclo gonotrófico, realizando uma ou mais alimentações sanguíneas, para obter nutrientes necessários ao desenvolvimento dos ovários e manutenção dos ovos, constituindo um processo essencial no ciclo de vida dessa espécie, aumentando a possibilidade de infecta-se por um dos cinco sorotipos do DENV, diferente do mosquito macho que alimenta-se apenas de néctar e seiva das plantas . De 8 a 12 dias de repasto sanguíneo, o que equivale o período de incubação viral no mosquito, a fêmea é capaz de

transferir o vírus pelo período de sua vida. Ovos são depositados pelas fêmeas nas paredes de recipientes, próximos a superfície da água de preferência com pouca matéria orgânica, podendo resistir a dessecação por mais de um ano (GÜNTHER et al. 2007, CECÍLIO et al. 2009, LE GOFF et al. 2011, MARTINS et al. 2012, ESPINOSA et al. 2014, JANSEN et al., 2010, CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Além da fêmea adquirir a infecção viral ao se alimentar com o sangue de um indivíduo contaminado, ela também pode ser infectada pela transmissão transovariana e a transmissão sexual, onde o vírus passa para fêmea através do esperma do macho contaminado (TEIXEIRA et al. 1999, BARRETO e TEIXEIRA 2008, GIL et al. 2010, FERNÁNDEZ et al. 2011).

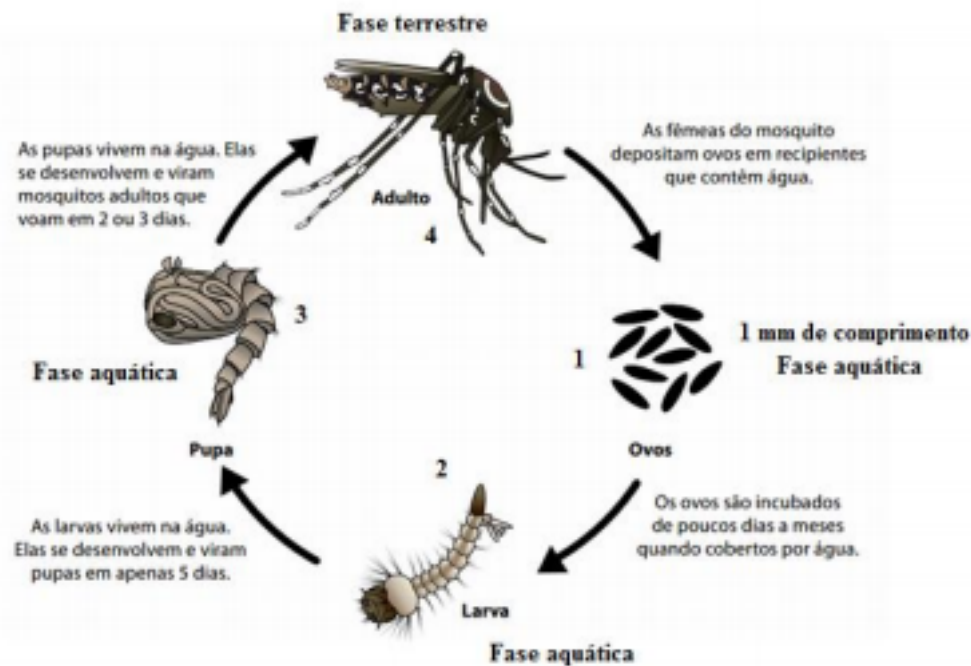
3.5 - Ciclo de vida

O *Aedes aegypti* em seu desenvolvimento apresenta metamorfose completa em seu ciclo evolutivo, por isso é conhecido como holometábolo, mosquito que sofre

27

metamorfose. O *Ae. Aegypti* passa por duas fases de desenvolvimento em dois ambientes diferentes: a fase aquática, ovos, larvas em quatro estágios larvais e pupa, já representando a fase terrestre temos os mosquitos adultos que é dividido em cabeça, tórax e abdome (FIGURA 1) (FORATTINI, 2002).

Figura 1 - Ciclo de vida do *Aedes Aegypti*



Fonte: Adaptada de (URDANETA-MARQUEZ E FAILLOUX, 2010)

3.5.1 - Ovos

Os ovos do mosquito *Aedes aegypti* são elípticos ou ovais de contorno alongados e fusiforme em forma de fuso, ou seja, alongados e com extremidades mais estreitas, muitas vezes achatado e um pouco côncavo, medindo aproximadamente 0,4mm a 1mm de comprimento (FORATTINI, 2002).

Inicialmente a membrana externa dos ovos são brancos (pálidos) e flexível no momento da oviposição, mas rapidamente torna-se rígida e adquirem uma cor negra brilhante ao entrar em contato com o oxigênio, garantindo a proteção do embrião nele contido, sendo que os inférteis não atingem a colocação escura (figura 5). Os ovos são colocados em conjuntos ou isoladamente, nas paredes úmidas do recipiente ou

28

diretamente na superfície da água, e quando entram em contato com a água levam de 10 a 30 minutos para eclodir. Porém tornam -se resistentes a dessecação, capazes de resistir mias de um ano. (ALMEIDA et al., 2008; BRASIL, 2001b; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994, 1998; NATAL, 2002; AGUIAR, 2006; FORATTINI, 2002).

As fêmeas realizam até cinco oviposição, colocando em média 120 ovos (MARQUES; SERPA; BRITO, 2006). Depositando-os em diversos criadouros, não

necessariamente apenas em uma casa, o que contribui para dispersão do mosquito (AGUIAR, 2006; EDMAN et al., 1998).

Figura 2 - 1 – Abdome da fêmea do *Aedes aegypti* durante a saída de ovos, (Acervo do OSWALDO CRUZ). 2 – Formato dos ovos



Fonte: (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

3.5.2 - Larvas

O *Aedes aegypti* é um mosquito holometabólico que tem sua fase larvária como um período de alimentação e crescimento, alimentando-se de matérias orgânicas, bactérias, fungos e protozoários que se acumulam nas paredes, no fundo e na superfície da água dos recipientes que se encontram (BRASIL, 2001b). A larva tem aspecto vermiforme (forma de verme) e dividida em cabeça, tórax e abdome, com uma coloração que varia entre esverdeado, esbranquiçado e avermelhada. Um sifão respiratório curto e mais escuro que o corpo, para realizar a respiração traqueal ao subir na superfície da água, ficando em posição perpendicular (FUNASA 2001, FORATTINI 2003, BECKER et al. 2010, FORATTINI, 2002, CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Possuem fotofobia, ou seja, são sensíveis à luz e a movimentos bruscos na água, deslocando-se rapidamente em direção ao fundo do recipiente (CONSOLI; OLIVEIRA,

29

1998). As larvas possuem quatro estágios de evolução conhecidos como período larvário (L1, L2, L3 e L4), o quarto estágio origina a pupa e é considerado o período mais longo dessa fase, pois depende da temperatura, da luz e da quantidade de larvas do criadouro e de alimentos disponíveis, levando em média 7 dias nessa fase (FORATTINI, 2002).

Figura 3- Fases Evolutivas do *Aedes aegypti*: do ovo, aos quatro estádios da larva até a pupa.



Fonte: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/kkitdengue2/epidemiologia/imagens.html>

3.5.3 - Pupas

As pupas não se alimentam e vão passar por uma metamorfose para transformarem-se em mosquitos adultos. (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). Esses organismos são desprovidos de mandíbulas funcionais. (FORATTINI, 1996). Segundo Consoli & Oliveira (1994), as pupas têm aspecto de vírgula.

Inicialmente possuem a mesma cor da larva, porém vão escurecendo conforme se aproximam da emergência do adulto. Seu corpo é provido de cerdas e é dividido em cefalotórax e abdômen. Para realizar a respiração, a pupa é provida de um par de estruturas chamadas de trompas respiratórias, encontradas no cefalotórax.

As pupas ficam normalmente paradas em contato com a superfície da água, porém, quando são incomodadas, se movimentam com muita rapidez. (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

Forattini (2002) afirma que pupas que irão dar origem aos mosquitos do sexo feminino são geralmente maiores que as pupas que darão origem aos mosquitos do sexo masculino. Ressalta ainda que, em condições de temperatura e umidade normais, a fase de pupa dura cerca de dois dias ou pouco mais.

Neste período de pupa são utilizados os nutrientes que foram armazenados durante a fase larval; passam então por uma metamorfose e se transformam em

mosquitos adultos, passando a viver em ambiente terrestre. (CARDOSO, 2009).

Figura 4 - Pupa de *Aedes aegypti*.



Fonte: <http://medent.usyd.edu.au/arbovirus/mosquit/photos/mosquitphotos.htm> #aegypti, 2009.

3.5.4 - Adulto

O corpo dos mosquitos adultos é dividido em cabeça, tórax e abdômen. Na cabeça encontram-se os olhos, antenas e palpos e órgãos do sentido. No tórax estão localizados os apêndices, especializados para a locomoção, as patas e as asas. No abdômen estão localizados os órgãos internos. Seu exoesqueleto é formado principalmente por quitina. (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

Segundo Forattini (2002), os mosquitos adultos representam a fase de reprodução e dispersão do inseto. Após a fecundação, as fêmeas apresentam a necessidade de realizarem o processo de hematofagia, chamado também de repasto sanguíneo; somente assim se inicia a maturação de seus ovos.

O metabolismo energético da grande maioria dos mosquitos, machos e fêmeas, depende da ingestão de carboidratos, frequentemente provenientes de seivas, flores e

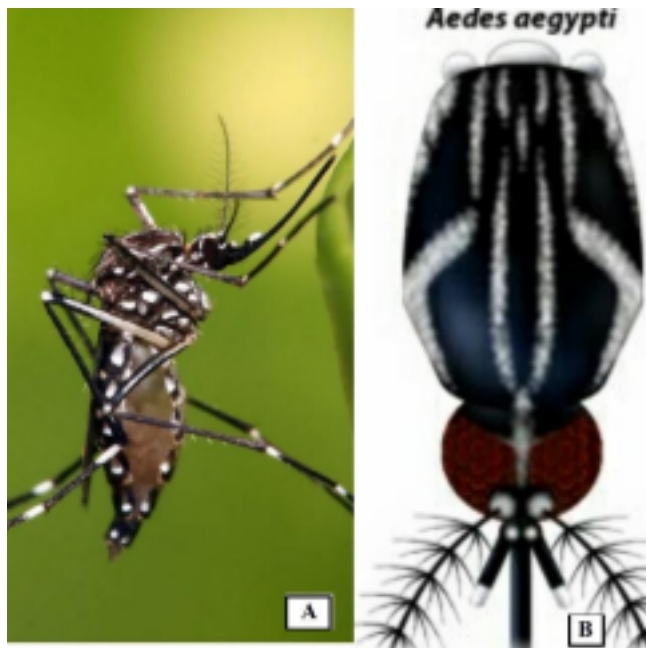
31

frutos. O glicogênio e triglicérides acumulados são determinantes para o potencial de atividade e longevidade. (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

O mosquito *A. aegypti* adulto (Fig. 5A) é facilmente reconhecido por sua cor,

geralmente marrom, apresentando uma nítida faixa curva branco-prateada em cada lado do tórax e outras duas faixas mais fina, reta, longitudinal e central, as quais formam a figura de uma lira (Fig. 5B). (LOZOVEI, 2001).

Figura 5 - Aspectos da morfologia externa do adulto fêmea de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).



Fonte: <https://www.pragaseeventos.com.br/saude-publica/identificando-o-mosquito-da-dengue-culex-x-aedes-aegypti-x-aedes-albopictus/> Acesso em: 11/09/16

Conforme Natal (2002) o corpo do mosquito apresenta manchas e listras brancas com fundo escuro, servindo como um tipo de camuflagem para o momento em que a fêmea vai picar sua vítima.

Segundo Beserra et.al. (2006) quando o *A. aegypti* encontra-se em condições ambientais não favoráveis, a fêmea diminui sua fecundidade para assim aumentar sua longevidade, então conseguindo superar as condições desfavoráveis.

Esses mosquitos possuem uma agilidade muito grande, de tal modo que, se durante o repasto sanguíneo o hospedeiro se movimentar mesmo que seja delicadamente, a fêmea logo sai voando e procura outro hospedeiro para continuar seu repasto ou retorna logo em seguida para o primeiro hospedeiro. (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

Logo depois do término do repasto sanguíneo e a digestão, os óvulos já se

encontrando maduros, as fêmeas são estimuladas à oviposição. A fecundação se dá com a passagem dos óvulos pelo oviduto e ocorre a postura desses ovos férteis, no ambiente. (NATAL, 2002).

Consoli & Oliveira (1998) afirmam que os criadouros preferidos do *A. aegypti* são recipientes artificiais, tanto faz os que são encontrados abandonados no ambiente e preenchidos com água como os que são utilizados pelo homem para uso doméstico, como as caixas d'água. Natal (2002) ainda confirma que os ovos são depositados pela fêmea nas “paredes” desses recipientes, um pouco acima da água.

3.6 - Controle do *Aedes aegypti*

As alternativas de controle do *A. aegypti* visam à eliminação das larvas ou dos mosquitos adultos. Com relação às larvas, pode-se incluir a eliminação ou modificação dos seus habitats, como, por exemplo, a drenagem ou aplicação de inseticidas ou larvicidas nos ambientes. Já com relação aos mosquitos adultos, o controle pode ser feito de modo preventivo com a utilização de telas, repelentes ou ainda a aplicação de inseticidas (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2002, BORROR & DELONG,).

