



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DE EXTRATOS E ÓLEO ESSENCIAL
DE *Piper capitarianum* Yunck , 1966 (PIPERACEAE) SOBRE *Aedes aegypti* Linnaeus,
1762 e *Anopheles* sp (CULICIDAE) EM LABORATORIO.**

LEANDRO PEREIRA FRANÇA

Manaus - Amazonas
2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



LEANDRO PEREIRA FRANÇA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DE EXTRATOS E ÓLEO ESSENCIAL
DE *Piper capitarianum* Yunck , 1966 (PIPERACEAE) SOBRE *Aedes aegypti* Linnaeus,
1762 e *Anopheles* sp (CULICIDAE) EM LABORATORIO.**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia - PPGBIOTEC
da Universidade Federal do Amazonas -
UFAM, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.**

Orientador(a): Dr. Wanderli Pedro Tadei

Co-Orientador(a): Dra. Ana Cristina da Silva Pinto

**Manaus - Amazonas
2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



LEANDRO PEREIRA FRANÇA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DE EXTRATOS E ÓLEO ESSENCIAL
DE *Piper capitarianum* Yunck , 1966 (PIPERACEAE) SOBRE *Aedes aegypti* Linnaeus,
1762 e *Anopheles* sp (CULICIDAE) EM LABORATORIO.**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia - PPGBIOTEC
da Universidade Federal do Amazonas -
UFAM, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.**

Aprovado em: ____/____/2015

BANCA EXAMINADORA:

Dr^a Francisca das Chagas do Amaral Souza, Membro
Instituto de Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA

Dr. Francisco Célio Maia Chaves, Membro
Empresa Brasileira de Pesquisas e Agropecuária-EMBRAPA

Dr. Wanderli Pedro Tadei, Presidente
Instituto de Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA

Ficha Catalográfica

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

P436a Pereira Franca, Leandro
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DE EXTRATOS E
ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper capitarianum* Yunck , 1966
(PIPERACEAE) SOBRE *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 e
Anopheles sp. (CULICIDAE) EM LABORATÓRIO. / Leandro Pereira
Franca. 2015
92 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Dr. Wanderli Pedro Tadei
Coorientadora: Dra. Ana Cristina da Silva Pinto
Tese (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. Dengue. 2. Malária. 3. Mosquitos. 4. Fitoquímica. I. Tadei, Dr.
Wanderli Pedro II. Universidade Federal do Amazonas III. Título]

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me iluminado e ter dado bastante força durante toda a jornada;

Ao meu orientador Dr. Wanderli Pedro Tadei, pela orientação, confiança e oportunidade, o que tornou possível a realização desse trabalho;

À minha Co-orientadora Dra. Ana Cristina, pelo empenho e paciência que me prestou para realização deste trabalho;

Em especial, minha ex-orientadora Dra. Iléa Rodrigues pela contribuição na minha formação científica, pela amizade, confiança, carinho.

Ao Dr. João Zequi, pela orientação, amizade, palavras de conforto e confiança.

A minha família, Lourdes e Pedro (pais), Lucileide, Luciana, Leticia (irmãs), Liandra (sobrinha), Cezar, Elwis, (cunhados), por todos os momentos de alegria e ensinamentos de vida, amor, apoio, compreensão, incentivo, palavras de conforto e fé,

Ao meu amigo, Augusto Ferreira pelo companheirismo, amizade, palavras de apoio nas horas difíceis.

A minha amiga, Nubiane pela ajuda, amizade, carinho e palavras de confortos.

A todos os meus amigos do laboratório, que contribuíram para realização deste trabalho (Adriano, Eliane, Eunice, Joelma, Grafe, Isabelle, Ana Paula, Elerson, Katak, Francimilton, Levi, e Sidney);

À equipe técnica do laboratório de Malária e Dengue do INPA, pelo auxílio na realização das coletas, em especial a Maria do Disterro, Juracy, pelo apoio, amizade, palavras de conforto.

A minha namorada Ituany Melo, pelo amor, carinho, força, paciência, dividindo minhas alegrias e tristeza;

RESUMO

Os mosquitos são responsáveis por sérios problemas de saúde pública mundial. O *Aedes aegypti* e *Anopheles* são importantes vetores na transmissão da dengue e malária no Brasil. Como não existe vacina disponível, a principal forma de reduzir os índices de dengue e malária é controlando a proliferação dos insetos vetores que se baseia no controle vetorial através da aplicação de inseticidas químicos que possibilitam a contaminação ao meio ambiente e seleção de resistência em populações de mosquitos em decorrência da intensa aplicação. O uso de extrato de plantas vem ganhando destaque como alternativa no controle de vetores, especialmente no ambiente amazônico, já que os vegetais empregados apresentam compostos químicos com atividade larvicida e inseticida. Este trabalho tem como objetivo realizar a prospecção fitoquímica e avaliar a atividade larvicida dos extratos e do óleo essencial de *P. capitarianum* para o controle de *A. aegypti* e *Anopheles* sp em condições de laboratório. Os ovos de *A. aegypti* foram coletados em dois bairros de Manaus, e as larvas de anofelinos foram obtidas nos criadouros do bairro Puraquequera. Os bioensaios foram preparados com os extratos, óleo e água destilada nas seguintes concentrações: 500, 250, 100, 50, 25 mg/mL, controle positivo (temefós) e o controle negativo (DMSO, H₂O e Tween), testados com Rockfeller, *A. aegypti* e *Anopheles* que foram avaliada através da observação da mortalidade das larvas em 24 , 48 e 72 horas de exposição. Os extratos hexânicos, metanólicos e aquoso foram preparados pelo sistema *Soxhlet*, método de infusão e o óleo essencial foi extraído por hidrodestilação e analisados em CG-EM. Os extratos foram submetidos à prospecção fitoquímica, onde foi analisada em cromatografia camada delgada (CCD), utilizando reveladores específicos. O estudo fitoquímico dos extratos revelou a presença das classes químicas antraquinonas, flavonóides, terpenos, alcalóides e esteróides. No óleo essencial foram identificados como constituintes majoritários, o β -cariofileno (34,08%), β -mirceno (13,77%) e o α -humuleno (13,32%), respectivamente. Os extratos hexânicos e metanólicos das inflorescências e óleo essencial de *P. capitarianum*, apresentaram atividade larvicida nas duas maiores concentrações (500 e 250 μ g /mL), com mortalidade de 100% sobre *A. aegypti* e *Anopheles* sp, após 72 horas exposição, demonstrando ser uma alternativa viável no controle dos vetores.

Palavras-chave: Dengue; Malária; Mosquitos; Fitoquímica

ABSTRACT

Mosquitoes are responsible for serious problems of global public health. The *Aedes aegypti* and *Anopheles* are important vectors in the transmission of dengue and malaria in Brazil. As there is no vaccine available, the main way to reduce dengue indices and malaria is controlling the proliferation of the insect vector that is based on vector control through the application of chemical insecticides that allow contamination of the environment and resistance selection in populations of mosquitoes as a result of intense application. The use of plant extracts has been gaining attention as an alternative in vector control, especially in the Amazon environment, since the plant employees have chemical compounds with larvicidal activity and insecticide. This study aimed to carry out phytochemical prospecting and evaluation of larvicidal activity of essential extracts and oil *P. capitatum* for controlling *A. aegypti* and *Anopheles* sp. under laboratory conditions. *A. aegypti* eggs were collected in two neighborhoods of Manaus, and the larvae of *Anopheles* were obtained in the breeding of Puraquequera neighborhood. Bioassays were prepared with the extracts, oil and distilled water at the following concentrations: 500, 250, 100, 50, 25 mg / ml, positive control (temephos) and negative control (DMSO, H₂O and Tween), tested at Rockefeller A. *aegypti* and *Anopheles* which were evaluated by observing the mortality of larvae at 24, 48 and 72 hours of exposure. The hexane extracts, methanolic and aqueous were prepared by Soxhlet system, infusion method and the essential oil was extracted by hydrodistillation and analyzed by GC-MS. The extracts were submitted to phytochemical screening, which was analyzed by thin layer chromatography (TLC), using specific developers. The phytochemical study of the extracts revealed the presence of chemical classes anthraquinones, flavonoids, terpenes, alkaloids and steroids. In the essential oil were identified as major constituents, the β -caryophyllene (34.08%), β -myrcene (13.77%) and α -humulene (13.32%), respectively. Hexane and methanolic extracts of the flowers and essential oil of *P. capitatum* showed larvicidal activity in the two higher concentrations (500 and 250 mg / mL), with 100% mortality of *A. aegypti* and *Anopheles* sp, After 72 hours exposure, It is proving to be a viable alternative for the control of vectors.

Keywords: Dengue, Malária, Mosquitoes; Phytochemistry

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pontos de coleta de anofelinos com as respectivas coordenadas geográficas.....	26
Tabela 2. Descrição e quantificação das partes coletadas de <i>P. capitarianum</i>	33
Tabela 3. Rendimentos dos extratos obtidos das partes coletadas de <i>P. capitarianum</i>	34
Tabela 4. Massas e rendimento óleo essencial das folhas de <i>P. capitarianum</i>	35
Tabela 5. Resultados dos bioensaios seletivos com extratos de <i>P. capitarianum</i> contra larvas de <i>A. aegypti</i> da cepa (Rockfeller), <i>A. aegypti</i> (campo) e <i>Anopheles</i> sp.....	37
Tabela 6. Resultados dos bioensaios de concentração com extratos de <i>P. capitarianum</i> contra larvas de <i>A. aegypti</i> da cepa (Rockfeller) exposta em diferentes concentrações.....	39
Tabela 7. Valores de CL ₅₀ e CL ₉₀ dos extratos de <i>P. capitarianum</i> contra larvas de <i>A. aegypti</i> da cepa (Rockfeller) após 24, 48 e 72 horas de aplicação.....	41
Tabela 8. Resultados dos bioensaios de dose com extratos de <i>P. capitarianum</i> contra larvas de <i>A. aegypti</i> do bairro Cidade Nova, situado na Zona Oeste da cidade de Manaus, exposta em diferentes concentrações.....	43
Tabela 9. Valores de CL ₅₀ e CL ₉₀ dos extratos de <i>P. capitarianum</i> contra larvas de <i>A. aegypti</i> (campo) após 24, 48 72 horas de aplicação.....	46
Tabela 10. Resultados dos bioensaios de dose com extratos de <i>P. capitarianum</i> contra larvas de <i>Anopheles</i> sp., do bairro Puraquequara, situado na Zona Leste da cidade de Manaus, exposta em diferente concentrações.....	48
Tabela 11. Valores de CL ₅₀ e CL ₉₀ dos extratos de <i>P. capitarianum</i> contra larvas de <i>Anopheles</i> sp., após 24, 48 72 horas de aplicação.....	50
Tabela 12. Resultados dos bioensaios seletivos com óleo essencial de <i>P. capitarianum</i> (OSFPC) contra larvas de <i>A. aegypti</i> da cepa (Rockfeller), <i>A. aegypti</i> (campo) e <i>Anopheles</i> sp.....	53
Tabela 13. Resultados dos bioensaios de dose com óleo essencial <i>P. capitarianum</i> contra larvas de <i>A. aegypti</i> da cepa (Rockfeller), <i>A. aegypti</i> (campo) e <i>Anopheles</i> sp, exposta em diferente concentrações.....	55
Tabela 14. Os valores da CL ₅₀ e CL ₉₀ do óleo essencial das folhas de <i>P. capitarianum</i> contra larvas de <i>A. aegypti</i> e <i>Anopheles</i> sp, após 24, 48 e 72 horas de aplicação.....	57
Tabela 15. Reveladores químicos utilizados placas de CCD para avaliação do perfil dos extratos de <i>P. capitarianum</i>	60

Tabela 16. Classes químicas identificadas nos extratos de <i>P. capitarianum</i> em placas de CCD.....	62
Tabela 17. Constituintes químicos identificados no óleo essencial das folhas de <i>P. capitarianum</i> por CG-EM.....	67
Tabela 18. Classes químicas identificadas nas frações do extrato EMIPC em placas de CCD.....	73
Tabela 19. Resultados dos bioensaios seletivos com frações do extrato EMIPC contra larvas de <i>A. aegypti</i> (campo) e <i>Anopheles</i> sp.....	75
Tabela 20. Resultados dos Bioensaios de dose com frações do extrato EMIPC sobre larvas de <i>A. aegypti</i> , exposta em diferente concentrações.....	77
Tabela 21. Os valores da CL50 e CL ₉₀ das frações do extrato EMIPC contra larvas de <i>A. aegypti</i> , após 24, 48 e 72 horas de aplicação.....	78
Tabela 22. Resultados dos Bioensaios de dose com frações do extrato EMIPC sobre larvas de <i>Anopheles</i> sp, exposta em diferente concentrações.....	80
Tabela 23. Os valores da CL50 e CL ₉₀ das frações do extrato EMIPC contra larvas de <i>Anopheles</i> sp, após 24, 48 e 72 horas de aplicação.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metabolitos isolados das espécies do gênero Piper.....	9
Figura 2. Partes aéreas de <i>P. capitarianum</i> coletadas em campo.....	15
Figura 3. Exsicata confeccionada da espécie <i>P. capitarianum</i> coletada.....	17
Figura 4. Processamento do material vegetal. (A) Estufa com circulação de ar para desidratação do material vegetal; (B) Moinho do tipo faca utilizado para trituração das partes coletadas de <i>P. capitarianum</i>	17
Figura 5. Fluxograma para obtenção de extratos da <i>Piper capitarianum</i>	18
Figura 6. Preparação dos extratos de <i>P. capitarianum</i> . (A) Sistema Soxhlet para obtenção dos extratos; (B) Evaporador rotativo para remoção dos solventes.....	19
Figura 7. Extração do óleo por hidrodestilação. (A) Sistema Clevenger modificado; (B) Óleo essencial extraído das folhas de <i>P. capitarianum</i> submerso água destilada.....	20
Figura 8. Armadilha de oviposição (ovitrampas) instaladas em residências para coleta dos ovos de <i>A. aegypti</i>	21
Figura 9. Manutenção de <i>Aedes aegypti</i> no insetario. (A) Bacias teladas utilizadas na manutenção das larvas no laboratório. (B) Introdução dos mosquitos adultos nas gaiolas.....	24
Figura 10. Coletas e Manutenção dos anofelinos. (A) Coletas de larvas na margem do criadouro; (B) Bacias utilizadas na manutenção das larvas no laboratório.....	27
Figura 11. Diluição dos extratos para realização dos bioensaios seletivos contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Anopheles</i> sp.....	28
Figura 12. Diluição dos extratos em DMSO e TWEEN para realização dos bioensaios. (A) Amostra sólida em tubo eppendorf. (B) Solubilização das amostras em DMSO e TWEEN na Ultrassônica.....	28
Figura 13. Esquema para realização dos bioensaios com extratos de <i>P. capitarianum</i>	29
Figura 14. Mortalidade (%) das larvas de <i>A. aegypti</i> da cepa Rockefeller nos bioensaios com extratos de <i>P. capitarianum</i> , nos intervalos de leitura de 24, 48 e 72 horas.....	31
Figura 15. Mortalidade em porcentagem das larvas de <i>A. aegypti</i> da cepa Rockefeller nos bioensaios com extratos de <i>P. capitarianum</i> , nos intervalos de leitura de 24, 48 e 72 horas....	40
Figura 16. Mortalidade em porcentagem das larvas de <i>A. aegypti</i> do campo nos bioensaios com extratos de <i>P. capitarianum</i> , nos intervalos de leitura de 24, 48 e 72 horas.....	44
Figura 17. Mortalidade em porcentagem das larvas de <i>Anopheles</i> sp nos bioensaios com extratos de <i>P. capitarianum</i> , nos intervalos de leitura de 24, 48 e 72 horas.....	49

Figura 18. Reta de regressão linear dose-probit obtida nos bioensaios com extrato EMIPC, sobre larvas de <i>A. aegypti</i> (Rockfeller), <i>A. aegypti</i> (campo) e <i>Anopheles</i> sp.....	51
Figura 19. Reta de regressão linear dose-probit obtida nos bioensaios com óleo essencial (OSFPC), sobre larvas de <i>A. aegypti</i> (Rockfeller), <i>A. aegypti</i> (campo) e <i>Anopheles</i> sp.....	58
Figura 20. Perfil cromatográfico dos extratos de <i>P.capitarianum</i> por CDD.....	61
Figura 21. Cromatograma de íons totais obtido do óleo essencial das folhas de <i>P. capitarianum</i> (OSFPC).....	68
Figura 22. Fracionamento cromatográfico do extrato EMIPC de <i>P. capitarianum</i> e resultados dos bioensaios (500µg/mL) em 48 horas de exposição das frações obtidas sobre as larvas de <i>A. aegypti</i> e <i>Anopheles</i> sp. em condições de laboratório.....	71
Figura 23. Perfil cromatográfico das frações ativas do extrato EMIPC por CDD.....	72

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Dengue.....	2
1.2 Malária.....	4
1.3 Atividade inseticida de extratos de plantas.....	7
1.4 Família Piperaceae.....	8
1.5 Gênero <i>Piper</i>	9
1.6 <i>Piper capitarianum</i>	11
2. JUSTIFICATIVA.....	12
3. OBJETIVOS	14
3.1 Geral.....	14
3.2 Específicos.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1 Coleta do material vegetal.....	15
4.1.1 Processamento do material vegetal.....	16
4.1.2 Obtenção dos extratos de <i>P. capitarianum</i>	17
4.1.3 Extração do Óleo essencial.....	19
4.1 ANÁLISES QUÍMICAS.....	20
4.2.1 Análise Cromatográfica em Camada Delgada –CCD.....	20
4.2.2 Fracionamento em Coluna de Sílica Gel.....	21
4.2.3 Análise do óleo em Cromatografia Gasosa – (CG-EM).....	21
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA.....	22
4.3.1 Coleta dos ovos <i>A. aegypti</i>	22
4.3.2 Manutenção de <i>A. aegypti</i> no insetário.....	23
4.3.3 Local de coleta dos anofelinos.....	25
4.3.4 Manutenção de anofelinos.....	26
4.3.5 Bioensaios.....	27
4.3.6 Bioensaios seletivos.....	27
4.3.7 Bioensaios dose.....	30
4.3.8 Análise dados.....	31
5. RESULTADOS.....	33
CAPITULO 1: BIOENSAIOS	
5.1 Material Vegetal – (<i>Piper capitarianum</i>).....	33
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DOS EXTRATOS DE <i>P. capitarianum</i>	35
5.2.1 Bioensaios seletivos.....	35
5.2.2 Bioensaios de dose.....	38
5.2.2.1 Bioensaios com <i>A. aegypti</i> (Rockfeller).....	38
5.2.2.2 Bioensaios de com <i>A. aegypti</i> (campo).....	42
5.2.2.3 Bioensaios com <i>Anopheles sp.</i>	46

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>P. capitarianum</i>	52
5.3.1 Bioensaios seletivos.....	52
5.3.2 Bioensaios de dose.....	53
CAPÍTULO 2: AVALIAÇÕES QUÍMICAS	
5.4 Análise Cromatográfica em Camada Delgada –CCD.....	60
5.4.1 Perfil cromatográfico dos extratos por CCD.....	60
5.5 AVALIAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CG-EM.....	64
5.5.1 Identificação dos constituintes químicos presente no óleo essencial das folhas de <i>P. capitarianum</i> (OSFPC).....	64
CAPÍTULO 3: FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS	
5.6 Fracionamento cromatográfico do extratos EMIPC.....	70
5.7 ATIVIDADE LARVICIDA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO EXTRATO EMIPC.....	73
5.7.1 Bioensaios seletivos.....	73
5.7.2 Bioensaios de dose.....	76
5.7.2.1 Bioensaios com frações do extrato EMIPC sobre larvas <i>A. aegypti</i>	76
5.7.2.3 Bioensaios com frações do extrato EMIPC sobre larvas <i>Anopheles sp.</i>	78
6. CONCLUSÕES	82
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS;	84

1. INTRODUÇÃO

Os mosquitos são insetos conhecidos como pernilongos muriçocas ou carapanãs, pertencentes à família Culicidae que são de grande importância para a saúde pública, por serem transmissores de patógenos causadores de doenças como malária, filariose, febre amarela, dengue, leishmanioses, febre chikungunya, vírus zika e entre outras arboviroses (CHRISTOPHERS, 1960; CONSOLI & LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; MS/SVS, 2015). Estes insetos pertencem ao filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Diptera, e estão distribuídos em todo globo terrestre, causando danos ao homem por estarem envolvidos na transmissão de múltiplas infecções (LOZOVEI, 2001; FORATTINI 2002).

O comportamento considerado importante para a evolução da relação patógeno-vetor é a hematofagia que ocorre por meio da picada das fêmeas infectadas, favorecendo a transmissão dos agentes etiológicos ao homem por intermédio do repasto sanguíneo. Este se faz necessário, pois as fêmeas necessitam de uma fonte de proteínas presente no sangue para o amadurecimento dos ovos. Durante o repasto sanguíneo, os mosquitos transmitem os patógenos ao organismo e estes desencadeiam os sintomas podendo comprometer vários órgãos e, às vezes até levar a óbito (FORATTINI, 2002; SVS/MS, 2015).

De acordo com WHO (2015), anualmente milhões de pessoas adoecem de malária e dengue no mundo e, diante deste fato, nota-se a importância dos estudos em mosquitos para o controle da transmissão destas enfermidades. Dentre os insetos vetores de patógenos de maior importância ao homem, o mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus, (1762), é o principal transmissor do vírus dengue no Brasil, podendo também transmitir os vírus chikungunya, zika e a febre amarela. Os mosquitos do gênero *Anopheles* sp.

também possuem grande importância médica, pois são responsáveis pela transmissão dos plasmódios, agente etiológico da malária, doença parasitária mais prevalente do mundo (FORRANTI, 2002; TADEI, *et al* 2010; WHO, 2015).

1.1 Dengue

A dengue é um dos principais problemas de saúde pública no mundo, sendo a segunda arbovirose mais importante em relação ao número de pessoas infectadas (WHO, 2012; WHO, 2015). Essa doença é causada pelo vírus da família Flaviviridae, gênero *Flavivirus* e, entre os sintomas, estão a cefaléia, mialgia e artralgias. Existem quatro sorotipos do vírus da dengue: DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, sendo que recentemente foi detectado o sorotipo DENV-5 na Malásia, que até o momento ocorre em primatas (GOULD & SOLOMON 2008; ROCHA & TAUIL 2009; VASILAKIS, 2013). Portanto o vírus dengue é transmitido pelos mosquitos *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes albopictus* (Skuse, 1894), sendo no Brasil o *A. aegypti* o principal vetor e no continente asiático o *A. albopictus* (MARZOCHI, 1994; OMS, 2014).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2015) estima que há em torno de 390 milhões de pessoas infectadas anualmente, em mais de 100 países de todos os continentes, exceto a Europa. Constatou-se também que dois quintos da população mundial, ou seja, mais de 2,5 bilhões de pessoas correm o risco de contrair dengue. Destes, cerca de 5 milhões de doentes necessitaram de hospitalização e 500 mil morreram em consequência desta arbovirose (WHO, 2015).

No Brasil a dengue apresenta a maior incidência de casos nos primeiros cinco meses do ano, período mais quente e úmido, típico dos climas tropicais, sendo que

devido às alterações climáticas, os casos passaram ocorrer em todo ano em várias localidades (SVS/MS, 2015).

