



ADRIENE MARIA JOSE DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
INSETICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Hyptis marrubioides*
(HORTELÃ DO CAMPO) EM LARVAS DE *Aedes aegypti***

**LAVRAS – MG
2020**

ADRIENE MARIA JOSE DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Hyptis marrubioies* (HORTELÃ DO CAMPO) EM LARVAS DE *Aedes
aegypti***

Dissertação apresentado à Universidade Federal de Lavras, como exigência do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/Medicina II, área de concentração Epidemiologia de doenças infecciosas e parasitárias, para obtenção do título de mestre.

Prof. Dr. Thales Augusto Barçante
Orientador

Prof. Dra. Maria das Graças Cardoso
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Oliveira, Adriene Maria José de.

Caracterização e avaliação da atividade inseticida do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* (Hortelã do Campo) em larvas de *Aedes aegypti* / Adriene Maria José de Oliveira. - 2020.

61 p. : il.

Orientador(a): Thales Augusto Barçante.

Coorientador(a): Maria das Graças Cardoso.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. *Aedes aegypti*. 2. *Hyptis marrubioides*. 3. Óleo essencial. I. Barçante, Thales Augusto. II. Cardoso, Maria das Graças. III. Título.

ADRIENE MARIA JOSE DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Hyptis marrubioies* (HORTELÃ DO CAMPO) EM LARVAS DE *Aedes
aegypti***

**CARACTERIZATION AND EVALUATION OF INSECTICIDATE ACTIVITY OF
ESSENTIAL OIL *Hyptis marrubioides* (FIELD MINT) IN *Aedes aegypti* LARVAE**

Dissertação apresentado à Universidade Federal de Lavras, como exigência do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/Medicina II, área de concentração Epidemiologia de doenças infecciosas e parasitárias, para obtenção do título de mestre.

APROVADA em 20 de Janeiro de 2020
Dr. Rafael Neodini Remedio - UFLA
Dr. Luiz Roberto Marques Albuquerque - UFUJM

Prof. Dr. Thales Augusto Barçante
Orientador

Prof. Dra. Maria das Graças Cardoso
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2020**

Aos pesquisadores que se ocupam de estudos sobre a epidemiologia de doenças infecciosas e parasitárias, na busca de reduzir impactos à saúde do homem, dedico!

AGRADECIMENTOS

A Deus, que permitiu a execução desta pesquisa e elaboração deste estudo, me dando sempre forças durante toda a caminhada.

À minha família, por tanto amor, incentivo, carinho e compreensão durante todo esse período árduo de trabalho.

À Universidade Federal de Lavras, direção e administração, que me presentaram com uma oportunidade ímpar, e pela confiança depositada na proposta do meu trabalho.

A todos os mestres e doutores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/Medicina II da Universidade Federal de Lavras, por todo o conhecimento compartilhado.

Ao meu orientador Thales Augusto Barçante, pela acolhida e pelo respeito com as minhas escolhas de pesquisa, prestígio pelas minhas descobertas, prestatividade em colaborar com informações e generosidade junto às minhas dificuldades.

À minha coorientadora Maria das Graças Cardoso, por todo o esteio no processo de orientação e edificação da dissertação.

À Universidade Federal de Minas Gerais, por me receber e compartilhar dos seus trabalhos, me ensinando a desenvolver minha pesquisa e por me fornecer suprimentos essenciais para execução da minha proposta.

Aos companheiros do laboratório de Química, em especial ao Alex, Allan e Rafaela.

À equipe do Horto – principalmente, à Camila pelo zelo e cuidado com o local.

À equipe Biopar – carinhosamente, à colaboradora Aline.

Aos supervisores e colaboradores do Laboratório Andrade Frota e Cia LTDA e laboratório de Análises Clínicas Unimed Varginha, pelo apoio e incentivo, sempre torcendo pela minha conquista e sendo compreensivos diante dos meus compromissos institucionais.

A todos, sou grata!

“Conhecimento não é aquilo que você sabe, mas aquilo que você faz com o que você sabe”

(Aldous Huxley)

RESUMO

O *Aedes aegypti* é o mosquito vetor dos vírus de várias doenças e de grande importância epidemiológica. Sabe-se que estes vetores se tornaram resistentes aos diversos inseticidas utilizados para o seu controle, até o momento – o que impõe a demanda do desenvolvimento de um produto que tenha uma ação eficaz sobre estes transmissores. Em busca desta contribuição para a ciência humana, foi estudado o efeito inseticida do óleo essencial de *Hyptis marruboides* em larvas de *Aedes aegypti*. O vegetal foi cultivado no Horto de plantas medicinais. A extração do óleo foi realizada pela técnica de hidrodestilação, empregando-se o aparelho *Clevenger* modificado. O óleo essencial foi caracterizado por Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Obteve-se rendimento de 0.4603 gramas, no qual a α -tujona e a β -tujona foram componentes majoritários desta espécie. Nos testes biológicos, as larvas foram obtidas a partir do cultivo em laboratório de ovos da linhagem *Rockefeller*, em estufa de demanda química do oxigênio. Verificou-se que a concentração letal 50% foi 0,026 μ l/ml, a dose letal 90, foi de 0,083 μ l/ml e a dose letal 99 é 0,218 μ l/ml. Os resultados foram promissores, visto que são necessárias pequenas doses para atingir a letalidade dos indivíduos. Espera-se que estes resultados contribuam para o desenvolvimento de mais pesquisas e para o controle do agente transmissor das doenças humanas.

Palavras-Chave: Óleo essencial. *Aedes aegypti*. Inseticida. *Hyptis marruboides*.

ABSTRACT

Aedes aegypti is the mosquito vector of viruses of various diseases and of great epidemiological importance. It is known that these vectors have become resistant to the various insecticides used for their control so far - which imposes the demand for the development of a product that has an effective action on these transmitters. In search of this contribution to human science, the insecticidal effect of the essential oil of *Hyptis marrubioides* on *Aedes aegypti* larvae was studied. The vegetable was grown in the garden of medicinal plants. Oil extraction was performed by hydrodistillation technique, using the modified Clevenger apparatus. The essential oil was characterized by gas chromatography coupled with mass spectrometry. A yield of 0.4603 grams was obtained, in which α -thujone and β -thujone were major components of this species. In the biological tests, the larvae were obtained from laboratory cultivation of eggs of the Rockefeller strain, in a greenhouse with chemical oxygen demand. The 50% lethal dose was found to be 0.026 μ l/ml, the 90 lethal dose was 0.083 μ l/ml and the 99 lethal dose 0.218 μ l/ml. The results were promising, since small doses are required to achieve the lethality of the individuals. These results are expected to contribute to the development of further research and control of the transmitting agent of human disease.

Keywords: Essential Oil. *Aedes aegypti*. Insecticide. *Hyptis marrubioides*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fases do ciclo evolutivo do <i>Aedes aegypti</i>	19
Figura 2 – <i>Aedes aegypti</i> na caracterização macho e fêmea.....	20
Figura 3 – Ciclo evolutivo de <i>Aedes aegypti</i>	21
Figura 4 – Rota biosintética dos metabólitos secundários.....	26
Figura 5 – Estrutura química do isopreno	28
Figura 6 – Aspectos gerais da planta adulta de <i>Hyptis marrubioides</i>	30
Figura 7 – Aspectos das mudas de <i>Hyptis marrubioides</i>	34
Figura 8 – Mudas de <i>Hyptis marrubioides</i>	35
Figura 9 – Canteiro	35
Figura 10 – <i>Hyptis marrubioides</i> em fase de colheita	36
Figura 11 – Amostra de <i>Hyptis marrubioides</i> para identificação vegetal	37
Figura 12 – Amostra seca de <i>Hyptis marrubioides</i> para identificação vegetal	37
Figura 13 – Hidrodestilação do óleo essencial de <i>Hyptis marrubioides</i>	39
Figura 14 – Separação do óleo essencial de <i>Hyptis marrubioides</i>	39
Figura 15 – Aspecto geral do processo para determinação de umidade com o aparelho Dean Stark em <i>Hyptis marrubioides</i>	40
Figura 16 – Estimulação a eclosão de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	43
Figura 17 – Ensaio do efeito inseticida de <i>Hyptis marrubioides</i> em larvas de <i>Aedes aegypti</i>	44
Figura 18 – Registro de identificação da espécie de <i>Hyptis marrubioides</i>	45
Figura 19 – Efeito inseticida do óleo essencial de <i>Hyptis marrubioides</i> em larvas de <i>Aedes aegypti</i>	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Extração em triplicata e o rendimento médio de óleo essencial	46
Tabela 2 – Médias da massa das extrações de óleo <i>Hyptis marrubioides</i>	47
Tabela 3 – Caracterização química por CG-EM do OE de <i>Hyptis marrubioides</i>	48
Tabela 4 – Efeito inseticida do óleo essencial de <i>Hyptis marrubioides</i> em larvas de <i>Aedes aegypti</i>	50

LISTA DE SIGLAS

ATP	Adenosina Trifosfato
BIT	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
BLU	Base Livre de Umidade
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CAPQ	Central de Análises e Prospecção Química
CB	Carbamatos
CG	Cromatografia gasosa
CL	Concentração Letal
EM	Espectrometria de Massas
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DDE	Dicloroetileno
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DIC	Detector por Ionização de Chamas
DL	Dose Letal
DMAPP	Dimetilalil Difosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DQI	Departamento de Química
DXPS	Deoxilulosefosfato
FPP	Farnesil Difosfato
GGPP	Geranil Geranil Difosfato
GPP	Trans-geranildifosfato
IPP	Isopentenil Difosfato
MS	Ministério da Saúde
OC	Organoclorados
OE	Óleo Essencial
OF	Organofosforados
OMS	Organização Mundial de Saúde
PI	Oiretróides
TPP	Tiamina Oirofosfato
RPM	Rotações por Minuto
UFLA	Universidade Federal de Lavras
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1	ITRODUÇÃO	13
2	JUSTIFICATIVA	15
3	HIPÓTESE	16
4	OBJETIVOS	17
4.1	Objetivo geral	17
4.2	Objetivo específico	17
5	REFERENCIAL TEÓRICO	18
5.1	<i>Aedes aegypti</i>	18
5.2	O combate à dengue no Brasil	22
5.3	Os inseticidas e o combate ao <i>Aedes aegypti</i>	23
5.4	Óleos essenciais	25
5.5	<i>Hyptis marrubioides</i>	29
5.6	Extração do óleo essencial	31
5.7	O uso de óleo essencial como inseticida	32
6	MATERIAIS E MÉTODOS	34
6.1	Cultivo e obtenção das amostras vegetais	34
6.2	Identificação da espécie vegetal	36
6.3	Extração do óleo essencial	38
6.4	Determinação do teor de umidade	40
6.5	Caracterização química do óleo essencial	41
6.6	Cultivo de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	42
6.7	Bioensaios	43
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
7.1	Cultivo e identificação da espécie vegetal	45
7.2	Rendimento do óleo essencial	46
7.3	Identificação dos constituintes do óleo essencial	48
7.4	Efeito inseticida de <i>Hyptis marrubioides</i> em larvas de <i>Aedes aegypti</i>	49
8	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

Há uma diversidade de doenças que são disseminadas por mosquitos, destacando-se o *Aedes aegypti*, o vetor responsável pelo aparecimento de doenças humanas de grande importância epidemiológica na conjuntura.

Da mesma forma, é sabido que a composição química dos inseticidas industrializados disponíveis e comercializáveis no mercado não apresentam, hoje, alta taxa de letalidade devido à seleção artificial dos artrópodes. Desta feita, este inseto se tornou resistente a diversos inseticidas e com isso o seu controle tem sido um grande desafio – incide aí, a contextualização que origina uma situação problema para a pesquisa.

Na expectativa de auxiliar na resolução deste problema de saúde pública, a presente dissertação se ocupou da investigativa de possíveis soluções à epidemiologia de doenças infecciosas e parasitárias trazidas pelo mosquito em questão (de *Aedes aegypti*), partindo-se da hipótese de que o óleo essencial de *Hyptis marruboides* tem ação inseticida sobre as suas larvas.

Hyptis apresenta várias espécies, é comum no cerrado brasileiro, com odor característico e efeitos medicinais. Dentre as espécies, *Hyptis marruboides*, apresenta efeito inseticida.

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos químicos de origem vegetal e apresentam como características: alta volatilidade, forte e característico odores. Podem ser sintetizados em folhas, frutos, caules, raízes, sementes, flores, botões florais e cascas. A sintetização do óleo essencial é dependente de muitos fatores, entre os quais destaca-se fatores ambientais e fase de desenvolvimento do vegetal. Seus componentes presentes e seu rendimento podem sofrer alterações de acordo com o meio e as condições de onde estão inseridas.

O uso de óleos essenciais tem sido alvo de pesquisas em busca de substâncias naturais que impliquem no controle dos insetos, uma vez que se tornaram resistentes aos inseticidas sintéticos. Diante dos impactos causados pelos inseticidas sintéticos, é apontado a necessidade de desenvolver um inseticida que controle o vetor do vírus das doenças de grande impacto ao homem. Entretanto, são descritas diversas espécies de plantas que possuem atividade inseticida.

Tendo como base o conhecimento bibliográfico de que o óleo essencial de *Hyptis marruboides* é rico em terpenoides, e que terpenoides apresentam ação inseticida, a execução desta pesquisa se propôs a investigar o seu potencial em larvas de *Aedes aegypti*, uma vez que o óleo essencial se trata de uma substância natural, apresentando menor efeito tóxico ao homem e a natureza, podendo ter resultado satisfatório e colaborar com o combate e controle desse agente transmissor de doenças humanas.