Para controlar o *A. aegypti* são realizadas intervenções como: ambiental, mecânica, biológicas, químicas e genéticas (BALDACCHINO *et al.*, 2015). Desde a década de 1970, o organofosforado temephos é o larvicida usado no Brasil para controle do *A. aegypti*. Em pouco tempo, casos de resistência a este inseticida em diversas regiões do Brasil começaram a surgir, levando à implantação de programas de monitoramento da suscetibilidade do mosquito aos inseticidas químicos (ANDRADE & MODOLO 1991; CAMPOS & ANDRADE, 2003; POLANCZYK *et al.* 2003; BRAGA *et al.* 2004; CARVALHO *et al.* 2004; LUNA *et al.*, 2004).

Quanto mais o inseticida for utilizado, mais rápido e maior é a seleção de insetos resistentes na população. A capacidade que os insetos possuem em tolerar concentrações inicialmente letais promove uma redução gradual na eficácia dos inseticidas, até sua ineficiência (CARVALHO *et al.*, 2004; CRUZ, 2002).

Devido à resistência dos mosquitos ao produto químico, um número maior de aplicações é utilizado, causando grandes impactos ao meio ambiente e ao homem.

(D'AMATO *et al.*, 2002).

No mundo todo, a utilização de plantas com fins medicinais e contra a ameaça representada por determinados organismos são hábitos comuns na cultura popular. Porém, seu uso no combate aos mosquitos é de certa maneira uma novidade em vigilância entomológica (SIMAS *et al.*, 2004).

Diversas substâncias extraídas da casca, do caule, das folhas e dos frutos de diversos vegetais têm demonstrado propriedades larvicida e de repelência no controle de diversos culicídeos, em especial para o *A. aegypti*. (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2002; ARRUDA *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2004; SIMAS *et al.*, 2004; KAUSHIK & SAINI, 2008; BAGAVAN & RAHUMAN, 2011; SIVAKUMAR R. *et al.*, 2011; EL-SHEIKH, *et al.*, 2012).

Esses produtos agem de diversas formas sobre os insetos, provocando também inibição da oviposição e da alimentação, distúrbios no desenvolvimento, deformações e infertilidade (ROEL, 2001). Reguladores de crescimento de insetos, os Insect Growth Regulator (IGR), causam modificações fisiológicas e morfológicas durante o desenvolvimento e o crescimento do inseto. O IGR mais utilizado é o diflubenzuron, inseticida fisiológico, e seu ingrediente ativo atua interferindo na deposição de quitina, um dos principais componentes da cutícula dos insetos (MARTINS & SILVA, 2004).

Uma alternativa para a substituição dos produtos químicos foi a utilização da bactéria *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (B.t.i.), que a partir de 1976 começou a ser utilizada no controle de insetos-pragas na agricultura, e atualmente é utilizado no controle de vetores de doenças, como é o caso do *A. aegypti* (POLANCZYK *et al.*, 2003). A ação do B.t.i se processa pela ingestão de esporos e cristais proteicos pelas larvas de mosquito. Uma vez ingeridos, os cristais são solubilizados no lúmen intestinal, em pH alcalino, liberando as protoxinas, que são clivadas por enzimas proteolíticas em fragmentos menores, tornando-se toxinas ativas (CHARLES, 1983). Estas toxinas ativas passam pela membrana peritrófica, interagem com a porção apical do epitélio do intestino médio da larva, dando início à formação de poros ou canais (LAHKIM-TSROR *et al.*, 1983), provocando distúrbios na regulação do potencial elétrico trans-membrana, causando lise colóide-osmótica das células do epitélio intestinal. (CHARLES, 1981). As toxinas interagem especificamente com receptores da membrana apical do intestino médio, causando danos ao epitélio, levando à morte da larva. (CHARLES, 1981; GILL *et al.*,

1992). Nas duas últimas décadas, ocorreu um aumento progressivo no número de produtos à base de B.t.i..(BECKER, 2000).

Outra forma de controlar o mosquito é alterar o processo de reprodução do mesmo, liberando machos estéreis. (KNIPLING, 1985). Os mosquitos estéreis são liberados no ambiente, de tal maneira que o resultado de acasalamentos resulte na inviabilização de ovos, podendo assim levar a extinção do mesmo. (BARTLETT, 1990). Os mosquitos se tornam estéreis devido ao uso de agentes que causam mutações, tais como a radiação gama. Criada pelo entomólogo americano Edward Knipping, a técnica de esterilização com energia nuclear já é utilizada em vários países como Peru, Chile, Portugal, Argentina, Austrália, África do Sul, Tailândia, Japão e recentemente no Brasil. Surge como uma medida alternativa a técnica usual de aplicação de inseticida, que, além de promover resistência do inseto ao produto químico utilizado, não é seletiva. (YANG, THOMÉ & ESTEVA, 2009).

Apesar dos avanços na área de controle dos mosquitos, ainda há muitos impedimentos quanto ao uso em âmbito comercial, pois a escassez de experimentos científicos na determinação da toxicidade ao homem e a outros organismos vivos é a real causa da impossibilidade de sua comercialização. As pesquisas são desenvolvidas simplesmente objetivando apenas a verificação da atividade larvicida.

3.7 - Controle alternativo: Inseticidas naturais

O uso de plantas com propriedades inseticidas é cada vez mais constante na luta contra o combate do *Aedes Aegypti*. Esta metodologia de combate foi bastante estudada nas últimas décadas, com o objetivo de reduzir ou eliminar os vetores, e diminuir o impacto causado pelos inseticidas sintéticos a saúde humana e ao meio ambiente, além de sua fácil obtenção (ROEL, 2001). Os extratos ou soluções derivadas de fontes naturais podem agir como larvicidas, repelentes, atrativos para as fêmeas na ocasião da oviposição ou até mesmo como inibidores no desenvolvimento do mosquito (BABU e MURUGAN, 1998).

As plantas produzem metabólitos primários, como aminoácidos e proteínas, moléculas essenciais para seu desenvolvimento. Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas contra insetos predadores e microrganismos, demonstra a ação inseticida

controle do gênero *Aedes*, como inseticida e larvicida (LUNA *et al.*, 2004; KIRAN *et al.*, 2006; OMENA *et al.*, 2007; CHAPAGAIN *et al.*, 2008; CHENG *et al.*, 2008; AUTRAN *et al.*, 2009; MELO SANTOS *et al.*, 2009).

Os inseticidas e larvicidas botânicos são derivados de plantas ou partes dela, utilizando o material triturado, material vegetal bruto ou seus produtos obtidos por extração aquosa pelo processo de hidrodestilação ou com solventes orgânicos (álcool, éter, acetona, clorofórmio, hexano), ou destilação. Pesquisadores buscam desenvolver fórmulas e métodos para a produção de inseticidas de origem vegetal, já que essa metodologia de controle está crescendo consideravelmente (MENEZES, 2005).

Estudos esclarecem os efeitos tóxicos de extratos botânicos sobre o *Ae. Aegypti*. O produto é absorvido pelo inseto impedindo a respiração e levando à morte ou é ingerido pelo inseto provocando redução na alimentação (MENEZES, 2005; BIERMAN, 2009).

3.8 - Cambará de Chumbo (*Lantana Camara*)

O *Lantana camara* (*Verbenaceae*) conhecida como cambará de chumbo, (FIGURA 6) foi inicialmente estudado por Linnaeus, em 1753, que descreveu 7 espécies, sendo seis (6) originárias da América do Sul e uma (1) da Etiópia. Estima-se que o número atual aproximado de espécies é 150, distribuídos em 50 países (Ghisalberti, 2000). Ocupando regiões tropicais, sub-tropicais, o Cambará de Chumbo é das plantas que se desenvolve em áreas abandonadas tanto em regiões secas quanto úmidas e que, frequentemente, cresce em vales e encostas, competindo com as gramíneas pela dominância ecológica (SHARMA E SHARMA, 1989; PEREIRA, 2005).

No Brasil, *Lantana camara* é conhecida por diversos nomes populares: chumbinho, erva-chumbinho, cambará-de-espinho, cambará, cambará-de-duascores, cambará-juba, cambará-de-cheiro, cambará-de-chumbo, cambará- vermelho, cambará verdadeiro, cambará-miúdo, cambará-de-folha-grande, lantana, lantana-espinhosa (Lorenzi, 1982; Tokarnia *et al.*, 2000). É uma planta do sol, não exige do solo, adaptando-se fácil aos ambientes que se encontram, resistente a podas, brotando rapidamente e floresce praticamente o ano todo (CORREA, 1984), adaptando-se como plantas invasoras, expandindo-se em áreas não utilizáveis (WATANABE, 2005; BRITO *et al.*

2004).

Na literatura é citada como planta tóxica, capaz de provocar fotossensibilização (doença causada por toxinas) em bovinos ou ovinos, embora nem todas as espécies

36

possuam esta propriedade (BRITO et al 2004; TOKARNIA et al. 1999). Uma planta que frequentemente é utilizada na medicina artesanal, como anti-séptico, contra hemorragias, gripes, e no tratamento de diarreia (SAGAR et al. 2005). São reconhecidos também propriedades alelopáticas, substâncias liberadas pela planta e solúveis em água (GORLA & PEREZ, 1997), e atualmente destaca-se com importantes efeitos repelentes contra larvas de mosquitos *Aedes* (IANNACONE & LAMAS, 2003).

Figura 6 - Cambará de Chumbo, *Lantana Camara* (Verbenaceae)



Fonte: AUTORA, 2016

3.8.1 - Características Botânica

Características gerais: planta perene (arbusto), ereta, com reprodução por

sementes, aromática, ramificada, nativa do Brasil, de 0,5 – 0,2 metros de altura. As folhas são simples, ásperas e têm de 5 - 7 cm de comprimento, flores de coloração amarela e vermelha (Lorenzi, 1982). Em contato com as folhas, podem causar irritação da pele,

37

além de apresentarem um cheiro forte que pode provocar dor de cabeça e vertigem (Mello et al., 2003). O fruto é uma baga globosa e drupas ovoides o, negro-arroxeadas, de 3 - 4 mm de diâmetro (Lorenzi, 1982).

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

Os trabalhos estão sendo conduzidos no Laboratório de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), Redenção, Ceará, em colaboração com o Laboratório de Biotransformações e Produtos Naturais (LBPN) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

4.1 - Planta

4.1.1 - Coleta e identificação do material botânico – Cambará de Chumbo (*Lantana Camara*)

A coleta das folhas da planta Cambará de Chumbo (*Lantana camara*) (figura 7), foram coletadas nos meses de junho e agosto de 2016, para obtenção dos extratos etanólicos e extração do óleo essencial, respectivamente, no sítio Vale do Alemão em Pernambuquinho, distrito de Guaramiranga-CE (S4°12'22.7" e W38°57'00.8").

É uma região caracterizada por possuir um clima tropical úmido (pela classificação Köppen e Geiger), com estação chuvosa nos períodos de janeiro a julho, sendo sua precipitação entre 1560mm - 1730mm anuais, segundo o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). A temperatura varia de 17 a 26°C, com umidade relativa de 81 a 91% e com uma vegetação desde a caatinga arbustiva densa à mata ciliar.

A exsiccata do material botânico foi encaminhada ao Herbário Prisco Bezerra do Departamento Botânico da Universidade Federal do Ceará (UFC) campus do Pici, em

seguida identificada e registrada no acervo pela taxonomista Profa. Dra. Maria Iracema Bezerra Loiola (LOIOLA, M.I.B), com o registro EAC60819.

Figura 7 - Cambará de Chumbo, *Lantana Camara* (Verbenaceae)

38



Fonte: AUTORA, 2016

4.1.2 - Processamento do material vegetal

Após a coleta foi realizada a triagem através da separação manual dos caules e folhas, com vistas à eliminação de material estranho, pesagem do material e secagem individual das flores para a estabilização do material vegetal.

A estabilização do material vegetal impede à atividade enzimática e, assim, evita a alteração dos compostos químicos originalmente presentes no vegetal. Consiste na desnaturação proteica das enzimas celulares, através da destruição das suas estruturas quaternária e terciária.

Assim, folhas foram rasgadas e dispostas em recipientes para serem pesadas e logo após levadas para a estufa incubadora EIP-010 (Caltech®) com ar circulante para evitar a saturação com vapor d'água que vai sendo desprendido do material que está a secar e exposto a uma temperatura constante de 50 ° C, durante 48 horas para secagem

(figura 8).

Figura 8 - Cambará de Chumbo, *Lantana Camara* (Verbenaceae), processo de desidratação folhas.

39



Fonte: AUTORA, 2016

A secagem tem por finalidade a retirada de água e com isso, impedir reações de hidrólise e crescimento microbiano. A umidade residual depende do tipo de órgão que constitui o material vegetal, no caso a folha. Propicia a redução de volume e de peso e facilita a moagem dos materiais. Caracterizam-se pela exposição a temperaturas relativamente baixas, inferiores a 60 °C, e longo tempo de exposição, em torno de 7 dias.

As folhas secas foram pesadas novamente em balança de precisão modelo BL3200H (Marte®). Logo após, o material foi triturado em liquidificador (Philips®) e armazenado em um béquer de 1000 ml.