A cidade de Manaus foi uma das últimas capitais brasileiras a ser infestada por *A. aegypti* (PINHEIRO, 2000). O isolamento geográfico favoreceu este fato, porém, em novembro de 1996, foi detectada a infestação em um dos bairros da área central (Praça XIV) e rapidamente o *Aedes aegypti* atingiu o centro da cidade, sendo que no ano seguinte já estava presente em toda cidade de Manaus (BASTOS, 2004; FIGUEIREDO et al., 2004). Dois anos após, em 1998, ocorreu a primeira epidemia na qual foram detectados os sorotipos DENV 1 e DENV 2, com registro de 29.033 casos clinicamente detectados (PINHEIRO, 2000).

Atualmente, o país vem enfrentando epidemias de dengue em grande parte do seu território, sendo que as populações ainda vivem em áreas de risco de transmissão da doença. Apesar do desenvolvimento tecnológico e científico, a dengue permanece como um dos maiores problemas de saúde pública a ser combatido. Segundo o SVS/MS (2015) relatou a ocorrência de 1.297 casos de dengue no país, levando 401 pessoas a óbitos. Esta situação fez com que o Brasil se tornasse um dos países com um índice expressivo de registros de casos de dengue.

Como ainda não dispõe uma vacina eficaz para a prevenção da dengue, o controle vetorial é a medida mais eficiente para manter a doença em nível que não cause epidemias. Embora ocorram importantes avanços no desenvolvimento de medidas alternativas, o uso de inseticidas químicos continua sendo essencial nos programas de controle integrado, sendo utilizados há muitos anos devido a sua eficácia, sustentabilidade e baixo custo (WHO, 2013), porém os principais problemas do uso destes inseticidas químicos são o aparecimento de populações resistentes e os danos ambientais provocados por seu uso intensivo em várias outras regiões tropicais e

subtropicais (LUNA et al., 2004; OMS, 2014). Em diferentes estados do Brasil (Rondônia, Rio de Janeiro, São Paulo e Distrito Federal) foram detectados o “status” de resistência do *A. aegypti* aos inseticidas químicos resultando em sérios problemas no controle da transmissão dos diferentes tipos de vírus (FUNASA, 2012; SILVA, 2013). Atualmente no Brasil, vários Estados brasileiros, tem se encontrado grande número de populações de insetos vetores resistentes a inseticidas ou com a suscetibilidade alterada, sendo assim os laboratórios realizam o monitoramento de resistência, preconizam a substituição destes inseticidas em cidades aonde tenha sido detectada resistência (PICCOLI, 2011). Em virtude desta problemática, há uma intensa busca por métodos alternativos ou complementares para o controle do vetor.

1.2 Malária

A malária é a doença parasitária mais freqüente no mundo em relação ao número de pessoas infectadas que ocorre na região tropical do globo terrestre causando problemas sociais e econômicos nas áreas em que é registrada (WHO, 2015). Essa doença é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, que podem ser transmitidos ao hospedeiro vertebrado pela picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* (FORRANTI, 2002; TADEI et al, 2010).

Segundo a OMS (2015), cerca de 220 milhões de pessoas são infectadas anualmente, em mais de 104 países, e aproximadamente dois milhões morrem em decorrência do agravo da doença, sendo que no continente africano estão concentrados aproximadamente 90% dos casos clínicos da doença e 90% das infecções.

No Brasil, a malária é endêmica nos estados que fazem parte da região Amazônica (Acre, Amazonas, Amapá, Roraima, Mato grosso, Maranhão, Rondônia e Tocantins), onde se registra cerca de 140 mil casos de malária por ano, sendo que 276

necessitam de hospitalização e 36 morreram em consequência dessa doença, que corresponde a 99% dos casos notificados oriundos da região Amazônica (OMS, 2014; SVS/MS, 2015). As condições ambientais, geográficas e ecológicas da região Amazônica favorecem o desenvolvimento dos anofelinos e sua interação com plasmódio, constituindo área de alto e médio risco de infecção (TADEI, 2005; TADEI et al., 2010; RODRIGUES et al., 2013). Outro fator importante na transmissão da malária é a variedade de ambientes aquáticos encontrados na região que estão relacionados ao contato do homem com o vetor, durante o período do pulso das enchentes e da vazante, causando a manifestação da doença (TADEI & DUTARY, 2000; TADEI et al., 2001; 2007; 2010).

Vários fatores contribuem para a manutenção da malária na Amazônia, como por exemplo, a colonização desordenada; a construção de usinas hidrelétricas; os tanques de piscicultura, aberturas de estradas, exploração de minérios e combustíveis fósseis, entre outros. (TADEI et al., 2007; HAHN et al., 2014). Todas essas atividades colocam o homem em contato com a mata proporcionando condições de reprodução para os anofelinos e aumentando a densidade populacional. Esse intenso contato homem-vetor nessas áreas provoca a disseminação da malária

A principal forma de reduzir os índices de malária é controlando a proliferação do inseto vetor, por meio do controle integrado que é a união de diferentes formas de atuação, no qual pode-se destacar: controle físico (manejo dos criadouros, telagem das casas), controle químico (uso de inseticidas químicos, como borrifação intradomiciliar, termonebulização, mosquiteiros impregnados de inseticidas) e controle biológico (com uso de patógenos) (TADEI, 2010; OMS, 2011).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2014), em mais de 90 países em todo mundo são distribuídos gratuitamente mosquiteiros impregnado com inseticidas químicos que tem contribuído para a diminuição de números de malária e também são recomendadas a aplicação dos inseticidas químicos através da borrifação intradomiciliar para manter as pessoas protegida do inseto vetor contaminado. Nos últimos anos tem sido observado um decréscimo na utilização de inseticidas químicos devido ao aumento no preço, contaminação ao meio ambiente e seleção de resistência dos mosquitos em decorrência da intensa aplicação. (WHO, 2014)

O controle biológico é uma ação alternativa ou complementar às demais ações já empregadas, consistindo na utilização de agentes bióticos que são letais contra o inseto alvo, contribuindo para a preservação de recursos naturais (RODRIGUES et al., 2008; FERREIRA, 2013). As principais vantagens do uso do controle biológico são: a) apresenta especificidade agindo diretamente sobre o inseto alvo e não provocando efeitos adversos; b) não poluem o meio ambiente, pois são biodegradáveis não possuindo efeito cumulativo no ambiente e c) não promovem resistência ao inseto alvo (ALVES, 1998).

Para o controle de anofelinos, utilizam-se: peixes predadores de larvas (PAMPLONA et al., 2004), extratos botânicos (CAVALCANTI et al., 2004), fungos (HABIB, 1984) e bactérias (DE BARJAC, 1990). Dentre as bactérias utilizadas destacam-se as pertencentes ao gênero *Bacillus* sp., estas produzem cristais tóxicos com ação inseticida (DE BARJAC, 1990).

Em conseqüência dos fatos têm-se necessidade pela busca de substâncias biologicamente ativas que não causem danos ambientais, com isso o uso de extratos de plantas vem sendo uma alternativa para o controle de vetores de patógenos, devido esses organismos apresentar compostos químicos inovadores efetivos contra espécies de

mosquitos, gerando alternativas de baixo custo para o controle (MEDEIROS, 2012; OMS, 2013).

1.3 Atividade inseticida com extratos de plantas

No Brasil encontra-se a maior diversidade de plantas do planeta, com cerca de 55.000 espécies catalogadas correspondendo a 30% da flora mundial, o que torna o país promissor na busca de novos compostos com atividade inseticida contra insetos (SIMOES et al., 2004; JOLY et al., 2011).

Os extratos de plantas com propriedade inseticida vêm sendo utilizados pelo homem desde a idade média, sendo que algumas produzem compostos ativos que podem agir sinergicamente ou como repelentes causando mortalidade e também atuam negativamente no comportamento e na fisiologia dos insetos (FRIGHETTO, 1997; SHAALAN et al., 2005). As plantas produzem defesas bioquímicas, também conhecidas como metabólitos primários e secundários. Os metabólicos primários são encontrados em todas as células vegetais e são importantes para o desenvolvimento da planta, diferente dos metabólicos secundários que são produzidos como proteção contra insetos e microrganismos (TAIZ & ZEIGER, 2013). Os compostos com propriedade inseticida estão presentes nos metabólicos secundários que podem ser utilizado como um método alternativo no controle de insetos vetores, pois suas ações são específicas sobre inseto alvo e agem em concentrações baixas, além de não serem tóxicos ao homem (PINTO et al., 2002)

Entre os compostos vegetais encontram-se as amidas, terpenos, alcalóides, flavonóides e lignanas que são consideradas os principais grupos de metabólitos da planta, pois são responsáveis pela atividade inseticida produzindo substâncias secundárias para a defesa contra insetos, sendo que as famílias Meliaceae, Rutaceae e

Piperaceae são as que mais produzem esses metabólitos. (YUNCKER, 1973; PARMAR et al., 1997; BARBOSA et al., 2012).

1.4 Família Piperaceae

A família Piperaceae é a mais primitiva entre as angiospermas que pertence à ordem Piperales segundo o sistema de classificação de Cronquist (1981) e suas espécies estão distribuídas em todas as regiões tropicais e subtropicais ocorrendo em ambos os hemisférios (YUNCKER, 1973; GUIMARÃES & SILVA, 2009).

Esta família compreende cerca de 2000 espécies distribuídas em 14 gêneros, sendo que no Brasil tem 3 gêneros nativos: *Sarcorrhachis* (Trel), *Piper* (Linnaeus) e *Peperomia* (Ruiz & Pav) (MABBERLEY, 1997) com aproximadamente 500 espécies (YUNCKER, 1972) sendo encontradas desde a região Norte ao Sul que representa uma grande parte do bioma amazônico (GUIMARÃES & MONETEIRO 2006; MARQUES et al., 2008)

Algumas espécies da família apresentam importância econômica, medicinal, ornamental, sendo utilizadas na alimentação como a *Piper nigrum* L. conhecida pimenta-do-reino (MOURA et al, 2008). Outras espécies são utilizadas na medicina popular por produzirem compostos ativos como alcalóides, propenilfenóis, lignanas, neolignanas, terpenos, esteróides, cavapironas, piperolídeos, chalconas, diidrochalconas, flavonas e flavononas (PARMAR et al, 1997), com diversas propriedades, tais como antiinflamatória, antimicrobiana, antihelmíntica, antifúngica, inseticida (LEAL, 2000; SANTOS et al., 2012; PINTO et al., 2012). Aproximadamente 592 substâncias foram isoladas, sendo que apenas 10% são das espécies do gênero *Piper*, com análise fitoquímica (MYERS et al., 2000; MARQUES & KAPLAN, 2015).

1.5 Gênero *Piper* (Linnaeus)

O gênero *Piper* é o mais representado da família Piperaceae com aproximadamente 700 espécies, as quais encontram-se distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, sendo que no Brasil são conhecidas cerca de 266 espécies (YUNCKER, 1973; LARA JUNIOR et al., 2012;). Este gênero compreende arbustos ou pequenas árvores, escandentes. As folhas são alternas, inteiras, simples que apresentam, podendo atingir em algumas espécies até, consistência membranácea a coriácea. As flores são sésseis, aperiartadas, dispostas em espigas opostas às folhas que variam de comprimento e espessura, eretas, providas de pedúnculos delgados ou espessos. Os frutos são drupas globosas com pericarpo pouco espessado (MOREIRA, 1995; REITZ, 2003; GUIMARÃES & GIORDANO, 2004).

As espécies desse gênero são comumente utilizadas como inseticida contra vários insetos, como por exemplo, a *Piper aduncum*, que em seu óleo essencial mostra altos teores de dilapiol, que identificaram atividade inseticida para o mosquito da dengue (PINTO et al., 2012). A espécie *Piper hispidinervum* conhecida como pimenta longa, é rico em safrol, componente químico aromático empregado como agente sinérgico de inseticidas (PIMENTEL et al., 1998). Os óleos essenciais obtidos de outras espécies de *Piper*, tais como: *P. hispidum*, *P. callosum*, *P. marginatum* e *P. divaricatum* são muito eficazes como inseticidas (SOUTO, 2011; SANTOS et al., 2012).

Compostos biologicamente ativos como ligninas, amidas de longa cadeia e ésteres graxos, foram isoladas de *P. nigrum*, *P. guineense* e *P. tuberculatum*, substâncias reconhecidas por sua ação inseticida, podendo agir por contato, sinérgico, repelente e anti-alimentar (ESTRELA et al., 2005; SCOTT et al., 2008; AHMAD et al., 2012). Outras espécies provenientes da Índia, como *P. longum*, *P. beetle*, *P. peepuloides*

e *P. cubeba* apresentam atividade inseticida sobre espécies da ordem Coleoptera e Diptera, sendo a piperina o principal constituinte (MIYAKADO et al., 1989; BOLL et al., 1994).

Outros metabolitos têm sido isolados do gênero Piper, e estão apresentados na Figura 1, como compostos químicos que apresentam atividade larvicida sobre o vetor da dengue *A. aegypti*, que são encontradas especialmente em *P. nigrum*, a espécie mais estudada da Família Piperaceae. Deve também notar-se os baixos valores de CL_{50} observada para algumas classes destes compostos, que poderia ser uma alternativa viável no controle de insetos vetores no ambiente amazônico (SIDDIQUI et al., 2007; DA SILVA et al., 2011; LEITE et al., 2012; RAHMAN, 2012; GARCEZ et al., 2013)

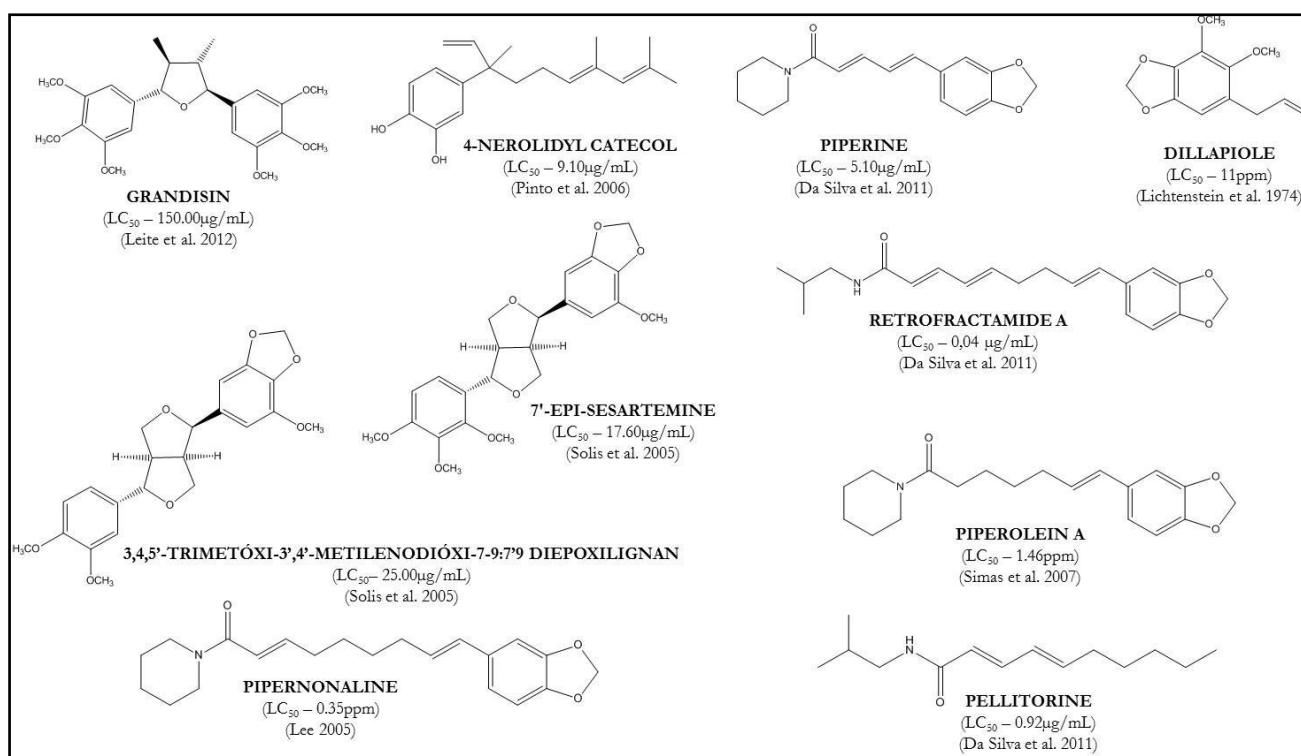


Figura 1. Metabolitos isolados das espécies do gênero Piper sobre *A. aegypti* em condições de laboratório.

Portanto, poucas espécies do gênero *Piper* foram estudadas do ponto de vista fitoquímico, havendo necessidade de ampliar os conhecimentos e obtenção de novos compostos ativos desta família que permitam a síntese de novos produtos inseticidas com o uso direto no controle de insetos vetores de patógenos.

1.6 *Piper capitarianum* (Yunck)

A espécie *Piper capitarianum* é um arbusto de 1-2m de altura com caule provido de nós e suas folhas são alternas, simples com diferentes formas e de tamanho variável, sendo que a inflorescência é basicamente uma espiga pedunculada, com 4-7 cm de comprimento (YUNCK, 1974)

Segundo o sistema de classificação de CRONQUIST (1981), a espécie *Piper capitarianum* pertence a Ordem Piperales, Família Piperacea e o Gênero *Piper*, e está distribuída naturalmente nos estados do Amazonas, Roraima e Rondônia (YUNCK, 1996; GUIMARÃES &GIORDANDO, 2004).

Em um trabalho realizado por Pohlit *et al.* (2004), foi realizada uma triagem com 56 espécies vegetais distribuídas em 28 famílias de plantas encontradas no estado do Amazonas e foram testados os extratos aquosos, etanólicos e metanólicos contra larvas de *A. aegypti*. Os extratos metanólicos que apresentaram a maior atividade larvicida do gênero *Piper* foram *P. aduncum*, *P. tuberculatum* e *P. capitarianum*. Portanto, não há nenhum estudo fitoquímico realizado quanto à presença de compostos com atividade inseticida dessa espécie.

Dessa forma, há necessidade de buscar informações sobre a composição química e suas atividades biológicas que serão fundamentais para o avanço das pesquisas na área de fitoquímica nestas espécies.

2. JUSTIFICATIVA

Em 2013 a incidência de malária aumentou em 35%, no Estado do Amazonas, comparada aos anos anteriores, segundo o boletim de Vigilância em Saúde da Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas (FVS), onde foram registrados 17.950 casos de malária (FVS, 2013). Portanto, o Amazonas ainda vem sendo classificado como área de alto risco devido aos elevados números de casos.

Outro problema que afeta a população do estado do Amazonas é o vírus dengue e chikungunya, que vem causando sérios problemas de saúde pública. Em 2011, o Estado do Amazonas vivenciou a maior epidemia de dengue da sua história, onde foram registrados 47 mil casos e tendo como consequência da epidemia, o registro de 12 óbitos (SUSAM, 2011). Em 2014, foram registrados 8 casos confirmados do vírus chikungunya no Estado do Amazonas, sendo que no seguinte ocorreram redução dos número de casos da doença (SVS/MS, 2015).

Neste contexto, a dengue e a malária são consideradas doenças passíveis de intervenção sendo importante o desenvolvimento de pesquisas para fornecer subsídios, que contribuam para o combate ao vetor.

No que se refere ao meio ambiente, o uso constante de inseticidas químicos que causa descontrole da população de mosquito, levando a seleção de espécies resistentes e também tem provocado outros efeitos indesejáveis, como poluição ambiental e toxicidade para seres humanos e outros organismos da fauna associada.

Assim, há necessidade de buscar novas alternativas ambientalmente seguras, potencialmente adequadas e mais eficazes para uso em programas de combate aos vetores. Uma das tendências atuais é a bioprospecção de plantas na expectativa de conseguir outros compostos, que apresentem atividade inseticida contra os insetos

vetores. Portanto, ainda continuam escassos os estudos sobre busca de novas moléculas bioativas, para serem incorporados nos atuais programas de controle.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar atividade larvicida de extratos e do óleo essencial de *Piper capitarianum* utilizada no controle de *A. aegypti* e *Anopheles* sp em condições de laboratório.

3.2 Específicos

- Obter extratos brutos e óleo essencial de *Piper capitarianum*;
- Detectar a atividade larvicida dos extratos e óleo essencial por meio de bioensaios seletivo em laboratório utilizando as larvas de *A. aegypti* e *Anopheles* sp;
- Determinar a concentração letal CL₅₀ e CL₉₀ por meios de bioensaios de concentração em laboratório utilizando as larvas de *A. aegypti* e *Anopheles* sp;
- Obter o perfil cromatográfico do óleo essencial de *Piper capitarianum* por meio de Cromatografia Gasosa (CG-EM);
- Fracionar os extratos ativos por meio de cromatografia (coluna, CCD).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta do material vegetal

As partes aéreas (folhas, caule e inflorescência) de *P. capitarianum* foram coletadas no Setor de Plantas Medicinais e Hortaliças da Embrapa Amazônia Ocidental (03° 06' 23,04"S e 60° 01' 35,14"W.), situado na Rodovia AM-010 da rodovia Manaus-Itacoatiara no km 30 (Figura 2).



Figura 2. Exemplar de *Piper capitarianum* cultivada em área experimental da Embrapa Amazônia Ocidental.

Após a coleta, o material foi acondicionado em sacos plásticos pretos devidamente etiquetados com nome do coletor e data, transportado ao Laboratório de Malária de Dengue do INPA. As partes (folhas, galhos e inflorescência) do material vegetal foram prensadas para confecção das exsicatas e secas em estufa á temperatura de 50°C por um período de 72 horas. As exsicatas foram identificadas por meio de comparação com material existente na coleção do herbário do INPA, onde se encontram depositadas sob o nº 259.231 do herbário do INPA (Figura 3).

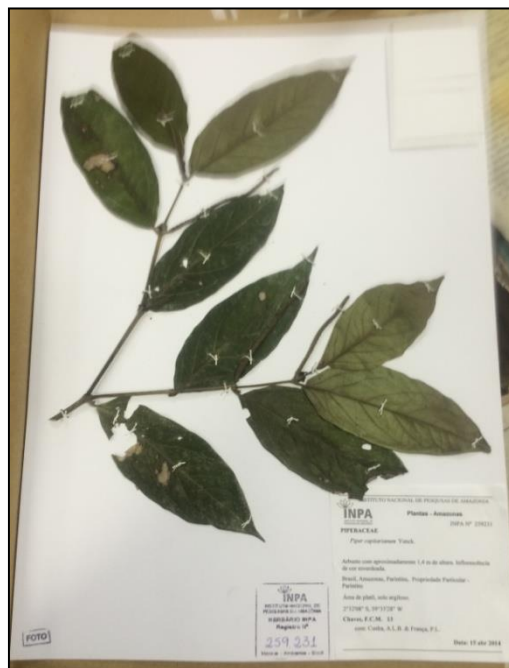


Figura 3. Exsicata confeccionada da espécie *Piper capitarianum* coletada e depositada no herbário do INPA.