Diante do contextualizado, objetivou-se na presente dissertação, avaliar a atividade inseticida óleo essencial de *Hyptis marrubioides* nas concentrações sobre larvas de *Aedes aegypti*.

2 JUSTIFICATIVA

Os vírus de algumas doenças como a febre amarela, *zika*, *chikungunya* e dengue são transmitidos por mosquitos, conhecidos como *Aedes aegypti*.

Tendo em vista que a alternativa para combate a estas doenças é o controle vetorial, pois não há disponível no mercado vacinas que confirmam proteção aos homens e que os inseticidas disponíveis já se apresentam pouco eficientes, além de prejudiciais ao meio ambiente, é de suma importância que se descubra outro recurso para controle desse agente transmissor.

Existe, na comunidade de Ciências da Saúde/Medicina uma demanda em controle de epidemiologia de doenças infecciosas e parasitárias, entendendo que a proposta de um inseticida para controle vetorial do *Aedes aegypti* esteja dentro de tal demanda.

São poucos os trabalhos encontrados na literatura que testam e discutem sobre o efeito inseticida das espécies de *Hyptis* – podendo citar Jaya *et al.* (2012), Campos *et al.* (2014), Alcantara *et al.* (2017) e Wangrawa (2018).

Especificamente, acerca do *Hyptis marruboides* com efeito inseticida em artrópodes (a partir de extração de óleo essencial), pode-se afirmar a inexistência de estudos publicados – o que vem tornar a pesquisa proposta relevante, e ímpar em relação à tentativa de contribuição para o combate do *Aedes aegypti*.

3 HIPÓTESE

O óleo essencial de *Hyptis marrubioides* tem ação inseticida sobre larvas de *Aedes aegypti*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Caracterizar e avaliar a atividade inseticida óleo essencial de *Hyptis marrubioides* nas concentrações sobre larvas de *Aedes aegypti*.

4.2 Objetivo específico

1. Extrair e caracterizar os constituintes do óleo essencial de *Hyptis marrubioides*;
2. Determinar o rendimento da extração de óleo essencial de *Hyptis marrubioides*;
3. Avaliar a susceptibilidade de larvas de *Aedes aegypti*, provenientes de colônias puras, em óleo essencial de *Hyptis marrubioides*, determinando a concentração letal (CL) 50, 95 e 99%.

5 REFERENCIAL TEÓRICO

5.1 *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti* é originado da Etiópia na África, e disseminou por regiões onde as condições climáticas eram favoráveis. É classificado no filo *Arthropoda*, classe *Insecta*, ordem *Diptera*, subordem *Nematocera*, família *Culicidae*, subfamília, *Culicinae*, tribo *Aedini*, e Gênero *Aedes* (BRAGA; VALLE, 2007; ARAÚJO, 2013).

Dados de Braga e Valle (2007) e de Mendonça *et. al.* (2014), indicam que o *Aedes aegypti* sofre influências sazonais e isso justifica sua prevalência em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Ainda, de acordo com os autores, outro fator que ganha destaque é sua urbanização, reproduzindo em domicílios ou peridomicílios.

Os artrópodes são eficazes transmissores de vírus em todo mundo. O *Aedes aegypti* é considerado um dos principais artrópodes transmissores de doenças virais de importância epidemiológica e, conseqüentemente, com grandes comprometimentos à saúde humana (ARAÚJO, 2013).

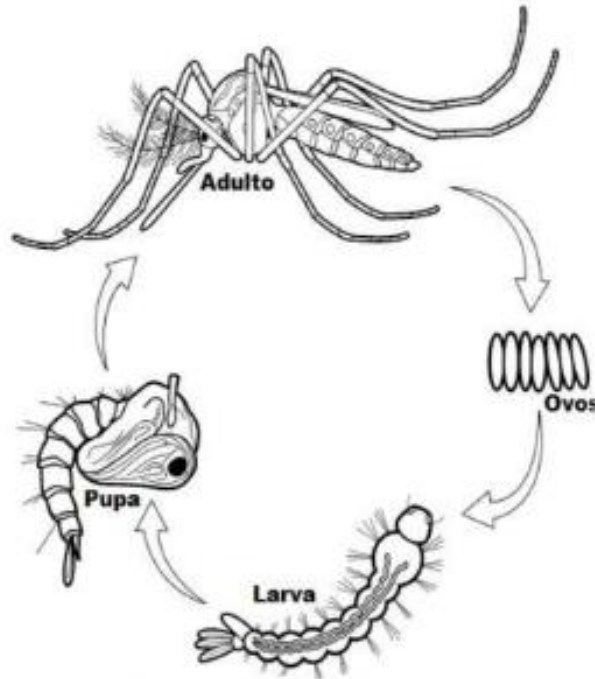
Dentre as arboviroses transmitidas para humanos, destacam-se: Dengue, *Chikungunya*, *Zika* e Febre Amarela. Estando as fêmeas infectadas, no momento da hematofagia, elas repassam esse vírus ao hospedeiro. A transmissão vertical nos insetos também é relatada, ocorrendo quando a fêmea transmite o vírus aos seus descendentes ou porcentagem deles via transovariana (PINHEIRO *et al.*, 2005).

O número de casos positivos para estas doenças tem ganhado destaque em cerca de 100 países. O índice de pessoas que contraem a doença, anualmente, registra em média 80 a 100 milhões casos. Ainda, é pertinente ressaltar que há um impactante número de casos que evoluem para a forma mais grave – como a dengue hemorrágica (MENDONÇA *et. al.*, 2014; GONZÁLES *et al.*, 2019).

Esta espécie de inseto consegue completar seu ciclo evolutivo, tanto em áreas urbanas, quanto em áreas rurais, acontecendo em decorrência de necessitar de pequena quantidade de água para sua proliferação (BRAGA; VALLE, 2007). Pequenos objetos que contenham água parada são suficientes para que seu ciclo se desenvolva – como por exemplo: caixas d'água, tampas de garrafa, latas, pneus, tanques, entre outros (ARAÚJO, 2013; MENDONÇA *et. al.*, 2014).

O ciclo evolutivo deste mosquito compreende quatro fases sendo, em ordem crescente: (1) ovo; (2) larva com quatro estádios; (3) pupa e; (4) adulto (SILVA; POLETO, 2012; GUEDES, 2012) – conforme ilustrado pela Figura 1 e explanado na sequência.

Figura 1 – Fases do ciclo evolutivo do *Aedes aegypti*



Fonte: Silva e Poletto (2012)

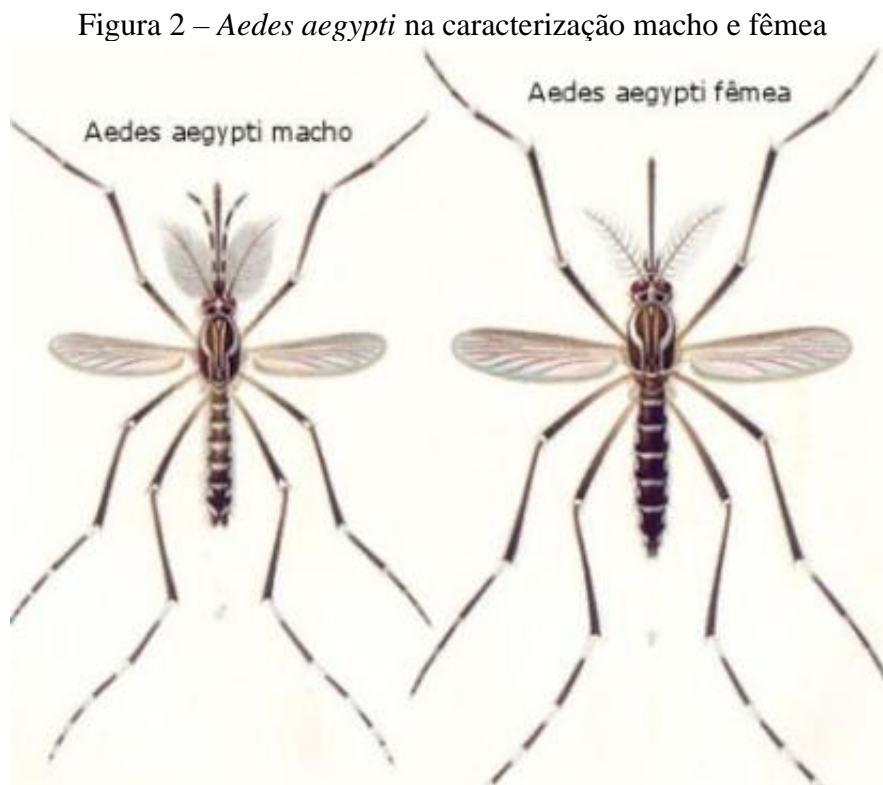
Os seus ovos – a primeira fase do ciclo evolutivo – apresentam tamanho médio de 1 mm de comprimento, são fusiformes e tem contorno alongado. Sua coloração no momento da postura é branca; entretanto, se tornam enegrecidos e brilhantes rapidamente. O ovo é a fase do ciclo evolutivo que apresentam maior resistência climática (CONSOLI; OLIVIRA, 1994; BESERRA *et al.*, 2008; LEITE; ASSOCIADO, 2011; SILVA; POLETO, 2012; GUEDES, 2012).

As larvas – a segunda fase do ciclo evolutivo – apresentam o corpo dividido em cabeça, tórax e abdome, sendo todo recoberto por cerdas. Em sua cabeça está presente um par de antenas, olhos e aparelho bucal classificado como mastigador-raspador. Na frente da cabeça estão presentes as escovas orais ou palatais, que auxiliam o inseto no processo de alimentação, no qual, em contato com a água, realizam movimentos e atingem partículas das quais se alimentam (CONSOLI; OLIVIRA, 1994). O seu tórax apresenta-se maior que a sua cabeça, caracterizando-se como globoso. O seu abdome é dividido em oito segmentos de formato cilíndrico, seguido de mais dois segmentos que formam o ânus e a genitália externa. A respiração das larvas acontece no oitavo segmento, no qual é presente o chamado tubo de ar,

sendo curto, grosso e escuro. Apresentam ainda estruturas enfileiradas lateralmente na parte posterobasal (SILVA; POLETO, 2012; CONSOLI; OLIVIRA, 1994).

As pupas – a terceira fase do ciclo evolutivo – apresentam sua estrutura corporal dividida em cefalotórax, no qual a cabeça é unida ao tórax e abdome, e tem todo corpo recoberto por cerdas. Em seu cefalotórax há duas trompas respiratórias, de onde emergem os espiráculos da pupa. Ainda, nesta região estão localizados os olhos. No final do abdome há um par de paletas que auxiliam a pupa em sua locomoção (BESERRA *et al.*, 2008). O lobo genital está localizado ao lado das paletas e, em geral, nas fêmeas são pequenos, enquanto nos machos são maiores – o que se justifica pela presença dos gonocoxitos e gonostilos (CONSOLI; OLIVIRA, 1994).

Quando adultos – a quarta fase do ciclo evolutivo –, os mosquitos atingem de 3 a 6 mm de comprimento, com coloração escura e faixas brancas na base dos segmentos. Têm o corpo dividido em cabeça, tórax e abdome (BESERRA *et al.*, 2008). Os mosquitos adultos apresentam um par de antenas entre os olhos – na fêmea são pilosas e nos machos é plumosa –, o que proporciona a distinção visual entre machos e fêmeas, como ilustrado na Figura 2.

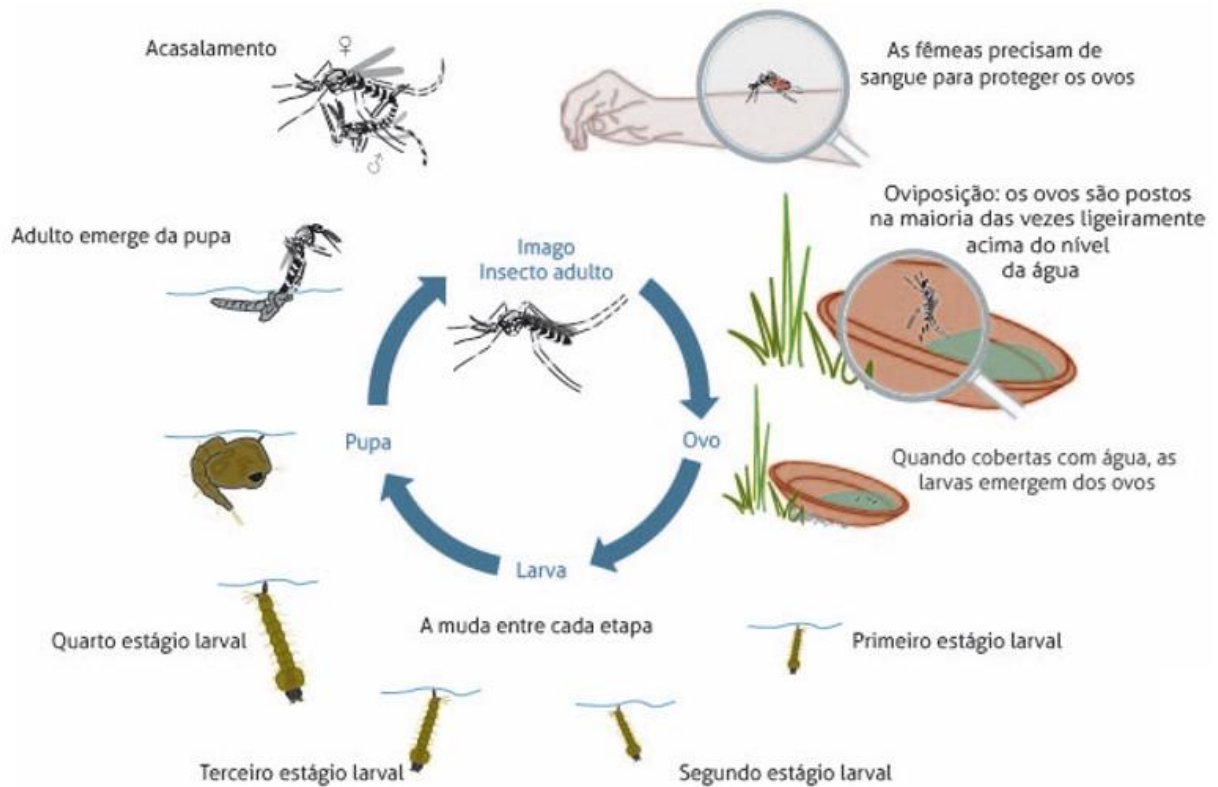


Fonte: Guedes (2012)

Além disso, os machos apresentam palpos mais alongados. Os adultos apresentam a denominada probóscide, composta de um par de maxilas e de mandíbulas, hipofaringe e o labro (LEITE; ASSOCIADO, 2011).