4.2 - Preparação do extrato etanólico das folhas de *Lantana camara*

O material, após a trituração com aproximadamente, 0,35 mm de tamanho das partículas, foi separado 100 g da amostra e adicionado em 450 ml de álcool etílico hidratado (etanol) 92,8%, permanecendo em repouso de 24 a 48 horas, conforme. O extrato etanólico foi obtido após várias extrações sucessivas em intervalos de quatro dias.

Posteriormente foram filtrados (figura 9), e acondicionados em frascos e/ou béqueres, as soluções extrativas filtradas foram submetidas ao processo de rotoevaporação, à

temperatura de 60° a 70° C, sob pressão de 500 a 750 mmHg, com rotação de 40 a 80 RPM, onde resultou em um extrato bruto etanólico de 35,49g (figura 10).

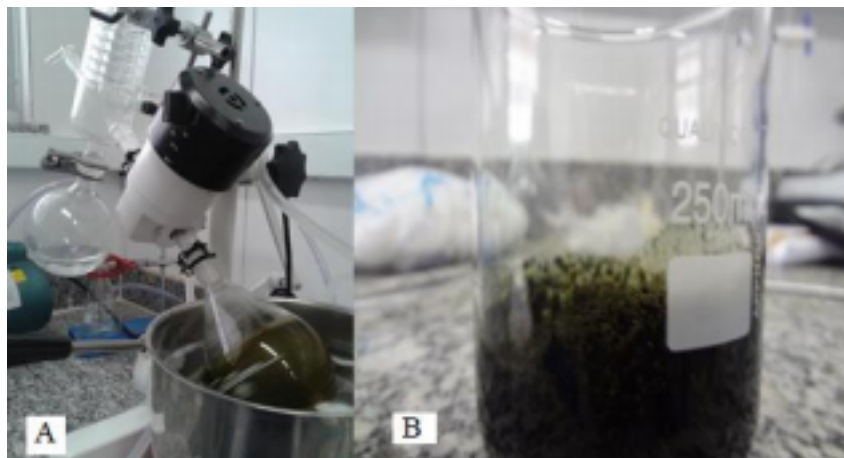
Figura 9 - Filtração da solução etanólica em repouso

40



Fonte: AUTORA, 2016

Figura 10 - (A) Processo de rotaevaporação do extrato etanólicos bruto. (B) Extrato etanólicos final.



Fonte: AUTORA, 2016

4.3 - Extração do Óleo Essencial das folhas de *Lantana Camara*

O óleo essencial das folhas do Cambará de Chumbo (*Lantana Camara*), foi extraído pelo método de hidrodestilação do tipo *Cleavenger* adaptado (TISSERAND, 1995), como mostra a (figura 11). O processo consiste em vaporizar o óleo essencial por

uma corrente de vapor de água (WATERMAN, 1993), acoplado à balão de fundo redondo de 2000mL, permite a separação do óleo e da água (hidrolato) e resfriamento do óleo, evitando a decomposição do mesmo.

As 310g de folhas foram colocadas no balão de fundo redondo com água deionizada, e adicionado na manta aquecedora. O tempo de extração de 2 horas a partir

41

da ebulição da amostra, seguindo as recomendações de tempo de hidrodestilação de Azevedo et al. (2002). Os óleos voláteis apresentam tensão de vapor mais elevadas que a da água, saindo no alto do destilador, e a seguir passa por um resfriamento. Então a água e óleo são condensados. Nesse produto de saída pode se ver a diferença de duas fases, óleo na parte superior e na inferior a água; elas são separadas por um processo de decantação. Durante a destilação continuou-se a adicionar água através do condensador de fluxo vertical. Em seguida retirou-se a água e logo em depois o óleo. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e filtrou-se a mistura em papel pregueado, lavou-se com CH_2Cl_2 (Diclorometano) e em seguida levado ao evaporador rotativo para a retirada do solvente.

O material obtido foi 1,2g, com densidade de $0,879\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, e rendimento em massa de 0,8%.

Figura 11 - Extração do óleo essencial da folha de *L. camara* por hidrodestilação do tipo *Cleavenger*

4.4 - Atividade Antioxidante do óleo essencial do *Cambará de Chumbo (Lantana camara)* por DPPH

Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexos de metais.

42

Eles podem ser sintéticos ou naturais e, para serem utilizados em alimentos, devem ser seguros para a saúde. Entre os naturais destacam-se ácido ascórbico (vitamina C), vitamina E e β -caroteno.

Os radicais de oxigênio (radicais hidroxila e peroxila) e o ânion superóxido têm um papel importante nas reações bioquímicas/fisiológicas do corpo humano. No entanto, se houver produção excessiva de radicais de oxigênio durante os processos patofisiológicos ou devido a fatores ambientais adversos e não existirem antioxidantes disponíveis *in vivo*, podem ocorrer doenças e danos profundos em tecidos (PANNALA *et. al.* 2001).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de formas a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes, na prevenção de doenças crônico-degenerativas. Dentre estas técnicas destaca-se o método de sequestro de radicais livres por DPPH (*2,2-difenil-1-picrilhidrazila*). Sendo inicialmente escolhida por se tratar de uma metodologia simples rápida e sensível, muito conveniente para realização de “*screening*” de um número de amostras.

O radical estável 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) tem sido amplamente utilizado para avaliar a capacidade de antioxidantes naturais a partir dos extratos aquosos e etanólicos de vegetais sequestrando seus radicais livres (SILVÉRIO; CASTRO; MIRANDA, 2013).

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico empregando metodologias de quantidades significativas de reagentes, padrões e amostras, e apresentando limitações em relação ao número de análises simultâneas que podem ser realizadas.

A atividade sequestradora do óleo foi determinada usando *2,2-difenil-1-picrilhidrazil* (DPPH), um radical livre estável (HEGAZI, 2003). À medida que o DPPH

é reduzido por um antioxidante, desaparece a banda de absorção em 520nm, a coloração roxa muda para amarela. As medidas foram feitas adicionando à amostra uma mistura contendo 1ml da amostra em várias concentrações em etanol e 1ml de DPPH 60µM. Logo

após a absorbância foi medida em 520nm, para o branco foi feita 1ml de etanol sem amostra. A metodologia utilizada para a atividade antioxidante foi realizada em triplicata para cada concentração analisada (TEPE *et al.*, 2005).

43

4.5 - Atividade da toxicidade do extrato etanólico do *Cambará de Chumbo (Lantana camara)* por meio do bioensaio com *Artêmia Salina (Branchipus stagnalis)*

A *Artemia salina* Leach, da ordem *Anostraca*, é uma espécie de microcrustáceo filtrador que se alimenta basicamente de bactérias, algas unicelulares, pequenos protozoários e detritos dissolvidos no meio aquático. Sendo encontrada em água salgada e comumente usada como alimento para peixes.

A toxicidade desses microcrustáceos ocorre por meio do alto nível de concentração desses animais no tubo digestivo de indivíduos como, elucidado por Souto (1991), a taxa de filtração diminui com o aumento da concentração de partículas, ficando estas acumuladas e interferindo o processo normal de seus batimentos. Outro efeito das altas concentrações é que podem passar diretamente pelo tubo digestivo sem sofrer digestão, tornando o indivíduo subnutrido (NASCIMENTO *et. al.*, 2008).

A toxidade do extrato foi testada no modelo de *artêmia salina (Branchipus stagnalis)* baseada na técnica descrita por Meyer *et al.* (1982) adaptado. Os cistos (larvas) do crustáceo foram colocados em um béquer com água salina, sob aeração, iluminação artificial e controle da temperatura (26 - 30°C) e incubadas por 24 horas para eclosão dos ovos. (figura12).

Figura 12 - Recipiente contendo cistos de *Artemia salina* (A) durante um período de 48h, submetidos a iluminação artificial e eclosão da larvas para eclosão (B).



Fonte: AUTORA, 2017.

Foram utilizadas 18mg do extrato bruto das folhas do Cambará de chumbo (*Lantana Camara*) dissolvidos em 18mL de *dimetilsulfóxido* (DMSO) 1%. As amostras foram dissolvidas no banho ultrassônico para preparar a solução mãe. A partir da solução

44

mãe, 5mL foram dissolvidos em água salina até obter as concentrações de 31,2; 62,5; 125; 250; 500 ppm.

O ensaio foi realizado em triplicata de amostras, e água salina foi utilizado como controle negativo. Com o auxílio de uma pipeta de pasteur, foram transferidas 10 larvas para cada tubo de ensaio. Após 24 e 48 horas em contato com a suspensão dos extratos, realizou-se a contagem do número de larvas mortas. Foram consideradas mortas aquelas larvas que permaneceram imóveis por mais de 10 segundos após agitação suave dos tubos.

O cálculo da concentração letal média (LC₅₀) dos extratos foi feito a partir das cinco concentrações estudadas utilizando o programa de análise PROBIT log-dose (FINNEY, 1952).

4.6 - Prospecção fotoquímico do extrato etanólicos da folha do Cambará de chumbo (*L. camara*)

4.6.1 - Teste para Fenóis e Taninos

Em tubos de ensaio foi colocado 2,00 mL do extrato etanólico das folhas de *Lantana camara*, sendo adicionado 10 mL de água destilada. Depois se acrescentou três gotas de solução de cloreto férrico (FeCl₃), utilizando a pipeta de Pasteur, da solução de

cloreto férrico a 10%. Em outro tubo de ensaio foi preparado o teste controle para a presença de fenóis e taninos, usando 3 mL de água e 3 gotas de FeCl₃. Posteriormente, foi realizada comparação para detecção ou não na amostra de taninos e fenóis com os resultados expostos na Tabela 3.

Qualquer mudança na coloração ou formação de precipitado é indicativa de reação positiva, quando comparado com o teste em branco (água + Solução de FeCl₃). Coloração inicial entre o azul e o vermelho é indicativa da presença de fenóis, quando o teste em branco for negativo.

Assim, o teste para taninos e fenóis foi utilizado a solução de cloreto férrico (FeCl₃) foi avaliada da seguinte forma: a coloração azul indica possível presença de taninos hidrolisáveis ou gálico, e a coloração verde de taninos condensados ou catéquico.

- Coloração azul com precipitado → reação positiva para taninos hidrolisáveis.

45

- Coloração azul sem precipitado → reação negativa para taninos hidrolisáveis.
- Coloração verde sem precipitado → reação positiva para taninos condensados.
- Coloração verde com precipitado → reação negativa para taninos condensados.

4.6.2 - Teste para flavonoides (flavonóis, flavonas e xantonas)

Colocou-se em um tubo, 2,0mL do extrato etanólico das folhas de *Lantana camara*, sendo adicionado algumas gotas de ácido clorídrico (HCl) concentrado, pelas paredes do tubo e 0,5 cm de magnésio (Mg) em fita.

Após o fim da efervescência, foi observada, por comparação, a mudança na cor da mistura da reação em tubos previamente acidulados devem apresentar de a vermelho intenso para indicar a presença dessa classe de flavonoides e variação do amarelo para o vermelho negativo. Os resultados expostos na Tabela 3.

4.6.3 - Teste para flavonoides (antocianidinas, antocianinas e flavonóis)

Foram preparados três tubos de ensaio com 3 mL do extrato etanólico de folhas de *Lantana camara*, em cada um dos recipientes. O primeiro foi acidulado até pH 3, com

ácido acético (C₂H₄O₂); o segundo e o terceiro tubo foram alcalinizados entre o pH 8,5 e 11 respectivamente, usando solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 5%. Os resultados expostos no Tabela 4.

4.6.4 - Teste para Esteroides/Triterpenoides

Em um tubo de ensaio com 3 ml de extrato das folhas de *Lantana camara*, adiciona-se 1 ml de clorofórmio e 1 ml de 98% de ácido sulfúrico puro. A formação de cor variando de parda até vermelha indica a presença de esteroides. Os resultados expostos na Tabela 3.

46

Esteroides/Triterpenoides → *Coloração azul evanescente seguida de verde, indicar a presença de Esteroides/triterpenoides respectivamente.*

4.6.5 - Teste para saponinas

Em um tubo de ensaio, com 2,0 mL da solução etanólica, foi adicionado 5,0 mL de água destilada fervendo. Após resfriamento, agitou-se vigorosamente, deixando em repouso por 20 minutos. Os extratos hidroalcoólicos foram agitados por três minutos e depois foi observada a presença ou ausência de espuma persistente e abundante. Os resultados expostos na Tabela 3.

4.7 - Composição volátil do óleo essencial do cambará de chumbo (*Lantana Camara*) - Espectro em Massa (EM)

A análise do óleo foi realizada em um instrumento Hewlett-Packard 5971 GC/MS empregando as seguintes condições: coluna capilar de sílica fundida dimetilpolisiloxano DB-1 (30m x 0,25mm, 0.1µm *film thickness*); gás de arraste: He (1mL/min); injetor de temperatura; 250°C; detector de temperatura: 200°C; temperatura da coluna: 35°-180°C a cada 4°C/min, e então 180° - 250°C a cada 10°C/min; EM: Impacto de elétrons de 70 eV.

Os componentes individuais foram identificados por duas bibliotecas digitais de Fonte de Espectro de massas (EM) usando o Índice de Retenção (RI) como uma rotina de pré-seleção (STENHAGEN; ABRAHAMSON; MCLAFFERTY, 1974) e para confirmação uma inspeção visual de espectro de massas da literatura (ADAMS, 2001).

4.8 - Avaliação da atividade larvicida o extrato etanólico das folhas e flores Cambará de Chumbo (*Lantana Camara*) Frente Ao *Aedes Aegypti*.