4.1.1 Processamento do material vegetal

Após a depósito das exsicatas no herbário do INPA, outras partes coletadas da planta como as folhas, galhos, inflorescência de *Piper capitarianum* foram higienizados e armazenados separadamente na estufa como segue:

- a) As folhas foram retiradas dos ramos e colocadas na estufa a 60°C com circulação de ar para desidratação. Após a secagem as folhas foram pesadas numa balança para verificar a quantificação do material seco.
- b) Os galhos foram retirados das folhas e escovados a seco para retirada das sujeiras. Em seguida foram colocados na estufa a 60°C para desidratação. Posteriormente, os galhos secos foram pesados para quantificar o material vegetal coletado.

- c) As inflorescências foram retiradas dos galhos, colocadas na estufa a 60°C para desidratação. Posteriormente, as inflorescências foram pesadas para a quantificação.

Em seguida, os materiais secos foram triturados separadamente em moinho tipo faca e pesados para obter a massa do material vegetal triturado que foi utilizado na preparação dos extratos (Figura 4).

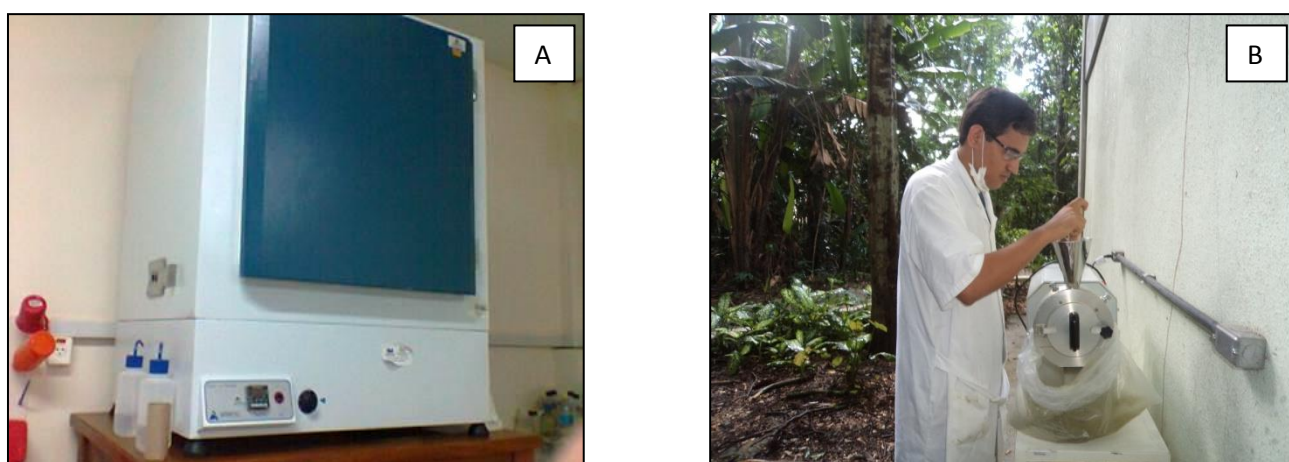


Figura 4. Processamento do material vegetal. (A) Estufa com circulação de ar para desidratação do material vegetal; (B) Moinho do tipo faca utilizado para trituração das partes coletadas de *Piper capitarianum*

4.1.2 Obtenção dos extratos de *Piper capitarianum*

Os extratos foram preparados no setor de Química de Produtos Naturais do Laboratório de Malaria de Dengue do INPA. O material vegetal triturado das partes coletadas (folhas, galhos e inflorescência) foram submetidos à extração separadamente utilizando o sistema de *Soxhlet* com solventes orgânicos (hexano, metanol) em ordem crescente de polaridade, por um período de 3x de 6 h para obtenção dos extratos, conforme a Figura 5.

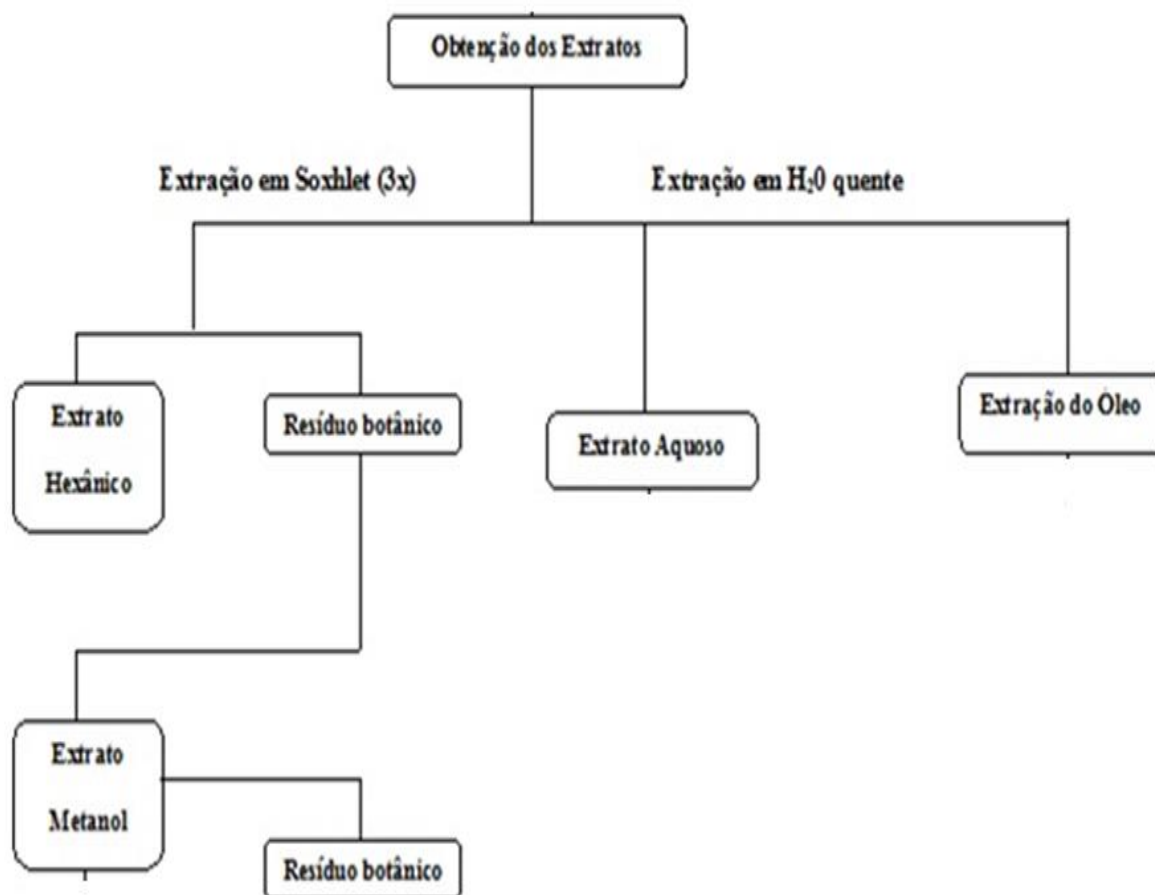


Figura 5. Fluxograma para obtenção de extratos da *Piper capitarianum*

Após a extração, os extratos foram filtrados em papel de filtro comum, concentrados em rotaevaporador com rotação de 100 rpm e temperatura do banho Maria 30°C, para eliminação dos solventes (Figura 6). Posteriormente, os extratos foram acondicionados em recipientes de vidro âmbar devidamente fechados e mantidos em geladeira até serem utilizados nos bioensaios seletivos para um “screening” inicial verificando atividade letal contra larvas de *A. aegypti* da cepa (Rockfeller), *A. aegypti* (campo) e *Anopheles* sp.

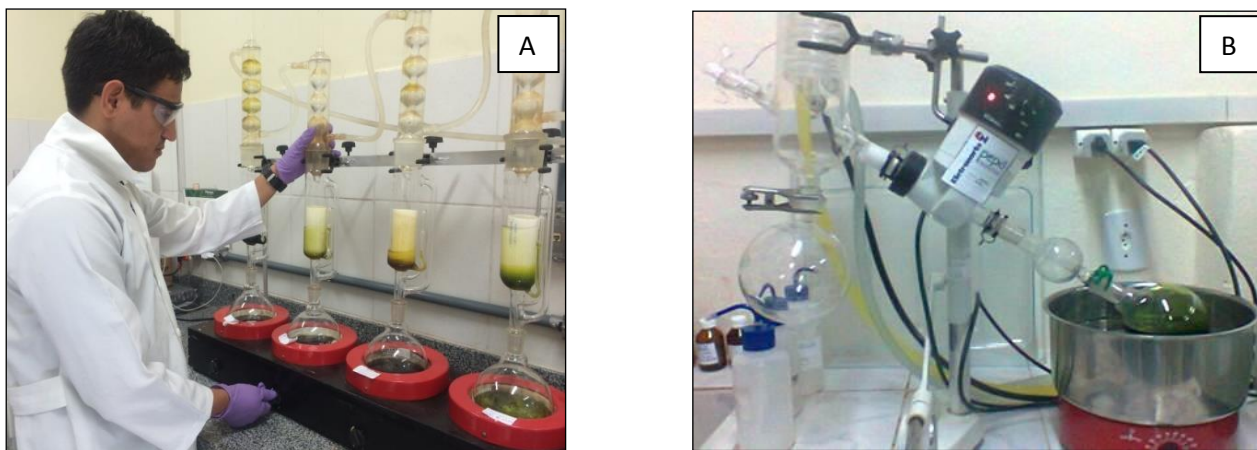


Figura 6. Preparação dos extratos de *Piper capitarianum*. (A) Sistema Soxhlet para obtenção dos extratos; (B) Evaporador rotativo para remoção dos solventes.

Na obtenção do extrato aquoso foi utilizado o método descrito por Saraiva (2006) por infusão, sendo pesadas 50g do material vegetal triturado (casca, galhos e folhas) acondicionados em becker com capacidade de 1 litro, onde foram adicionados 600 mL de água fervente, por aproximadamente 15 minutos. Em seguida os extratos foram filtrados em papel filtro, armazenados em recipientes de vidro âmbar devidamente fechados, onde foram congelados até o processo de liofilização para retirada da água residual.

4.1.3 Extração do Óleo essencial

A extração do óleo essencial das folhas de *Piper capitarianum* foi feita pelo método hidrodestilação utilizando o sistema de Clevenger por período de 4h. Esse sistema é composto por uma manta aquecedora, um balão de fundo redondo com capacidade de 2000 mL e um sistema de circulação de água fria (Figura 7). No balão de fundo redondo foram adicionados 1litro de água destilada e 200g de folhas trituradas que foi aquecido sobre a manta aquecedora em uma temperatura de 100 °C. Após o processo de extração, o óleo foi lavado em diclorometano e seco em sulfato de sódio

(Na_2SO_4) anidro comercial para retirar água residual, acondicionado em frasco de vidro âmbar e deixado na capela com exaustor por 24 horas para evaporação do solvente (diclorometano).

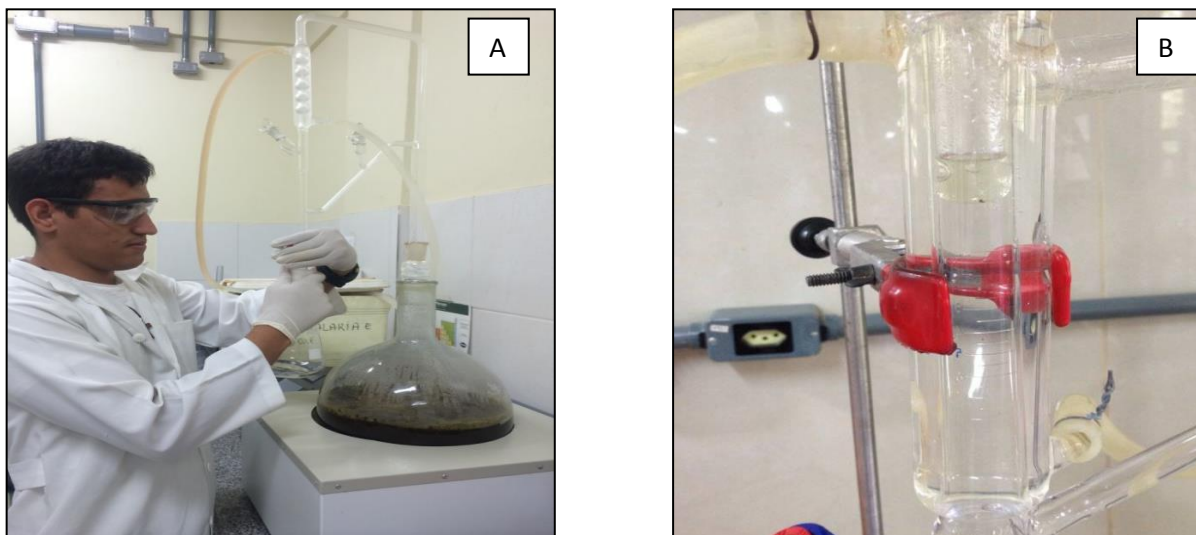


Figura 7. Extração do óleo por hidrodestilação. (A) Sistema Clevenger modificado; (B) Óleo essencial extraído das folhas de *Piper capitarianum* submerso em água destilada.

Posteriormente foi realizada a determinação do rendimento do óleo e em seguida a realização dos bionsaios. O óleo essencial foi analisado em Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massa (CG-EM) para determinação dos constituintes químicos majoritários.

4.2 Análise químicas

4.2.1 Análise Cromatográfica em Camada Delgada -CCD

Os extratos ativos foram analisados por cromatografia (CCD), utilizando cromatoplasmas da marca Merck, sílica gel de fase normal com suporte de alumínio de tamanho 20 x 20 cm com indicador de fluorescência F_{254} (Figura 8 A). Para revelar as

placas foram utilizados reveladores universais e específicos, visualizadas na luz UV (365 e 254 nm).

4.2.2 Fracionamento em Coluna de Sílica Gel

Os extratos ativos foram submetidos a fracionamento cromatográfico através de uma coluna de vidro, 20 cm de altura e 4 cm de diâmetro, utilizando sílica gel 60 da Merck em diferentes sistemas de eluição (solventes orgânicos) para isolamento dos constituintes químicos majoritário (Figura 8 B). As frações obtidas da coluna foram comparadas e reunidas pela cromatografia em camada delgada - CCD comparativa. Os constituintes isolados foram caracterizados por métodos espectroscópicos de RMN ^{13}C e ^1H .

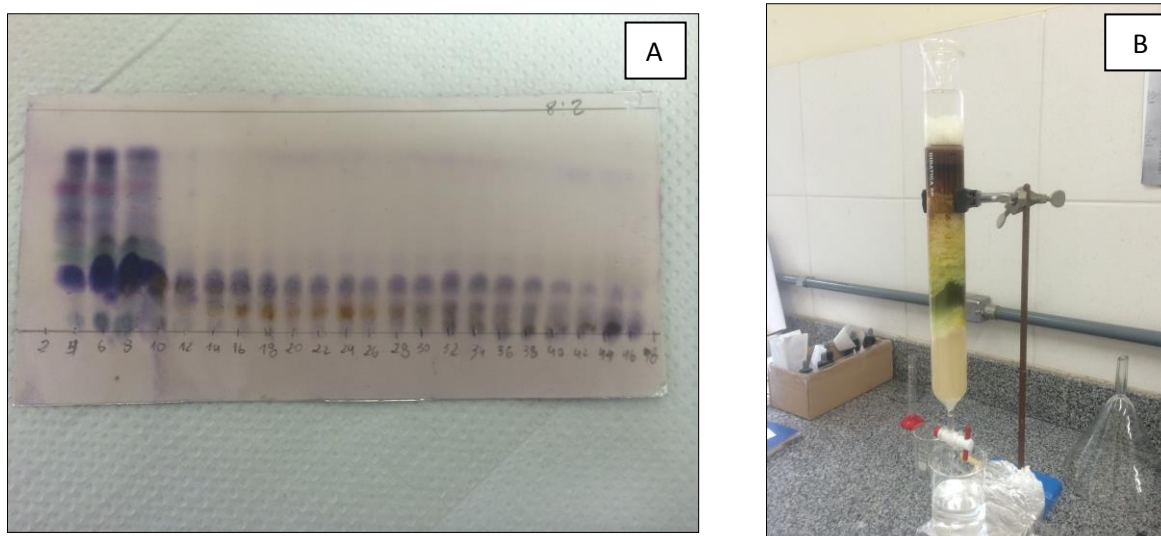


Figura 8. Fracionamentos dos extratos ativos (A) Cromatográfica em camada delgada - CCD ; (B) Cromatografia em coluna

4.2.3 Análise do óleo em Cromatografia Gasosa – (CG-EM)

O óleo essencial obtido das folhas de *Piper capitarianum* (OSFPC) foram analisados por Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massa, utilizando

um Cromatógrafo a Gás (ShimadzuTM), equipado com detector de Ionização por Chama (DIC), com DB-5MS, coluna capilar (30 m × espessura de 0,25 mm, espessura de filme 0,25 µm), usando Hélio (He) como o gás de arraste (1,0 mL min⁻¹). As temperaturas do injetor e detector foram de 250 °C e 290 °C, respectivamente, sendo injetados padrões de hidrocarbonetos lineares C7 a C30 para a determinação dos índices de retenção nas mesmas condições cromatográficas do CG-EM.

A identificação dos componentes químicos foi realizada com dados de índices de retenção por CG-DIC e dos espectros de massas por CG-EM, que foram calculadas utilizando Equação de van der Dool-Kratz, relacionando os tempos de retenção das substâncias presentes nos óleo essencial com os tempos de retenção de hidrocarbonetos lineares injetados no aparelho. Os índices de retenção e os espectros de massa foram comparados com as informações da biblioteca (WILEY 7.0) e de acordo com ADAMS (2007).

4.3 Avaliação da atividade larvicida

4.3.1 Coleta dos ovos de *Aedes aegypti*

Os ovos de *A. aegypti* foram coletados no bairro Cidade Nova (S03°03'09.0" W59°55'59.0") localizado na zona oeste da cidade de Manaus. O critério de escolha desse bairro foi baseado no Levantamento do Índice Rápido de Infestações por *A. aegypti* (LIRAA), divulgado pela Secretaria Municipal de Saúde (SEMSA). Segundo o LIRAA (2013), foi registrado a zona oeste da cidade como a área de alto risco de ocorrência dos casos de dengue, devido maiores Índices de Infestação Predial (IIP), onde o período de maior proliferação do mosquito transmissor, ocorre com a alta incidência de chuvas (BRASIL 2013). Para a coleta dos ovos de *A. aegypti*, foram utilizadas 20

armadilha de oviposição, contendo uma solução atrativa. Esta solução atrativa é uma infusão preparada com 83 g de capim elefante (*Pennisetum purpureum*) picado, adicionado em 10 litros de água e mantido em um recipiente com tampa, por um período de 7 dias. Após o período da infusão, a solução foi coada em uma peneira e apenas o líquido resultante foi utilizado nas armadilhas, na concentração de 10% (REITER & GUBLER, 1997).

As armadilhas utilizadas são constituídas de recipientes plásticos preto contendo duas palhetas eucatex (3x13x 0,5cm), fixadas verticalmente em sua parede com grampos, servindo de substrato de oviposição, sendo distribuídas duas armadilhas, em diferentes cômodos do intradomicílio: quarto, cozinha ou sala, e peridomicílio: quintal, garagem ou área de serviço, tomando-se o cuidado de escolher locais onde não houvesse incidência de luz solar e chuva. Após cinco dias de permanência nos domicílios, as armadilhas de oviposição (ovitrapa) foram recolhidas e as palhetas foram acondicionadas no insetário do Laboratório de Malária e Dengue no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia- INPA, e colocadas para secar em condições de laboratório por um dia.

4.3.2 Manutenção de *Aedes aegypti* no insetário.

As palhetas contendo os ovos foram colocadas em bacias contendo 500 mL de água para eclosão dos ovos. As larvas foram alimentadas diariamente com ração para gato da marca Purina (Friskies) macerado em moinho. A limpeza das bacias eram feitas 3 vezes na semana com remoção de 1/3 da água para evitar a formação de película na superfície seguindo a metodologia de rotina do Laboratório de Malária e Dengue (SANTOS *et al* 1980, SCARPASSA & TADEI, 1990). As larvas foram mantidas até

atingirem o estágio de pupa, posteriormente as bacias foram teladas por filó (tecido) contendo uma abertura central, onde foi colocado chumaço de algodão para facilitar o acesso do capturador (aspirador entomológico), ao coletar os adultos recém emergidos. Após a emergência, os adultos foram identificados pela chave taxonômica de Consoli & Lourenço de Oliveira (1994) observado com o auxílio de microscópio estereoscópico e em seguida foram introduzidos nas gaiolas para montar a colônia no insetário (Figura 9 A, B).

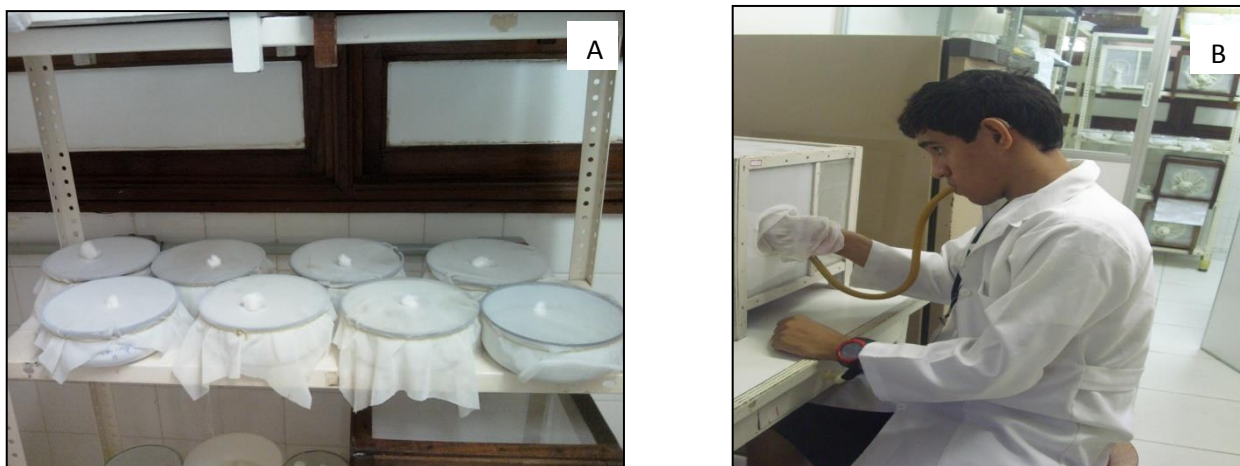


Figura 9. Manutenção de *Aedes aegypti* no insetário. (A) Bacias teladas utilizadas na manutenção das larvas no laboratório. (B) Introdução dos mosquitos adultos nas gaiolas.

Os mosquitos adultos foram mantidos nas gaiolas após a introdução de macho e fêmeas de *A. aegypti* para reprodução e reposição do estoque de ovos do laboratório. Estes foram alimentados com solução açucarada a 10%, contida em erlenmeyer com algodão umedecido. Para as fêmeas foi oferecida alimentação sanguínea para a maturação de seus ovos, utilizando hamster (*Mesocricetus auratus*) anestesiados por aproximadamente 30 minutos, seguindo o Protocolo CEUA 069 /2015 do Comitê de Ética Animal do INPA que proporciona o bem estar do animal utilizado em ensaios experimentais.