O ciclo de evolutivo (completo) – como ilustrado pela Figura 3 e explanado na sequência – se inicia com o repasto sanguíneo das fêmeas, devido a sua necessidade para a maturação dos ovos. A hematofagia ocorre, normalmente, após as fêmeas copularem, buscando um hospedeiro e com auxílio das probóscide, realizando o seu repasto que tem duração média de três a dez minutos, dependendo das condições encontradas. O volume estimado de sangue que o mosquito ingere é de 1,5 a 4,2 mm³. Apresentam característica antropofílica e realizam, preferencialmente, a hematofagia no período matutino ou vespertino (BARATA et al., 2001; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Figura 3 – Ciclo evolutivo do *Aedes aegypti*



Fonte: Wilke *et al.* (2011)

Posteriormente, segundo Wilke *et al.* (2011) e Silva *et al.* (2018), as fêmeas buscam lugares úmidos e repousam para depositar seus ovos. A quantidade de ovos colocados por fêmea, em cada ciclo gonadotrófico, é muito variável, sendo de 150 a 200 ovos – variação esta que depende da eficiência do seu repasto.

Estando depositados os ovos na parede dos recipientes, de forma isolada e em locais úmidos, pouco acima da linha da água, podem permanecer incubados por dias ou até meses, dependendo das condições em que se encontram, como por exemplo, ausência da água do meio.

Esse processo de interrupção de evolução do mosquito é chamado de quiescência. Este é um mecanismo natural, decorrente da manutenção da espécie (BESERRA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2018).

Quando as condições voltam à favorabilidade, a eclosão do ovo ocorre e seu ciclo segue normalmente. O volume de água pode variar desde pequenas quantidades até grandes volumes. Quando sobrepostos por água, os ovos evoluem para larvas em até cinco dias. As larvas são visíveis a olho nu, móveis e ativas. Elas se alimentam de detritos orgânicos presente na água, dentre outras fontes, tais como bactérias, fungos e protozoários (BESERRA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2018).

Seu ciclo segue com a formação da pupa, ainda na superfície da água. Este estágio dura, em média, dois dias. Nesta fase não há ingestão de alimento devido suas às mudanças para formação do mosquito adulto (WILKE *et al.*, 2011).

Quando evoluem para o estágio de mosquitos adultos, permanecem na parede dos recipientes até completa formação do seu exoesqueleto. O ciclo do *Aedes aegypti* leva cerca de oito a quinze dias para se completar e tornar um mosquito adulto; contudo, dependerá de diversos fatores do meio, como por exemplo, nutrientes e condições climáticas (SILVA; SILVA, 1999; ARAÚJO, 2013).

5.2 O combate do *Aedes aegypti* no Brasil

As primeiras tentativas de controle o *Aedes aegypti* no Brasil eram baseados em produtos químicos – isso ocorreu entre as décadas de 30 e 40. Conhecido, popularmente, como composto Verde de Paris, acetoarsenito de cobre, tinha por finalidade agir sobre as larvas do mosquito, e o seu resultado sobre este foi bastante satisfatório; no entanto, era altamente tóxico e inorgânico (SOPER, 1965).

Os inseticidas sintéticos orgânicos surgiram na Segunda Guerra Mundial, que ficou conhecida como a ‘Era Química’, sendo o primeiro, conhecido como diclorodifeniltricloroetano (DDT) (1,1,1-tricloro-2,2-di(p-clorofenil)etano). Como vantagem ele apresentava longo efeito inseticida e baixo custo, e atingia outros vetores como *Lutzomya* e *Anopheles*, sendo usado por um longo período no Brasil. Outro organoclorado utilizado foi o dicloroetileno (DDE) (2,2-bis-p-clorofenil-1,1-dicloroetileno), oriundo do DDT, contudo, apresentou danos aos animais e a natureza (CRINNION, 2000).

Por um longo período, acreditou-se que o DDT havia erradicado a espécie de *Aedes aegypti*, até o seu reaparecimento no estado do Pará. Em busca de novos recursos para o

controle do mesmo, foi verificado que diversos países já utilizavam os organofosforados, como um grupo de inseticidas. Estes surgiram com finalidade de substituir os organoclorados, pois já haviam espécies resistentes a ele em alguns países; porém, só anos mais tarde, o uso deste inseticida foi abolido no Brasil (CRINNION, 2000).

O uso exclusivo de organofosforados foi feito no Brasil por uma média de 20 anos. Em 1986, o seu uso aumentou significativamente com o aparecimento de novos casos. Junto a este episódio, foram constatadas populações dos mosquitos resistentes a este composto em todo o país. O larvicida mais conhecido, deste grupo de compostos, é o *Temefós* (O,O,O',O'-tetramethyl O,O'-thiodi-p-phenylene diphosphorothioate), utilizado na agricultura e na saúde pública (CHAVASSE; YAP, 1997).

Supervisionado pelo Ministério da Saúde (MS), foi desenvolvida uma Rede de Monitoramento de Resistência do *Aedes aegypti* a inseticidas – (Rede MoReNAa) –, tendo por finalidade a averiguação e monitoramento da resistência da população de *Aedes aegypti* as medidas para controle utilizadas. Com isso foi possível constatar que havia uma grande resistência da população de mosquitos aos produtos utilizados para seu controle (DAVIDSON; ZAHAR, 1973; BRAGA; VALLE, 2007).

A medida adotada para contenção do vetor foi à substituição do larvicida *Temefós* por *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*); no entanto, essa alteração não atingiu todos os países, e teve enfoque onde foram constatadas as maiores resistências. Os aduictidas também foram substituídos por piretróides (LOKE *et. al*, 2010).

5.3 Os inseticidas e o combate ao *Aedes aegypti*

Diversos são os inseticidas químicos já utilizados na tentativa de controle e/ou erradicação do *Aedes aegypti*, dentre eles: organoclorados (OC), organofosforados (OF) e carbamatos (CB), piretróides (PI) e reguladores do crescimento de insetos (ARAÚJO, 2013).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2007), os organoclorados foram os primeiros utilizados em busca do combate à dengue, e apresentam como vantagens: a permanência por um longo período no ambiente, devido sua estabilidade química e; baixo custo. Em contrapartida, por permanecer por um longo período no ambiente, houve contaminação ambiental, além de acumular nos tecidos dos organismos que estavam expostos ao mesmo, inclusive humanos.

Os organoclorados apresentam em sua estrutura química o carbono, cloro e hidrogênio. O DDT é o mais conhecido neste grupo de inseticidas. Cinco grupos podem ser mencionados

nesta classificação, sendo: o clorado difenil-etano, neste o qual o DDT está presente; hexaclorocicloexano; hexaclobenzenos; ciclodienos e; por fim, hidrocarbonetos clorados (MENONE *et al.*, 2000).

Organofosforados e carbamatos surgiram logo após os organoclorados. Pertencem a este grupo de inseticidas todos que, em sua composição, apresenta fósforo. Diferentemente dos organoclorados, apresentam baixa fixação, e isso implica em baixa impregnação no ambiente; entretanto, apresentam uma toxicidade mais elevada em vertebrados quando comparados com organoclorados. Os inseticidas desta classe têm ação adulticida e larvicida (BECKER *et al.*, 2003).

O mecanismo de ação dos carbamatos é semelhante aos organofosforados, no qual apresentam atividade tóxica ampla, é facilmente degradado o que implica em uma menor toxicidade aos mamíferos (WARE; WHITACRE, 2004).

Os Piretróides são compostos subdivididos em Piretróide Tipo I e Piretróide Tipo II. A diferença se dá pela sua estrutura química, notando a ausência ou presença do grupamento alfa-ciano. O seu mecanismo de ação está relacionado ao sistema nervoso central, interferindo no canal de sódio (BECKER *et al.*, 2003).

São conhecidas quatro gerações deste inseticida, sendo que apenas a terceira teve produção voltada para efeito inseticida e aplicação agrícola. A quarta geração evidencia os inseticidas mais utilizados deste grupo, apresentando como vantagens: baixo efeito tóxico em mamíferos e; baixo impacto relacionados ao meio ambiente. Este inseticida apresenta ação com baixa dosagem e atinge um número grande de insetos (WARE, WHITACRE, 2004).

Os Reguladores do Crescimento de Insetos são um grupo de inseticidas que agem no desenvolvimento dos insetos e também em sua metamorfose. Estes inseticidas se caracterizam por não provocar morte imediata no estágio larval, ele tem sua ação quando em estágio de pupa, pode implicar em má formação e morte dos mosquitos adultos (GRAF, 1993).

Durante a metamorfose, pelo bloqueio de quitina, os insetos podem não suportar sua musculatura durante a muda. A morte pode ocorrer também por inanição quando não conseguem eliminar sua exúvia. Os insetos atingidos por esses inseticidas podem perder sua aptidão física e reprodutiva, além de apresentarem limitações fisiológicas (GRAF, 1993).

5.4 Óleos essenciais

Desde os primórdios, civilizações já utilizaram as plantas em suas culturas, acreditando em seus efeitos medicinais, culinários e até mesmo cosmetológicos, devido ao seu aroma. Com o decorrer dos anos, muitas pesquisas envolvendo plantas foram desenvolvidas para exploração e conhecimento dos seus efeitos. As indústrias começaram a trabalhar para extração de compostos que pudessem ter aplicações nas mais diversas áreas, como por exemplo, agrônômica, medicinal e gastronômica (STRINGARO *et al.*, 2018).

Assim, pode-se afirmar que a utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa procede desde o desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental, merecendo destaque as culturas Egípcia, Greco-romana e Chinesa (JÚNIOR; BOLZANI, 2006).

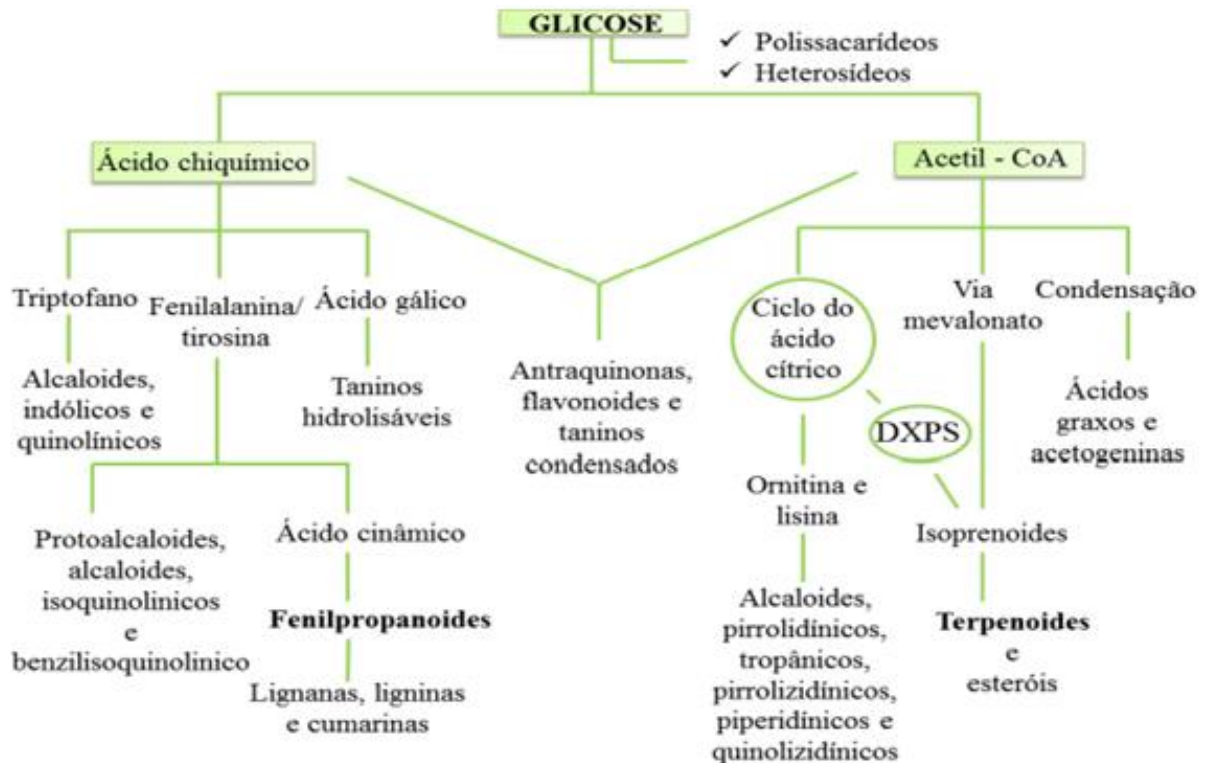
Desde então, a partir de diversas e exaustivas pesquisas, foi comprovado que as plantas apresentam duas vias metabólicas. A primeira é essencial à vida dos vegetais e são produzidos em grande quantidade. A partir desta, surge o metabolismo secundário, apresentando maior complexidade, produzido em pequena escala e de dependência com o meio em que estão inseridos, variando de acordo com grupo de plantas, espécie, entre outros fatores (WALLACE, 2004; GIVIZIEZ, 2010).