As folhas foram lavadas em água destilada corrente, secas em estufa de circulação de ar com temperatura de 50° a 70°C graus, durante 48 horas. Após a secagem, foram pesadas, trituradas e submetidas à extração por maceração no etanol. O extrato foi filtrado e rotaevaporado, com rotação de 40 a 80 rpm e temperatura de 50° a 70°C graus.

47

Os ovos de *Aedes spp.* foram coletados no parque Barreto, localizado no bairro São João do Tauape, e na trilha do Cocó, no bairro do Cocó, ambos no município de Fortaleza-CE, com vistas de adquirir amostras de *Ae. Aegypti* e *Ae. Albopictus* de populações geograficamente distintas. A realização de tais coletas foi através de armadilhas de oviposição (conhecidas como ovitrampas), preparadas de acordo com FAY E ELIASON (1966).

As ovitrampas positivas foram enviadas ao Laboratório de Entomologia Médica do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, onde foram imersas em água destilada para induzir a eclosão dos ovos, cujas larvas resultantes foram transferidas para recipientes plásticos de 300 mL, sendo alimentadas com ração à base de proteína de soja e mantidas sob temperatura de 25 ± 2 °C. As pupas resultantes foram distribuídas em recipientes plásticos de 100 mL, os quais foram inseridos no interior de gaiolas, adaptadas à manutenção das formas aladas emergentes. Uma vez atingido o estágio adulto, os mosquitos, identificados de acordo com chave de classificação específica (FORATTINI, 1995), foram alimentados com uma solução de sacarose a 10%, embebida em algodão, e para o repasto sanguíneo das fêmeas foram utilizadas codornas (*Coturnix coturnix*) anestesiadas. Em acordo com Qadir (2014) os mosquitos foram expostos a um fotoperíodo controlado, com 14 horas de luz e 10 horas de escuro.

Larvas (20 espécimes/amostra) de 3° e 4° estádios da geração de descendentes

oriundos das colônias mantidas em laboratório de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, foram utilizadas para os ensaios larvicidas com a amostra obtida, de acordo com os parâmetros estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1981). As amostras foram submetidas ao tratamento com quatro concentrações diferentes (400, 600, 700, 900 ppm) dos extratos etanólicos, realizado em triplicatas, a partir das quais foram estimadas as concentrações letais do(s) produto(s) responsáveis pela mortalidade de 50% (CL₅₀) dos espécimes testados.

48

5 - MÉTODOS FÍSICOS DE ANÁLISES

5.1 - Cromatografia Líquida gravitacional em Coluna Aberta (CC) As cromatografias de adsorção em coluna foram feitas utilizando gel de sílica 60 da Merck (ϕ μ m 63-200) Art. 7734. O tamanho das colunas (comprimento e diâmetro) variou de acordo com a quantidade de amostra a ser submetida à cromatografia e adsorvente empregado.

5.2 - Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As cromatografias de adsorção em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando-se sílica gel 60 (ϕ = 0,004-0,005 mm) código 1094 da marca VETEC, em placas de vidro na dimensão de 10 x 5 cm com uma das faces revestida por uma camada de 0,5 mm de espessura. Também foram utilizadas cromatoplasas de gel de sílica 60 (ϕ = 2-25 μ m) sobre poliéster T-6145 da SIGMA CHEMICAL CO, com camada de 250 μ m de espessura e dimensões de 20 x 20 cm.

As revelações das substâncias nas cromatoplasas analíticas foram realizadas, através da exposição destas, a irradiação ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda 254 e 366 nm, emitidos por lâmpada modelo UVSL-25 da Mineral Light e/ou pela borrifação com solução de vanilina (C₈H₈O₃) 5g/100 mL da solução de ácido perclórico (HClO₄) 0,75 M/100 mL de EtOH (C₂H₆O), seguida de aquecimento em estufa (\approx 150 °C), por aproximadamente 3 minutos, ou ainda pela exposição a vapores de iodo

Os dados espectrais deste trabalho foram obtidos nos equipamentos da Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

5.3 - Ponto de fusão (pf)

Os pontos de fusão foram obtidos em equipamento de microdeterminação digital da METTLER TOLEDO, provido de uma estação de aquecimento FP82HT e uma central de processamento FP90. As determinações foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de 2 °C/min.

49

5.4 - Espectrometria de massa (EM)

Os espectros de massas do óleo essencial, ésteres metílicos e produtos de biocatálise foram obtidos no espectrômetro de massa Hewlett-Packard, modelo HP-5971 A, acoplado a cromatógrafo gás-líquido, modelo HP-5890 A, série II (CGL/EM), provido de coluna capilar de metil-fenil silicone (25,0 m x 0,20 mm x 0,25 µm) utilizando hélio a 1,0 mL/min como gás carreador no modo split, operando com gradientes de temperatura que variavam dependendo da natureza química dos compostos analisados. Para os compostos de baixa Massa Molecular utilizou-se um gradiente de 10°C/min (40-180°C) e de 40°C/min (180°-300°C) e para os de Massa Molecular mais elevada um gradiente de 10°C/min (100-180°C) e de 40°C/min (180-300°C), com a temperatura de injetor de 250°C e detector de 280°C.

5.5 - Cromatografia Gasosa acoplada a Detector de Ionização de Chama (CG-DIC)

A determinação dos excessos enantioméricos (ee) foi obtida com um cromatógrafo gasoso da THERMO ELECTRON modelo Trace GC Ultra equipado com uma coluna capilar quiral da Varian Chirasil-Dex CB (α-ciclodextrina, 25,0 m x 0,25 mm x 0,25 µm), utilizando hélio como gás carreador com fluxo de 1,0 mL/min no modo split. Foram utilizados dois programas de temperatura: 2°C/min (100-180°C) e 2°C/min (130- 160°C). A temperatura do injetor e detector foi 220°C.

5.6 - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de Próton (RMN ¹H) e carbono

¹³C), uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelos DRX-300 e DPX-500, operando na frequência de 300 e 500 MHz para próton e para carbono-13 75 e 125 MHz, respectivamente. Os solventes deuterados utilizados na dissolução das amostras e obtenção dos espectros foram: clorofórmio (CDCl₃), acetona [(CD₃)₂CO], metanol (C₈H₈O₃), e piridina (C₅D₅N). As multiplicidades das absorções foram indicadas segundo a convenção: s (singlete), d (dubleto), dd (duplo dubleto), t (triplete), ddd (duplo dubleto dubleto) hep (hepteto) e m (multiplete). O padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN ¹³C foi determinado através da utilização da técnica

50

DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), com ângulo de nutação de 135°, CH e CH₃ com amplitude em oposição ao CH₂. Os carbonos não-hidrogenados foram caracterizados pela subtração dos sinais do espectro BB (Broad Band) e DEPT e segundo convenção, a terminologia metílico, metilênico e metínico, foi aplicada para os grupos CH₃, CH₂ e CH, respectivamente.

6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 - Atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH

Através dos dados foi possível calcular atividade antioxidante do óleo de Cambará de chumbo (*Lantana camara*) e fazer comparativos com a Vitamina C e Trolox, através de uma equação da reta, para a obtenção de 50% de atividade (IC₅₀), como apresentados na Tabela 1. De acordo com a metodologia realizada (HEGAZI; EL HADY, 2002), o óleo obtido apresentou moderada atividade antioxidante, em comparação com os controles positivos trolox e vitamina C. Com base nos dados, podemos observar uma ação antioxidante, com IC₅₀ de 0,44mg.ml⁻¹, quando comparado com os padrões positivos de ácido ascórbico (0,27mg.ml⁻¹) e Trolox (0,23mg.ml⁻¹).

Tabela 1 - Percentagem do sequestro do radical livre DPPH para 50% de atividade (IC₅₀) do óleo essencial de CC.

<u>Tratamento</u>	<u>Concentração IC₅₀ (mg. ml⁻¹)</u>
Trolox	0,02

0,23	±
0,27	±
0,44	±

Vitamina C 0,01
Óleo (Cambará de Chumbo) 0,03
Fonte: AUTORA, 2016.

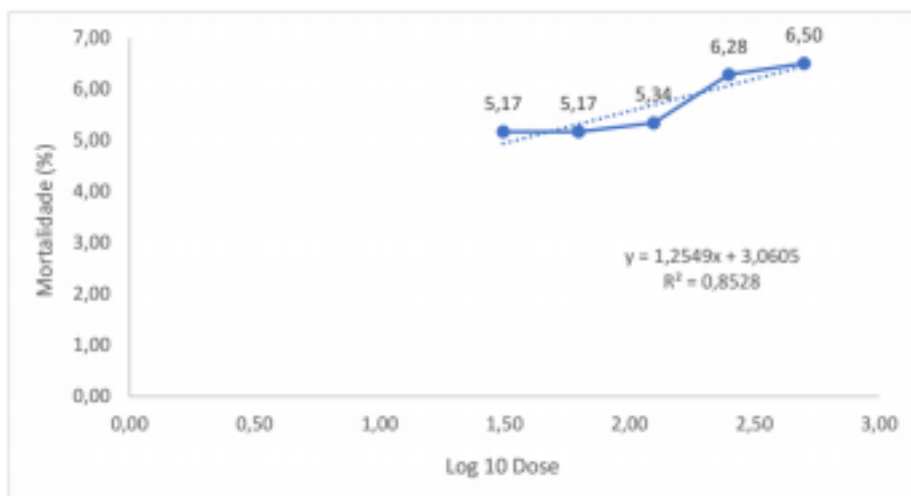
6.2 - Resultado da avaliação do bioensaio de toxicidade com *Artemia salina* dos extratos etanólicos das folhas de cambará de chumbo (*L. camara*)

De acordo com os resultados do bioensaio com artêmia salina (*Branchipus stagnalis*), nas concentrações testadas, no período de incubação com luz artificial e temperatura controlada entre (26 – 30°C) por 24 horas, apresentou uma concentração letal

51

(LC₅₀) de 35,699 ppm, de acordo com a metodologia adotada, sugere-se que o extrato, a partir desse ensaio, destaca alta toxicidade como mostra a figura 13 No período de 48 horas o extrato permaneceu com sua alta toxicidade, LC₅₀ de 7,671 ppm, matando um número elevado de larvas do crustáceo (Figura 14), afirmando que a concentração letal do extrato do cambará de chumbo (*Lantana camara*) não precisa ser alta para eliminar grande quantidade de larvas (Tabela 2).

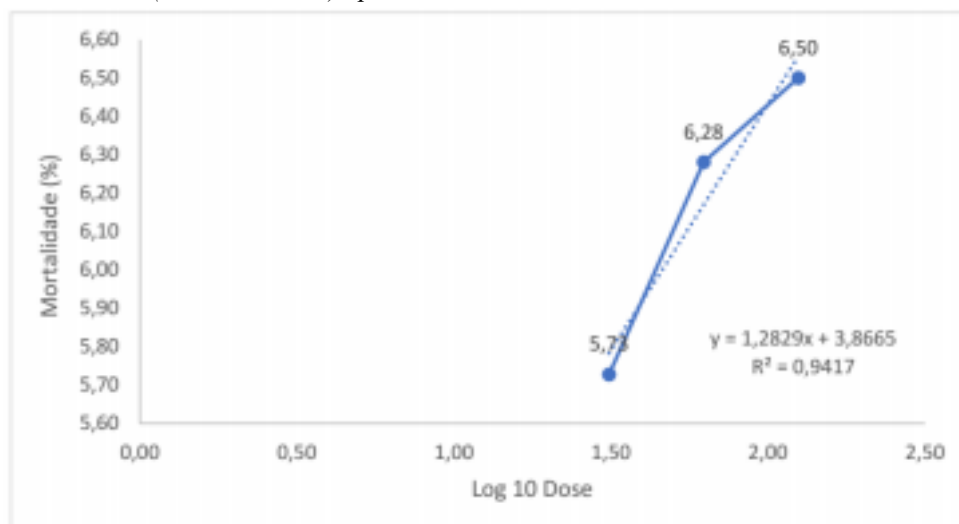
Gráfico 1 - - Curva concentração-resposta da mortalidade de *artêmia salina* ao extrato etanólico do Cambará de chumbo após 24 horas.



CL₅₀ = 35,699 ppm (Probit Analysis). LC – Concentração letal.

Fonte: AUTORA, 2017

Gráfico 2 - Curva concentração-resposta da mortalidade de *Artêmia salina* ao extrato Etanólicos do Cambará de Chumbo (*Latana Camara*) após 48 horas.



CL₅₀ = 7,671 ppm (Probit Analysis). LC – Concentração letal.

Fonte: AUTORA, 2017

52

Tabela 2 - Mortalidade média de *Artêmia Salina* de acordo com as concentrações do extrato etanólico do Cambará de Chumbo (*Latana Camara*).

Concentração do extrato (mg/mL)	Número de Cistos (Larvas) expostos. Processo por		Cistos (Larvas) mortas. 24 h	Cistos (Larvas) mortas. 48 h
	30	27		
0,5	30	28	30	0,0312
0,25	30	27	30	0,0312
0,125	30	19	28	0,0312
0,0625	30	17	27	0,0312

0,5 30 28 30 0,25 30 27 30 0,125 30 19 28 0,0625 30 17 27 0,0312

(Controle negativo/água

salina) 30 0 0 Fonte: AUTORA, 2017

O teste de toxicidade com *artêmia salina* é um ensaio biológico constantemente utilizado para testes toxicidades por ser rápido, confiável, de baixo custo e por ter demonstrado boa correlação com várias atividades biológicas (Meyer et al., 1982), como atividade antitumoral (McLaughlin, 1991; McLaughlin *et al.*, 1991, 1993). Segundo a escala Hodge e Sterner extratos com LD₅₀ < 50 ppm são consideradas substâncias altamente tóxicas. Os experimentos com amostras repetidas (triplicata) retificam que plantas do gênero *Lantana* possuem efeito acumulativo e quando administradas em doses que correspondem a uma dose letal causa grave intoxicações (Tokarnia *et al.*, 1984).