Após o período de repasto sanguíneo, foram colocados recipientes (copo de plástico 100 mL) na gaiola contendo água e uma tira de papel de filtro em sua parede interna para a desova. Após o período de oviposição, os copos contendo as desovas (Geração 1) foram retirados das gaiolas e novamente foi repetida metodologia de criação para desenvolvimento da geração F1, sendo que as larvas de 3º estágio foram selecionada para testar a atividade larvicida dos extratos e óleo essencial de *P. capitarianum* por meio de Bioensaios.

Os ovos da cepa Rockefeller utilizada como referência de suscetibilidade para comparação das mortalidades de *A. aegypti*, foram obtidos do SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias) do estado de São Paulo e mantidos seguindo a técnicas do Laboratório de Malária e Dengue do INPA.

No insetário onde foi feita a manutenção dos mosquitos, as condições ambientais foram padronizadas e controlada, quanto à temperatura de $26^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de aproximadamente 80% e fotoperíodo de 12 horas. (SCARPASSA & TADEI, 1990).

4.3.3 Local de coleta dos anofelinos

As coletas das larvas de anofelinos foram realizadas na Zona Leste, no bairro Puraquequera e no ramal do Brasileirinho, área periurbana da cidade de Manaus (Tabela 1). O critério de escolha desse bairro é baseado nos trabalhos publicados por Tadei et al (1998, 2001, 2007) e Arcos & Ferreira (2012) que registra como endêmica desta espécie, apresentando várias coleções hídricas com vegetação aquática, tornando o ambiente propício para o desenvolvimento de formas imaturas do mosquito. Estas foram coletadas com o auxílio de concha entomológica com capacidade de aproximadamente 350 mL, abertura de 11 cm e cabo de manuseio de um metro para

alcançar as áreas em torno dos criadouros (TADEI, et al., 2007). Os pontos de coleta selecionados estão descritos na Tabela 4 com as respectivas coordenadas geográficas.

Tabela 1. Pontos de coleta de anofelinos com as respectivas coordenadas geográficas.

Pontos	Localidade	Tipo de criadouro	Coordenadas
P1	Puraquequara	Tanque de piscicultura	S 03° 02'44.4" W 59°53'09.0"
P2	Ramal Brasileirinho	Barragem	S 03° 01'.236" W 59° 54'. 664'
P3	Puraquequara	Barragem	S 03° 03'.081" W 59° 53'.594"
P4	Puraquequara	Tanque de piscicultura	S 03° 03'.304" W 59° 53' 533"

4.3.4 Manutenção de anofelinos

Após a coleta, as larvas foram colocadas em vasilhame plástico utilizados para transporte até o insetário do Laboratório de Malária e Dengue do INPA (Figura 10). As larvas transferidas para bacias contendo água e alimentadas diariamente com ração de peixe (Tetramim® e Goldfish®) macerados. A limpeza das bacias e adição de água eram realizadas todos os dias, seguindo-se a metodologia de rotina do Laboratório de Malária e Dengue (SANTOS *et al* 1980, SCARPASSA & TADEI, 1990). A limpeza da água foi muito importante porque as larvas de *Anopheles* se alimentam na superfície da lâmina d' água. O excesso de alimento origina uma película gordurosa na superfície da água, que dificulta a troca gasosa das larvas. Posteriormente foi feita a triagem separando o instares larvais (L1, L2, L3 e L4) com auxílio de um conta gota e somente as de 3º estágio foram utilizadas nos bioensaios seletivos e de doses para testar a toxicidade dos extratos e do óleo essencial.



Figura 10. Coletas e Manutenção dos anofelinos. (A) Coletas de larvas na margem do criadouro; (B) Bacias utilizadas na manutenção das larvas no laboratório

4.3.5 Bioensaios

Os bioensaios foram realizados no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, no Laboratório de Malária e Dengue em sala com temperatura controlada em $26^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de aproximadamente 80% e fotoperíodo de 12 horas. Foram realizados dois tipos de bioensaios, um seletivo para verificar a toxicidade dos extratos as larvas de *A.aegypti* da cepa Rockefeller, *A.aegypti* (campo) e *Anopheles* sp e outro de dose para determinar a Concentração letal mediana (CL_{50}) e Concentração letal final (CL_{90}) com seus limites de confiança.

4.3.6 Bioensaios seletivos

Os bioensaios seletivos foram conduzidos para testar a toxicidade, verificando os extratos e óleo ativos de *Piper capitarianum* sobre as larvas de *A.aegypti* da cepa Rockefeller, *A.aegypti* (campo) e *Anopheles* sp. A montagem dos bioensaios foi realizada de acordo com a metodologia da Organização Mundial da Saúde (2005) com modificações, seguindo-se os critérios estabelecidos por Dulmage *et al* (1990). Antes da aplicação dos bioensaios, foram preparadas as amostras (extratos e óleo), pesadas 250

mg em balança analítica colocados em tubos eppendorfs com capacidade de 2 mL, solubilizados em 1000 μ L dos solventes (DMSO, TWEEN) a 1%, devido a tolerância das larvas de *A. aegypti* e *Anopheles sp* (Figura 11), tendo uma concentração final de 250 mg/mL no eppendorf, levados ao banho de ultrassom sob moderada sonicação para dissolução por um período de 2 horas (Figura 12).

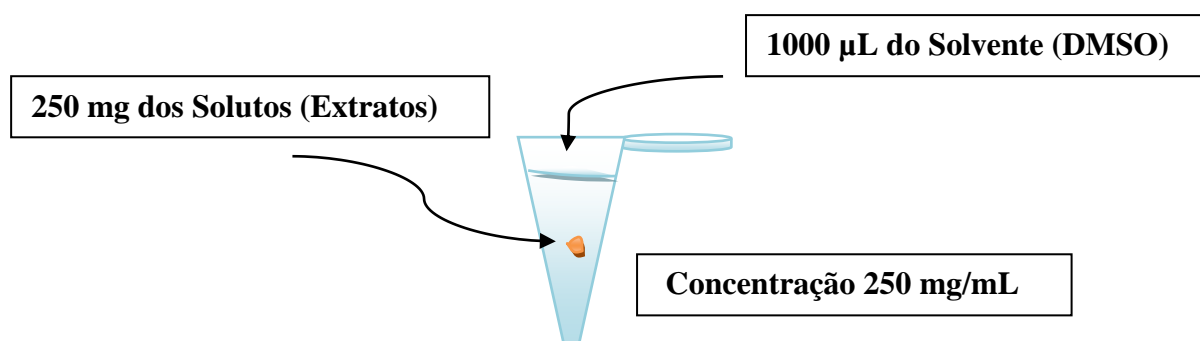


Figura 11. Diluição dos extratos para realização dos bioensaios seletivos contra larvas de *Aedes aegypti* e *Anopheles sp*.

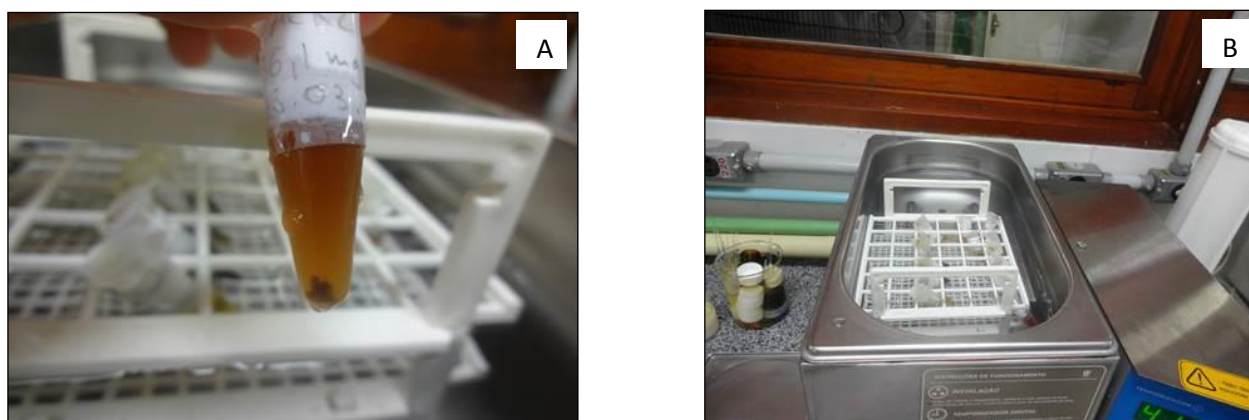


Figura 12. Diluição dos extratos em DMSO e TWEEN para realização dos bioensaios. (A) Amostra sólida em tubo eppendorf. (B) Solubilização das amostras em DMSO e TWEEN na Ultrassônica.

Após a dissolução, foram retirados 200 μL dos tubos de eppendorf com auxílio de pipeta automática, adicionados em copos plástico com capacidade de 180 mL, contendo 9,8 mL de água destilada, 1 mL de alimento, 20 larvas de 3^o estágio de *A.aegypti* da cepa Rockfeller, *A.aegypti* (campo) e *Anopheles* sp., tendo uma concentração final de 500 μg /mL com o objetivo de detectar toxicidade acima de 50% (Figura 13).

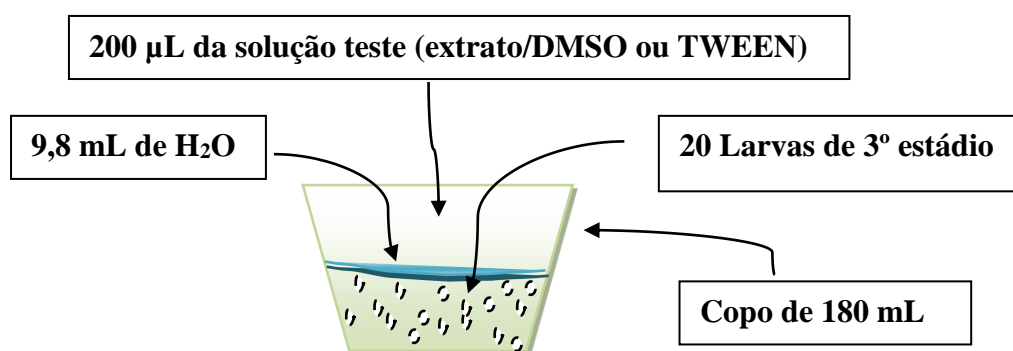


Figura 13. Esquema para realização dos bioensaios seletivos com extratos e óleo de *Piper capitarianum*.

Nesses ensaios foram preparadas três réplicas de cada da concentração e três réplicas do controle negativo sem a adição do extrato vegetal, contendo DMSO ou TWEEN e água destilada e do controle positivo teméfos na dose diagnóstica de 0,012 mg/L, segundo a OMS, 2005. Após aplicação dos extratos e óleo foram realizadas as leituras em 24 e 48 horas, fazendo-se a contagem das larvas mortas e vivas. Os extratos que apresentaram mortalidade igual ou superior a 50% foram utilizadas nos bioensaios de dose para determinar as concentrações letais da CL₅₀ e da CL₉₀.

4.3.7 Bioensaios de Dose

Os bioensaios de dose foram preparados de acordo com os resultados obtidos com os bioensaios seletivos, sendo que para cada dose testada tinham cinco réplicas de copos plásticos com capacidade de 180 mL, contendo 100 mL de água destilada, alimento, 20 larvas de 3º estágio de *A. aegypti* da cepa Rockefeller, *A. aegypti* (campo) e *Anopheles* sp (Figura 14). Os tratamentos tiveram 5 diferentes concentrações (500, 250, 100, 50 e 25 mg/mL) sendo acrescentado o grupo controle (água destilada, DMSO e TWEEN sem adição de extratos), que serviu como base para mensurar a mortalidade natural das larvas que segundo Dulmage *et al* (1990), não pode ultrapassar 10%. Se ocorre mortalidade acima de 10 % e se as larvas pertencentes ao grupo controle puparem no curso do experimento, o teste deverá ser descartado. Testes com mortalidade de 20 % ou mais para o grupo controle foram insatisfatórios e foram repetidos. Para comparação da atividade larvicida dos extratos e óleo de *P.capitarianum*, utilizou-se o larvicida químico temefós (grau técnico) na dose 0,012 mg/L e o alfacipermetrina (grau técnico) na dose 0,04 mg/L como controle positivo, que ainda vem sendo utilizado pela SEMSA (Secretaria Municipal de Saúde) no controle do *A. aegypti* e *Anopheles* em áreas urbanizadas e periurbanas da Cidade de Manaus (OMS 2005; SILVA *et al.*, 2014). Após a aplicação foi feita avaliação dos bioensaios por meio das contagens das larvas vivas e mortas, em intervalos de 24, 48 e 72 horas. Os bioensaios foram repetidos em três dias alternados e foi empregado o programa POLO PC® (LeOra Software Berkeley, CA) para realização da análise de próbit (FINNEY,1971).



Figura 14. Esquema para realização dos bioensaios com extratos de *Piper capitarianum*.

4.3.8 Análise dos Dados

Os dados da mortalidade obtidos dos bioensaios de dose, foram utilizados para determinação da Concentração Letal Mediana (CL₅₀) e Concentração Letal Final (CL₉₀), realizadas pela análise de probit (FINNEY, 1971) considerando o nível de significância de 95%, calculada com auxílio do programa POLO PC® (LeOra Software Berkeley, CA) por meio de Regressão Linear dose-resposta. Se a mortalidade do controle estiver entre 5 % e 20 %, o percentual de mortalidade deverá ser corrigido pela Fórmula de Abbott:

$$\text{Abbott: } \frac{\% \text{ mortalidade do teste} - \% \text{ mortalidade do controle}}{100 - \% \text{ mortalidade do controle}} \times 100$$

$$100 - \% \text{ mortalidade do controle}$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Capítulo 1 – BIOENSAIOS

5.1 Material Vegetal – (*Piper capitarianum*)

O material vegetal das partes coletadas (folhas, galhos e inflorescência) foram selecionados para a investigação fitoquímica e atividade biológica, sendo que suas massas com seus respectivos pesos estão descritos na Tabela 2. Durante o processamento das partes coletadas, observou-se que nas folhas (1,210kg), obteve-se maior quantidade de material triturado, seguido dos galhos (730g) e da inflorescência (280g), material suficiente para preparação dos extratos deste trabalho. É importante ressaltar que a massa perdida após a secagem, foi devido à presença de água nas partes coletadas e a trituração foi realizada para aumentar a superfície de contato do material na extração com os solventes orgânicos.

Tabela 2. Descrição e quantificação das partes coletadas de *Piper capitarianum*

Partes Coletadas	Massa Verde (g)	Massa Seca (g)	Massa Perdida (%)	Massa Triturada (g)
Folhas	4.720	1.280	54	1.210
Galhos	3.310	846	49	730
Inflorescência	1.507	400	50	280

Após o processo de extração com material triturado foi feito a determinação dos rendimentos dos extratos que estão descritos na Tabela 3. Os extratos metanólicos das partes coletadas (folhas, galhos e inflorescência) apresentaram maior rendimento, seguido dos extratos aquosos e hexânico. Estes resultados são semelhantes aos obtidos

por Silva *et al.* (2007), que obtiveram o mesmo rendimento nos extratos metanólicos e aquosos das folhas com mesma quantidade de material vegetal das espécimes de *Piper aduncum* coletadas em várias localidades da região amazônica. Outros autores como Choochote *et al.* (2006), também encontraram valores aproximados de rendimentos nos extratos etanólicos (10,5%) e metanólicos das folhas (11%) e galhos (13,5%) das espécies *Piper longum*, *Piper ribesoides* e *Piper sarmentosum* coletadas em duas localidades na Tailândia.

Tabela 3. Rendimentos dos extratos obtidos das partes coletadas de *P. capitarianum*

Partes Coletadas	Rendimento (%)		
	Hexânico	Metanólico	Aquoso
Folhas	9,5	17,5	1,0
Galhos	2,8	10,5	8,1
Inflorescência	5,0	15,5	5,8

Os resultados obtidos das massas e o rendimento do óleo essencial das folhas de *P. capitarianum* constam na Tabela 4. O óleo essencial foi extraído em duas etapas sendo que foram utilizados 200 gramas de material triturado obtendo-se um total de 2,42g da massa do óleo essencial, que corresponde a um rendimento de 1,2%. Estes resultados corroboram aos obtidos por Facundo *et al.* (2008), que obtiveram o mesmo rendimento (1,2%) utilizando quantidade diferente de massa triturada (300g) e analisaram os constituintes voláteis dos óleos essenciais presentes em espécimes de

Piper tuberculatum e *Piper hispidum* coletadas em várias localidades da região amazônica.

Tabela 4. Massas e rendimento do óleo essencial das folhas de *P. capitarianum*.

Partes Coletadas	Massa Triturada (g)	Massa do Óleo (g)	Rendimento (%)
Folhas	400	2,42	1,2

5.2 Avaliação da atividade larvicida dos extratos de *Piper capitarianum*

5.2.1 Bioensaios seletivos

Os resultados dos bioensaios seletivos com extratos *P. capitarianum* sobre larvas de *A. aegypti* da cepa Rockefeller, *A. aegypti* (campo) e *Anopheles* sp. estão representados na Tabela 5. Dos 9 extratos testados seletivamente para detectar a toxicidade considerando mortalidade acima de 50%, somente 4 mostraram atividade larvicida, que corresponde aos extratos hexânicos (EHGPC) e (EHIPC), metanólico (EHIPC), e o aquoso (EAIPC) sobre larvas de *A. aegypti* da cepa Rockefeller. Os resultados mostram 100% de mortalidade para os extratos hexânico após 48 horas de aplicação com exceção do extrato metanólico (EMIPC) e aquoso (EAIPC) que apresentaram mortalidade de 98% e 86% respectivamente, no mesmo intervalo de leitura.

Nas larvas de *A. aegypti* (campo), somente 5 extratos apresentaram atividade larvicida, que foram os hexânicos (EHGPC e EHIPC) e os metanólicos (EMFPC,

EMGPC e EMIPC). Os extratos hexânico (EHIPC) e metanólico (EMIPC) da inflorescência de *P. capitarianum*, mostrou maior mortalidade (93%), após 72 horas de aplicação, comparados aos extratos hexânico dos galhos (EHGPC) e o metanólico das folhas (EMFPC) e dos galhos (EMGPC) que apresentaram mortalidade de 83%, 53% e 73% respectivamente na mesma leitura (72 horas). Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Pohlit *et al.* (2004), que observaram mortalidade de 54% no extrato metanólico das folhas de *P. capitarianum* sobre larvas de *A. aegypti* coletados nos bairros de Manaus, na concentração de 500µg/mL em condições de laboratório.

Considerando os testes com as larvas de anofelinos, apenas os extratos metanólico (EMFPC, EMGPC e EMIPC) apresentou atividade larvicida com mortalidade de 85%, 78% e 80%, respectivamente na leitura de 24 horas. O extrato metanólico da inflorescência de *P. capitarinum*, (EMIPC) apresentou maior percentual de mortalidade (99%) após 72 horas de exposição comparadas aos demais extratos testados. Nos controles negativos (DMSO, TWEEN, H₂O) dos bioensaios foram registrados mortalidade inferior ou igual a 3%, nos extratos testados contra larvas dos mosquitos.

Considerando mortalidade das larvas nos bioensaios, observa-se que as larvas de *A. aegypti* da cepa Rockefeller, apresentou a maior mortalidade comparando-se com os valores obtidos para as larvas de *A. aegypti* do campo e com a mortalidade observadas para os anofelinos, tornando-se mais suscetível aos extratos de *P. capitarianum*.

Desta forma, os extratos (EHGPC), (EHIPC), (EMFPC), (EMGPC), (EMIPC) e (EAIPC) foram selecionados para os bioensaios de dose com objetivo de determinar a concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀).

Tabela 5 – Resultados dos bioensaios seletivos com extratos de *Piper capitarianum* contra larvas de *Aedes aegypti* da cepa (Rockfeller), *Aedes aegypti* (campo) e *Anopheles sp.*

Extratos	Concentração (µg/mL)	<i>Aedes aegypti</i> (Rockfeller)			<i>Aedes aegypti</i>			<i>Anopheles sp</i>		
		Mortalidade (%)			Mortalidade (%)			Mortalidade (%)		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
EHFPC	500	23	46	53	18	33	35	16	23	31
EHGPC	500	95	100	100	65	75	83	13	28	31
EHIPC	500	78	91	98	63	66	93	31	35	48
Controle	TWEEN	0	0	3	0	0	3	0	0	3
EMFPC	500	28	36	63	36	55	76	85	91	98
EMGPC	500	13	38	55	18	41	53	78	88	97
EMIPC	500	95	98	100	81	86	93	80	91	99
Controle	DMSO	0	0	1,6	0	0	3	0	0	2
EAFPC	500	1,6	5	8	3	5	5	4	11	16
EAGPC	500	0	5	15	1	13	15	6	16	23
EAIPC	500	40	86	93	26	31	15	10	17	31
Controle	H ₂ O	0	0	3	0	0	3	0	0	2
Controle positivo	TEMEFOS	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Controle positivo	α-cipermetrina	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Nos testes foram utilizadas 20 larvas por copo em triplicata;

Controles: DMSO e TWEEN a 1 %.

Controle Positivo : Temefos a 0,012mg/mL e α-cipermetrina a 0,04mg/mL

EHFPC- Extrato hexânico das folhas;

EHGPC- Extrato hexânico dos galhos;

EHIPC- Extrato hexânico das inflorescências;

EMFPC- Extrato metanólico das folhas;

EMIPC- Extrato metanólico das inflorescências;

EMGPC- Extrato metanólico dos galhos;

EAIPC- Extrato aquoso das inflorescências;

EAFPC- Extrato aquoso das folhas;

EAGPC- Extrato aquoso dos galhos;

5.2.2 Bioensaios de dose

5.2.2.1 Bioensaios com *A.aegypti* (Rockfeller)

Os resultados obtidos nos bioensaios quantitativos com 5 extratos de *P. capitarianum* sobre larvas de *A. aegypti* da cepa Rockfeller, estão representados na Tabela 6. Os extratos hexânicos dos galhos (EHGPC), da inflorescência (EHIPC) e o metanólico (EMIPC), apresentaram atividade larvicida nas duas maiores concentrações testadas (500 e 250 µg/mL), com mortalidade de 91%, 77% e 90% respectivamente, em 24 horas de exposição. Nas demais concentrações, a mortalidade foi inferior a 50% na leitura de 24 horas. Estendendo-se a observação até 72 horas, esses valores de mortalidade aumentaram nas concentrações (500, 250 e 100 µg/mL), para todos os extratos testados sobre as larvas de *A. aegypti* da cepa Rockfeller, sendo que duas menores concentrações não mostraram mortalidade de 50%. O grupo controle apresentou mortalidade de 2% em 24 horas e 3% nas leituras de 48 e 72 horas nos bioensaios.

Considerando-se os valores de mortalidade nos intervalos de leitura de 24, 48 e 72 horas, observa-se que o maior impacto de mortalidade ocorreu na 24 horas para os todos os extratos testados (Figura 15). Considerando o extrato metanólico da inflorescência de *P. capitarianum* (EMIPC), observa-se que ocorreram os maiores percentuais de mortalidade, demonstrando haver atividade larvicida para as larvas de *A. aegypti* da cepa Rockfeller quando comparados aos demais extratos.

Tabela 6 – Resultados dos bioensaios de concentração com extratos de *Piper capitarianum* contra larvas de *Aedes aegypti* da cepa (Rockfeller) exposta em diferentes concentrações.