O metabolismo primário dos organismos vegetais envolve grande número de processos bioquímicos, com a finalidade de metabolizar macromoléculas, dentre as quais, podem ser citados os lipídios, os carboidratos, as proteínas e ácidos nucleicos –, sendo degradados ou transformados através de processos metabólicos auxiliando na nutrição e manutenção da vida dos vegetais (WALLACE, 2004; SIMÕES *et al.*, 2004).

O metabolismo secundário das plantas envolve metabolização, produção e/ou acúmulo de substâncias que não estão essencialmente ligadas à manutenção da vida dos vegetais, e está relacionado à sua interatividade no ambiente e perpetuação da espécie, além de estar relacionado à sua proteção (ANDRADE, 2013; GIVIZIEZ, 2010).

Entre os metabólitos secundários, citam-se: alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais. Esses podem ser divididos em três grupos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados – sendo todos eles originados do metabolismo da glicose, a partir de dois intermediários principais: o ácido chiquímico ou acetil-coA (ANDRADE, 2013; BAKKALI *et al.*, 2008), conforme elucidado pela Figura 4, que segue.

Figura 4 – Rota Biosintética dos metabólitos secundários



Fonte: Simões *et al.* (2007)

O ácido chiquímico é precursor de cumarinas, alcaloides (derivados dos aminoácidos aromáticos), lignanas, ligninas e fenilpropanoides. É um composto que possui em comum a presença de um anel aromático na sua constituição; ao passo que os derivados do acetil-CoA são os aminoácidos alifáticos e os alcaloides derivados desses terpenoides e esteroides (BRAZ-FILHO, 2010).

Os óleos essenciais podem ser formados pela via chiquimato ou acetato. São misturas complexas de compostos químicos de origem vegetal e apresentam como características: alta volatilidade, forte e característico odores. São líquidos, límpidos e raramente apresentam alguma coloração, sendo frequentemente incolores. São, ainda, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos, apresentando baixa densidade quando comparada à água (OUSSALAH, 2007; SIMÕES *et al.*, 2007; BAKKALI *et al.*, 2008).

Os óleos essenciais podem ser sintetizados em folhas, frutos, caules, raízes, sementes, flores, botões florais e cascas. São estocados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares. Quando presente em várias estruturas de uma mesma planta, suas propriedades podem se diversificar em uma mesma espécie (GIVIZIEZ, 2010; SIMÕES; SPITZER 2000; ANDRADE, 2013).

A sintetização do óleo essencial é dependente de muitos fatores, entre os quais destacam-se fatores ambientais e fase de desenvolvimento do vegetal. Os componentes presentes nos óleos essenciais, bem como seu rendimento, podem sofrer alterações em decorrência: do estágio de crescimento da planta, dos períodos do dia, da nutrição da planta, da forma de cultivo, dos fatores ambientais, da origem botânica, origem geográfica, da época e período de colheita, da forma de secagem (SIMÕES; SPITZER 2000; BAKKALI *et al.*, 2008; ANDRADE, 2013).

Possuem propriedades antissépticas, medicinais e aromáticas, e podem ser usados na conservação de alimentos e, também, como agentes antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, espasmolíticos e analgésicos locais. Na natureza, os óleos essenciais possuem um importante papel no sistema de defesa químico das plantas, devido às interações com predadores (BAKKALI *et al.*, 2008).

Os óleos essenciais são compostos por uma diversificada classe de substâncias naturais, além de conterem múltiplas moléculas menores, com diferentes funções orgânicas e estes são conhecidos como alcoóis, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos e, em menor frequência, apresentam associação com enxofre e nitrogênio. Apesar da complexidade da composição, os constituintes dos óleos essenciais são formados por fenilpropanoides e terpenos. Os principais terpenos encontrados nos óleos essenciais podem ser divididos em monoterpenos e sesquiterpenos. Os fenilpropanoides são encontrados em menor quantidade e apresentam diferentes propriedades biológicas (SIMÕES *et al.*, 2007).

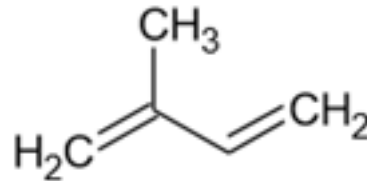
Os óleos essenciais podem conter de 20-60 componentes em diferentes concentrações entre eles, sendo geralmente caracterizados por dois ou três principais componentes possuindo concentrações bastante elevadas entre 20-70%, comparados aos outros componentes que estão presentes em quantidades mínimas. Esses compostos em maiores quantidades são denominados de constituintes majoritários. Na literatura, foram registradas várias pesquisas em que esses constituintes determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais; mas, também há relatos em que a ação do óleo essencial pode ser atribuída ao sinergismo dos vários componentes (SIMÕES; SPITZER 2000; BAKKALI *et al.*, 2008).

Os compostos terpênicos ocorrem em uma grande variedade de espécies vegetais e compreendem uma classe de metabólitos secundários com uma grande variedade estrutural. São biossintetizados a partir do isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP) (SIMÕES *et al.*, 2007).

Os terpenos são formados a partir de combinações de duas ou mais moléculas de 2-metil-1,3-butadieno, conhecido como isopreno (unidade de cinco átomos de carbono (C5)) – como na Figura 5, que segue –, e são classificados pelo número de unidade isoprênica que

possuem. Um monoterpene (C10) é constituído por duas unidades de isopreno; um sesquiterpene (C15) é constituído por três unidades de isopreno; um diterpene (C20) tem quatro unidades de isopreno, e assim por diante. As unidades de isopreno podem ser ligadas de forma a originar cadeias lineares ou moléculas cíclicas (SIMÕES *et al.*, 2007; BAKKALI *et al.*, 2008).

Figura 5 – Estrutura química do isopreno



Fonte: Simões *et al.* (2007)

O IPP, precursor fundamental para a formação dos terpenos, é biossintetizado a partir de duas vias: a via do mevalonato, sendo ativa no citosol e no retículo endoplasmático e; a via DXPS, ocorrendo nos plastídios. A rota do ácido mevalônico envolve a condensação de três moléculas de acetil-CoA em dois passos, acetil-CoA catalisada por tiolase e hidroximetilglutaril-CoA sintase, resultando no 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), que é subsequentemente reduzido por HMG-CoA redutase em duas reações acopladas, obtendo o ácido mevalônico. Duas fosforilações sequenciais do ácido mevalônico dependem de adenosina trifosfato (ATP) e uma subsequente fosforilação/descarboxilação seguida por eliminação, obtém-se então o IPP (SIMÕES *et al.*, 2007; BUCHANAN *et al.*, 2015).

Na rota biossintética para a formação do IPP pela via 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS), o piruvato reage com tiamina pirofosfato (TPP), dando origem a um fragmento de dois carbonos, hidroxietil-TPP, que se condensa com gliceraldeído 3-fosfato por transferências C2 da TPP catalisada pela transcetolase. O TPP é liberado para formar um composto de cinco átomos de carbono intermediário, 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato, o qual é rearranjado e reduzido para formar 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato e, subsequentemente, transformado para se obter o IPP (BAKKALI *et al.*, 2008; BUCHANAN *et al.*, 2015).

As diferentes classes de terpenos são formadas por adições repetitivas do isopentenil difosfato. O isopentenil difosfato e seu isômero, o DMAPP, são as unidades penta carbonadas ativas na biossíntese dos terpenos que se unem para formar moléculas maiores. Primeiro o IPP e o DMAPP reagem para formar o trans-geranildifosfato (GPP), uma molécula que possui 10 carbonos, onde são formados os monoterpeneos. O GPP pode se ligar a outra molécula de IPP, formando um composto de 15 carbonos, farnesil difosfato (FPP), precursor da maioria dos sesquiterpenos. A adição de outra molécula de IPP forma o geranyl geranyl difosfato (GGPP),

composto que contém 20 carbonos precursores dos diterpenos. Assim, as moléculas de FPP e GGPP podem dimerizar para formar triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀), respectivamente (BUCHANAN *et al.*, 2015).

Os fenilpropanoides são substâncias naturais amplamente distribuídas nos vegetais e são caracterizados estruturalmente por apresentarem um anel benzênico unido a uma cadeia lateral de três carbonos, sendo derivados biossinteticamente do ácido chiquímico (SIMÕES *et al.*, 2007; BAKKALI *et al.*, 2008; BUCHANAN *et al.*, 2015).

O ácido chiquímico é formado pela condensação aldólica de dois metabólitos da glicose, o fosfoenopiruvato e a eritrose-4-fosfato. Por meio da reação do ácido chiquímico e de uma molécula de fosfoenolpiruvato, ocorre a formação do ácido corísmico – que é responsável por gerar aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina e a tirosina que, por sua vez, com a ação da enzima fenilalanina amonialiase (FAL), perde uma molécula de amônia, resultando na formação dos ácidos cinâmicos e p-cumárico. Por meio de redução enzimática, os ácidos cinâmicos e p-cumárico formam propenilbenzenos e/ou alilbenzenos que, conseqüentemente, por meio de reações de oxidação com degradação das cadeias laterais e ciclização geram diversos compostos presentes nos óleos essenciais, entre eles os fenilpropanoides (SIMÕES *et al.*, 2007; BAKKALI *et al.*, 2008).

5.5 *Hyptis marrubioides*

Hyptis é um gênero de vegetal que apresenta uma diversidade de espécies, variando de 300 a 400. É comumente encontrada no cerrado brasileiro e apresenta um odor característico. Seus principais efeitos medicinais aplicados são: para tratamentos gastrointestinais; para tratamento de câimbras; para infecções da pele e; dores (MACHADO; FERNANDES, 2011; PEDROSO *et al.*, 2017; ECHEVERRÍA, ALBUQUERQUE, 2019).

Diversas espécies têm sido estudadas em busca de novas descobertas que contribuam para medicina (HARLEY, 1988; MELLO *et al.*, 2014; PEDROSO *et al.*, 2017; ECHEVERRÍA, ALBUQUERQUE, 2019). Dentre as tais diversas espécies de *Hyptis*, este estudo teve como enfoque a *Hyptis marrubioides*, justificando-se na assertiva descrita previamente na literatura de que este vegetal apresenta efeito inseticida (MELLO *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

A *Hyptis marrubioides* é conhecida popularmente como Hortelã do Campo, pertencente à família *Lamiaceae* – ordem *Lamiales*, que compreende uma média de 200 gêneros e é formado por mais de 3.000 espécies (BOTREL *et al.*, 2010).

A *Hyptis marrubioides* é classificada como uma planta aromática e tem o óleo essencial como um produto do seu metabolismo secundário. Sua maior prevalência é na região do cerrado brasileiro (MELLO *et. al.*, 2014).

Esta espécie vegetal apresenta estatura média, formando ramagens ou pequenos arbustos, podendo chegar a formar árvores. Apresentam caules quadrangulares, folhas opostas, contendo glândulas com substâncias aromáticas. As suas flores estão presentes no ápice (HARLEY, 1988), como demonstrado na Figura 6.

Figura 6 – Aspectos gerais da planta adulta de *Hyptis marrubioides*



Fonte: Da autora (2019)

São conhecidos duas variedades de *Hyptis marrubioides*, apresentando dois tipos de inflorescência: uma roxa e o outro branca. A diferença entre os tipos é descrita na pesquisa realizada por Botrel *et al.* (2010). Para o pesquisador, existe diferença entre a composição química e teor do óleo essencial destas duas variedades, além de diferença entre o óleo das folhas, flores e caules obtidos da mesma espécie e variedade da planta.

Alguns estudos apontam que o gênero *Hyptis* apresenta efeitos terapêuticos, como por exemplo, em casos de infecções bacterianas e fúngicas, além de ter conhecida aplicação em tratamentos gastrintestinais, ação anti-inflamatória e antiespasmódico. São descritas ainda ações inseticidas como um dos seus efeitos biológicos (HARLEY, 1988; KUHNT *et al.*, 1995; BOTREL *et al.*, 2010). Tais características justificam as especulações e em torno da espécie e as pesquisas encomendadas e realizadas pelas indústrias, com vistas à exploração e transformação de descobertas em produtos lucrativos (PINHEIRO; 2003; MELLO *et. al.*, 2014).