6.3 - Resultado dos estudos fotoquímicos do extrato etanólico da folha do Cambará de chumbo (*L. camara*)

A fitoquímica é responsável pela caracterização estrutural, avaliação de propriedades e investigações biossintéticas de metabólitos secundários produzidos por organismos vivos (RODRIGUES; SOUZA FILHO; FERREIRA, 2009; FILHO, 2010). Uma análise fitoquímica consiste no recolhimento e classificação botânica da espécie em estudo, na extração, na separação e na purificação de constituintes químicos, na

53

determinação estrutural de compostos isolados e nos ensaios biológicos e farmacológicos (BESSA; TERRONES, SANTOS, 2007).

Os testes foram executados em duplicatas e os resultados (Tabela 3) obtidos na triagem fitoquímica estabelecida conforme os seguintes parâmetros: Positivo = (+) e Negativo = (-).

O procedimento para a prospecção preliminar fitoquímica, foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Matos (1997), e os resultados obtidos baseiam-se em reações qualitativas de mudança de coloração e formação de precipitados e de suas propriedades físico-químicas dos constituintes que a planta compõe.

Tabela 3 - Resultados das análises fitoquímicas para reconhecimento dos metabólitos secundários distintos obtidos a partir da amostra de extrato etanólico das folhas de *L. camara*.

Metabólitos Secundários Resultado do extrato etanólico das folhas

Lantana camara

Saponinas -

Taninos -

Triterpenoides/Esteroides

Flavonoides totais

Hidrolisáveis ±
Condensados
Antocianidinas
Antocianinas
Flavonas e xantonas

Terpenos +

Fonte: AUTORA, 2017.

6.3.1 - Resultado para o teste de Fenóis e Taninos

No extrato etanólico bruto das folhas da *L. camara* (Figuras 13), foi identificada a presença de taninos condensados, observado pela coloração esverdeada. Esse método baseia-se na redução de Fe^{3+} , que determina o poder redutor. Compostos fenólicos, tais como os taninos, têm a capacidade de reduzir o Fe^{3+} do cloreto férrico ($FeCl_3$), formando um complexo colorido resultante do Fe^{2+} do cloreto férrico II ($FeCl_2$). Já os taninos hidrolisáveis não foram detectados pelos testes realizados.

54

6.3.2 - Resultado para o teste de flavonoides (flavonóis, flavonas e xantonas)

As flavonas e os flavonóis são protetores químicos que absorvem luz em comprimentos de onda mais curtos do que àqueles visíveis ao olho humano, protegendo as células vegetais dos danos causados pela fotoxidação. Além dessa função protetora, esses dois flavonoides ainda funcionam como sinais atrativos para insetos como as

abelhas, que enxergam na faixa extrema do ultravioleta. Segundo Buer & Muday (2004) as flavonas e os flavonóis não estão restritos às flores; eles também estão presentes nas folhas de todas as plantas verdes.

Esse teste é caracterizado pela alteração de coloração para a formação da tonalidade avermelhada. O teste foi considerado positivo quando o produto da reação desenvolveu coloração vermelho intenso (figura 14). Assim, após a efervescência, o aparecimento ou intensificação da cor vermelha indicou a presença dessas subclasses flavonoides (flavonóis, flavonas e/ou xantonas livres).

Segundo Martinez (2005), afirma que ocorre uma redução causada pelo magnésio (Mg) em presença do ácido clorídrico (HCl), que altera a coloração do composto flavonoídico. Para que os testes dos flavonoides sejam positivos é necessário que alguns compostos tenham o núcleo benzopirona na sua estrutura química.

6.3.3 - Resultado para o teste de flavonoides (antocianidinas, antocianinas e flavonóis)

Outras subclasses relevantes de flavonoides são as antocianidinas e as antocianinas. Sendo as antocianidinas são menos estáveis que as antocianinas. Isso se dá pelo fato de que às antocianidinas também designados por proantocianidinas, se originam por cisão oxidativa (e não hidrólise) em álcool, a quente.

As antocianinas são pigmentos fenólicos solúveis em água, pertencentes à classe dos flavonoides, responsáveis pelas várias nuances entre laranja, vermelho e azul, exibidas pelas frutas, hortaliças, folhas, raízes e principalmente flores. A identificação das antocianidinas e antocianinas foram realizadas a partir da comparação da coloração da amostra do extrato etanólico das folhas de *L. camara* na presença de em meio ácido e alcalino, visto que esses compostos possuem propriedades anfóteros, ou seja, se comportam diferentes em meio ácido e alcalino.

55

Os resultados a partir da observação da mudança na coloração do material foram avaliados consoantes a literatura descrita por Matos (1997) e os resultados expostos na tabela 4.

Tabela 4 - Alterações observadas na coloração do meio avaliadas no teste para antocianidinas, antocianinas e flavonoides.

Classes de substâncias	Coloração do meio		
	Ácido (pH 3,0)	Alcalino (pH 8,5)	Alcalino (pH 11)
Antocianidinas e Antocianinas	Vermelho	Lilás	Azul púrpura
Flavonois	-	-	Vermelho púrpura

Fonte: MATOS, 1997.

Dessa forma, o teste determinou a presença de antocianinas e antocianidinas nas amostras do extrato etanólico das folhas *L. camara* sendo importante para a verificação de possíveis atividades antioxidante e uso de princípios ativos para diversos empregos na medicina.

6.3.4 - Resultado para o teste de Esteroides/Triterpenoides

Os triterpenos possuem grandes potencialidades em atividades biológicas: são anti-inflamatórios, antibacterianos, fugicídicos, antivirais, analgésicos, cardiovasculares, antitumorais (SOARES, 2008).

Em relação a esteróides/triterpenóides, os resultados foram positivos, quando em comparação com o extrato bruto, notou-se o surgimento de uma coloração verde ou azul após a reação de Liebrman-Burchard figura 15.

6.3.5 - Resultado para o teste de saponinas

Não foi identificada a presença de saponinas no extrato etanólico das cascas do caule e das folhas de *L. camara* não havendo a formação de espuma persistente. O efeito espumante é decorrente de suas estruturas que apresenta uma parte lipofílica

56

(triterpeno ou esteróide), denominada aglicona ou sapogenina, e uma parte hidrofílica (açúcares) constituída por um ou mais açúcares.

6.4 - Resultado da atividade larvicida do extrato etanólico das folhas do Cambará de Chumbo (*Lantana Camara*), frente Ao *Aedes Aegypti*.

Para os bioensaios, utilizou-se larvas de terceiro e quarto estágio de *Ae. aegypti*, expostas a quatro diferentes concentrações dos extratos. O grupo controle foi composto de água deionizada e diluente. Foram utilizadas quatro repetições por tratamento, com 20 larvas por repetição. O extrato analisado em concentração de 600ppm, causou mortalidade média superior a 90% das larvas testadas e uma análise total de 95% de mortalidade, até 48 horas de exposição das larvas ao extrato, (tabela, 5). Verificou-se, por meio da análise de Probit, CL₅₀ de 136,9 ppm. Deve-se ressaltar que espécies da família *Verbenaceae*, com sabor amargo, possuem atividade inseticida e pesticidas o que aumenta o interesse para serem investigadas para ações frente ao *Ae. Aegypti*.

Tabela 5 - Ensaio larvicida com extrato etanólico da folha do Cambará de Chumbo (*Lantana câmara*) em 48 horas.

Concentração do extrato (ppm) larvas	Número de expostas. Processo por triplicata	Larvas mortas. 48 h
400 60 53		
600 60 54		
700 60 52		
900 60 54		

Fonte: AUTORA, 2017

O efeito larvicida do extrato estudado pode estar associado aos diversos compostos presentes na espécie, corroborando com relatos de Aguiar-Menezes (2005), onde o autor chama também à atenção para a atuação dos princípios ativos presentes nas plantas que são normalmente compostos por uma complexa mistura de substâncias que

pode causar inibição da alimentação de insetos ou dificultar o seu crescimento, desenvolvimento, reprodução e comportamento, apresentar ainda ações tóxicas capazes de atuar sobre o sistema nervoso central, podendo causar a morte dos insetos, e ainda podendo atuar como agente antialimentar, impedindo que os insetos iniciem a alimentação, contribuindo assim para sua morte. Esses compostos podem ainda está agindo isoladamente ou em sinergismo, fato esse que pode ser comprovado com relatos feitos por Bessa (2007) onde o autor afirma que o extrato bruto pode apresentar em alguns casos maior efeito quando comparado com suas respectivas frações onde alguns compostos são isolados, e em outras situações o isolamento desses compostos facilita o conhecimento da estrutura química das plantas além de contribuir com a produção de derivados semissintéticos, sendo que estes podem atuar com um melhor desempenho no que tange à potência, estabilidade ou segurança do composto.

6.5 - Resultado da composição volátil do óleo essencial do camarará de chumbo (*Lantana Camara*)

Em análise de CG/EM e FID, nove compostos foram identificados representando 84,1% do total de componentes detectados. A composição química de óleo está presente na tabela 16.

Tabela 6 - Constituintes do óleo volátil de Camará de Chumbo por CG/EM

Compostos	RI	Porcentagem %	Identificação
α - pineno	7,56	1,2	RI, EM, Literatura
β - pineno	8,94	1,0	RI, EM, Literatura
γ - terpineno	11,84	3,1	RI, EM, Literatura
Copaeno	23,25	5,0	RI, EM, Literatura
Cariofileno	24,72	7,3	RI, EM, Literatura
α - cubebeno	25,74	2,1	RI, EM, Literatura
Germacreno D	26,74	37,5	RI, EM, Literatura
Germacreno B	27,23	21,7	RI, EM, Literatura
(+)- δ -cadinene	28,06	5,2	RI, EM, Literatura

Os três principais compostos que compõem o aroma do óleo volátil foram sesquiterpenos, apresentando a seguinte composição: cariofileno (7,3%), germacreno B (37,5%) e o germacreno D (21,7%).

6.6 - CARACTERIZAÇÃO DE EEFALC-1 - Substância Isolada em *Lantana camara*

A fração em acetato de etila (EtOAc) obtida a partir da partição do extrato etanólico (EtOH) das folhas de *L. camara* (*Verbenaceae*) foi submetida a diversos procedimentos cromatográficos, iniciado por uma filtrante e posteriormente, cromatografia em coluna (CC), o que resultou no isolamento de um biosídeo da flavona, inédito na nesta espécie. A estrutura foi definida através da análise dos espectros de ressonância magnética nuclear (NMR) de ^1H e de ^{13}C (1D e 2D) e espectrometria de massas. Os dados corroboraram para que sua elucidação seja semelhante a estrutura (EEFALC-1) denominada: 5''-O- α -L-rhamnopyranosyl-1'- β -D-glucopyranoside- 4',6-dimethoxyflavone (**1**)

Figura 13 - Estrutura do flavonóide glicosilado

(**1**)

As unidades da glicona do referido biosídeo foram: um rhamnopyranosídeo e um glucopyranosídeo e a aglicona: uma flavona substituída, como mostrada na Figura 2.

Figura 14 - Partes segumentadas do flavonóide glicosilado.