Extratos	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	N (Amostral)	Mortalidade (%)		
			24 h	48 h	72 h
EHGPC	500	100	91	97	99
	250	100	59	71	95
	100	100	42	63	78
	50	100	16	35	56
	25	100	4	14	20
EHIPC	500	100	77	92	96
	250	100	64	79	86
	100	100	38	48	61
	50	100	11	27	35
	25	100	2	15	18
EMIPC	500	100	90	94	98
	250	100	77	88	92
	100	100	45	76	83
	50	100	31	44	48
	25	100	9	20	36
EAIPC	500	100	82	86	93
	250	100	28	41	55
	100	100	19	37	41
	50	100	6	17	24
	25	100	2	9	11
Controle	TWEEN	100	0	2	3
	H ₂ O	100	0	0	2
	DMSO	100	0	0	3
Controle positivo	TEMEFÓS	100	100	100	100

Nos testes foram utilizadas 20 larvas por copo;

Controles: DMSO e TWEEN a 1 %

Controle Positivo : Temefos a 0,012mg/mL

EHGPC- Extrato hexânico dos galhos;

EHIPC- Extrato hexânico das inflorescências;

EMIPC- Extrato metanólico das inflorescências;

EMGPC- Extrato metanólico dos galhos;

EAIPC- Extrato aquoso das inflorescências;

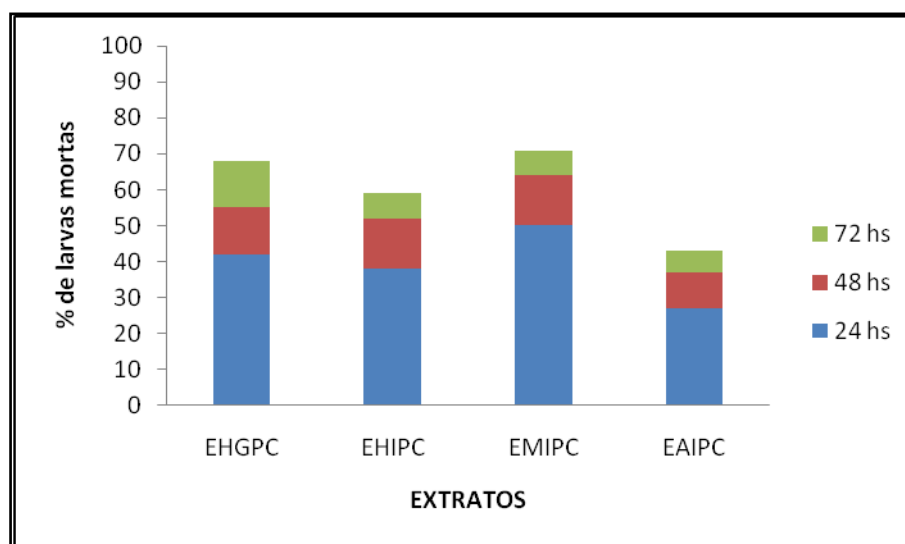


Figura 15. Mortalidade (%) das larvas de *Aedes aegypti* da cepa Rockefeller nos bioensaios com extratos de *Piper capitarianum*, nos intervalos de leitura de 24, 48 e 72 horas.

A partir dos bioensaios de dose, foram obtidos os valores das concentrações letais CL_{50} e CL_{90} (Tabela 7), através da análise de *probit*, considerando o intervalo de confiança no nível de significância de 95% verificando o qui-quadrado (χ^2) e a equação de regressão ($y=(a+5) + b.\log x$) que corresponde a retas linear de dose-resposta.

Considerando os 4 extratos testados nos bioensaios sobre as larvas de *A. aegypti* da cepa Rockefeller no intervalo de 24, 48 e 72 horas, os resultados indicaram que os dados se ajustaram á análise de *probit*, com exceção dos extratos hexânico (EHIPC) e aquoso (EAIPC) da inflorescência de *P. capitarianum* que não se ajustaram, como mostra o programa. Os valores do qui-quadrado (χ^2), calculado pelo programa POLO PC, foram maiores que χ^2 tabelado ou esperado, não apresentando diferenças significativas a $g \leq 0,5$. Portanto o extrato metanólico da inflorescência de *P. capitarianum* (EMIPC), apresentou os menores valores da CL_{50} (106,63 $\mu\text{g/mL}$, 58,61 $\mu\text{g/mL}$ e 44,09 $\mu\text{g/mL}$) e CL_{90} (488,87 $\mu\text{g/mL}$, 271,65 $\mu\text{g/mL}$ e 198,25 $\mu\text{g/mL}$) respectivamente nas leituras de 24, 48 e 72 horas, com intervalos de confiança de 95%, sendo eficaz as larvas de *A. aegypti* da linhagem Rockefeller comparados aos demais

extratos testados que apresentaram maiores valores de CL_{50} e CL_{90} . Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2005), as populações da cepa Rockefeller, são caracterizadas como uma linhagem padrão de mosquito, susceptível á classe de inseticidas químicos derivados de produtos naturais. Estes são utilizados como referência em estudos de monitoramento de resistência comparados com os mosquitos existentes nas cidades brasileiras. Portanto, é importante ressaltar que as larvas de *A. aegypti* da cepa Rockefeller foram mais susceptíveis aos extratos de *P. capitarianum*, do que as larvas *A.aegypti* do campo (Cidade Nova), embora alguns extratos não tenham apresentado atividade larvicida em níveis satisfatórios.

Tabela 7 – Valores de CL_{50} e CL_{90} dos extratos de *Piper capitarianum* contra larvas de *Aedes aegypti* da cepa (Rockefeller) após 24, 48 e 72 horas de aplicação.

Extrato	CL_{50} (IC 95%)	CL_{90} (IC 95%)	X^2	Equação de regressão $y=(a+5) + b.log x$
EHGPC	148,03 (101,78 - 226,76)	590,31 (346,86 - 1732,03)	7,57	$y= (-4,63 + 5) + 2,13.log x$
	87,01 (41,59 - 156,22)	401,30 (207,11 - 2554,69)	5,56	$y= (-3,74 + 5) + 1,93.log x$
	50,98 (43,50 - 58,75)	166,53 (138,22 - 211,90)	2,54	$y= (-4,25 + 5) + 2,49.log x$
EMIPC	106,63 (91,61 - 124,12)	488,87 (381,28 - 675,85)	2	$y= (-3,92 + 5) + 1,93x$
	58,61 (37,05 - 83,46)	271,65 (172,39 - 639,81)	5,91	$y= (-3,40 + 5) + 1,92x$
	44,09 (25,43 - 63,57)	198,25 (128,99 - 444,93)	5,27	$y= (-3,22 + 5) + 1,96x$
EAIPC	281,66 N.E	1091,27 N.E	20*	$y= (-5,33+ 5) + 2,17x$
	1146,3 N.E	188,44 N.E	18,8*	$y= (-3,71+ 5) + 1,63x$
	142,65 (61,67 - 309,91)	700,18 (318,82 - 1242,9)	13,7*	$y= (-3,99+ 5) + 1,85x$

NE = Não estimado a 95%

*Significativo ($p<0,05$)

x = log da concentração

EHGPC- Extrato hexânico dos galhos;

EMIPC- Extrato metanólico das inflorescências;

EAIPC- Extrato aquoso das inflorescências;

5.2.2.2 Bioensaios de dose com *Aedes aegypti* (campo)

Os resultados obtidos nos bioensaios quantitativos com os extratos de *P. capitarianum* sobre larvas de *A. aegypti* do campo, estão representados na tabela 8. Os extratos hexânico (EHIPC) e metanólico (EMIPC) das inflorescências apresentaram atividade larvicida nas duas maiores concentrações testadas (500 e 250 µg/mL), com mortalidade de 90% e 73% respectivamente, em 48 horas de exposição, sendo que para as demais concentrações, a mortalidade foi inferior a 50% na mesma leitura (48 horas). Os demais extratos (EHPC, EMFPC e EMGPC) mostraram mortalidade de 87%, 51% e 74% na concentração de 500 µg/mL, em 72 horas, sendo que as menores concentrações mostraram mortalidade insatisfatória e o grupo controle apresentou mortalidade de 2% em 48 horas e 3% na última leitura (72 horas).

Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Chansang *et al.* (2005) que relataram a atividade larvicida do extrato metanólico das folhas de *Piper retrofractum*, apresentando mortalidade de 100% sobre larvas de *A. aegypti* na concentração de 100 µg/mL, após 24 horas de exposição. Por outro lado, trabalhos realizados por Nawaz *et al.* (2011) também relataram que os extratos de *Piper nigrum* conhecida como pimenta de macaco, foram eficazes contra *A. aegypti*, podendo ser usado como alternativa de controle no ambiente. Estudos realizados por Chaithong *et al.* (2006) que também avaliaram ação inseticida dos extratos etanólicos em larvas de terceiro instar de *A. aegypti*, extraído de três espécies do gênero *Piper*, como *Piper longum*, *Piper ribesoides* e *Piper sarmentosum*, também detectaram 100% de mortalidade de demonstrando similaridades com os resultados deste trabalho.

Tabela 8 – Resultados dos bioensaios de dose com extratos de *Piper capitarianum* contra larvas de *Aedes aegypti* do bairro Cidade Nova (Manaus), exposta em diferentes concentrações.

Extratos	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	N (Amostral)	Mortalidade (%)		
			24 h	48 h	72 h
EHGPC	500	100	61	76	87
	250	100	50	60	79
	100	100	41	47	57
	50	100	23	26	30
	25	100	9	10	14
EHIPC	500	100	60	73	92
	250	100	36	53	63
	100	100	14	18	23
	50	100	5	7	11
	25	100	1	3	5
EMIPC	500	100	82	90	93
	250	100	55	72	86
	100	100	24	33	38
	50	100	5	12	13
	25	100	0	3	4
EMGPC	500	100	22	39	51
	250	100	19	28	45
	100	100	10	20	33
	50	100	5	8	10
	25	100	1	2	3
EMFPC	500	100	36	52	74
	250	100	9	17	25
	100	100	4	7	11
	50	100	2	5	8
	25	100	0	1	3
Controle	TWEEN	100	0	0	2
	DMSO	100	0	1	3
Controle positivo	TEMEFÓS	100	100	100	100

Controles: DMSO e TWEEN a 1 %.

. Controle Positivo: Temefos a 0,012mg/mL

EHGPC– Extrato hexânico dos galhos;

EHIPC– Extrato hexânico das inflorescências;

EMIPC - Extrato metanólico das inflorescências;

EMGPC- Extrato metanólico dos galhos;

EMFPC- Extrato metanólico das folhas;

Considerando os valores de mortalidade não acumulativos nos intervalos de leitura de 24, 48 e 72 horas, observa-se que o maior impacto de mortalidade ocorreu em 24 horas para o extrato hexânico dos galhos (EHGPC) e o metanólico da inflorescência de *P. capitarianum* (EMIPC), mostrando percentuais maiores 66% e 63% respectivamente, demonstrando atividade larvicida contra as larvas de *A. aegypti* do campo quando comparados aos demais extratos (Figura 16). Nos extratos EHIPC, EMFPC e EMGPC, registraram-se maiores níveis de mortalidade nas leituras de 24 e 48 horas, que foram inferiores considerando nível de 50 % de mortalidade.

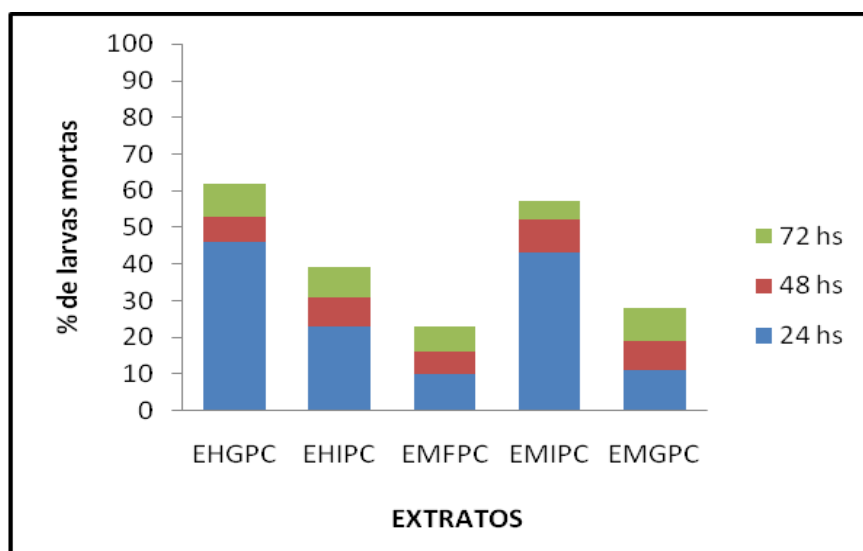


Figura 16. Mortalidade em porcentagem das larvas de *Aedes aegypti* do campo nos bioensaios com extratos de *Piper capitarianum*, nos intervalos de leitura de 24, 48 e 72 horas.

Considerando os 5 extratos testados nos bioensaios com as larvas de *A. aegypti* do campo no intervalo de 24, 48 e 72 horas, apenas o extrato hexânico (EHGPC, EHIPC) e o metanólico da inflorescência (EMIPC) se ajustaram á análise de probit, não apresentando diferenças significativas a $g \leq 0,5$. Os valores do qui-quadrado (χ^2), foram menores que χ^2 tabelado (FINNEY,1971). Os extratos metanólicos das folhas (EMFPC) e dos galhos (EMGPC), não se ajustaram, na leitura de 72 horas,

embora os dados não fossem suficientes para o cálculo da CL_{50} e CL_{90} , conforme a Tabela 9. Portanto, os extrato hexânico dos galhos (EHGPC) e o metanólico da inflorescência (EMIPC) apresentaram os menores valores da CL_{50} (97,63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 127,11 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e da CL_{90} (508,38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 354,44 $\mu\text{g}/\text{mL}$) respectivamente na leitura de 72 horas com intervalos de confiança de 95%. Estes resultados mostram que as larvas terceiro instar de *A. aegypti*, são susceptíveis às diferentes concentrações testadas, comparadas aos demais extratos que apresentaram maiores valores de CL_{50} e CL_{90} , demonstrando atividade larvicida em níveis satisfatórios.

Segundo Mongelli *et al.* (2002) que avaliaram a atividade inseticida das folhas de *Piper peltata* em larvas de *A. aegypti* e relataram que os extratos brutos apresentaram uma CL_{50} de 398 $\mu\text{g} / \text{mL}$ em 24 horas de exposição, que são semelhantes aos resultados obtidos para os extratos EHIPC (CL_{50} 373,47 $\mu\text{g} / \text{mL}$) e EMIPC (CL_{50} 214,35 $\mu\text{g} / \text{mL}$), deste estudo. Estudos realizados na Índia por Tennyson *et al.* (2012) com extratos metanólicos das folhas de *Piper betle*, foi moderadamente ativos contra *A. aegypti*, na concentração de 1000 ppm com valores de CL_{50} de 236,73 e 98.45 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectivamente nas leituras de 24 e 48 horas. Estes resultados mostram similaridade com aos resultados obtidos no extrato EHGPC deste trabalho, que apresentaram valores aproximados da CL_{50} que foi de 239,43 e 97,63 $\mu\text{g} / \text{mL}$ na leitura de 24 e 48 horas de exposição. Estes resultados são indicativos que estes extratos mostraram-se promissores como método alternativo no controle de vetor da dengue em áreas urbanizadas devido aos baixos valores de CL_{50} e a presença de classes químicas que apresentam essa ação inseticida (GARCEZ *et al.*, 2013).

Atualmente, estratégias que inserem diversas formas de controle em um processo integrado são altamente viáveis para a região amazônica, principalmente aquelas em que priorizem o manejo ambiental de forma racional, reduzindo os impactos

negativos do uso indiscriminado de inseticidas químicos, que podem favorecer o aparecimento de resistência em espécies de mosquitos (TADEI, et al., 2010; OMS, 2012; MEDEIROS et al., 2013).

Tabela 9 – Valores de CL₅₀ e CL₉₀ dos extratos de *Piper capitarianum* contra larvas de *A. aegypti* (campo) após 24, 48 72 horas de aplicação.

Extratos	CL ₅₀ (IC 95%)	CL ₉₀ (IC 95%)	X ²	Equação de regressão y(a+5)b.logx
EHGPC	239,43 (146,31 - 562,40)	3201,6 (1053,9 - 62740)	4,75	y= (-2,70 + 5) + 1,13x
	149,14 (106,88 - 219,08)	1178,4 (626,44 - 3813,7)	3,36	y= (-3,10 + 5) + 1,42x
	97,63 (81,61 - 115,86)	508,38 (387,88 - 728,02)	2,73	y= (-3,55 + 5) + 1,78x
EHIPC	373,47 (308,76 - 474,47)	1738,96 (1184,9 - 3011,9)	0,11	y= (-0,18+ 5) + 0,80x
	248,07 (212,26 - 296,17)	1037,45 (774,38 - 1537,32)	1,34	y= (-0,15+ 5) + 0,66x
	183,67 (155,28 - 212,04)	517,03 (425,03 - 683,71)	2,86	y= (-0,64+ 5) + 2,85x
EMIPC	214,35 (188,30 - 246,28)	684,87 (551,14 - 908,75)	2,06	y= (-5,92+ 5) + 2,54x
	151,76 (132,30 - 173,92)	486,58 (398,41 - 629,18)	0,1	y= (-5,52+ 5) + 2,53x
	127,11 (97,20 - 161,88)	354,44 (263,41 - 565,47)	3,91	y= (-6,05+ 5) + 2,87x
EMFPC	885,30 (495,78 - 6083,6)	4160 (1400,8 - 2737,6)	5,16	y= (-5,62+ 5) + 1,90x
	536,79 N.E	1850,85 N.E	6,08	y= (-6,50+ 5) + 2,38x
	370,49 N.E	739,62 N.E	8,96*	y= (-10,96+ 5) + 4,26x
EMGPC	2335,4 (1108,1 - 1060)	4394 (9907,4 - 1004,7)	2,12	y= (-3,38+ 5) + 1,00x
	774,26 (405,06 - 3995,4)	8927,2 (2267,1 - 5183,8)	3,74	y= (-3,48+ 5) + 1,20x
	370,26 N.E	3163,8 N.E	11,35*	y= (-3,53+ 5) + 1,37x

NE = Não estimado a 95%

*Significativo (p<0,05)

x = log da concentração

EHGPC– Extrato hexânico dos galhos;

EHIPC– Extrato hexânico das inflorescências;

EMIPC - Extrato metanólico das inflorescências;

EMGPC- Extrato metanólico dos galhos;

EMFPC- Extrato metanólico das folhas;

5.2.2.3 Bioensaios de dose com *Anopheles*

Os resultados obtidos nos bioensaios de dose com os extratos de *P. capitarianum* sobre larvas de *Anopheles sp* estão representados na Tabela 10. Os extratos metanólicos das folhas (EMFPC), dos galhos (EMGPC) e das inflorescências (EMIPC), apresentaram atividade larvicida nas duas maiores concentrações testadas (500 e 250µg/mL), com mortalidade de 93% e 56% para extrato (EMFPC), 91% e 66% (EMGPC), 95% e 77% (EMIPC) respectivamente em 24 horas de exposição, sendo que nas demais concentrações a mortalidade foi inferior a 50% na mesma leitura. Estendendo a leitura até 72 horas, a mortalidade aumentou nas maiores concentrações dos extratos, sendo que nas menores mostraram mortalidade insatisfatória e o grupo controle apresentou mortalidade de 2% em 24 e 48 horas e 3% na última leitura (72 horas), sendo que no grupo positivo (inseticida químico), teve mortalidade de 100% após 24 horas de exposição.

Segundo Trindade & Silva, (2009) avaliaram atividade larvicida dos extratos metanólicos das folhas de *Piper tuberculatum* e dos galhos de *Piper alatabaccum* em nove concentrações (5, 10, 25, 50, 125, 250, 500, 750, 1000 µg/mL e controle), em larvas de terceiro instar de *Anopheles darlingi* em condições de laboratório e observaram que ocorreu mortalidade de 100% apenas nas duas maiores concentrações (1000 e 750 µg/mL). Estes resultados são semelhantes aos obtidos com os extratos metanólicos (EMFPC, EMGPC e EMIPC) deste trabalho. Em outras espécies do gênero *Piper* como *Piper aduncum*, *Piper crassinervium*, *Piper cuyabanum*, *Piper diospyrifolium* e *Piper hostmannianum* apresentou efeito moluscida com 100% de mortalidade dos caramujos, em concentrações que variaram de 10 ppm a 60 ppm (RAPADO, 2007).

Medeiros *et al.* (2013) avaliaram atividade larvicida de extratos aquosos e metanólico do cravinho da índia (*Eugenia caryophyllata* THUMBERG) sobre larvas de *Anopheles darlingi*, apresentando mortalidade de 97% e 72% respectivamente, após 24 horas de aplicação na concentração de 100 µg/mL. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os extratos metanólicos (EMFPC, EMGPC e EMPC) de *P. capitarianum*, podem ser promissores como método alternativo no controle de mosquitos vetores da malária, importantes em saúde pública na Amazônia. Para isto, seria necessário a realização bioensaios em campo do ambiente amazônico.

Considerando os valores de mortalidade não acumulativos nos intervalos de leitura de 24, 48 e 72 horas, o maior impacto de mortalidade ocorreu em 24 horas para os todos os extratos testados, sendo que o extrato metanólico da inflorescência (EMIPC), mostrou maior percentual (63%) demonstrando atividade larvicida sobre as larvas de *Anopheles sp* (Figura 17). Nas demais leituras (48 e 72 horas), os extratos (EHIPC, EMFPC e EMGPC) apresentaram mortalidade inferior a 50% em níveis insatisfatórios.

Tabela 10 – Resultados dos bioensaios de dose com extratos de *Piper capitarianum* contra larvas de *Anopheles sp*, do bairro Puraquequara, situado na Zona Leste da cidade de Manaus, exposta em diferente concentrações.

Extratos	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	N (Amostral)	Mortalidade (%)		
			24 h	48 h	72 h
EMFPC	500	100	93	92	94
	250	100	56	61	65
	100	100	20	25	27
	50	100	7	11	14
	25	100	2	4	6
EMGPC	500	100	91	93	95
	250	100	66	79	82
	100	100	15	19	22
	50	100	7	12	16
	25	100	2	3	7
EMIPC	500	100	95	97	99
	250	100	77	81	84
	100	100	21	27	30
	50	100	10	12	16
	25	100	5	6	10
Controle	DMSO	100	0	0	3
Controle positivo	α - Cipermetrina	100	100	100	100

Nos testes foram utilizadas 20 larvas por copo em 5 repetições

Controles: DMSO a 1 %.

Controle Positivo : α - Cipermetrina a 0,04mg/mL;.