5.6 Extração do óleo essencial

Os óleos essenciais são extraídos dos tricomas glandulares de plantas aromáticas a partir de diversos métodos de extração, conforme a necessidade de características específicas do produto final desejado e as particularidades de cada óleo (SILVEIRA *et al.*, 2012).

Os métodos de extração mais utilizados são os de: hidrodestilação; extração por solventes orgânicos; destilação a vapor; extração por fluido supercrítico; enfloração; prensagem a frio; dentre outros (CASSEL *et al.*, 2009; BIZZO *et al.*, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2012).

A hidrodestilação consiste no contato do vegetal com a água em ebulição, no qual o vapor abre as paredes celulares onde ficam armazenado o óleo essencial (OE) e este é arrastado pelo vapor. Por sua vez, este é composto de água e óleo, os quais passam por um condensador, resfriando. Os componentes da água e OE não se misturam, implicando em uma solução bifásica. O OE é separado e armazenado em frasco vedado e protegido da luz (BIZZO *et al.*, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2012).

A destilação por arraste a vapor é utilizada uma caldeira para geração do vapor, um destilador, a matéria prima, o condensador e um frasco coletor. O vapor é percolado através do leito de sólidos, no interior do vaso extrator, arrastando o óleo essencial (CASSEL *et al.*, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2012).

A extração por meio de solvente é realizada com solvente orgânico em contato com a matriz vegetal. O processo respeita um tempo determinado para a ocorrência da transferência dos constituintes solúveis presentes na planta, efetuando-se por meio de separação das fases sólida e líquida. Obtém-se, então, o óleo a partir da evaporação do solvente na fase líquida. Por meio de tal método, têm-se óleos essenciais com maior qualidade, o que vai potencializar seu processo terapêutico, haja vista a capacidade de manutenção significativa a integridade dos extratos em termos de compostos ativos (CASSEL *et al.*, 2009; BIZZO *et al.*, 2009).

O método de enfloração resume-se numa técnica empregada para flores, cuja característica principal é o baixo teor de OE. O baixo teor o deixa instável e não permite sua destilação por arraste a vapor, haja vista as perdas quase completas de seus compostos aromáticos. O método se dá pela decomposição de pétalas sobre uma camada de gordura durante certo período de tempo. Em seguida, estas pétalas esgotadas são substituídas por novas até a saturação total, quando a gordura é tratada com álcool. A obtenção de óleos voláteis ocorre a partir de baixas temperaturas, para que possa ter valor comercial. É um processo lento, complexo e caro (CASSEL *et al.*, 2009; BIZZO *et al.*, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2012).

Por fim, a prensagem a frio resume-se num método para extração de óleos voláteis de frutos cítricos. Especificamente, no Brasil, a exportação do óleo da laranja é significativa. Resume-se na disposição de frutos inteiros em uma prensa hidráulica para a coleta do suco e do óleo presente na casca. Na sequência, o óleo é separado da emulsão formada com a água através de decantação, centrifugação ou destilação fracionada (CASSEL *et al.*, 2009; BIZZO *et al.*, 2009).

5.7 O uso de óleo essencial como inseticida

A utilização dos óleos essenciais com atividade inseticida tem sido alvo de pesquisas em busca de substâncias naturais que impliquem no controle dos insetos, uma vez que se tornaram resistentes aos inseticidas sintéticos. Além disso, existe a problemática quanto à presença e resíduos químicos no meio ambiente, levando à contaminação dos alimentos e à intoxicação de pessoas e animais (ESTRELA *et al.*, 2006).

Diante dos impactos causados pelos inseticidas sintéticos, é apontada a necessidade do desenvolvimento de inseticidas que controlem o vetor do vírus das doenças de grande impacto aos homens (FEITOSA-ALCANTARA *et al.*, 2017).

Dentro da literatura contemporânea, são descritas diversas espécies de plantas que possuem atividade inseticida, podendo ser preparadas e aplicadas na forma de pó, extratos e óleos (KIM *et al.*, 2003). Dentre as vantagens, o emprego de plantas inseticidas favorece especialmente o pequeno produtor, pelo menor custo, facilidade de utilização, não exigindo pessoal qualificado e pelo fato de não afetar o meio ambiente (MAZZONETTO; VENDRAMIM, 2003).

Alguns trabalhos vêm testando e discutindo sobre o efeito inseticida das espécies de *Hyptis*, como o realizado recentemente por Wangrawa (2018), que testou o efeito de *Hyptis suaveolens*, *Hyptis spicigera* em mosquitos obtidos do campo, concluindo que os óleos essenciais destas plantas apresentaram resultados satisfatórios.

Jaya *et al.* (2012) testaram OE de *Hyptis suaveolens* em *Tribolium castaneum* Herbst, o inseto de grãos de armazenamento, e puderam perceber que uma pequena quantidade de OE (250ppm) foi suficiente para atingir a mortalidade de 100% da espécie testada.

Vários outros óleos essenciais apresentam propriedades inseticidas, como descrevem, ainda, alguns autores. Campos *et al.* (2014) avaliaram o efeito inseticida do OE de *Baccharis articulata* no caruncho do feijão, no qual demonstraram nos resultados que a dosagem, o tempo de exposição e a interação tiveram efeito significativo na mortalidade dos insetos. Feitosa-

Alcantara *et al.* (2017) avaliaram a atividade formicida de *Hyptis pectinata*, também mostrando resultados promissores.

Registra-se que buscas acerca da utilização de óleos essenciais em artrópodes foram realizadas na literatura; entretanto sem resultados exitosos. Não foram encontrados trabalhos com abordagens de ação inseticida, de dosagens, de métodos de extração, métodos de análises e análises das ações inseticidas específicas em artrópodes– estudos necessários e relacionados ao tema de estudo dessa dissertação, para fundamentação.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Cultivo e obtenção das amostras vegetais

A região de cultivo do vegetal *Hyptis marrubioides* foi a região sudeste, com latitude de 21° 14' 43" S e longitude de 44° 59' 59" W, tendo 919 metros de altitude, no horto de plantas medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), município de Lavras/MG.

Foram feitas mudas da espécie vegetal em estudo – *Hyptis marrubioides* – no referido horto, para obtenção da quantidade de massa vegetal desejável para desenvolvimento do projeto.

Foram selecionadas ramagens do ápice dos galhos que estivessem vistosas e bem nutridas, com bom desenvolvimento de folhagens. As mudas apanhadas foram selecionadas, a partir do critério de aparência de melhor desenvolvimento, com uma média de seis folhas – conforme caracterizadas pela Figura 7.

Figura 7 – Aspectos das mudas de *Hyptis marrubioides*



Fonte: Da autora (2019)

As mudas foram acondicionadas em local fresco e arejado, sendo regadas diariamente. Após 20 dias, as mudas atingiram o tamanho ideal para plantio, conforme Figura 8. Pedroso *et al.* (2017), com base em pesquisas realizadas, afirmaram que após 20 a 30 dias de plantio, a

planta já possui massa suficiente – conforme, o achado na pesquisa proposta por essa dissertação.

Figura 8 – Mudanças de *Hyptis marrubioides*



Fonte: Da autora (2019)

Obtidas as mudas, um canteiro foi preparado somente para este vegetal. A terra para o plantio estava bem afogada e rica em nutrientes. Foram cavados buracos de aproximadamente 10 cm de profundidade para cultivo das mudas. Foram alocadas uma a uma em suas covas – conforme a Figura 9. Após o plantio, eram aguadas diariamente.

Figura 9 – Canteiro



Fonte: Da autora (2019)

Aproximadamente, após 90 dias, o vegetal atingiu o tamanho desejável – conforme a Figura 10.

Figura 10 – *Hyptis marrubioides* em fase de colheita



Fonte: Da autora (2019)

O vegetal, já se apresentava adulto, então pronto para colheita das folhagens e extração do óleo essencial.

6.2 Identificação da espécie vegetal

Visto que foram feitas mudas e também plantio da espécie vegetal, considerou-se necessária a identificação, bem como o registro junto ao herbário da UFLA, com vistas à certificação de manutenção e reprodução da mesma espécie.

Para o processo de identificação, é necessário deixar o vegetal passar por todas as fases de diferenciação celular, sendo elas: crescimento, maturação e desenvolvimento do corpo para atingir a fase adulta. Após esse estágio, deve-se coletar uma amostragem que seja representativa da espécie vegetal.

Coletou-se uma ramagem representativa da espécie cultivada, contendo: caule, folhas e flores – como elucidado pela Figura 11, que segue.

Figura 11 – Amostram de *Hyptis marruboides* para identificação vegetal



Fonte: Da autora (2019)

A amostra foi envolta por jornais, deixando-a secar – conforme a Figura 12 – e, posteriormente, encaminhada ao herbário da UFLA.

Figura 12 – Amostra seca de *Hyptis marruboides* para identificação vegetal



Fonte: Da autora (2019)

Utilizando a chave taxonômica, especialistas da área identificou a planta em estudo como *Hyptis marrubioides*.

6.3 Extração do óleo essencial

No processo de extração, as folhas foram coletadas às 6:30 da manhã, do dia 20 de março de 2019, próximo ao nascer do sol. No momento da coleta, estava um pouco nublado e a temperatura ambiente era de 23°C. A umidade do ar era de 81%. Adotou-se tal critério para prevenção de interferência nos resultados da extração, haja vista que a umidade da natureza e fortes temperaturas implicam diretamente nos resultados de extração do óleo essencial.

Após a coleta, as folhas foram levadas, de imediato, para o processo de extração no Laboratório de Química Orgânica da UFLA. A metodologia utilizada para extração do óleo essencial foi de hidrodestilação, em aparelho Clavanger. Entretanto, realizou-se antes o preparo do vegetal para o processo.

O preparo do vegetal para extração consistiu em, inicialmente, separar as folhas do caule. O caule é descartado e as folhas são cortadas com auxílio de uma tesoura, em pequenos pedaços. Em seguida, as amostras foram fracionadas e pesadas em balança de precisão digital. Apurou-se, aproximadamente, 300 gramas de massa de planta – volume este suficiente para completar o balão volumétrico do destilador.

Foi introduzida a massa foliar pesada no balão volumétrico, que era de 5 litros e completado com água de torneira até a metade do balão – conforme recomendações da Farmacopeia Brasileira, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2010).

O balão foi acoplado ao aparelho destilador, na manta aquecedora, e foi mantido por duas horas em ebulição – o tempo é cronometrado a partir do momento de inicia a ebulição, também, como recomendado pela ANVISA (2010).

O processo de ebulição consiste na separação da porção orgânica e aquosa – conforme mostra a Figura 13, que segue. O processo consiste em hidrodestilação, no qual, após a fervura do vegetal imerso na água, os componentes voláteis são arrastados por vapores, que posteriormente, com o resfriamento no equipamento Clavenger, sofrem condensação e se separam da parte aquosa por decantação.

Figura 13 – Hidrodestilação do óleo essencial de *Hyptis marrubioides*



Fonte: Da autora (2019)

Após esse processo, todo o volume condensado e decantado foi recolhido em um tubo de ensaio e submetido à centrifugação a 3.000 rotações por minuto (RPM), por 15 minutos para separar a porção aquosa da porção do óleo, obtendo apenas óleo essencial de interesse – conforme Figura 14.

Figura 14 – Separação do óleo essencial de *Hyptis marrubioides*



Fonte: Da autora (2019)

A literatura recomenda que para o processo, recorra-se ao auxílio de uma micropipeta, para que o óleo seja retirado do tubo de ensaio e armazenado em um frasco de vidro estéril e, ainda, seja envolto com papel alumínio (LIMA *et. al.*, 2009). Obtido o óleo essencial, ele foi devidamente identificado e armazenado em geladeira, na temperatura de 2° a 8°C. Este processo foi repetido em triplicata no mesmo dia, mantendo as mesmas condições para obtenção do rendimento do óleo essencial.

6.4 Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada concomitante ao processo de extração do óleo essencial, no qual foram pesados 5g de planta picada e, em seguida, submergida em 80 ml de ciclohexano em balão volumétrico. O balão foi acoplado ao condensador de Dean Stark aquecido, por meio de uma manta aquecedora, por um período de duas horas.

O volume de água presente na amostra foi quantificado com auxílio de tubo de ensaio volumetricamente graduado, como mostra a Figura 15.

Figura 15 – Aspecto geral do processo para determinação de umidade com o aparelho Dean Stark em *Hyptis marrubioides*



Fonte: Da autora (2019)

A determinação da umidade foi realizada em triplicata, seguindo a metodologia descrita por Pimentel *et al.* (2006). O rendimento da extração do óleo essencial de cada planta foi

determinado em porcentagem de peso/peso (%p/p) em Base Livre de Umidade (BLU), utilizando-se a Equação (1):

$$\begin{aligned} & \text{massa de planta seca} \\ & = \text{massa e planta fresca} - \left(\frac{\text{teor de umidade} \cdot \text{massa de planta fresca}}{100} \right) \end{aligned}$$

O rendimento do óleo essencial foi calculado e expresso em peso de óleo por peso de material livre de umidade. Este procedimento é essencial para calcular o rendimento de óleo do vegetal coletado e, assim, comparar com as referências literárias, analisando se o resultado é equivalente.

6.5 Caracterização química do óleo essencial

A caracterização química do óleo essencial de *Hyptis marruboides* foi realizada, qualitativamente e quantitativamente, na Central de Análises e Prospecção Química (CAPQ) do Departamento de Química (DQI) da UFLA.