Unidade ramnospiranosídeo

Unidade 7-hidroxi-4',6-dimetoxiflavona

59

Unidade glicopiranosídeo

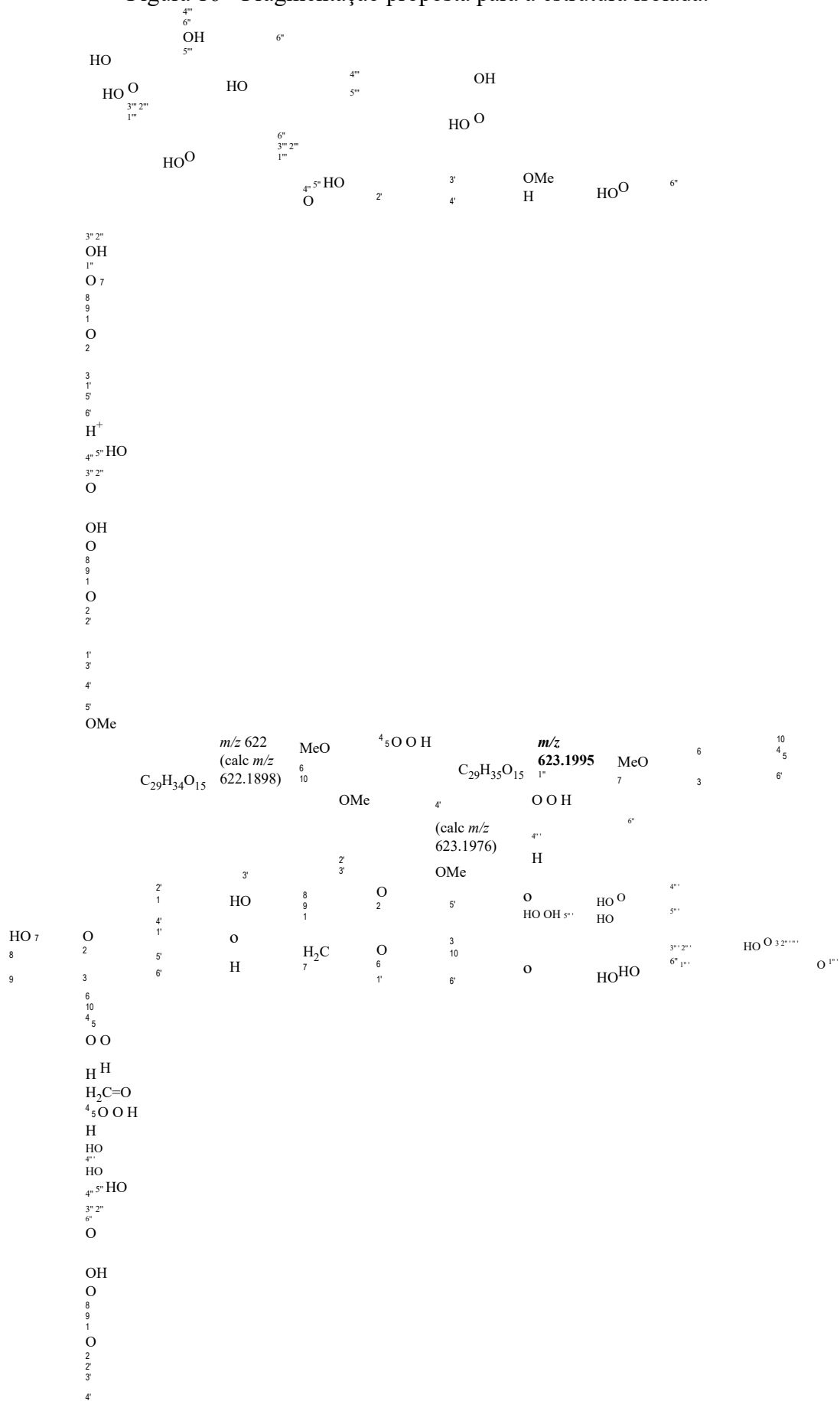
O espectro de massas da substância glicosilada **1** não revelaram a presença de fragmentos correspondentes aos íons moleculares, notando-se em todos estreita semelhança com o do pectolarina (ref) ($[M]^+$ 622, $C_{29}H_{34}O_{15}$), figura 3 e 4. Nos EM de **1** o pico base de m/z 622 representa a unidade aglicona com fórmula molecular $C_{29}H_{34}O_{15}$. A natureza glicosídica destas substâncias foi indicada pelo número de sinais oximetilênicos e oximetínicos observados nos espectros de RMN de 1H e de ^{13}C , e confirmada pelos espectros 2D de correlação homonuclear (COSY) e heteronuclear (1H ^{13}C -HMQC e 1H ^{13}C -HMQC), permitindo caracterizar as estruturas destes glicosídeos como mostrados na tabela 6.

O composto (**1**), foi obtido como um pó marrom pálido com a fórmula molecular $C_{29}H_{34}O_{15}$ foi determinado por HR-ESI-MS at m/z 622.1898 $[M+H]^+$ (calc. for 623.1898). O espectro de RMN 1H (Table 1) exibe sinais de metila devido a ramnose em δ_H 1.17 (d, $J=6.2$ Hz), dois prótons metilênicos oxigenados da glicose equivalentes em δ_H 3.9 (m) (br d, $J=9.9$ Hz), dois sinais de singletos para dois grupos metoxi em δ_H 3.76 (s) e 3.85 (s) (3H, s), dois prótons anoméricos em δ_H 4.25 (s) e 4.82 (d) (d, $J=7.2$ Hz), dois prótons aromáticos em 6.88 (s) e 6.92 (s), e um sistema de acoplamento do tipo AA'BB' em δ_H

8.022 (d, 8.9) e 7.15 (d, 8.9), ver figura 4. O espectro de ressonância de carbono (RMN ^{13}C), (Tabela 6) de **1** mostrou 29 sinais de carbono, que foram classificadas pelos valores do deslocamento químico e espectro de coerência heteronuclear quântica (HSQC) único como dois açúcares (ramnose: δ_C 17.78, 68.32, 70.44, 70.82, 72.06 e 100.45), e a glicose: 66.02, 69.57, 73.20, 75.78, 76.48 e 100.45), duas metoxilas de carbonos (δ_C 55,64 e 60,43), quatro carbonos metínicos do tipo sp^2 (δ_C 103.43, 94.46, 114.85 (2xC) e 128.52 (2xC)), nove carbonos quaternários do tipo sp^2 (δ_C 106.01, 122.80, 132.81, 152.29, 152.30, 156.57, 162.51 e 164.23) e um carbono carbonílico em δ_C 182.42.

Figura 15 - Espectrometria de massas de alta resolução com ionização por electrospray (HRESIMS).

Figura 16 - Fragmentação proposta para a estrutura isolada.



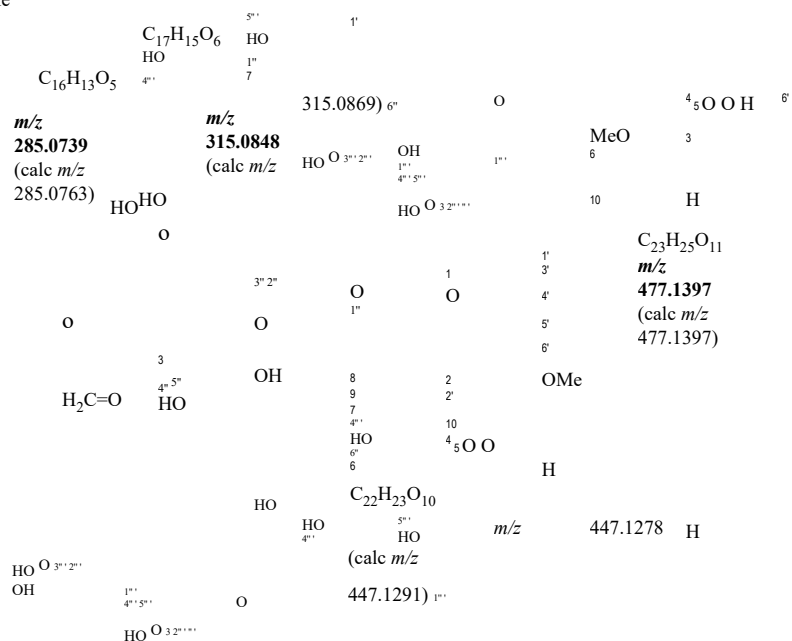


Tabela 7 - Dados espectroscópicos da estrutura (1) e um modelo (Mo-01) da literatura (WIDYOWATI et al, 2016).

(1)

HSQC HMBC

1 Mo-01

$$\delta_C \delta_H^2 J_{CH}^2 \delta_C \delta_H^3 J_{CH} \delta_C \delta_H C$$

2 164.23 - H-3 166.9 - 4 182.42 - H-3 184.6 - 5 152.29 - 154.4 - 6 132.81 - H-8; MeO-6 134.0 - 7 156.57 - H-8 158.0 - 9 152.30 - H-8 154.6 - 10 106.01 - H-3; H-8 108.0 - 1' 122.80 - H-3; H-3'/H-5' 124.7 - 4' 162.51 - H-2'/H-6'; MeO-4' 164.5 -

61

CH

3 103.43 6.88 (s) 104.5 6.68 (s) 8 94.46 6.92 (s) 95.5 6.89 (s) 2',6' 128.52 8.022 (d, 8.9) 129.8 7.95 (d, 8.1) 3',5' 114.85 7.15 (d, 8.9) 115.8 7.08 (d, 8.1)
 1'' 100.45 4.82 (d) 101.6 5.19 (d, 7.2) **2''** 73.20 3.35 74.8 3.58 (t, 8.3)
 3'' 75.78 H-3'' 77.9 3.52 (t, 8.9) 4'' 69.57 71.6 3.43 (m) 5'' 76.48 77.3 3.73 (m) 1''' 100.45 4.25 (s) 99.3 4.72 (br s) 2''' 70.44 71.1 5.15 (dd, 3.3, 1.6) 3''' 72.06 73.3 5.01 (dd, 9.9, 3.3) 4''' 70.82 71.3 3.42 (d, 9.9) 5''' 68.32 3H-6''' H-1''' 70.0 3.77 (m) CH₂
 6'' 66.02 3.90 (s) 67.5 4.05 (br d, 9.9) 3.76 (m)

CH₃

6''' 17.78 1.17 (d, 6,2) H-5''' 18.0 1.17 (d, 6,2) MeO-6 60.43 3.76 (s) 61.7 3.89 (s) MeO-4' 55.64 3.85 (s) 56.2 3.89 (s) HO-5 - 12.92 (sl)
 AcO-2''' - - - - 171.5 20.6 AcO-3''' - - - - 172.1 20.8

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Figura 17 - Espectro de RMN 1H (500

MHz, em MeOD) de 1. 7 -

-
1.93 (s) -
1.75 (s)

Com a demonstração da evolução das pesquisas que tratam das alternativas de controle sobre o vetor da Dengue, foi possível verificar que houve aumento na busca por maiores informações referente aos inseticidas botânicos, garantindo maior conhecimento sobre os compostos vegetais e sua melhor forma de utilização. É certo que todos vegetais

apresentam em sua composição, substâncias que conferem proteção para o seu desenvolvimento, apresentando propriedades tóxicas para patógenos, competidores, herbívoros e para o próprio homem. Entretanto, esta ação tóxica se corretamente manipulada, pode agir em benefício do homem, é este o objetivo de explorar o funcionamento metabólico das plantas. Cabe ressaltar que esta busca se limita a não prejudicar a forma de vida vegetal e, sim usufruí-la de forma consciente e sustentável. É possível verificar que existe a possibilidade de integrar esses métodos alternativos aos atuais métodos de controle gerando um manejo integrado. A utilização de compostos vegetais como controle de vetores é promissor e apresenta inúmeras vantagens como, rápida degradação, não persistindo por longo período no ambiente induzindo menor risco aos organismos não-alvo e menor índice de desenvolvimento de resistência pelos vetores; possuem rápida ação, causando morte gradativa ou imediata; apresentam toxicidade baixa em relação aos mamíferos; não são fitotóxicos, ou seja, não são tóxicos às plantas em baixas concentrações; e, por fim, apresentam alta disponibilidade de material vegetal e baixo custo de fabricação. Frente ao quadro apresentado nesse trabalho, deve-se continuar a busca por maiores informações sobre inseticidas botânicos a fim de contribuir para um melhor e mais eficaz controle contra a Dengue.

Em resumo, o estudo demonstra que nos extratos etanólicos das folhas do camará de chumbo (*Lantana camara*), a partir da observação e da investigação química contém compostos fenólicos, taninos e terpenos, principais metabólitos secundários das plantas. Desses os que foram detectados nos testes qualitativos baseados na coloração, precipitação ou espuma foram: flavonoides (flavonas, flavonois, xantonos, antocianinas, antocianidinas,) que podem servir como fontes naturais de agentes antioxidantes.

Os testes da avaliação antioxidante pelo método de DPPH, de toxicidade pela letalidade do extrato na *Artemia salina* também detectaram altos índices para todas essas atividades. O estudo também permitiu analisar a composição volátil do óleo essencial de *L.camara*, destacando três principais compostos responsáveis por seu forte aroma.

O extrato etanólicos foi submetido a diversos procedimentos cromatográficos, o que resultou no isolamento de um biosídeo da flavona, inédito na nesta espécie. A estrutura foi definida através da análise dos espectros de ressonância magnética nuclear (NMR) de ^1H e de ^{13}C (1D e 2D) e espectrometria de massas. Os dados corroboraram para que sua elucidação seja semelhante a estrutura (EEFALC-1) denominada: 5''-O- α -L-rhamnopyranosyl-1'- β -D-glucopyranoside-4',6-dimethoxyflavone.

8 - REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. *Identification of essential oils componentes by gas chromatography/TrapMassSpectrometryA, Ilured Publ. Corp., Carol Steam, IL (2001).*

AGUIAR, R. **A trajetória do *Aedes aegypti*: uma história anterior à dengue.**
Notícias do IOC, Fio Cruz 2006.

AGUIAR-MENEZES, E. L. **Inseticida botânico: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Embrapa Agrobiologia.** Seropédica, RJ. 2005. 58 p

ALMEIDA, M. C. D. M.; ASSUNÇÃO, R. M.; PROIETTI, F. A.; CAIAFFA, W. T. **Dinâmica intra-urbana das epidemias de dengue em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1996-2002.** Cadernos de Saúde Pública, v. 24, p. 2385-2395, 2008.

ALVES TMA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Smânia EFA, Júnior AS, Zani CL. **Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants.** Mem Inst Oswaldo Cruz 2000; 95(3): 367-73.

ANDRADE, C.F.S.; MODOLO; M.. **Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in integrated control.** Rev. Saúde. Publ. 25: 184-187. 1991.

ARRUDA, W.; OLIVEIRA, G.M. C.; SILVA, I.G.. **Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia Pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 36: 17-25. 2003.

AUGUSTO, L. G. S.; CÂMARA NETO H. F. **O combate químico das pragas domésticas: um problema oculto de saúde pública.** In: Augusto LGS, Carneiro RM, Martins PH. **Abordagem ecossistêmica em saúde – ensaios para o controle da dengue.** Recife, Universitária UFPE. 199- 212, 2005.