EMGPC- Extrato metanólico dos galhos;

EMFPC- Extrato metanólico das folhas;

EMIPC- Extrato metanólico das inflorescências;

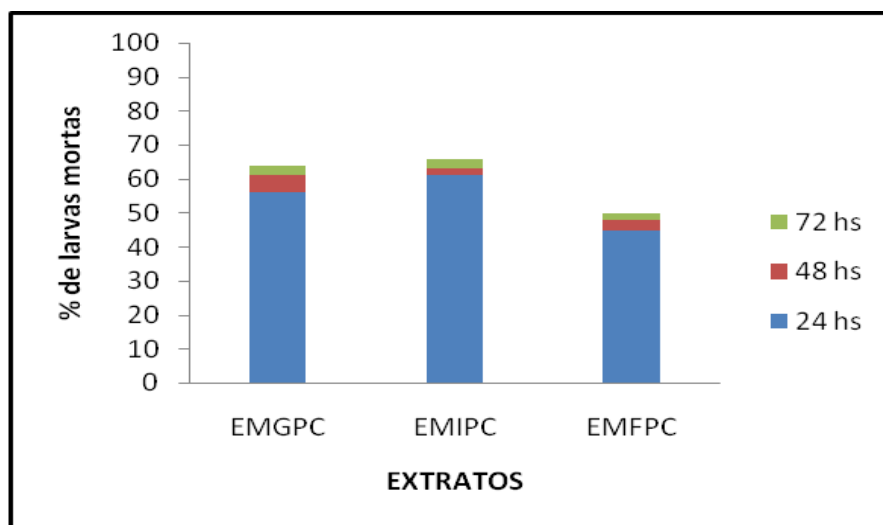


Figura 17. Mortalidade em porcentagem das larvas de *Anopheles sp* nos bioensaios com extratos de *Piper capitarianum*, nos intervalos de leitura.

Em relação aos 3 extratos testados nos bioensaios sobre as larvas de *A. aegypti* do campo nos intervalos de 24, 48 e 72 horas, apenas os extratos metanólicos das folhas (EMFPC) e das inflorescências (EMIPC) se ajustaram á análise de probit, não apresentando diferenças significativas a $g \leq 0,5$. Em relação ao extrato metanólico dos galhos (EMGPC), que não se ajustou, nas leituras de 48 e 72 horas, o Programa POLO PC utilizou o fator de heterogeneidade dos dados para o cálculo da CL_{50} e CL_{90} , dados representados na Tabela 11. Portanto, o extrato metanólico da inflorescência (EMIPC) apresentou os menores valores da CL_{50} (146,91 $\mu\text{g/mL}$, 129,99 $\mu\text{g/mL}$ e 140,23 $\mu\text{g/mL}$) e da CL_{90} (427,76 $\mu\text{g/mL}$, 376,23 $\mu\text{g/mL}$ e 307,39 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente nas leituras de 24, 48 e 72 horas, com intervalos de confiança de 95%. Estes dado mostram que as larvas de terceiro instar de *Anopheles sp* são susceptíveis dependendo de suas espécies e das condições ambientais como a alta umidade relativa do ar , que pode prejudicar o andamento dos bioensaios em campo.

Tabela 11 – Valores de CL₅₀ e CL₉₀ dos extratos de *P. capitarianum* contra larvas de *Anopheles sp.*, após 24, 48 72 horas de aplicação.

Extratos	CL ₅₀ (IC 95%)	CL ₉₀ (IC 95%)	X ²	Equação de regressão y=(a+5) + b.log x
	188,66 (138,01 - 270,40)	557,90 (364,20 - 1246,74)	7,10	y= (-6,19 + 5) + 2,72x
EMFPC	168,94 (126,59 - 234,41)	574,06 (376,68 - 1193,98)	5,4	y= (-5,37 + 5) + 2,41x
	169,95 (116,55 - 222,49)	488,68 (352,22 - 924,47)	3,82	y= (-6,22 + 5) + 2,79x
	184,18 (136,56 - 257,03)	519,26 (349,51 - 1063,68)	6,79	y= (-6,44 + 5) + 2,84x
EMGPC	150,19 (101,14 - 233,44)	431,88 (268,16 - 1172,63)	11,1*	y= (-6,09+ 5) + 2,79x
	154,80 (88,17 - 208,01)	372,83 (272,31 - 760,46)	9,76*	y= (-7,35+ 5) + 3,3x
	146,91 (94,11 - 244,58)	427,76 (254,20 - 1425,78)	13,6	y= (-5,98+ 5) + 2,76x
EMIPC	129,99 (86,06 - 205,68)	376,23 (230,90 - 1080,74)	12	y= (-5,87+ 5) + 2,77x
	140,23 (69,81 - 192,27)	307,39 (222,11 - 718,47)	6,64	y= (-8,07+ 5) + 3,76x

NE = Não estimado a 95%

*Significativo (p<0,05)

x = log da concentração

EMIPC - Extrato metanólico das inflorescências;

EMGPC- Extrato metanólico dos galhos;

EMFPC- Extrato metanólico das folhas;

A atividade larvicida do extrato metanólico da inflorescência de *P. capitarianum* (EMIPC) sobre as larvas *A. aegypti* da cepa Rockefeller, *A. aegypti* (campo) e *Anopheles* sp, comparadas por meio das retas de regressão linear está representada graficamente na Figura 18. Comparando-se os resultados obtidos nas três modalidades de testes, observa-se que as larvas da cepa Rockefeller mostraram-se mais susceptíveis ao extrato, do que as larvas do *A. aegypti* do campo e das larvas de anofelinos. Estes resultados podem ser interpretados como decorrentes da pressão de seleção que as ações de controle, tanto da dengue como da malária, exercem no ambiente, e de forma maior sobre os anofelinos. As constantes aplicações de inseticidas químicos em campo, objetivando o controle tanto da Dengue como da Malária, em doses cada vez mais elevadas, resultam em uma pressão de seleção maior no ambiente, o que resulta em linhagens com resistência aos inseticidas, em algumas espécies de insetos (Braga e Valle 2007).

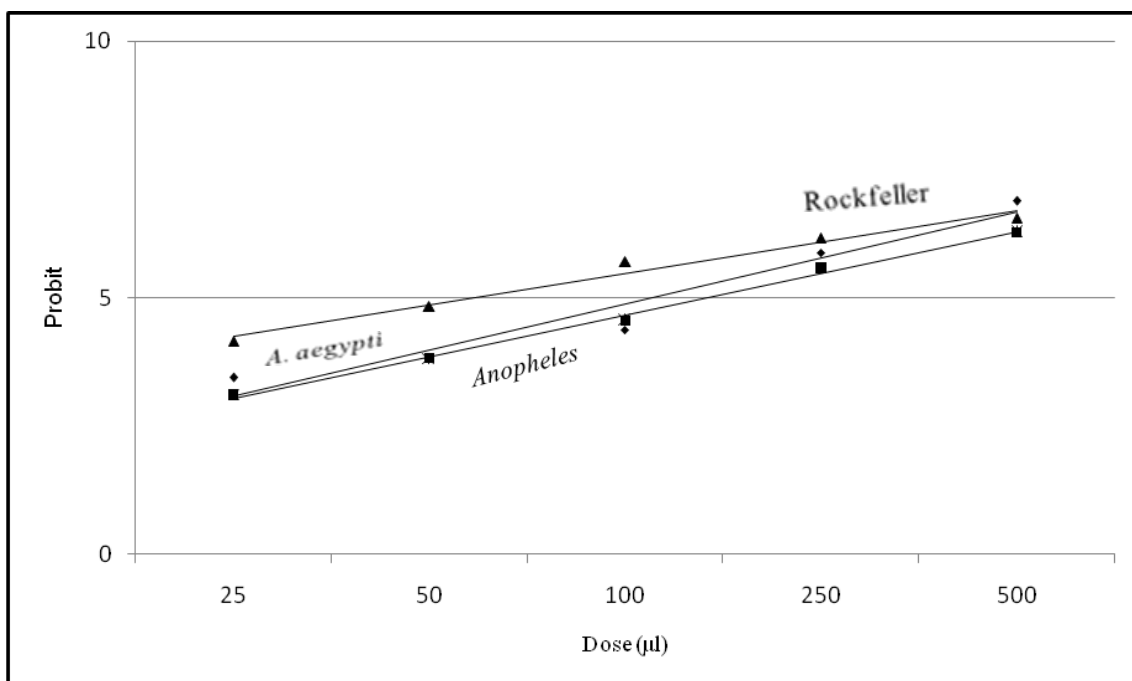


Figura 18. Reta de regressão linear dose-probit obtida nos bioensaios com extrato metanólico da inflorescência (EMIPC) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Rockefeller), *Aedes aegypti* (campo) e *Anopheles* sp .

Diante dos resultados obtidos dos bioensaios, para as três modalidades de teste, observa-se que o extrato EMIPC foi o mais promissor, mostrando potencial para contribuir em programas de controle de insetos vetores de patógenos. Nesta ótica, será necessário o fracionamento destes extratos para a identificação do(s) princípio(s) ativo(s) presente(s), objetivando ações direcionadas para um controle mais efetivo.

Neste sentido, a etapa seguinte deste estudo foi conduzida para avaliar o perfil químico, por diferentes técnicas cromatográficas, com o intuito de identificar compostos responsáveis por essa atividade inseticida, presentes no vegetal.

5.3 Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *Piper capitarianum*

5.3.1 Bioensaios seletivos

Os resultados dos bioensaios seletivos com óleo essencial de *P. capitarianum* sobre larvas de *A. aegypti* da cepa Rockefeller, *A. aegypti* (campo) e *Anopheles* sp. estão representados na Tabela 12. O óleo essencial (OSFPC) foi testado seletivamente para detectar a sua toxicidade com o critério de mortalidade de 50%. Considerando a mortalidade das larvas nos bioensaios, observa-se que as larvas de *A. aegypti* da cepa Rockefeller e do *A. aegypti* de campo, apresentaram maiores mortalidades (100%) em 24 horas de exposição, comparadas com as larvas de anofelinos que apresentaram 95% de mortalidade, na mesma leitura (24 horas), tornando todas as espécies testadas suscetíveis ao óleo essencial de *P. capitarianum*.

Desta forma, o óleo essencial (OSFPC) foi selecionado para os bioensaios de dose e determinar as concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀).

Tabela 12 – Resultados dos bioensaios seletivos com óleo essencial de *Piper capitarianum* (OSFPC) contra larvas de *Aedes aegypti* da cepa (Rockfeller), *Aedes aegypti* (campo) e *Anopheles* sp.

População	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	N (Amostral)	Mortalidade (%)		
			24 h	48 h	72 h
Rockfeller	500	60	100	100	100
	DMSO	60	0	0	3
	Teméfós	60	100	100	100
<i>Aedes aegypti</i>	500	60	100	100	100
	DMSO	60	0	2	4
	Teméfós	60	100	100	100
<i>Anopheles</i> sp.	500	60	95	98	100
	DMSO	60	0	1	2
	α -cipermetrina	60	99	100	100

Nos testes foram utilizadas 20 larvas por copo em triplicata;

Controles: DMSO a 1 %.

Controle Positivo : Temefos a 0,012mg/mL e α -cipermetrina a 0,04mg/mL

5.3.2 Bioensaios dose

Os resultados obtidos nos bioensaios de dose com óleo essencial das folhas de *P. capitarianum* sobre larvas de *A. aegypti* da cepa (Rockfeller), *A. aegypti* (campo) e *Anopheles* sp, expostas em diferente concentrações estão representados na Tabela 13. O óleo essencial (OSFPC) mostrou atividade larvicida nas duas maiores concentrações (500 e 250 $\mu\text{g/mL}$), testadas para as larvas da cepa Rockfeller com mortalidade 100%, após 24h de exposição. As larvas de *A. aegypti* (campo) apresentaram mortalidade de 100% e 72% respectivamente, nas concentrações de 500 e 250 $\mu\text{g/mL}$ na mesma leitura (24 horas). As larvas de anofelinos apresentaram mortalidade de 100% e 95% nas mesmas concentrações após 72 horas de exposição, sendo que as menores concentrações (100, 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$) não mostraram mortalidade em níveis satisfatórios. O controle negativo apresentou mortalidade de 3% na ultima leitura (72 horas), e o

controle positivo (inseticida químico) teve mortalidade de 100% após 24 horas de exposição. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Oliveira *et al.* (2012) que analisaram o óleo essencial das folhas de *P. aduncum* e verificou a atividade larvicida contra as larvas de *A. aegypti*, com uma de mortalidade de 100% após 24h de exposição, nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL. Provavelmente a mortalidade das larvas ocorreu pela presença do fenilpropanóide dilapiol, encontrado nessa planta e que foi isolado por Oliveira *et al.* (2004), o qual possui atividade inseticida (FAZOLIN *et al.*, 2005)

Portanto os resultados obtidos neste trabalho mostram que as larvas são susceptíveis aos constituintes químicos presentes no óleo essencial das folhas *P. capitarianum* nas concentrações de 500 e 250 µg/mL e a sua utilização pode ser considerada uma alternativa importante para o controle dos mosquitos, uma vez que são biodegradáveis e não prejudica o meio ambiente.

Tabela 13 – Resultados dos bioensaios de dose com óleo essencial *Piper capitarianum* contra larvas de *Aedes aegypti* da cepa (Rockfeller), *Aedes aegypti* (campo) e *Anopheles* sp, exposta em diferentes concentrações.

População	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	N (Amostral)	Mortalidade (%)		
			24 h	48 h	72 h
CEPA Rockfeller	500	100	100	100	100
	250	100	100	100	100
	100	100	27	31	38
	50	100	11	16	20
	25	100	0	4	8
<i>Aedes aegypti</i> (campo)	500	100	100	100	100
	250	100	72	81	91
	100	100	11	17	25
	50	100	4	6	9
	25	100	0	2	4
<i>Anopheles</i> sp	500	100	98	99	100
	250	100	84	90	95
	100	100	22	25	30
	50	100	6	8	12
	25	100	2	5	8
Controle	DMSO	100	0	0	3
Controle positivo	TEMEFÓS	100	100	100	100
Controle positivo	α -cipermetrina	100	100	100	100

Nos testes foram utilizadas 20 larvas por copo em 5 repetições;

Controles: DMSO a 1 %.

Controle Positivo: Temefos a 0,012mg/mL e α -cipermetrina a 0,04mg/mL

Os resultados dos valores da CL₅₀ e CL₉₀ do óleo essencial das folhas de *P. capitarianum* contra larvas de *A. aegypti* da cepa (Rockfeller), *A. aegypti* (campo) e *Anopheles sp.*, após 24, 48 e 72 horas de aplicação estão na Tabela 14. Os dados obtidos das três espécies testadas, apenas as larvas de Rockfeller não se ajustaram a análise de probit, nas leituras de 24, 48 e 72 horas sendo que não foram suficientes para o cálculo da CL₅₀ e CL₉₀. Portanto os menores valores CL₅₀ foram (141,45 µg/mL, 123,86 µg/mL e 129,85 µg/mL e CL₉₀ (325,86 µg/mL, 298,48 µg/mL e 221,20 µg/mL), para as larvas de anofelinos nas leitura de 24, 48 e 72 horas com intervalos de confiança de 95%, tornando susceptíveis ao óleo essencial das folhas de *P. capitarianum*.

Segundo Tabanca *et al.* (2013) o óleo essencial de louro (*Laurus nobilis*) apresentou CL₅₀ de 117 µg/mL sobre as larvas de *Culex pipiens*, e também apresentou CL₅₀ de 167,9 µg/mL contra as larvas de *A. aegypti* em 24 h de exposição, demonstrando similaridades com os resultados obtidos na população de *A. aegypti* e *Anopheles* que apresentaram valores aproximados de CL₅₀ 173,04 e 141,45 µg/mL respectivamente na mesma leitura (24 horas). A mesma ação também foi observada no trabalho realizado por Fazolin *et al.* (2005) em insetos fitófagos da ordem Coleoptera (adultos de *Cerotoma tingomarianus*), quando utilizou o óleo essencial extraído de folhas e ramos secundários dessa planta.

Outros estudos realizados por Santos *et al.* (2013) demonstraram que a CL₅₀ do óleo essencial de *S. terebinthifolia* foi 117,34 µg/mL sobre as pragas do café (*Hypothenemus hampei*) o que fez não corresponder ao valor encontrado nos mosquitos testados neste trabalho.

Tabela 14. Os valores da CL₅₀ e CL₉₀ do óleo essencial das folhas de *Piper capitarianum* contra larvas de *Aedes aegypti* da cepa Rockefeller, *Aedes aegypti* (campo) e *Anopheles sp*, após 24, 48 e 72 horas de aplicação.

População	CL ₅₀ (IC 95%)	CL ₉₀ (IC 95%)	X ²	Equação de regressão y=(a+5) + b.log x
Rockefeller	110,69 NE	203,35 NE	22,2*	y= (-9,91 + 5) + 4,85x
	100,75 NE	220,43 NE	29,9*	y= (-7,55 + 5) + 3,76x
	111,07 NE	145,50 NE	16,4*	y= (-22,3+ 5) + 10,9x
<i>A.aegypti</i>	173,04 (120,74 - 251,75)	347,77 (241,50 - 792,33)	12,16	y= (-9,46+ 5) + 4,22x
	163,07 (128,17 - 195,10)	295,77 (242,36 - 419,41)	3,44	y= (-10,96+ 5) + 4,95x
	139,10 (109,74 - 165,48)	246,87 (203,61 - 347,61)	3,04	y= (-11,02+ 5) + 5,14x
<i>Anopheles sp.</i>	141,45 (100,61 -203,89)	325,86 (221,93 - 700,07)	10,3	y= (-7,60+ 5) + 3,53x
	123,86 (65,92 - 266,99)	298,48 (167,02 - 2329,22)	26,4	y= (-7,02+ 5) + 3,35x
	129,85 (91,58 - 162,86)	221,20 (174,58 - 388,29)	4,94	y= (-11,7+ 5) + 5,53x

NE= Não estimado a 95%

*Significativo (p<0,05)

x = log da concentração

A atividade larvicida do óleo essencial das folhas de *P. capitarianum* (OSFPC) sobre as larvas *A. aegypti* da cepa Rockefeller, *A. aegypti* (campo) e *Anopheles sp*, comparadas por meio das retas de regressão linear representada graficamente na Figura 19. Comparando-se as três espécies testadas, observa-se que as larvas da cepa Rockefeller mostraram-se mais susceptíveis ao óleo essencial do que as demais espécies que apresentaram respostas semelhantes qualitativamente. Portanto, os dados de mortalidade observada obtidos nos bioensaios foram diferentes significativamente das mortalidades esperadas, calculada pelo programa POLO PC, utilizada na construção das retas de regressão linear.

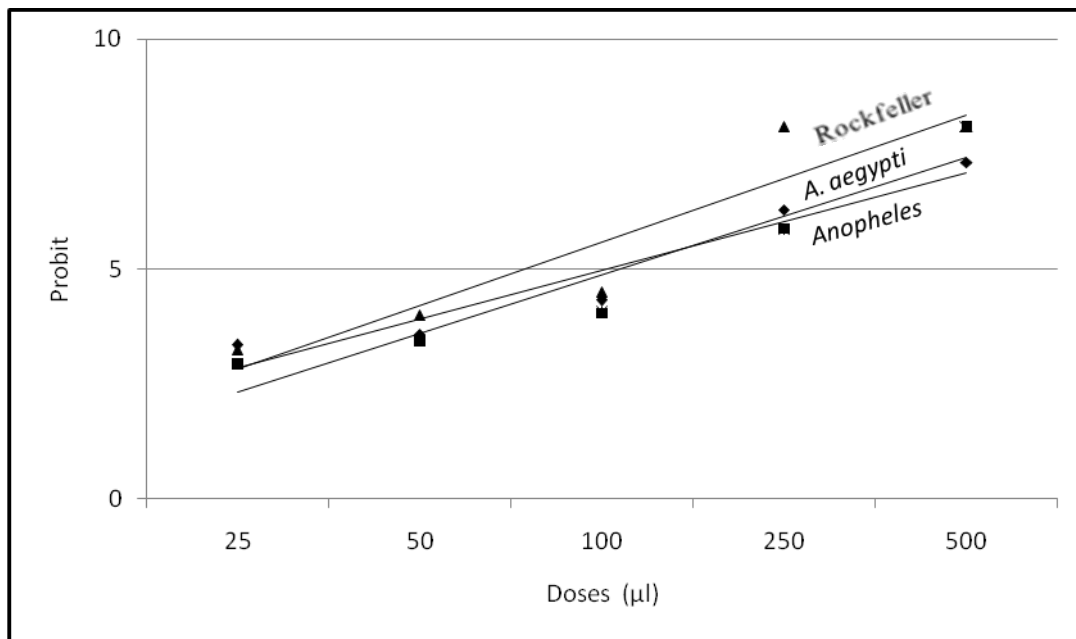


Figura 19. Reta de regressão linear dose-probit obtida nos bioensaios com óleo essencial (OSFPC) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Rockfeller), *Aedes aegypti* (campo) e *Anopheles sp.*

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Capítulo 2 – AVALIAÇÕES QUÍMICAS

5.4 Análise cromatográfica em camada Delgada -CCD

5.4.1 Perfil cromatográfico dos extratos por CDD.

Os extratos que apresentaram atividade larvicida contra as larvas das três espécies de mosquitos testadas, comprovadas pelos bioensaios, foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD). Os perfis cromatográficos dos extratos de *P. capitarianum*, foram obtidos utilizando cromatoplasmas de sílica normal (SiO₂) com suporte de alumínio como fase estacionária e na fase móvel a mistura dos eluentes hexano e acetato de etila na proporção 7:2 (Figura 20). Os reveladores químicos utilizados nas placas de CCD para a revelação das classes de substâncias presentes nos extratos de acordo com sua coloração sendo visualizadas na luz normal e UV (365 e 254 nm) estão descritos na Tabela 15 (WAGNER, 1996).