Para determinação dos compostos foi utilizada a técnica de Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (CG-EM), com a utilização do equipamento modelo ‘QP 2010 Plus’ (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), e sob as seguintes condições experimentais: coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) com fase ligada composta por filme de DB5 (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano); fase móvel He 5.0 (White Martins, Rio de Janeiro, Brasil) como gás de arraste; fluxo de 1,0 mL min⁻¹; temperatura do injetor: 220 °C; temperatura do detector: 240 °C; volume de injeção da amostra de 0,5 µL, diluído em hexano (1%) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA); taxa de partição do volume injetado (*split*) de 1:100; rampa de temperatura iniciada a 60°C, com um aumento para 240°C a uma taxa de 3°C min⁻¹, seguida de aumento a 10°C min⁻¹ até atingir 300°C, sendo a temperatura final mantida por 7 min.

A pressão na coluna foi em torno de 71,0 kPa. Os parâmetros operacionais do espectrômetro de massas foram os seguintes: potencial de ionização de 70 eV; temperatura de fonte de íons de 200°C.

A análise de massas foi realizada em modo de varredura total, variando de 45 a 500 Da, com velocidade de varredura de 1000 Da seg⁻¹ e intervalo de varredura de 0,5 fragmentos s⁻¹;

os dados foram processados e obtidos utilizando-se o *software* ‘LabSolutions LC/GC Workstation 2.72’.

O índice de retenção dos compostos foi calculado em relação a uma série homóloga de n-alcenos (nC₉-nC₁₈), empregando-se a Equação (2):

$$IR = 100n + \frac{100t_R(i) - t_R(n)}{t_R(n+1) - t_R(n)} \quad (2)$$

Em que:

t_R é o tempo de retenção do composto avaliado;

i representa o composto avaliado;

n é número de átomos de carbonos do alcano padrão antecessor ao composto avaliado;

$n + 1$ é número de átomos de carbonos do alcano padrão sucessor ao composto avaliado.

Os constituintes foram identificados com base na comparação dos índices de retenção da literatura (ADAMS, 2007).

Na avaliação quantitativa, que foi realizada por meio de normalização de áreas (%), utilizou-se um cromatógrafo gasoso (CG) ‘Shimadzu GC-2010’, equipado com detector por ionização de chamas (DIC) e as condições experimentais foram as mesmas empregadas na identificação dos constituintes dos óleos, realizada por CG-EM.

6.6 Cultivo de larvas de *Aedes aegypti*

As larvas de *Aedes aegypti* foram obtidas a partir da colônia pura da linhagem Rockefeller, fornecida pelo Laboratório de Entomologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A estimulação à eclosão larval ocorreu em recipientes plásticos de 5 litros, no qual foram preenchidos com média de 1 litro de água mineral. Os ovos foram adicionados na água e acrescentado ração de peixe macerada – como mostra a Figura 16, que segue –, para que, após eclosão, as larvas (L1) já tenham acesso ao alimento auxiliando em seu desenvolvimento. Observado o primeiro estágio larval, foram transferidas uma média de 300 larvas para outro recipiente plástico de mesmo porte, contendo um litro de água e ração de peixe. Esse processo foi realizado para cada estágio larval.

Figura 16 – Estimulação a eclosão de ovos e *Aedes aegypti*



Fonte: Da autora (2019)

A água foi trocada diariamente. Os ensaios foram realizados em estufas incubadoras BOD¹, para que as larvas fossem mantidas em condições ambientais favoráveis à sua evolução, sendo uma temperatura média de 26°C, apresentando variação de mais ou menos 1°C e fotoperíodo de 12hs. Foram mantidas sobre estas condições até atingirem o 3° instar. Após este estágio, elas foram submetidas a diferentes concentrações de óleo essencial.

6.7 Bioensaios

Inicialmente, testou-se a solubilidade do óleo essencial em um solvente, visto que o mesmo não é solúvel em água, selecionando o dimetilsulfóxido (DMSO), o qual solubilizou todo o óleo essencial. Posteriormente, foi testado se o solvente não afetaria o desenvolvimento larval. Para isso, foram submetidas, em triplicata, 10 larvas em uma concentração de 0.5% de DMSO e, após 24 horas, foi observado que todas as larvas permaneceram vivas.

Partindo do ponto que o solvente não interferiu no desenvolvimento larval, foi iniciado os testes para verificação do efeito do óleo essencial sobre as larvas. Foram testadas nove diferentes concentrações de óleo essencial (0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312, 0.0156, 0.0078, 0.0039 e 0.0095 µL/mL).

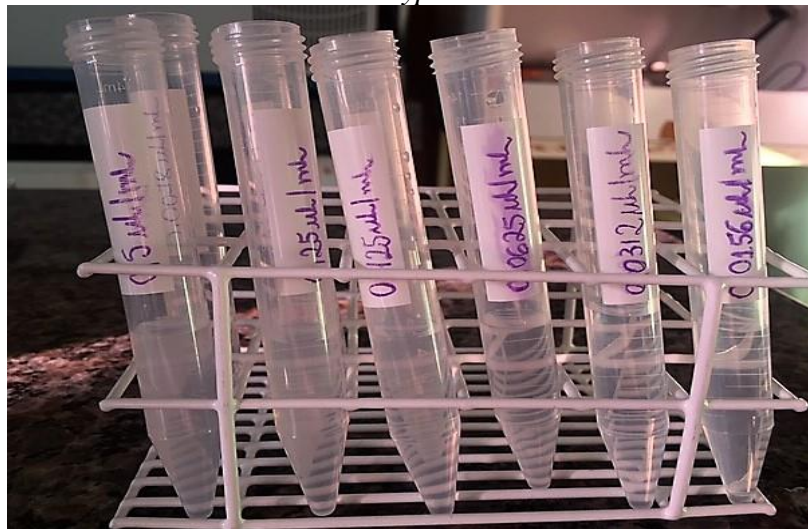
¹ Incubadora ou Estufa Incubadora *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) – Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)

Os testes foram realizados em tubo cônico devidamente identificado com suas respectivas concentrações a serem testadas. Foram adicionados 5 μL de óleo essencial, 50 μL de DMSO e completado para 10 mL com água mineral. A partir desta primeira diluição, foram realizadas diluições seriadas para demais concentrações.

Juntamente com as concentrações testadas, foi realizado o teste controle da água e da água com DMSO, com vistas a constatar que estes não estariam interferindo no desenvolvimento larval.

Com auxílio de uma pipeta de Pasteur, foram captadas as larvas e colocadas no tubo cônico, adicionando-se ração. Foram adicionadas 10 larvas por concentração testada. Preparados os testes – conforme a Figura 17 –, estes foram alocados em um estande e colocados na estufa de BOD, mantendo assim as condições de desenvolvimento. Depois de 24 horas, foi observado o número de larvas vivas e número de larvas mortas.

Figura 17 – Ensaio do efeito inseticida de *Hyptis marruboides* em larvas de *Aedes aegypti*



Fonte: Da autora (2019)

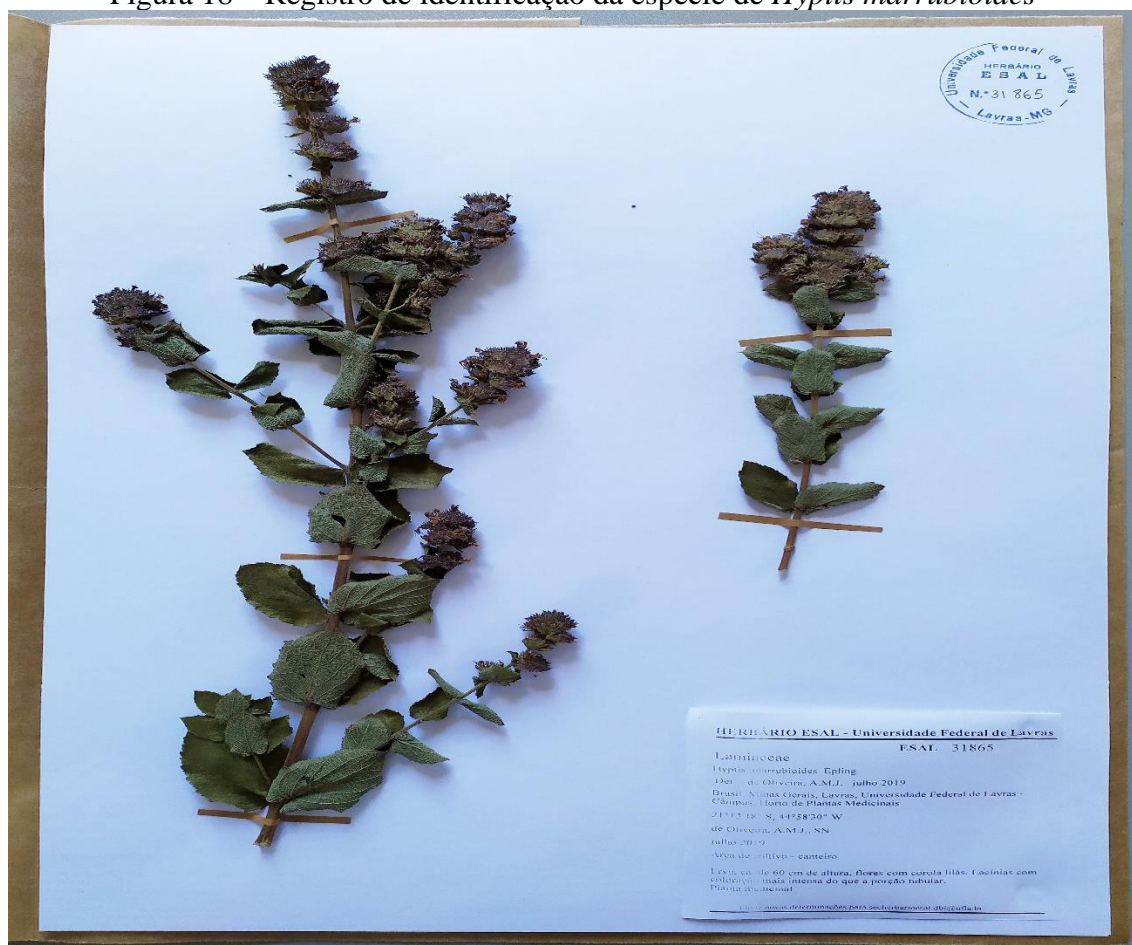
As condições submetidas às colônias de *Aedes aegypti* foram as mesmas para todos os ensaios, os quais foram realizados em triplicata, em dias diferentes, para eliminar quaisquer erros analíticos e constatar a reprodutibilidade dos ensaios.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Cultivo e identificação da espécie vegetal

A identificação vegetal foi realizada para fidedignidade da espécie em estudo e a exsicata está deposita no herbário da UFLA, sobre registro 31865, confirmando a espécie vegetal ser *Hyptis marrubioides* – conforme comprovação da Figura 18.

Figura 18 – Registro de identificação da espécie de *Hyptis marrubioides*



Fonte: Da autora (2019)

É descrito por Botrel *et al.* (2010), que a região de maior prevalência da espécie é o cerrado; contudo, o cultivo de *Hyptis marrubioides* não foi prejudicado, visto que o vegetal teve um bom desenvolvimento quando comparamos o seu cultivo com outras pesquisas. Ou mesmos autores relatam que entre o período de transplantagem das mudas até sua florescência, leva certa de 110 dias, o que valida a boa evolução do plantio da pesquisa em questão, sendo de uma média de 100 dias.

7.2 Rendimento do óleo essencial

Realizado o processo de hidrodestilação, foram realizados os cálculos para obter o rendimento do óleo essencial. Para chegar ao rendimento do óleo essencial, deve obter primeiramente o teor médio de umidade da planta.

Realizada a extração em triplicata, o rendimento médio de óleo essencial apresentado foi de 0,4603% com desvio de 0.01 para mais ou para menos – conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Extração em triplicata e o rendimento médio de óleo essencial

1ª Extração	$\text{massa de planta seca} = 303,05 - \left(\frac{74,80 \cdot 303,05}{100}\right) = 76,37$ <p>76,37 ----- 100% 0,3457 (massa de óleo essencial) - x X = 0,4527</p>
2ª Extração	$\text{massa de planta seca} = 303,31 - \left(\frac{74,80 \cdot 303,31}{100}\right) = 76,43$ <p>76,46 ----- 100% 0,3366 ----- x X = 0,4402</p>
3ª Extração	$\text{massa de planta seca} = 320,38 - \left(\frac{74,80 \cdot 320,38}{100}\right) = 80,73$ <p>80,73 ----- 100% 0,3939 ----- x X = 0,4879</p>
Média	X = 0,4603

Fonte: Da autora (2019)

Obtido a teor da umidade, o qual foi de 74.80%, segue com o cálculo do rendimento, sendo calculado pela Equação (3):

massa de planta seca

$$= \text{massa e planta fresca} - \left(\frac{\text{teor de umidade} \cdot \text{massa de planta fresca}}{100}\right) \quad (3)$$

Realizada a extração em triplicata, foram feitas as médias da massa de cada extração, conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2 – Médias da massa das extrações de óleo *Hyptis marruboides*

Extração	Massa de planta fresca (g)	Massa utilizada na umidade (g)	Volume de H ₂ O medido	Massa de óleo
1 ^a	303,05	5,05	3,8	0,3457
2 ^a	303,31	5,03	3,8	0,3366
3 ^a	320,38	5,05	3,7	0,3939

Fonte: Da autora (2019)

Comparando à pesquisa realizada por Botrel *et al.* (2010), o presente trabalho obteve maior rendimento de óleo essencial. Os autores demonstraram um rendimento de OE obtido das folhagens do gênero *Hyptis marruboides* roxa, de apenas 0,0668 gramas.