AUTRAN, E.S., NEVES, I.A., SILVA, C.S.B., SANTOS, G.K.N., CÂMARA, C.A.G., NAVARRO, D.M.A.F. **Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal**

65

activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). *Bioresource Technology*, v. 100, p. 2284-2288, 2009.

BABU, R.; MURUGAN, K. **Interactive effect of neem seed kernel and neem gum extracts on the control of *Culex quinquefasciatus* Say.** *Neem Newsletter*, v.15, n. 2, p. 9-11, 1998.

***Bacillus thuringiensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*.** *Rev. Saúde Pública* 37: 813-816. 2003.

BAGAVAN A.; RAHUMAN, A. Abdul. **Evaluation of larvicidal activity of medicinal plant extracts against three mosquito vectors.** *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 29-34. 2011.

BALDACCHINO, F. et al. **Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review.** *Pest Manag Sci*. 2015.

BARRETO ML, TEIXEIRA MG. **Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa.** *Estud av* 22: 53-72, 2008.

BARTLETT, A. C.. **Insect sterility, insect genetics, and insect control.** In **Handbook of Pest Management in Agriculture** Vol. II. D. Pimentel Ed., CRC Press, Boca Raton, FL. 1990.

BECKER N, PETRIC D, ZGOMBA M, BOASE C, MADON M, DAHL C, KAISER A. **Mosquitoes and their control.** Springer Science & Business Media, 2010.

BECKER, N.. **Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies.** In: CHARLES, J-F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application.** Dordrecht: Kluwer. 383-396.2000.

BERGO, E. S., et al. **Avaliação do desenvolvimento larval de *Anopheles darlingi* criado em laboratório sob diferentes dietas.** Revista de Saúde Pública. 24: 95-100. São Paulo. 1990.

66

BESERRA, E. B. et al. **Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba.** Neotropical Entomology, Londrina, v. 35, n. 6, p. 853-860, 2006.

BESERRA, E. B., et al. **Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba.** Neotropical Entomology. 35(6). 2006.

BESSA, T.; TERRONES, M. G. H.; SANTOS, D. Q. **Avaliação fitotóxica e identificação de metabólitos secundários da raiz de *Cenchrus echinatus*.** Revista Horizonte Científico vol.1, nº 7, Uberlândia/MG, 2007.

BESSA, Tatiana; TERRONES, Manuel G. H.; SANTOS, Douglas Q. **Avaliação fitotóxica e identificação de metabólitos secundários da raiz de *Cenchrus Echinatus*.** Universidade Federal de Uberlândia, 2007.

BIERMAN, ANA CRISTINA SAPPER. **Bioatividade de Inseticidas Botânicos sobre *Ascia monuste orseis* (LEPIDOPTERA: PIERIDAE).** 2009. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

BORROR, D.J. & DELONG, D.M. **Introdução ao estudo dos insetos.** São Paulo, Ed. Edgard Blücher. 653.1988.

BRAGA, I. A.; VALLE, D.. ***Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil.** Epidemiol. Serv.Saúde. Brasília. 16 (2): 113-118. 2007.

BRAGA, I.A, et al.. ***Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil.** Mem Inst

Oswaldo Cruz. 99: 199-203. 2004.

BRASIL (2012). **“Doenças e tratamentos: como o Brasil enfrenta a Dengue”**.

Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br>>. Acesso em: 01 novembro. 2016.

67

BRITO, M.F.; TOKARNIA, C.H. & DÖBEREINER, I. **A toxidez de diversas lantanias para bovinos e ovinos no Brasil**. Pesquisa Veter. Brasileira, v. 24, n.3, 2004.

BROGDON, W.G.; MCALLISTER, J.C. **Insecticide Resistance and Vector Control**. Emerging Infectious Diseases. 4(4): 605-613. 1998.

BUER, C. S.; MUDAY, G. K. **The transparent testa4 mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of Arabidopsis roots to gravity and light**. Plant Cell, v. 16, p. 1191-1205, 2004.

CAMPOS, J.; ANDRADE, C. F. S.. **Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos**. Rev. Saúde Pública, 35: 232-236. 2003.

CARDOSO, A. F.. **Vitelogênese do mosquito *Culex quinquefasciatus***. 2009. 27 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade São Paulo, São Paulo, 2009.

CARVALHO, M. S., et al. **Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temephos no Distrito Federal**. Rev. Saúde Pública. 38: 623-62. 2004.

CAVALIERE, M. J. et al. **Mitotoxicidade por organofosforados**. Revista de Saúde Pública. São Paulo. 30 (3): 267-72. 1996.

CECÍLIO, A. B.; CAMPANELLI, E. S.; SOUZA, K. P. R.; FIGUEIREDO, L. B.; RESENDE, M. C. **Natural vertical transmission by *Stegomyia albopicta* as dengue vector in Brazil**. Braz. J. Biol., 69(1); 123-127, 2009.

CHAPAGAIN, B. P.; SAHARAN, V.; WIESMAN, Z. **Larvicidal activity of saponins from *Balanites aegyptiaca* callus against *Aedes aegypti* mosquito**. Bioresource

Technology, v. 99, n. 5, p. 1165-1168, 2008.

CHARLES, J.F. **Action de la δ endotoxine de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur cultures de cellules de *Aedes aegypti* L. En microscopie electronique.** Annals of Microbiology, London. 134A:365- 381. 1983.

68

CHARLES, J.F. **Histopatologie de l' actino de la delta endotoxine de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur larves d'*Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** Entomophaga. 26: 203-212. 1981.

CHENG, S-S. et al. **Larvicidal activity of tectoquinone isolated from red heartwood type *Cryptomeria japonica* against two mosquito species.** Bioresource Technology, v.99, n. 9, p. 3617-3622, 2008.

CHIARAVALLOTI-NETO F, DIBO MG, BARBOSA AAC, BATTIGAGLIA M. ***Aedes albopictus* (S) na região de São José do Rio Preto, SP: estudo da sua infestação em área já ocupada pelo *Aedes aegypti* e discussão de seu papel como possível vetor de dengue e febre amarela.** Rev Soc Bras Med Trop 35: 351-357, 2002.

CLEMENTS, A. N. **The biology of mosquitoes**, vol. 1. London: Chapman & Hall, 1999.

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

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

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. O. D. **Main mosquitoes with relevance for health in Brazil.** 1 Reimpressão. Fiocruz, 1998. p. 228.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas,** Minist. Agric., IBDF, v.1, 1984.

CRUZ, I.. **Manejo da resistência de insetos-praga a inseticidas, com ênfase em**

Spodoptera frugiperda (Smith). Embrapa Milho e Sorgo. Documentos. 21: 15p. 2002.

Forattini **Culicidologia Médica. Identificação, biologia epidemiologia**. Vol II. Editora da Universidade de São Paulo, 860p. 2002.

69

D'AMATO, C.; TORRES, J.P.M.; MALM, O.. **DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano): Toxicidade e contaminação ambiental – uma revisão**. Quim. Nova. 25: 995- 1002. 2002.

DEGRAEVE, N.; CHOLLET, M.C.; MOUTSCHEN, J. **Cytogenetic and genetics effects of subchronic treatment with organophosphorus insecticides**. Archives of Toxicology, New York. 56: 66-67. 1984.

Digestive system. In V. H. Resh, & R. T. Cardé (Eds.), **Encyclopedia of Insects** (2nd edn, pp. 273–281). San Diego, CA: Academic Press. Terra & Ferreira 2009.

DONALISIO, M. R.; GLASSER, C. M.. **Entomological surveillance and control of dengue fever vectors**. Rev. Bras. Epidemiol..São Paulo. 5(3): 259-272. 2002.

DULOUT, F. N. **Sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in a population exposed to pesticides**. Mutation Research, Amsterdam. 143: 237-244. 1985.

EDMAN, J. D.; SCOTT, T. W.; COSTERO, A.; MORRISON, A. C.; HARRINGTON, L. C.; CLARK, G. G. **Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) movement influenced by availability of oviposition sites**. Journal of Medical Entomology, v. 35, n. 4, p. 578-83, Jul 1998.

EIRAS, Á. E.. **Culicidae: Parasitologia humana**. 11 edição. Rio de Janeiro: Atheneu. cap. 43 355-367. 2005.

El-Sheikh; TAREK, M.Y, et al. **Larvicidal and repellent effect of some *Tribulus terrestris* L., (Zygophyllaceae) extracts against the dengue fever mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae)**. Journal of Saudi Chemical Society. Saudi Arabia. 2012.

ESPINOSA M, GIAMPERETTI S, ABRIL M, SEIJO A. **Vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* collected in Puerto Iguazú, Misiones, Argentina.** Rev Inst Med Trop São Paulo 56: 165-167, 2014.

70

EVANS, W. C. Phenols and Phenolic Glycoside. In: _____. **Trease and Evan's Pharmacognosy.** 14. Ed. London: WB Saunders Company, 1996, p. 227

EYER, P. **Neuropsychopathological changes by organophosphorus compounds: a review.** Human & Experimental Toxicological. London. 14: 857-864. 1995.

FAY, R. W.; ELIASON, D. A. **A Preferred Oviposition Site as a Surveillance Method for *Aedes aegypti*.** Mosquito News, p. 531-535, 1966.

FERNANDES, Carlo Rivero Moura. **Efeito da densidade, da temperatura e da qualidade da água no ciclo de vida do *Aedes aegypti*.** 2006. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2006.

FERNÁNDEZ LD, PINEDA CC, FRANCOIS LA. ***Aedes (St.) aegypti*: relevância entomoepidemiológica y estratégias para su control.** AMC 22: 610-625, 2011.

FILHO, Raimundo B. **Contribuição da Fitoquímica Para o Desenvolvimento de um País Emergente.** Quimica Nova, v. 33, n. 1, 2010.

FINNEY, D. J. Probit Analysis. **Journal of the Institute of actuaries.** 2nd. Ed. 1952, 78 (3): 388-390.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica.** Vol. 2. São Paulo: EDUSP, 2002. 864 p.

FORATTINI, O. P. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** Cadernos de Saúde Pública, v. 11, n. 1, p. 157–158, mar. 1995.

FORATTINI, O. P.. **Culicidologia Médica: Princípios Gerais, Morfologia, Glossário**

Taxonômico. Vol 1. São Paulo. Editora da Universidade de São Paulo, 2002.

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

71

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Dengue: Instruções para pessoal de combate ao vetor – Manual de Normas Técnicas.**

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Direção do Centro Nacional de Epidemiologia: Jarbas Barbosa da Silva. Plano de intensificação das ações de prevenção e controle da Febre Amarela.** Funasa; Jul. 2002.

GARRETT, V. **Genotoxic and carcinogenic potencial of anticholinesterases.** In: BALLANTYNE, B.; MARRS, T. (Ed.). **Chemical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates.** Oxford: Butterworth. Heinemann. 233-240. 1992.

GHISALBERTI, E. L. **Lantana camara L. (Verbenaceae).** *Fitoterapia*, v. 71, n. 5, p. 467 - 486, 2000.

GIBBONS RV, VAUGHN DW. **Dengue: an escalating problem.** *BJM* 324: 1563-1566, 2002.

GIL DCQ, BENÍTEZ JEO, MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ M. **Competencia vectorial: consideraciones entomológicas y su influencia sobre la epidemiologia del dengue.** *IATREIA* 23: 146-156, 2010

GILL, S. S., COWLES, E.A., PIETRANTONIO, P.V. **The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins.** *Annual Review of Entomology*, Palo Alto. 37: 616-636, 1992.

GORLA, C.M. & PEREZ, S.C.J.G.A. **Influência de extratos aquosos de Folhas de *Miconia albicans* Triana, *Lantana camara* L, *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit e *Drimys winteri* Forst, na germinação e crescimento inicial de sementes de tomate e pepino.** *Revista Brás. Sementes*, v. 19, n. 2, p. 260-265, 1997.

GRATZ, N.G. **Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. Medical and Veterinary Entomology**, v.18, p.215-227, 2004.

GUBLER, D.J. **Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n.3, p.480-496, 1998.

72

GÜNTHER J, MARTÍNEZ-MUÑOZ JP, PÉREZ-ISHIWARA DG, SALAS-BENITO J. **Evidence of vertical transmission of dengue virus in two endemic localities in the state of Oaxaca, Mexico. Intervirology** 50: 347-352, 2007.

• HALSTEAD SB. **Dengue hemorrhagic fever: two infections and antibody dependent enhancement, a brief history and personal memoir. Rev Cubana Med Trop** 54: 171-179, 2002.

HALSTEAD, S.B **Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular Biology. Science**, v.239, n. 4839, p. 476-81, 1988.

HEGAZI, A.G.; EL HADY, F. K. A. **Zeitung Naturforsch**, 2002, 57c, p.395

Hodge, A. and Sterner, B. (2005) **Toxicity Classes. In: Canadian Center for Occupational Health and Safety.**

IANNACONE, J. & LAMAS, G. **Efecto insecticida de cuatro extractos botánicos y del cartap sobre la polilla de la papa *Phthorimae operculella* en el Perú, Entomotropica**, v.18, n.2, p. 95-105, 2003.

JIRAKANJANAKIT, N., LEEMINGSAWAT, S.; DUJARDIN, J.P.. **The geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in isofemale lines through successive generations. Inf. Genet. Evol.** 8:414-421. 2007.