Tabela 15. Reveladores químicos utilizados placas de CCD para avaliação do perfil dos extratos de *Piper capitarianum*

Revelador	Classe Química	Coloração
Dragendorff	Alcalóides	Laranja ou Marron
KOH	Antraquinonas	Vermelho
	Cumarinas	Azul (UV - 365 mn)
Vanilina Sulfúrica	Saponinas	Vermelho ou Marron
	Esteróides	Amarela
NP/ PEG	Flavonóides	Verde ou Laranja
Anisaldeido	Terpenos	Lilás ou Rosa

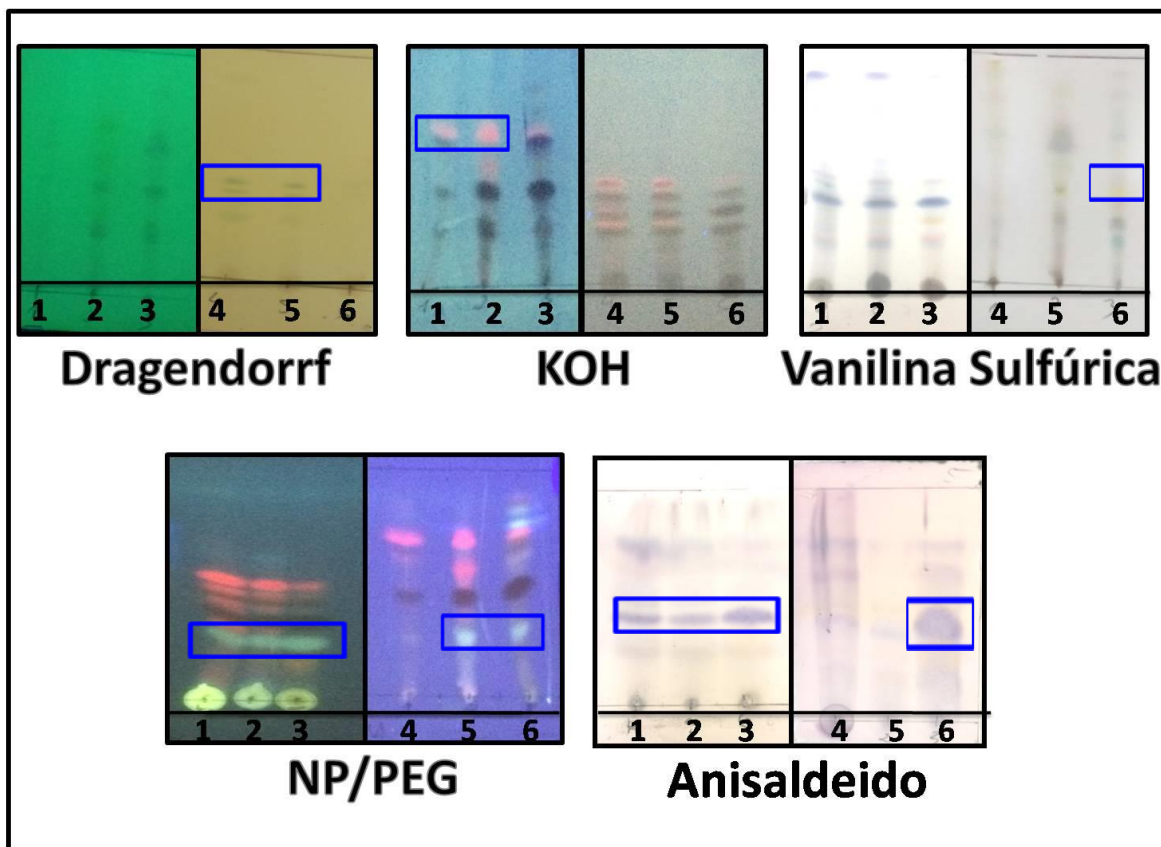


Figura 20. Perfil cromatográfico dos extratos de *Piper capitarianum* por CDD.

Observando primeiramente a placa revelada com dragendorff, é possível notar que nos extratos EMFPC (4) e EMGPC (5), existem uma intensa banda marrom, com o mesmo RF, indicando a presença de alcalóides, sendo que o revelador é específico para essa classe química, que reage quimicamente com o grupo amina presente na sua constituição. Portanto, os demais extratos avaliados não apresentaram compostos alcaloídicos em sua constituição química.

Analisando as placas reveladas com KOH, observam-se uma banda de coloração avermelhada nos extratos EHFPC (1) e EHGPC (2), características de compostos fenólicos, possivelmente da classe antroquinonas, sendo que os demais extratos não apresentam essa característica em sua constituição. Já nas placas reveladas com vanilina sulfúrica, foi possível identificar a classe química esteróides no extrato EMIPC (6), devido à presença da coloração amarela.

As placas reveladas com NP/PEG têm a função de identificar compostos da classe flavonóides, que apresentaram bandas de coloração esverdeadas com o mesmo RF nos extratos EHFPC (1), EHGPC (2), EHIPC (3), EMGPC (5) e EMIPC (6), que foram visualizadas sobre a luz UV (365 nm), que possivelmente são anéis aromáticos, indicando a presença da classe flavonóides.

O anisaldeído é um revelador universal, sendo que nas placas foi possível observar a presença da classe terpenos para os extratos EHFPC (1), EHGPC (2), EHIPC (3) e EMIPC (6), devido a intensa banda de coloração rosa, característica de hidrocarbonetos com ligações duplas presente em sua constituição. Os extratos foram numerados nas placas de CCD, conforme Tabela 16, demonstrando suas respectivas classes químicas identificadas.

Tabela 16. Classes químicas identificadas nos extratos de *Piper capitarianum* em placas de CCD,

Numeração	Extratos	Classes químicas
1	EHFPC	Antraquinonas, Flavonóides, Terpenos
2	EHGPC	Antraquinonas, Flavonóides, Terpenos
3	EHIPC	Flavonóides, Terpenos
4	EMFPC	Alcalóides
5	EMGPC	Alcalóides, Flavonóides
6	EMIPC	Esteroides, Flavonóides, Terpenos

Dentre as classes de substâncias identificadas nos extratos, encontram-se os terpenos, alcalóides e flavonóides considerados os principais grupos de metabólitos das plantas, responsáveis pela atividade inseticida em vários insetos (PARMAR et al., 1997; AHMAD et al., 2012; SIMAS et al., 2004). Os terpenos, encontrados nos óleos essenciais de espécies do gênero *Piper*, como o limonene, α -phellandrene, mirceno entre outros, apresentam atividade inseticida contra larvas de *A. aegypti* (TAWATSIN et al., 2006; LARA JUNIOR et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2013). Aparentemente sua ação inseticida seria decorrente da inibição dos receptores específicos da acetilcolinesterase nos insetos, provocando paralisia e morte (CASIDA, 2011).

Os alcalóides naturais encontrados no gênero *Piper*, foram isolados de espécies como: *Piper longum*, *Piper nigrum*, *Piper chaba*, *Piper retrofractum* e *Piper officinarum*, resultando no isolamento de 145 alcalóides que apresentam diversas atividades biológicas como antibacteriano, antifúngico, antiinflamatório, antimalárico e inseticida (PARMAR, et al., 1997; LEAL, 2000; MARTINS, et al., 2000; YOUYOU, 2011; PINTO et al., 2012). Portanto os alcalóides são substâncias orgânicas que possuem sua estrutura molecular compostos nitrogenados (NO_2) que forma parte de um anel heterocíclico provenientes dos aminoácidos, que contribuem para a atividade inseticida por meio da interação com receptores biológicos (MENEZES, 2005; HONG-FEI et al., 2010).

Os flavonóides por sua vez, atuam como antioxidantes ao se ligarem em resíduos oxidativos, moléculas importantes para todos os seres vivos, como enzimas, proteínas, hormônios e demais compostos denominados por radicais livres, que apresentam diversas propriedades tais como antiinflamatório, antimicrobiana, anti-hemorrágica, anti-alérgica, inseticida (COSTA et al., 2004; KWEKA et al., 2008; RATHI et al., 2008). A classe flavonóides constitui um grupo de pigmentos vegetais, oriundos da via

biossintética do ácido acético e ácido chiquímico, os quais são amplamente distribuídos na natureza sendo que esta relacionada à atividade inseticida (PINTO, et al., 2002). Em trabalho de revisão química do gênero *Piper*, verificou que já foram isoladas 7 flavononas e 17 flavonas (PARMAR, et al., 1997). Portanto poucos flavonóides têm sido isolados de espécies de *Piper*, e sua relação com atividades biológicas comparadas a demais famílias de vegetais.

5.5 Avaliação do perfil cromatográfico por CG-EM

5.5.1 Identificação dos constituintes químicos presente no óleo essencial das folhas de *Piper capitarianum* (OSFPC)

A composição química do óleo essencial obtido das folhas de *P. capitarianum* (OSFPC), em ordem crescente de seus índices de retenção consta na Tabela 17, sendo identificados 28 compostos voláteis, dos quais são 5 monoterpenos (17,03%) e 23 sesquiterpenos (78,13%) correspondendo a um total de 95% dos constituintes identificados, através da comparação dos fragmentos espectrométricos considerando índice de similaridade de 90%.

Os componentes majoritários identificados do óleo de essencial foram sesquiterpeno não oxigenado β -cariofileno (34,08%), seguido do β -mirceno (13,77%) e do α -humuleno (13,32%). Considerando um valor de área maior que 2%, registram-se os constituintes γ -muuroleno (8,17%), β -selineno (4,19%), E-nerolidol (3,15%), β -elemeno (2,84%) e limoneno (2,28%), como pode ser observado nos picos de maior intensidade no cromatograma de íons totais obtido do óleo essencial de *P. capitarianum* (Figura 21).

Dentre os constituintes voláteis majoritários identificados, o sesquiterpeno não oxigenado β -cariofileno (34,08%), foi isolados em varias espécies vegetais, sendo

descrito na literatura por apresentar diversas atividades biológicas tais como antimicrobiana, antitumoral, antiinflamatório e inseticida (MARTIN et al., 1993; COLE et al., 2007; AL-BAYATI, 2008; SILVA et al., 2010). Segundo SANTOS et al., (2013) relatam que os principais componentes majoritários β -cariofileno, limoneno, β -mirceno e β -elemeno, presente no óleo essencial das folhas de *S. terebinthifolius* (Anacardiaceae) apresentaram mortalidade 100% sobre as larvas de *A. aegypti* após 24 horas de exposição, demonstrando similaridades com os resultados deste trabalho. Por outro lado, os constituintes químicos presentes nos óleos essenciais, como fenilpropanóides, eugenol, E-nerolidol, safrol, α -pineno e timol, são considerados compostos úteis para o controle do mosquito da dengue. (CARVALHO et al., 2003; CAVALCANTI et al., 2004; SIMAS et al., 2004; MORAIS et al., 2006). Dos óleos de essenciais de *Piper glandulosissimum*, foram identificados 66 voláteis, sendo que seu componente majoritário foi o β -cariofileno (folhas 9,3%; e caule 12,3%), semelhantes ao encontrados neste trabalho (ANDRADE & ZOGHBI, 2007). Em outras espécies do gênero *Piper*, conhecida como pimenta longa na região Amazônica, onde foram identificados os compostos oxido cariofileno e β -cariofileno como majoritários do óleo essencial extraído de suas folhas (FACUNDO et al., 2006).

Considerando os resultados obtidos nesta dissertação com a literatura, foi possível observar que os sesquiterpenos são predominantes na maioria dos óleos essenciais estudados e neste trabalho representa cerca 78% dos voláteis, que apresentam atividade inseticida contra os vetores da dengue e malária, podendo agir por contato e ingestão, ligando-se a enzima acetilcolinesterase que interfere no mecanismo de transmissão neuronal, ocasionando paralisia e morte do inseto (BRAGA e VALLE, 2007). Portanto é possível que atividade inseticida apresentada neste trabalho, seja pela ação do componente majoritário β -cariofileno, sendo que só poderá ser comprovada

quando for testado isoladamente e seu mecanismo de ação também for avaliado. Apesar disso, os constituintes responsáveis pela atividade biológica dos óleos essenciais nem sempre está relacionada ao composto majoritário podendo agir em conjunto com os componentes minoritários pelo fenômeno denominado sinergismo, sendo que para as afirmações sejam feitas a respeito do composto responsável pela atividade, é necessário que estes sejam avaliados separadamente.

Tabela 17. Constituintes químicos identificados no óleo essencial das folhas de *Piper capitarianum* por CG-EM.

Numeração	Constituintes	IR _{calc}	IR _{lit}	Área (%)
1	α -tujeno	926	924	00,8
2	α -pineno	933	932	0,48
3	β -pineno	977	974	0,42
4	β -mirceno	990	988	13,77
5	Limoneno	1028	1024	2,28
6	δ -elemeno	1338	1335	0,42
7	α -cubebeno	1351	1348	0,11
8	α -ylangeno	1373	1373	0,15
9	α -copaeno	1377	1374	0,47
10	β - elemeno	1393	1389	2,84
11	β -cariofileno	1422	1417	34,08
12	β -copaeno	1430	1430	0,68
13	α -guaiano	1434	1437	0,32
14	α -humuleno	1455	1452	13,32
15	Allo-aromadendreno	1462	1458	0,06
16	4,5-di-epi-aristolocheno	1471	1471	0,43
17	γ -muuroleno	1482	1478	8,17
18	Germacreno-D	1487	1480	3,06
19	β -selineno	1496	1489	4,19
21	γ -amorpheleno	1501	1495	0,32
22	α -selineno	1507	1498	0,65
23	δ -cadineno	1524	1522	1,22
24	α -calacoreno	1543	1544	1,31
25	E-nerolidol	1564	1561	3,15
26	Óxido de cariofileno	1584	1581	1,71
27	Óxido de humeleno	1549	1608	0,53
28	α -cadinol	1655	1652	0,27
Monoterpenos		-	-	17,03
Sesquiterpenos		-	-	78,13
Total identificado				95,16

IR_{calc}= Índice de retenção calculado , IR_{lit} = Índice de Retenção descrito na Literatura (ADAMS, 2007).

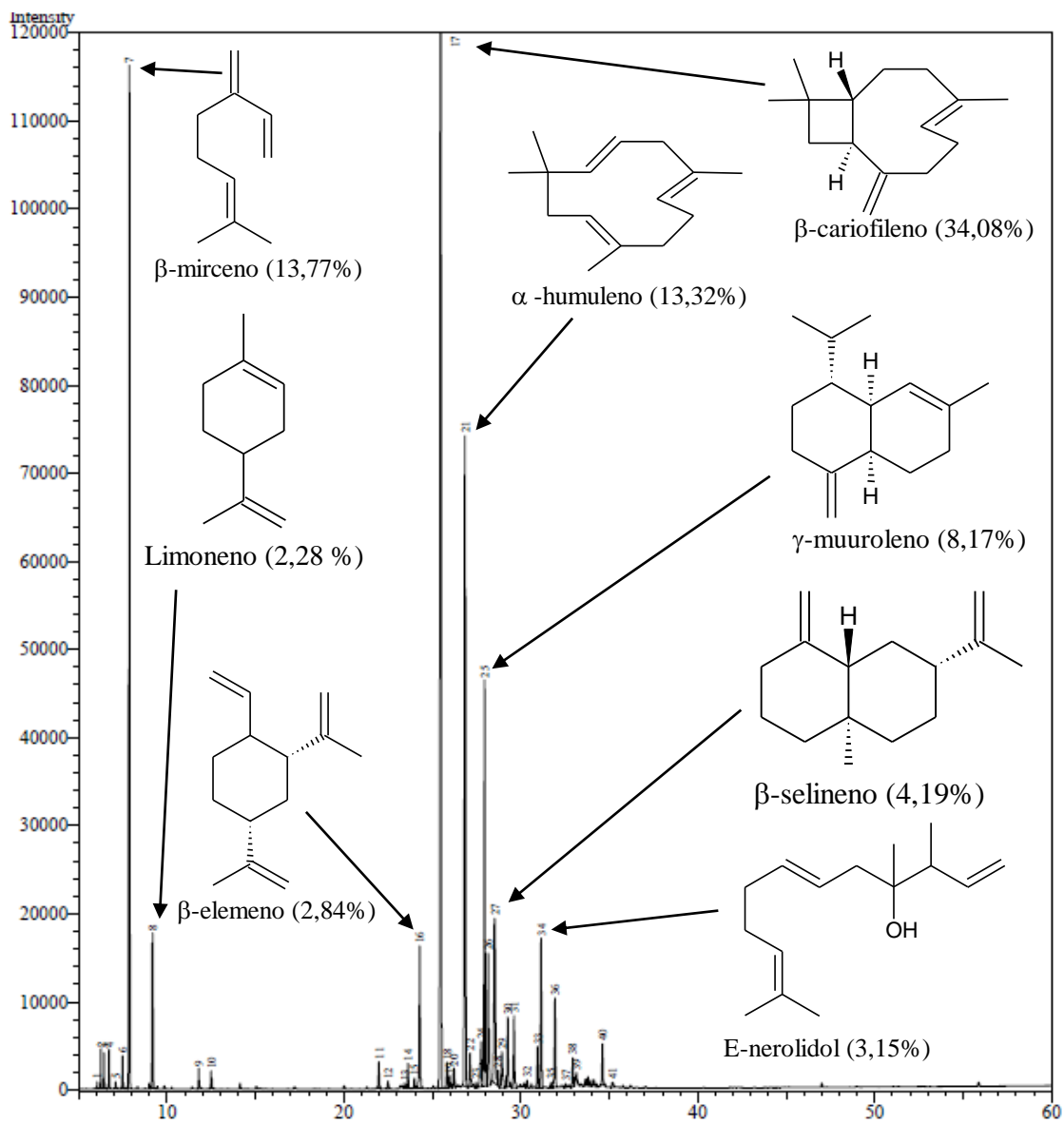


Figura 21. Cromatograma de íons totais obtido do óleo essencial das folhas de *Piper capitarianum* (OSFPC).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Capítulo 3 – FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS

Os resultados obtidos dos bioensaios realizados anteriormente, apenas o extrato (EMIPC), foi selecionado para fracionamento cromatográfico devido sua atividade larvívica contra as larvas de *A. aegypti* da cepa Rockefeller, *A. aegypti* (campo) e *Anopheles* sp, em condições de laboratório.

5.6 Fracionamento cromatográfico do extrato EMIPC

O extrato metanólico das inflorescências de *Piper capitarianum* (EMIPC), foi submetido ao fracionamento por cromatografia em coluna, utilizando sílica normal (SiO_2) como fase estacionária e na fase móvel a mistura dos eluentes (Hexano /Acetona (8:2), (7:3), (6:4), (1:1), seguido da acetona 100% e no final metanol 100% respectivamente. Neste procedimento cromatográfico foi utilizado 8,32g do extrato EMIPC, resultando em 134 frações, sendo que apenas 8 frações apresentaram atividade larvívica contra *A. aegypti* e *Anopheles* sp e foram reunidas por cromatografia em camada delgada-CCD com seus respectivos rendimentos conforme a Figura 22.

Nas frações 20-22 e 50-54, ocorreu a formação de cristais amarelados, sendo recristalizadas em CHCl_3 e foram caracterizados por métodos espectroscópicos de RMN ^{13}C e ^1H . Após a análise, as frações 20 e 50 resultaram no isolamento de dois compostos denominados ISOLADOS A e B, respectivamente que ainda estão em fase de análise dos espectros para identificação e elucidação estrutural das moléculas isoladas.

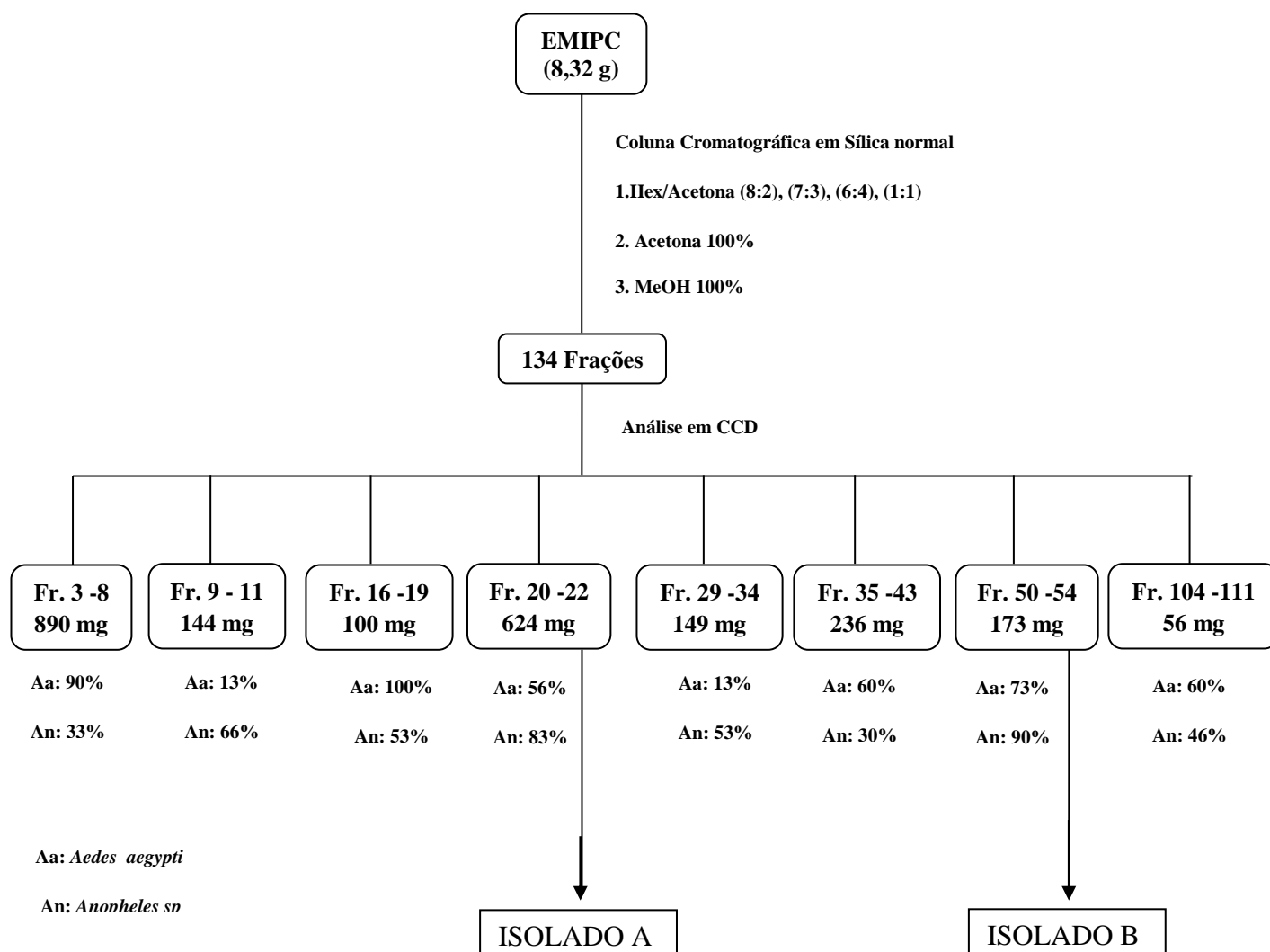


Figura 22. Fracionamento cromatográfico do extrato EMIPC de *Piper capitarianum* e resultados dos bioensaios (500µg/mL) em 48 horas de exposição das frações obtidas sobre as larvas de *Aedes aegypti* e *Anopheles sp.* em condições de laboratório.

As frações foram avaliadas através de CCD com os mesmos reveladores químicos utilizados na avaliação dos extratos ativos (Figura 23). Quando reveladas com vanilina sulfúrica, as frações 1 e 2 apresentam bandas de coloração amarelas e roxas, indicando a presença de esteróides e compostos aromáticos. A revelação com KOH, não apresentaram bandas de coloração vermelha e azul, portanto não indicou a presença de classes químicas nas frações. As placas reveladas com NP/PEG, apresentaram intensa

bandas alaranjadas nas frações 3, 4, 5 e 6 com mesmo RF, indicando a presença de flavonóides.

A avaliação das frações de EMIPC em dragendorff, não indicou a presença de compostos alcaloídicos nas frações. Apesar disso, as placas reveladas com anisaldeido, foi possível observar a presença da classe terpenos para as frações 5, 6 e 7 devido aparecimento da banda de coloração rosa, que podem estar relacionados a atividade larvicida neste extrato. Portanto, as frações foram numeradas nas placas de CCD, conforme Tabela 18, demonstrando suas respectivas classes químicas identificadas.