Esta diferença, entre o resultado deste estudo e o resultado do estudo dos autores, pode ser oriunda da forma de cultivo, pois, enquanto o cultivo dos pesquisadores citados foi desenvolvido *in vitro*, na presente pesquisa foi realizado *in vivo*.

É sabido que as condições de cultivo implicam diretamente no metabolismo dos vegetais e conseqüentemente nos produtos oriundos deste metabolismo (BOTREL, 2010).

Independente da metodologia adotada para extração do OE, a quantidade de óleo obtida para qualquer espécie de planta é relativamente baixa, sendo geralmente, inferior a 1%. Raras são as espécies que apresenta grande produção de OE. Como exemplo de espécie produtoras de grande quantidade de OE, pode-se mencionar botões florais de cravo – podendo este render até 15% (SERAFINI *et al.*, 2002).

O rendimento do OE tem interferência direta da fase de crescimento em que estava o vegetal no momento da colheita, períodos do dia em que foi obtido, nutrição da planta, forma de cultivo, fatores ambientais, origem geográfica, além de época de colheita, entre outros fatores (SIMÕES; SPITZER 2000; BAKKALI *et al.*, 2008; ANDRADE, 2013).

Essa inconsistência de resultados pode presumir que, quanto mais natural estes vegetais forem cultivados e com maior riqueza em nutrientes, maior será sua produção de óleo essencial.

Branquinho (2015) estudou sobre a influência de diferentes temperaturas e velocidades do ar de secagem, que pudessem promover variações no teor e composição dos óleos essenciais de *Hyptis marruboides* Epling, *Hyptis suaveolens* (Linnaeus) Poiteau e *Hyptis pectinata* (Linnaeus) Poiteau. Foi possível verificar que Cis- e trans-tujona foram os compostos

majoritários da espécie *Hyptis marrubioides*. Para a espécie *Hyptis suaveolens*, o óxido de cariofileno teve maior concentração e, por fim, para *Hyptis pectinata*, as análises químicas também apontaram o composto óxido de cariofileno como majoritário em todas as condições de secagem, não sofrendo interferência em suas composições frente às diferentes temperaturas.

Zouari-Bouassida *et al.* (2018), investigaram a interferência sazonal para o rendimento de OE de *Mentha longifolia* – tendo, também, os monoterpenos como componentes majoritários. Os autores concluíram que há diferença de rendimento entre as estações, apontando a primavera como melhor período para rendimento do OE.

7.3 Identificação dos constituintes do óleo essencial

Os resultados obtidos para a caracterização química do OE de *Hyptis marrubioides* estão apresentados na Tabela 3. Foram identificados 8 constituintes no OE da espécie cultivada.

Tabela 3 – Caracterização química por CG-EM do OE de *Hyptis marrubioides*

Composto	% Área	IR T	IR C
<i>α – tujona</i>	30,78	1112	1118
<i>β – tujona</i>	28,23	1101	1107
<i>γ – cadineno</i>	9,63	1484	1481
<i>β – cariofileno</i>	7,38	1417	1419
<i>Copaene</i>	6,81	1374	1376
<i>Cis -pinocanfona</i>	4,19	1172	1176
<i>Sabinene</i>	2,22	969	974
<i>δ – cadineno</i>	0,42	1522	1518
% de constituintes identificados	89,66%		

Legenda: TR – tempo de retenção; IRLit – índice de retenção da literatura; IRcal – índice de retenção calculado; N. Área – Normalização da área

Fonte: Da autora (2019)

Pelos dados apresentados na Tabela 3, observa-se que o constituinte majoritário *α-tujona*, uma cetona monoterpênica, representando 30,78%.

O estudo realizado por Botrel *et al.* (2010), aponta o mesmo constituinte de maior porcentagem em sua pesquisa, evidenciado em 25.1%.

O segundo constituinte de maior percentualidade foi a β -tujona, também classificado como cetona monoterpênica, com 28,23%, seguidos de outros constituintes de menor porcentagem, os quais são γ -cadineno (9,63%), β -cariofileno (7,38%), *Copaene* (6,81%), que são hidrocarbonetos; *Cis-pinocanfona* (4,19%), classificado como cetona; *Sabinene* (2,22%), monoterpene e por fim δ -cadineno, um hidrocarboneto com 0,42%.

Tais dados corroboram com o que descrevem Botrel *et al.* (2010), no qual identificaram-se, de maneira semelhante, os mesmos compostos de maior predominância na caracterização do óleo.

Botrel *et al.* (2010) descreveram que a espécie de *H. marruboides*, no serrado brasileiro, apresenta a cariofila-4(14),8(15)-dien-5 β -ol, eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol, óxido de cariofileno e (β)-cariofileno como os principais constituintes.

A partir de tais dados, pode-se inferir que a diferença na identificação dos compostos majoritários pode ser justificada pela região de cultivo e tipo de solo, mudando o perfil dos compostos da planta em estudo, visto que estes fatores implicam na produção e composição do óleo essencial.

Outras espécies de *Hyptis*, como *H. suaveolens* e *H. spicigera*, apresentaram como componentes majoritários os monoterpeneos e hidrocarbonetos (WANGRAWA, 2018).

A composição química dos óleos essenciais pode ser determinada por fatores genéticos. Mas, outros fatores podem causar alterações significativas na composição dos metabólitos secundários. Dentre eles, citam-se: as estações do ano, a idade e o estágio de desenvolvimento da planta, o horário de coleta, o fator hídrico, a temperatura, a nutrição do solo, os processos de colheita e a pós-colheita (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

7.4 Efeito inseticida de *Hyptis marruboides* em larvas de *Aedes aegypti*

Foi avaliada para o óleo essencial de *Hyptis marruboides*, a menor concentração que apresentou um efeito inseticida sobre larvas de *Aedes aegypti*; ou seja, a concentração letal (CL) mínima. Essa concentração é aquela necessária para causar 100% de morte das larvas. Os valores referentes as concentrações testadas estão representadas na Tabela 4.

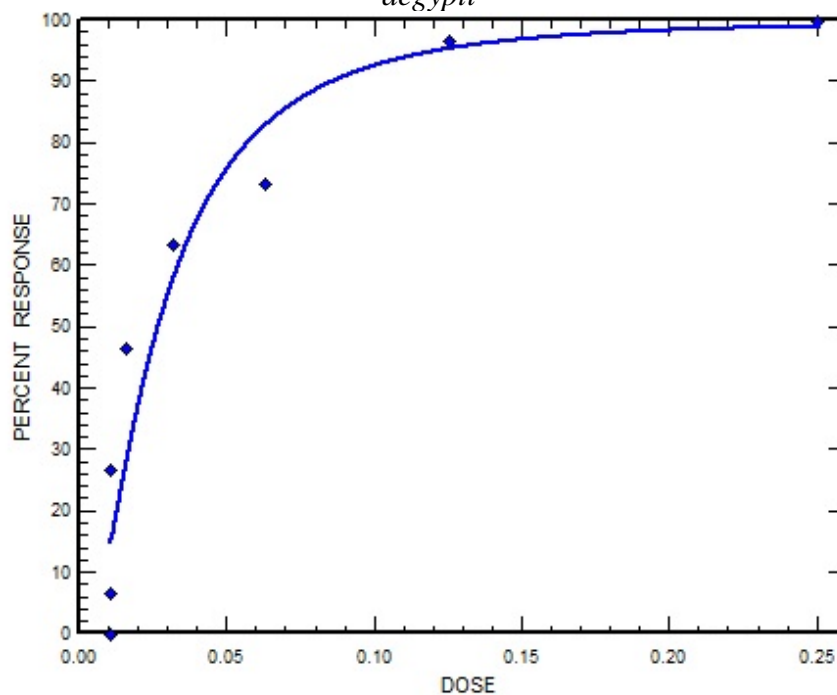
Tabela 4 – Efeito inseticida do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* em larvas de *Aedes aegypti*

Concentração de óleo	Total de larvas vivas	Total de larvas mortas
0,50 µl/ml	00	30
0,25 µl/ml	00	30
0,125 µl/ml	01	29
0,0625 µl/ml	08	22
0,0312 µl/ml	11	19
0,0156 µl/ml	16	14
0,0078 µl/ml	21	09
0,0039 µl/ml	26	04
0,00195 µl/ml	30	00

Fonte: Da autora (2019)

Os dados obtidos estão representados na Figura 19, mostrando que o efeito inseticida é dose dependente, ou seja, quanto maior a concentração de óleo essencial utilizado, maior a letalidade dos indivíduos.

Figura 19 – Efeito inseticida do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* em larvas de *Aedes aegypti*



06 SEP 2019

properties of *Hyptis marrubioides* against *A. aegypti* larvae.

Hyptis

Fonte: Da autora (2019)

Testadas as amostras controles apenas com água e com diluente, certificou-se que os resultados obtidos dão somente ao efeito do óleo essencial.

Utilizou-se o programa *Probit* para análise de dados. Este modelo é utilizado, especificamente, para averiguar a dose resposta de uma dada substância em um determinado indivíduo ou em grupos de indivíduos. Ele permite identificar com grande eficiência a CL50, e para determinação das demais doses que se deseja obter, como CL95 e CL99.

Após computados os dados obtidos, foi encontrada a CL₅₀, que corresponde a 0.026 µl/ml, a DL₉₀, que é 0.083 µl/ml e a CL₉₉, 0.218 µl/ml.

Massoud (2000) observou em sua pesquisa com OE de *Commiphora molmol*, o efeito inseticida sobre larvas de mosquitos, apresentando atividade letal mediana contra larvas de segundo, terceiro e quarto ínstar de *Culex pipiens* a 0,016 x 10 (2), 0,17 x 10 (2) e 1,6 x 10 (2) g / l, respectivamente. Enquanto a CL50 contra larvas de *Aedes caspius* de terceiro ínstar foi de 0,2 x 10 (2) g / l., pode-se observar uma baixa concentração de OE para obtenção do resultado esperado, como foi o apresentado nesta presente pesquisa.

Foi possível constatar, com base nos dados neste estudo constatados, que o óleo essencial de *Hyptis marrubioides* apresentou ativo efeito inseticida sobre as larvas de *Aedes aegypti*. Com base em dados numéricos, evidenciou-se a necessidade de uma pequena concentração para que obtivesse as doses letais, tendo isso como grande vantagem.

Na literatura existem poucas descrições sobre o efeito inseticida e composição química de *Hyptis marrubioides*. Entretanto, Mello *et al.* (2014), descreveram em pesquisa, um efeito inseticida semelhante quando testou o efeito do OE de *Hyptis marrubioides* em *Zabrotes subfasciatus* (gorgulho do feijão mexicano) e obtiveram grande êxito, observando sua mortalidade, utilizando pequena concentração de óleo e obtendo o efeito em curto espaço de tempo.

Foi desenvolvida uma revisão bibliográfica por Luna (2019), no qual foi pesquisado, dentre a diversidade de óleos essenciais, os que apresentam melhor efeito inseticida. Concluiu-se que das classes de OE, os monoterpenos são os que atuam melhor com efeito inseticida em *Aedes aegypti*. Tal pesquisa corrobora com os resultados obtidos no presente trabalho, visto que *Hyptis marrubioides* apresenta os hidrocarbonetos monoterpenos como compostos majoritários e com efeito inseticida para *Aedes aegypti*.

Hari e Mathew (2018) testaram o óleo essencial de *Hyptis suaveolens*, a qual tem características semelhantes, e observou que com 55,41mg/L foi possível atingir a CL50.

Quando comparado aos inseticidas atuais utilizados para controle do *Aedes aegypti*, pode-se apontar como vantagem, o uso do OE, por ser um produto natural, que causa menor

dano a fauna e a flora, e que é necessária uma pequena concentração para que atinja os resultados esperados.

Importante abordar sobre a biodisponibilidade dos óleos essenciais, uma vez que são foto sensíveis. Foi constatado o efeito do óleo essencial; todavia, é essencial realizar mais pesquisas para estudo da sua forma de utilização, para que não perca seu efeito quando exposto à luz. Todos estes testes foram realizados com fotoperíodo, sendo 12 horas de exposição e 12 horas sem a presença de luz.

Hari e Mathew (2018) desenvolveram um estudo comparativo por meio da disponibilidade do OE por nanoencapsulação e sem encapsular. Foi possível observar que, embora o OE nanoemcapsulado tenha apresentado menor atividade inseticida, ele oferece uma vantagem maior sobre o OE livre, devido à proteção conferida pelo polímero contra a fotodegradação.

Silva *et al.* (2018), testaram o efeito inseticida de *Hyptis fruticosa* (Lamiaceae) e *Hyptis pectinata* (Lamiaceae) em larvas de *Aedes aegypti* nas mesmas condições do presente trabalho – no qual 30 larvas foram submetidas a diferentes concentrações de OE e, após 24 horas, foram avaliadas os efeitos. Constataram-se que *Hyptis fruticosa* apresenta menor efeito inseticida que *Hyptis pectinata*, uma vez que apresentam diferentes compostos orgânicos.