KAUSHIK, R.; SAINI, P.. **Larvicidal activity of leaf extract of *Millingtonia hortensis* (Family: Bignoniaceae) against *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. Journal of Vector Borne Diseases.**45: 66-69. 2008.

KIRAN, S. R. et al. **Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*.**

Bioresource technology, v. 97, p. 2481-2484, 2006.

73

KNIPLING, E. F. . **Sterile insect technique as a screwworm control measure: The concept and its development.** In Symposium on Eradication of the Screwworm from the United States and Mexico. Misc. Publ. Entomol. Soc. America. O. H. Graham ed., College Park, MD. 62: 4-7. 1985.

KUHN RJ, ZHANG W, ROSSMANN MG, PLETNEV SV, CORVER J, LENCHES E, JONES CT, MUKHOPADHYAY S, CHIPMAN PR, STRAUSS EG, BAKER TS, STRAUSS JH. **Structure of dengue virus: implications for Flavivirus organization, maturation, and fusion.** Cell 108: 717-725, 2002.

LAHKIM-TSROR, L. et al. **Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* serovar H14 in *Aedes aegypti*: histopathological studies.** Journal of Invertebrate Pathology. 41: 104- 116. 1983.

LAW, J.H.; RIBEIRO, J.M.; WELLS, M.A. **Biochemical insights derived from insect diversity.** Annual Review of Biochemistry. Palo Alto. .61: 87-111. 1992.

LE GOFF G, REVOLLO J, GUERRA M, CRUZ M, BARJA SIMON Z, ROCA Y, VARGAS FLORES J, HERVE JP. **Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Bolivia.** Parasite 18: 277-280, 2011.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil.** Nova Odessa: Franciscana, 1982. 608 p.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R . **Qual a importância da hematofagia extradomiciliar do *Anopheles darlingi* na Amazônia.** Rev Patol Trop. 23 (suppl.): 100-101. 1995.

LÖWY, I.. **Representing and intervening in public health: viruses, mosquitoes and Rockefeller Foundation experts in Brazil.** História, Ciências, Saúde Manguinhos. 5(3):

LÖWY, I. **Yellow fever in Rio de Janeiro and the Pasteur Institute Mission (1901-1905): the transfer of science to periphery.** *History of Medicine.* 34:144-163. 1990.

74

LOZOVEI, A. L.. Culicídeos (mosquitos), 59-104. In: MARCONDES, C. B. (ed.). **Entomologia Médica e Veterinária.** Editora Atheneu, 432 p. 2001.

LUNA J.E.D., et al. **Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil.** *Rev. Saúde Pública.* 38: 842-843. 2004.

LUNA JED, MARTINS MF, ANJOS AF, KUWABARA EF, NAVARRO-SILVA MA. **Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil.** *Rev. Saúde Pública* 38: 842-843, 2004.

MAMANI E. **New serotype 5 of dengue virus: need to strengthen the molecular surveillance in Peru.** *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 31: 171-173, 2014.

MARCONDES, C. B.. **Entomologia Médica e Veterinária.** Ed. Atheneu. São Paulo, 2001.

MARQUES, G. R. A. M.; SERPA, L. L. N.; BRITO, M. *Aedes aegypti.* SUCEN. São Paulo: SUCEN 2006.

MARTÍNEZ A. **Flavonóides. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. Medellín,** setembro, 2005.

MARTINS VEP, ALENCAR CH, KAMIMURA MT, ARAÚJO FMC, SIMONE SG, DUTRA RF, GUEDES MIF. **Occurrence of Natural Vertical Transmission of Dengue-2 and Dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil.** *PLo One* 7: e41386, 2012.

MARTINS, F. E SILVA, I. G. **Avaliação da atividade inibidora do diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae).** *Rev Soc Bras Med Trop* 37: 135-138. 2004.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997.

75

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 3ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009.

MATSUNAMI, K., **New Isolinarins C, D and E, Flavonoid Glycosides from Linaria japônica**, *Chem. Pharm. Bull.* 2016, 65 (5), 517-521

MCLAUGHLIN, J.L. **Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractions**. In: DEY, P.M.; HARBONE, J.B. *Methods in plant biochemistry*. New York: Academic Press, 1991, p.1- 32.

MCLAUGHLIN, J.L.; CHANG, C.J.; SMITH, D.L. **“Benchtop” bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update**. In: RAHMAN, A. *Studies in Natural Product Chemistry 9*. Amsterdam: Elsevier, 1991, p.383-409.

MCLAUGHLIN, J.L.; CHANG, C.J.; SMITH, D.L. **Simple bench-top bioassays (BS & PD) for discovery of plant antitumor compounds-review of recent progress in human medicinal agents from plants**. Nova York: Kinghorn & Balandrini, 1993, p.112- 37.

MELLO, F. B.; JACOBUS, D.; CARVALHO, K. C. S.; MELLO, J. R. B. **Effects of Lantana camara (Verbenaceae) on rat fertility**. *Veterinary and Human Toxicology*, v. 45, n. 1, p. 20 – 23, 2003.

MELO, M. E. B. et al. **Ação mutagênica do inseticida organofosforado temefós em células de medula óssea de camundongos**. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. São Paulo. 67(3): 196- 201. 2008.

MELO-SANTOS, M.A.V., ARAÚJO, A.P., RIOS, E.M.M., REGIS, L. **Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* serovar. *Israelensis* larvicidal activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) breeding places is associated to bacteria recycling**.

Biological Control, v.49,p.186-19, 2009.

MENEZES, Elen de Lima Aguiar. **Inseticidas botânicos: Seus Princípios Ativos, Modo de Ação e Uso Agrícola. Seropédica:** Embrapa Agrobiologia, Rio de Janeiro,

76

2005.

Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R.; Putnam, L.B.; Jacobsen, L.B.; Nichols de Mclaughlin, J.L. 1982. **Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. J Med Plant Res.** 45: 31- 34

Ministério da Saúde Brasileira. 3ª Edição revisada. 75p. 2001.

NASCIMENTO, J.E.; MELO, A.F.M.; LIMA E SILVA, T.C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS, E.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; AMORIM, E.L.C. **Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de Artemia salina Leach. de três espécies medicinais do gênero Phyllanthus (Phyllanthaceae). Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences,** v. 29, n.2, p. 143- 148, 2008.

NATAL, D.. **Bioecologia do Aedes aegypti.** Biológico, São Paulo. 64(2): 205-207. 2002.

NOBRE, A.; ANTEZANA, D.; TAUIL, PL.. Febre Amarela e Dengue no Brasil: epidemiologia e controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical;** 27(Supl. III): 59-66. 1994.

NORMILE D. **Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. Science** 342: 415, 2013.

OMENA, M. C. et al. **Larvicidal activities against Aedes aegypti of some Brazilian medicinal plants.** Bioresource Technology, v.98, p. 2549-2556, 2007.

PANNALA, A.S.; CHAN, T.S.; O'BRIEN, P.J.; RICE-EVANS, C.A. **Flavonoid b-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. Biochem. Biophys. Res. Commun.,** v. 282, n. 5, p. 1.161-1.168, 2001.

PEREIRA, A. M. Toxicidade de Lantana camara (Verbenaceae) em operárias de Apis

mellifera (Hymenoptera: Apidae). 2005. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Zoologia) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, Rio Claro, SP.**

77

PINA, I. G.; FONSECA, A. H. D. A.. **Comportamento de *Aedes aegypti* L., 1762 (DIPTERA: CULICIDAE) alimentados artificialmente com sangue de diferentes espécies de doadores.** Revista Patologia Tropical 28 (1): 64-71. 1999.

POLANCZYK, R.A.; GARCIA, M.O.; ALVES, S.B.. **Potencial de *Bacillus thuringiensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*.** Rev. Saúde Pública 37: 813-816. 2003.

QADIR, U. **Bioefficacy of *Anamirta cocculus* Linn. (Menispermaceae) seed extracts against dengue vector, *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae).** Asian Pacific Journal of Tropical Disease, v. 4, n. S2, p. S556–S562, 2014.

RODRIGUES, I.M.C.; SOUZA FILHO, A.P.S.; FERREIRA, F.A. **Estudo Fitoquímico de *Senna Alata* por duas Metodologias. Planta Daninha, Viçosa-MG, v. 27, n. 3, 2009.**

RODRÍGUEZ, M.M.; BISSET, J.A.; FERNÁNDEZ, D.. **Determinación in vivo del papel de las enzimas esterasas y glutathion transferasa en la resistencia a piretroides en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** Revista Cubana de Medicina Tropical. 59(3): 209- 212. 2007.

ROEL, A.R.. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local. 1: 43-50. 2001.**

SAGAR, L. et al. **Evaluation of antimotility effect of *Lantana camara* constituents on neostigmine induced gastrointestinal transit in mice.** BMC – Complementary and Alternative Medicine, v. 18, n.5, 2005.

SANTOS RLC. **Atualização da distribuição de *Aedes albopictus* no Brasil (1997-2002).** Rev Saúde Pública 37: 671-673, 2003.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE. Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN). **Normas, orientações e recomendações técnicas para a vigilância e controle de *Aedes aegypti* no Estado de São Paulo.** São Paulo: 2002.

78

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Dados e indicadores selecionados.** Coordenação: Departamento de Análise de Situação de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde. 2003.

SERUFO JC, OCA HM, TAVARES VA, SOUZA AM, ROSA RV, JAMAL MC, LEMOS JR, OLIVEIRA MA, NOGUEIRA RMR, SCHATZMAYR HG. **Isolation of dengue vírus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos City, state of Minas Gerais, Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz 88: 503-504, 1993.

SHARMA, O. P.; SHARMA, P. **Natural products of the Lantana plant – the present and prospects.** Journal of Science & Industrial Research, v. 48, p. 471 – 478, 1989.

SILVA,Jr.J.B., et al. **Dengue in Brazil: current situation and control activities.** Epidemiological Bulletin. 23(1): 3-6. 2002.

SILVA,Jr.J.B., et al. **Dengue in Brazil: current situation and control activities.** Epidemiological Bulletin. 23(1): 3-6. 2002.

SILVÉRIO,M.D.O; CASTRO, C.F.S; MIRANDA, A.R. **Avaliação da atividade antioxidante e inibitória da tirosinase das folhas de *Dipteryx alata* Vogel (Baru).** Rev.Bras. Pl. Med. Botucatu. v.15, n.1, p.59-65, 2013

SIMAS, N. K.; LIMA, E. da C.; CONCEIÇÃO, S. da R.. **Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue: atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilterpenóides.** Química Nova. 27(1): 46-49. 2004.

SIMAS, N. K.; LIMA, E. da C.; CONCEIÇÃO, S. da R.. **Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue: atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilterpenóides.** Química Nova. 27(1): 46-49. 2004.

SIVAKUMAR, R.. et al. **Larvicidal and repellent activity of tetradecanoic acid against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera:Culicidae).** Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 706-710. 2011.

79

SOARES, E. L. C.; SILVA, M. V.; VENDRUSCOLO, G. S.; THODE, V. A.; SILVA, J. G.; MENTZ, L. A. **A família Solanaceae no Parque Estadual de Itapuã Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil.** Revista Brasileira de Biociências, v.6, n.3, p.177- 188, 2008.

SOPER, F.L.. **The 1964 status of *Aedes aegypti* eradication and yellow fever in the Americas.** American Journal of Tropical Medicine & Hygiene. 14(6): 887- 891. 1965.

STENHAGEN,E.; *et al.* **Registry of mass spectra data.** New York: Jonh. Willey & Sons, 1974.

TAVEIRA, L.A., FONTES, L.R., NATAL, D. **Manual de diretrizes e procedimentos no controle do *Aedes aegypti*.** Ribeirão Preto: Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto, 2001.

TEIXEIRA MG, BARRETO ML, GUERRA Z. **Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue.** Info Epidemiol SUS 8: 5-33, 1999.

TEPE, B. et al. **Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae).** Food Chemistry, Oxford, v. 90, n. 3, p. 333-340, May 2005.

TISSERAND, R. **Essential oil safety: a guide for health care professionals.** Churchill Livingstone. ISBN 0-443-05260-3, 1995.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. **Plantas Tóxicas do Brasil, Rio de Janeiro: Helianthus, 320 p., 2000.**

TOKARNIA, C.H. et al. **Estudos complementares sobre a toxidez de Lantana camara (Verbenaceae) em bovinos.** Pesq. Veter. Brás., v. 19, n.3, p. 128- 132, 1999.

WARD, W. W., PRENTICE, H. J., ROTH, A. F., CODY, C. W., & REEVES, S. C.

Spectral perturbations of the Aequorea green- fluorescent protein. Photochem.

Photobiol. 35: 803-808. 1982.

WATANABE, M.A. **Ácaros em Lantana camara. Embrapa Meio Ambiente,**

Informativo n. 51, 2005.

80

WIDYOWATI, R.; SUGIMOTO, S.; YAMANO, Y.; SUKARDIMAN; OTSUKA, H.; MATSUNAMI, K., **New Isolinariins C, D and E, Flavonoid Glycosides from *Linaria japonica***, Chemical Pharmaceutical Bulletin. 2016, 65 (5), 517-521.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquitoes larvae to insecticide.** Who/Vbc/81.807, 1981.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control:** new edition. Geneva: World Health Organization; 2009.

YANG, H.M., THOME, R.C.A, ESTEVA, L, **Optimal control of *Aedes aegypti* mosquitoes by the sterile insect technique and insecticide.** Mathematical Biosciences. 223: 12-23. 2009.