Araújo (2013), testou a atividade inseticida de *Hyptis martiusii* em larvas de *Aedes aegypti*. Foi observado em seu experimento que esta espécie apresenta 100% de mortalidade após 1 dia de exposição na concentração de 250mg/l. Salienta-se que, devido à grande variabilidade genética e evolução das espécies, sempre vai existir um indivíduo que conseguirá sobreviver às condições submetidas, buscando com a pesquisa um controle mais eficaz deste grupo de indivíduos.

Com base em algumas pesquisas já realizadas com *Hyptis*, é possível presumir que esta espécie é uma promissora inseticida e que poderá auxiliar no combate à disseminação de doenças virais de importância epidemiológica.

8 CONCLUSÃO

Por meio da pesquisa desenvolvida, cumpriu-se o objetivo de avaliar a atividade inseticida óleo essencial de *Hyptis marruboides* nas concentrações sobre larvas de *Aedes aegypti*. Para tanto, inicialmente foram extraídos e caracterizados os constituintes do óleo essencial de *Hyptis marruboides*; na sequência, determinou-se o rendimento da extração de óleo essencial de *Hyptis marruboides*; posteriormente, identificaram-se os compostos presentes no óleo essencial de *Hyptis marruboides* e; por fim, avaliou-se a susceptibilidade de larvas de *Aedes aegypti*, provenientes de colônias puras, em óleo essencial de *Hyptis marruboides*, determinando a concentração letal 50, 95 e 99%.

Neste percurso, constatou-se pelo processo de extração do óleo essencial de *Hyptis marruboides*, que os componentes majoritários deste vegetal são os monoterpenoides α -*tujona* e β -*tujona*. Também, que esta espécie apresenta um bom rendimento de óleo essencial quando cultivada adequadamente. E, ainda, que o óleo essencial estudado apresentou efeito inseticida sobre as larvas de *Aedes aegypti*, sendo necessário baixas concentrações para atingir a dose letal 50, 95 e 99%.

Desta feita, confirmou-se a hipótese de pesquisa, sendo possível concluir que o óleo essencial de *Hyptis marruboides* tem ação inseticida sobre larvas de *Aedes aegypti*.

Dentre as limitações de pesquisa, considera-se que a escassez de estudos e pesquisas acerca da investigativa do efeito inseticida sobre larvas de *Aedes aegypti* (ou artrópodes diversos), a partir de óleos essenciais (inclusive, *Hyptis marrubioide*), impediram uma discussão mais direta com os resultados e achados da pesquisa proposta por esta dissertação.

Contudo, acredita-se que tal limitação tenha-se transformado em contribuições para a comunidade acadêmico-científica, haja a vista da edificação de um estudo ímpar, reunindo informações importantes para as Ciências da Saúde e Medicina, bem como para programas de Epidemiologia de doenças infecciosas e parasitárias.

Assim, este trabalho pode servir de base para mais estudos voltados ao desenvolvimento de um inseticida à base do óleo essencial de *Hyptis marruboides*, que contribuirá para controle e combate ao mosquito, disseminador do vírus de várias doenças de grande impacto a saúde do homem.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oils componentes by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4th ed. Carol Stream: Allured, 2007.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**. 5 ed. Anvisa: Brasília: ANVISA, 2010.
- ALVES, L. S.; *et. al.* Teor, rendimento e composição química do óleo essencial de plantas de manjeriço submetidas ao estresse salino com NaCl. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.4, p.807-813, 2015.
- ANDRADE, M. A. **Óleos essenciais de *Cinnamodendrom dinisii Schwacke* e *Siparuna guianensis Aublet*: composição química, caracterização das estruturas secretoras e avaliação do potencial biológico**. Lavras: Repositório UFLA, 2013.
- ARAÚJO, A. P. **Análise da resistência a inseticidas químicos em populações de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), de Municípios do Estado de Pernambuco**. Recife: s. n, 2013. 120 p.: ilus. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.
- BAKKALI, F., *et. al.* Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BARATA, E. A. M. F. *et. al.* População de *Aedes aegypti* (L) em área endêmica de dengue, sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 3, n. 35, p. 237-242, 2001.
- BECKER, N. *et.al.* **Mosquitoes and their control**. New York: Kluwer Academic, 2003.
- BESERRA, E. B.; CASTRO, J. R.; FRANCISCO, P. Biologia comparada de Populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) da Paraíba. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 1, p. 81-85, 2008.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- BOTREL, P. P. *et al.* Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marrubioides Epl.*, *Lamiaceae* em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum. Agronomy**. Maringá, v. 32, n. 3, p. 533-538, 2010.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviço de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 279-293, 2007.
- BRANQUINHO, N. A. Á. **Avaliação de teor e composição química dos óleos essenciais de três espécies de *Hyptis*, submetidas a diferentes velocidades e temperaturas de secagem**. Rio Verde: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, 2015.
- BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 229-239, jul. 2010.

BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists. 2.ed. Editora John Wiley & Sons, 2015.

CAMPOS, A. C. T. *et al.* Atividade repelente e inseticida do óleo essencial de carqueja doce sobre o caruncho do feijão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, n.8, p.861-865, 2014.

CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F., MARTINEZ, N.; LORENZO, D.; DELLACASSA, E. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. **Industrial Crops and Products**, v. 29, n.1, p. 171-176, 2009.

CHAVASSE, D. C, YAP, H. H. **Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance**. World Health Organization. Division of Control of Tropical Diseases. Geneva: World Health Organization, 1997.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. São Paulo: Editora Fiocruz, 1994.

CRINNION, W. J. Environmental medicine, part 4: pesticides - biologically persistent and ubiquitous toxins. **Altern Med Rev**, v.1, n.1, p. 423-447, oct. 2000.

D'AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (Dicloro Difetil Tricloroetano): Toxicidade e Contaminação Ambiental – uma revisão. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6, p. 995-1002, 2002.

DAVIDSON, G.; ZAHAR, A. R. The practical implications of resistance of malaria vectors to insecticides. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneve, v. 49, n. 5, p. 475-483, 1973.

ECHEVERRIA, J.; ALBUQUERQUE, R. D. D. G. Nanoemulsions of Essential Oils: new Tool for Control of Vector-Borne Diseases and in vitro effects on Some Parasitic Agents. **Medicines**, v. 6, n. 42, 2019.

ESTRELA, J. L. V.; FAZOLIN, M.; CATANI, V.; ALÉCIO, M. R.; LIMA, M. S. Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.217-222, 2006.

FEITOSA-ALCANTARA, R. B. *et al.* Essential Oils of *Hyptis pectinata* Chemotypes: Isolation, Binary Mixtures and Acute Toxicity on Leaf-Cutting Ants. **Molecules**, v.22, n.4, p. 621, apr. 2016.

GIVIZIEZ, C. R. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* e desenvolvimento de antisséptico com princípio ativo natural**. Lavras: UFLA, 2010.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, out. 2007.

GONZÁLEZ, *et al.* Micro-environmental features associated to container-dwelling mosquitoes (Diptera: Culicidae) in an urban cemetery of the Dominican Republic. 2019. **Revista de Biología Tropical**, v.6, n.1, p.132-145, p. 132-145, mrch 2019.

GRAF, J. F. The role of insect growth regulators in arthropod control. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 9, n. 12, p. 471-474, 1993.

GUEDES, D. R. D. **Análise da competência vetorial para o vírus dengue em populações naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* de Pernambuco/Recife**. 2012. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2012.

HARI, I.; MATHEW, N. Larvicidal activity of selected plant extracts and their combination against the mosquito vectors *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. **New Journal**, v. 25, n.1. p.9176-9185, 2018.

HARLEY, R. M. Revision of generic limits in *Hyptis* Jacq. (*Labiatae*) and its allies. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 2, n.1, p.87-95, 1988.

JAYA, P. S.. BHANU, P.; DUBEY, N. K. Insecticidal activity of *Ageratum conyzoides* L., *Coleus aromaticus* Benth. and *Hyptis suaveolens* (L.) Poit essential oils as fumigant against storage grain insect *Tribolium castaneum* Herbst. **Healt**, v. 51, n. 9, p.2210-2215, sep. 2014.

JÚNIOR, C. V.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

KIM, S. I.; ROH, J. Y.; KIM, D. H.; LEE, H. S.; AHN, Y. J. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. **Journal of Stored Products Research**, v.39, n.1, p.293-303, 2003.

KUHNT, M., *et. al.* Biological and Pharmacological Activities and Further Constituents of *Hyptis verticillata*. **Planta Medica**, v. 61, n. 03, p. 227-232, 1995.

LEITE, G. L. D.; ASSOCIADO, I. I. Entomologia Básica: Tórax. **Publicações UFMG**, v. 17, n. 2, p. 20, 2011.

LIMA, R. K. *et. al.*, Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagartado-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Acta Amazônica**, v. 39, n.2, p. 37382, 2009.

LOKE, R. S. *et. al.* Susceptibility of field-collected *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to *Bacillus thuringiensis israelensis* and *temephos*. **Tropical Biomedicine**, Putrajaya, v. 27, n. 3, p. 493-503, 2010.

LUNA, E. C. Active Essential Oils and Their Components in Use against Neglected Diseases and Arboviruses. **Oxidative Medicine and Cellular Longevit**, v.1, n.1, 2019.

MAZZONETTO, F.; VENDRAMIM, J. D. Efeito de pós de origem vegetal sobre *Acanthoscelidesobtectus* (Say) (*Coleoptera: Bruchidae*) em feijão armazenado. **Neotropical Entomology**, v.32, p.145-149, 2003.

MACHADO, B. F. M. T.; FERNADES, J. A. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos Acadêmicos**, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.

MELLO, *et. al.* Atividade inseticida do óleo essencial de *Hyptis marruboides* no controle de *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae). **Revista Agrogeoambiental**, v.6, n.1, abr. 2014.

MENDONÇA. B. A. A., *et. al.* Temporal genetic structure of major dengue vector *Aedes aegypti* from Manaus, Amazonas, Brazil. **Acta Tropica**. 134 ed. p. 80-88, 2014.

MENONE, M. L. *et al.* PCBs and Organochlorines in Tissues of Silverside (*Odontesthes bonariensis*) from a Coastal Lagoon in Argentina. **Archives Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 38, n.1, p.202-208, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **The use of DDT in malaria control**. WHO position statement. Geneva: WHO, 2007.

OLIVEIRA, L. M. *et. al.*, 2011. Propagação vegetativa de *Hyptis leucocephala* Mart. ex Benth. e *Hyptis platanifolia* Mart. ex Benth. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n.1, p. 73-78, 2011.

OUSSALAH, M., *et. al.* Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v.18, n. 5, p. 414-420, 2007.

PEDROSO, R. C. N. *et. al.* Impact of quality on flavonoid production and growth of *Hyptis marruboides* seedlings cultivated *in vitro*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V.. 27, n. 1, p. 466-470, 2017.

PIMENTEL, F. A. *et al.* A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 373-375, jan. 2006.

PINHEIRO, A. L. **Produção de óleos Essenciais**, Viçosa: CPT, 2003.

PINHEIRO, V. C. S. *et al.* Detection of dengue virus serotype 3 by reverse transcriptionpolymerase chain reaction in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) captured in Manaus, Amazonas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 8, p. 833-839, 2005.

SERAFINI; L. A.; SANTOS, A. C. A.; TOUGUINHA, L. A.; AGOSTINI, G.; DALFOVO, V. **Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002.

SILVA, H. G.; SILVA, I. G. Influência do período de quiescência sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 32, n.4, p. 349-355, 1999.

SILVA, L. S. B. *et al.* 2018. Modelo Entomologico Determinístico sob Efeito da Pluviosidade para o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus*. **Tendências em Matemática Aplicada e Computacional**, v. 19, n. 2, p. 289-303, 2018.

SILVA, O. E.; POLETO, C. Monitoramento do *Aedes albopictus* em pequenas comunidades. **Uningá Review**, v. 10, n. 1, p. 25-32, 2012.

SILVEIRA, J. C. *et al.*. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos Essenciais. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p. 2038-2052, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2000.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2007.

SOPER, F. L. Rehabilitation of the eradication concept in prevention of communicable diseases. **Public Health Reports**, Boston, v. 80, n. 10, p. 855- 869, oct, 1965.

STRINGARO, A.; COLONE, M.; ANGIOLELLA, L. Antioxidant, Antifungal, Antibiofilm, and Cytotoxic Activities of *Mentha spp.* Essential Oils. **Medicines**, v. 5, p. n.1, p.112-10, 2018.

WALLACE, R. J. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. **Proceedings of the Nutrition Society** v. 63, n.1, p. 621–629, 2004.

WANGRAWA, D. W. Insecticidal Activity of Local Plants Essential Oils Against Laboratory and Field Strains of *Anopheles gambiae* s. l. (*Diptera: Culicidae*) From Burkina Faso. **Journal of Economic Entomology**, v. 111, n.6, p. 2844-2853, dec. 2018.

WARE, G. W.; WHITACRE, D. M. **An introduction to insecticides**. 4.ed. Tucson, Arizona, 2004.

WILKE, A. B. B. *et al.* Controle de vetores utilizando mosquitos geneticamente modificados. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 43, n. 5, p. 869-874, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Methods for use by individuals and communities**. Geneva: WHO, 1997.

ZOUARI-BOUASSIDA, K. *et al.* Seasonal Variation in Essential Oils Composition and the Biological and Pharmaceutical Protective Effects of *Mentha longifolia* Leaves Grown in Tunisia. **BioMed Research International**, v. 18, n.1, p.1-12, 2018.