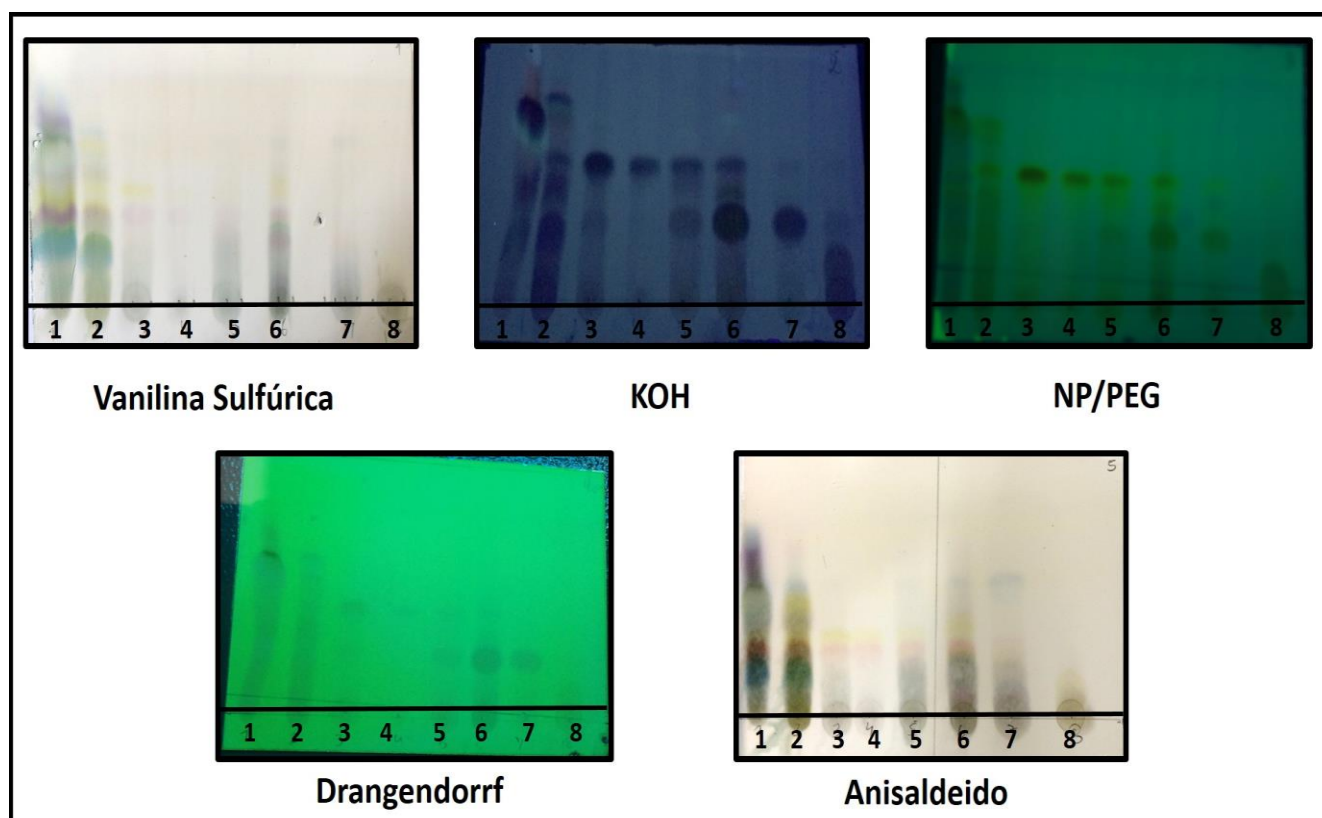


Figura 23. Perfil cromatográfico das frações ativas do extrato metanólico da inflorescência (EMIPC) por CDD.

Tabela 18 – Classes químicas identificadas nas frações do extrato metanólico da inflorescência (EMIPC) em placas de CCD.

Numeração	Frações	Código das frações	Classes químicas
1	3-8	EMI-A	Esteróides
2	9-11	EMI-B	Esteróides
3	16-19	EMI-D	Flavonóides
4	20-22	ISOLADO-A	Flavonóides
5	29-34	EMI-I	Flavonóides, Terpenos
6	35-47	EMI-J	Flavonóides, Terpenos
7	50-54	ISOLADO-B	Terpenos
8	104-111	EMI-T	Não identificado

5.7 Atividade larvicida das frações obtidas do extrato EMIPC

5.7.1 Bioensaios seletivos

Os resultados dos bioensaios seletivos com as frações do extrato EMIPC sobre larvas de *A.aegypti* (campo) e *Anopheles* sp. estão representados na Tabela 19. Das 134 frações testadas seletivamente para detectar a toxicidade considerando mortalidade acima 50%, apenas 6 frações mostraram atividade larvicida sobre larvas de *A. aegypti*, com mortalidade de 100% para as frações 3-8(EMI-A) e 16-19(EMI-D) após 72 horas de aplicação, com exceção das demais que apresentaram mortalidade de 66% para as frações 20-22(ISOLADO-A) e 35-77(EMI-J) e 76% para as frações 50-55(ISOLADO-B) e 104-111(EMI-T), na mesma leitura.

Para as larvas de anofelinos apenas as frações 3-8(EMI-A), 9-11(EMI-B), 16-19(EMI-D), 20-22(ISOLADO-A), 29-34(EMI-I) e 50-55(ISOLADO-B) apresentaram atividade larvicida com mortalidade de 56%, 66%, 70%, 100%, 53% e 96%, respectivamente, após 72 horas de exposição, sendo que os compostos isolados (A e B) apresentaram maior percentual de mortalidade comparados as demais frações do extrato EMIPC. O controles (DMSO e H₂O) registraram mortalidade inferior ou igual a 3%, na leitura de 72 horas, sendo que no grupo positivo (inseticida químico), teve mortalidade de 100% após 24 horas de exposição.

Desta forma, as frações 3-8(EMI-A), 9-11(EMI-B), 16-19(EMI-D), 20-22(ISOLADO-A), 29-34(EMI-I), 35-77(EMI-J), 50-55(ISOLADO-B) e 104-111(EMI-T) foram selecionados para os bioensaios de dose para determinar a concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀).

Tabela 19 – Resultados dos bioensaios seletivos com frações do extrato metanólico da inflorescência (EMIPC) contra larvas de *Aedes aegypti* (campo) e *Anopheles* sp.

Frações	Código das frações	<i>Aedes aegypti</i>			<i>Anopheles</i> sp		
		Mortalidade (%)			Mortalidade (%)		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
3-8	EMI-A	90	100	100	23	33	56
9-11	EMI-B	3	13	16	33	50	66
12-15	EMI-C	6	33	40	33	40	46
16-19	EMI-D	100	100	100	43	53	70
20	ISOLADO-A	23	56	66	83	96	100
29-34	EMI-I	0	13	20	36	50	53
35-43	EMI-J	26	60	66	6	23	30
50	ISOLADO-B	66	73	76	86	90	96
61-67	EMI-O	0	10	13	3	10	16
68-75	EMI-P	0	6	16	-	-	-
76-86	EMI-Q	0	3	6	20	23	36
87-100	EMI-R	10	20	7	36	43	46
101-103	EMI-S	10	23	30	-	-	-
104-111	EMI-T	33	60	76	36	43	46
112-117	EMI-V	13	20	30	3	26	36
118-124	EMI-W	10	36	46	23	40	46
125-128	EMI-X	30	43	50	33	36	46
129-132	EMI-Z	0	3	10	16	26	43
133	EMI-AA	3	6	10	3	16	23
Controle	DMSO	0	0	2	0	2	4
	H ₂ O	0	0	1	0	3	3
Controle positivo	Teméfós	100	100	100	-	-	-
	α -Cipermetrina	-	-	-	100	100	100

Nos testes foram utilizadas 20 larvas por copo em triplicata na concentração de 500 μ g/mL

Controles: DMSO 1 %.

Controle Positivo : Temefos a 0,012mg/mL e α -cipermetrina a 0,04mg/mL

5.7.2 Bioensaios de dose

5.7.2.1 Bioensaios com frações do extrato EMIPC sobre larvas de *Aedes aegypti*

Os resultados obtidos nos bioensaios quantitativos das frações do extrato EMIPC sobre larvas de *A.aegypti*, estão representados na Tabela 20. As frações EMI-D e ISOLADO-B, apresentaram atividade larvicida nas duas maiores concentrações testadas (500 e 250 µg/mL), com mortalidade de 98%, 64% e 76%, 68% respectivamente, após 72 horas de exposição, sendo que nas concentrações menores, a mortalidade foram inferiores 50% na mesma leitura. As demais frações (EMI-A, EMI-J, EMI-T e ISOLADO-A) mostraram mortalidade de 94%, 66%, 70% e 66% respectivamente na concentração de 500 µg/mL, em 72 horas, sendo que nas menores concentrações testadas, a mortalidade não foi satisfatória. O grupo controle apresentaram mortalidade de 2% em 48 horas e 3% na última leitura (72 horas), sendo que no grupo positivo (inseticida químico), teve mortalidade de 100% após 24 horas de exposição.

Apesar das 6 frações testadas nos bioensaios, apenas a fração EMI-A, não se ajustou ao modelo de probit nos intervalos de 24, 48 e 72 horas, porém o programa (POLO PC) utilizou o fator de heterogeneidade dos dados para o cálculo da CL₅₀ e CL₉₀, conforme a Tabela 21. Portanto a fração EMI-D, apresentou os menores valores da CL₅₀ (186,17µg/mL, 153,31µg/mL e 130,64 µg/mL) e CL₉₀ (589,43 g/mL, 579,38µg/mL e 499,33µg/mL) respectivamente nas leituras de 24, 48 e 72 horas com intervalos de confiança de 95%, sendo eficazes as larvas de *A. aegypti*, comparados as demais as frações testadas que apresentaram maiores valores de CL₅₀ e CL₉₀

Tabela 20 – Resultados dos bioensaios de dose com frações do extrato EMIPC sobre larvas de *Aedes aegypti*, exposta em diferente concentrações.

Frações	Concentração (µg/mL)	N (Amostral)	Mortalidade (%)		
			24 h	48 h	72 h
EMI-A	500	50	80	90	94
	250	50	12	16	20
	100	50	6	10	14
	50	50	3	6	10
	25	50	0	2	6
EMI-D	500	50	94	96	98
	250	50	52	58	64
	100	50	22	16	42
	50	50	10	9	22
	25	50	3	2	8
ISOLADO-A	500	50	48	52	66
	250	50	16	22	30
	100	50	8	12	18
	50	50	4	8	9
	25	50	0	4	6
ISOLADO-B	500	50	60	66	76
	250	50	52	60	68
	100	50	14	24	28
	50	50	4	8	16
	25	50	0	6	10
EMI-J	500	50	30	60	66
	250	50	20	28	38
	100	50	10	14	18
	50	50	4	8	14
	25	50	0	4	10
EMI-T	500	50	35	55	70
	250	50	16	18	32
	100	50	4	8	14
	50	50	3	6	10
	25	50	0	4	8
Controle	H ₂ O		0	2	2
	DMSO		0	2	3
Controle positivo	TEMEFÓS		100	100	100

Nos testes foram utilizadas 20 larvas por copo em 5 repetições

Controles: DMSO a 1 %.

Controle Positivo : Temefos a 0,012mg/mL

Tabela 21. Os valores da CL₅₀ e CL₉₀ das frações do extrato EMIPC contra larvas de *Aedes aegypti*, após 24, 48 e 72 horas de aplicação.

Frações	CL ₅₀ (IC 95%)	CL ₉₀ (IC 95%)	X ²	Equação de regressão y(a+5)b.logx
EMI-A	374,36 (336,77 – 417,24)	518,90 (506,59 – 730,11)	17,8*	y= (-8,30 + 5) + 3,25x
	353,46 (236,27 – 529,13)	553,17 (414,27 – 2483,3)	22,6*	y= (-5,86 + 5) + 2,33x
	377,87 (232,57 – 488,17)	503,81 (384,96 – 1659,6)	3,79*	y= (-0,84 + 5) + 7,89x
EMI-D	186,17 (121,43 – 317,90)	589,43 (338,51 – 2233,56)	5,94	y= (-5,81+ 5) + 2,56x
	153,31 (99,70 – 256,40)	579,38 (323,68 – 2193,96)	5,15	y= (-4,85+ 5) + 2,21x
	130,64 (75,50 - 210,71)	499,33 (287,65 – 1834,87)	4,57	y= (-4,65+ 5) + 2,20x
EMI-J	793,88 (551,91- 1371,4)	3495,93 (1882,1 – 9693,5)	1,11	y= (-4,09+ 5) + 1,34x
	1101,6 (559,76 – 4870,5)	1883,8 (442,62 – 5876,3)	0,32	y= (-3,16+ 5) + 1,04x
	640,08 (375,48 – 1856,8)	1047,8 (301,90 – 1719,4)	0,68	y= (-2,96+ 5) + 1,05x
ISOLADO-A	563,40 (432,00 – 856,38)	1980,7 (1189,9 – 5089,6)	3,06	y= (-5,15+ 5) + 1,84x
	605,13 (416,30 – 1187,8)	3840,2 (1729,5 – 19783)	2,88	y= (-3,83+ 5) + 1,37x
	480,36 (328,42 – 912,90)	4282,9 (1823,2 – 23039)	1,98	y= (-3,72+ 5) + 1,39x
ISOLADO-B	310,62 (210,65 – 576,65)	1225,91 (637,02 – 6096,5)	3,72	y= (-5,35+ 5) + 2,14x
	248,28 (159,31-498,07)	1417,46 (643,86 – 9831,5)	3,68	y= (-4,05+ 5) + 1,69x
	202,32 (117,30 – 347,68)	1047,04 (533,67 – 6140,7)	3,10	y= (-4,13+ 5) + 1,79x
EMI-T	798,45 (555,13 – 1478,9)	3304,6 (1710,1 – 11400)	0,36	y= (-5,22+ 5) + 1,76x
	1390,62 (666,70 – 9124,2)	1922,1(4181 – 124212)	1,00	y= (-3,43+ 5) + 1,08x
	669,32 (426,43- 1562,8)	5782,84 (2204,2 – 43768,9)	0,31	y= (-3,76+ 5) + 1,10x

NE = Não estimado a 95%

*Significativo (p<0,05)

x = log da concentração

5.7.2.2 Bioensaios com frações do extrato EMIPC sobre larvas de *Anopheles sp.*

Os resultados obtidos nos bioensaios quantitativos com as frações do extrato EMIPC sobre larvas de *Anopheles sp.*, estão representados na Tabela 22. As frações EMI-B, ISOLADO-A e ISOLADO-B, apresentaram atividade larvicida nas duas maiores concentrações testadas (500 e 250 µg/mL), com mortalidade de 66% e 50%; 92% e 78%; 90 e 74% respectivamente, após 72 horas de exposição, sendo que para as demais concentrações, a mortalidade foram inferiores 50% na leitura. O grupo controle

apresentou mortalidade de 2% em 48 horas e 3% na última leitura (72 horas), sendo que no grupo positivo (inseticida químico), teve mortalidade de 100% após 24 horas de exposição.

Apesar das 6 frações testadas nos bioensaios, apenas as frações EMI-A e EMI-B não se ajustaram ao modelo de probit nos intervalos de 24, 48 e 72 horas, devido o valores do χ^2 serem maiores que valores tabelados, porém o programa (POLO PC) utilizou o fator de heterogeneidade dos dados para o cálculo da CL_{50} e CL_{90} , conforme a Tabela 23. Portanto as frações que contêm o composto ISOLADO-A, mostraram os menores valores da CL_{50} (269,15 μ g/mL, 128,43 μ g/mL e 98,68 μ g/mL) e CL_{90} (1166,3 μ g/mL, 463,41 μ g/mL e 422,91 μ g/mL), seguindo da fração ISOLADO-B, que apresentaram baixos valores da CL_{50} (287,24 μ g/mL, 199,42 μ g/mL e 103,85 μ g/mL) e CL_{90} (860,71 μ g/mL, 745,08 μ g/mL e 530,83 μ g/mL) respectivamente nas leituras de 24, 48 e 72 horas com intervalos de confiança de 95%. É importante ressaltar que o extrato EMIPC e os compostos isolados são biologicamente ativos contra larvas de anofelinos, podendo ser uma alternativa viável no controle, devido sua ação rápida e baixo custo sendo capaz de reduzir densidade de insetos vetores em surtos epidêmicos. Para isso é necessário a complementação de mais ensaios que precisam ser realizados em campo.

Tabela 22 – Resultados dos bioensaios de dose com frações do extrato EMIPC sobre larvas de *Anopheles sp.*, exposta em diferente concentrações.

Frações	Concentração (µg/mL)	N (Amostral)	Mortalidade (%)		
			24 h	48 h	72 h
EMI-A	500	50	76	82	96
	250	50	26	32	42
	100	50	8	14	20
	50	50	4	8	14
	25	50	0	4	8
EMI-B	500	50	44	50	66
	250	50	36	44	50
	100	50	14	24	34
	50	50	10	20	28
	25	50	4	12	16
EMI-D	500	50	46	52	56
	250	50	24	30	38
	100	50	10	14	18
	50	50	6	8	14
	25	50	0	2	6
ISOLADO-A	500	50	76	84	92
	250	50	34	64	78
	100	50	22	48	58
	50	50	8	14	30
	25	50	0	6	12
EMI-I	500	50	44	48	54
	250	50	28	36	42
	100	50	14	18	24
	50	50	6	10	14
	25	50	0	4	10
ISOLADO-B	500	50	78	82	90
	250	50	38	60	74
	100	50	10	22	36
	50	50	4	8	20
	25	50	0	4	12
Controle	H ₂ O		0	0	2
	DMSO		0	2	3
Controle positivo	TEMEFÓS		100	100	100

Nos testes foram utilizadas 20 larvas por copo em 5 repetições

Controles: DMSO a 1 %.

Controle Positivo : Temefos a 0,012mg/mL

Tabela 23. Os valores da CL₅₀ e CL₉₀ das frações do extrato EMIPC contra larvas de *Anopheles sp.*, após 24, 48 e 72 horas de aplicação.

Frações	CL ₅₀ (IC 95%)	CL ₉₀ (IC 95%)	X ²	Equação de regressão y(a+5)b.logx
EMI-A	331,50 (210,06 – 777,42)	1006,6 (520,44 – 10301)	6,43*	y= (-6,69 + 5) + 2,65x
	278,19 (171,44 – 650,36)	1165,8 (539,58 - 10931)	10,23*	y= (-5,03 + 5) + 2,05x
	NE	NE	7,16*	y= (-16,8 + 5) + 6,85x
EMI-B	596,50 (378,91 – 1341,7)	6343,9 (2355 – 46669)	0,81	y= (-3,46+ 5) + 1,24x
	454,34 (272,26 – 1220,9)	1097 NE	0,60*	y= (-2,46+ 5) + 0,92x
	NE	NE	0,84*	y= (-2,29+ 5) + 0,63x
EMI-D	601,04 (415,18 – 1123,9)	3596,5 (1701,5 – 15027)	1,47	y= (-4,58+ 5) + 1,64x
	436,64 (298,8 – 791,17)	3095,1 (3095,1 – 19728)	0,52	y= (-3,97+ 5) + 1,50x
	640,08 (375,48 – 1856,8)	1047,8 (301,90 – 1719,4)	0,68	y= (-2,96+ 5) + 1,05x
EMI-I	569,77 (400,56 – 1038,9)	3590,3 (1691,4 – 16188)	1,78	y= (-7,57+ 5) + 2,74x
	513,58 (339,35 – 1039,1)	5074,4 (2043,3 – 29799)	0,14	y= (-3,49+ 5) + 1,28x
	435,15 (281,54 – 882,38)	4407,2 (1716,3 – 39332)	0,13	y= (-3,36+ 5) + 1,27x
ISOLADO-A	269,15 (150,81 – 883,65)	1166,3 (486,48 – 38672)	7,75	y= (-4,89+ 5) + 2,01x
	128,43 (79,64 – 217,82)	463,41 (259,68 – 1861,4)	6,18	y= (-4,89+ 5) + 2,29x
	98,68 (76,41 – 124,66)	422,91 (306,42 – 677,01)	1,10	y= (-4,04+ 5) + 2,02x
ISOLADO-B	287,24 (238,81 – 357,02)	860,71 (629,95 – 1388,2)	2,10	y= (-6,60+ 5) + 2,68x
	199,42 (163,39 – 249,49)	745,08 (539,55 – 1229,7)	1,09	y= (-5,10+ 5) + 2,21x
	103,85 (103,85- 180,07)	530,83 (385,67 – 884,90)	0,90	y= (-4,77+ 5) + 2,22x

NE = Não estimado a 95%

*Significativo (p<0,05)

x = log da concentração

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesse estudo, pode-se afirmar que:

- O extrato metanólico da inflorescência de *Piper capitarianum* (EMIPC), apresentou maior letalidade frente às larvas de *Aedes aegypti* (campo) e *Anopheles sp* com CL_{50} 106,63 e 146,91 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, após 24 horas de exposição, demonstrando o mais promissor para ser utilizado no controle dos vetores da dengue e malária no ambiente amazônico.
- A análise fitoquímica dos extratos ativos de *Piper capitarianum*, analisadas por cromatografia CCD, revelaram a presença das classes químicas antraquinonas, esteróides, alcalóides, flavonóides e terpenos, podendo estar relacionada a atividade larvicida, oferecendo novas oportunidades de controle efetivo para insetos vetores.
- A análise química do óleo essencial das folhas de *Piper capitarianum* possibilitou a identificação de 28 constituintes voláteis, tendo o sesquiterpeno não oxigenado β -cariofileno (34,08%) como componente majoritário, seguido do β -mirceno (13,77%) e do α -humuleno (13,32%).
- O óleo essencial das folhas de *Piper capitarianum* apresentaram atividade larvicida, nas duas maiores concentrações (500 e 250 $\mu\text{g/mL}$) testadas contra *A.aegypti* da cepa Rockefeller, *A. aegypti* (campo) e *Anopheles sp* com 100% de mortalidade após 72 horas de exposição.
- O fracionamento cromatográfico do extrato EMIPC, resultou no isolamento de duas substâncias (ISOLADOS A e B), que ainda estão sendo analisados para

elucidação estrutural, mas que apresentaram atividade larvicida sobre as larvas *Aedes aegypti* e *Anopheles sp* com 269,15 e 287,24 µg/mL, após 24 horas de exposição, demonstrando ser uma alternativa viável no controle desse vetores.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4th ed. New York: Hardcover, 2007.

BRAGA, I.A.; VALLE, D. 2007a. **Aedes aegypti: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil**. *Epidemiol e Serviços de Saúde*, 16: 295-302.

AL-BAYATI, F. A. 2008. **Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts**. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 116, n. 3, p. 403–406.

BASTOS, M. S. **Perfil soroepidemiológico do dengue diagnosticado na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (1998-2001)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2004.

BARBOSA, *et al*, 2011. **Insecticide effects of *Ruta graveolens*, *Copaifera langsdorffii* and *Chenopodium ambrosioides* against pests and natural enemies in commercial tomato plantation**. *Acta Scientiarum. Agronomy Maringá*, v. 33, n. 1, p. 37-43,

BARJAC, H. 1990. **Classification of *Bacillus sphaericus* strains and comparative toxicity to mosquito larvae**, p.228-236.

BRAGA, *et al*, 2000. **Comparação entre pesquisa larvária e armadilha de oviposição, para detecção de *Aedes aegypti***. *Soc. Bras. Med. Trop.*, 33:347-353.

BRASIL, 2002. **Guia de vigilância epidemiológica**. Influenza/varíola. Brasília: Ministério da Saúde. Vol. II, 1-12 pp.

BRASIL 2013. **Levantamento Rápido de Índices Para *Aedes Aegypti* – LIRAA**.

BROGDON, W. G.; MCALLISTER, J. C, 1998. **Insecticide resistance and vector control**. *Emerging Infectious Diseases*;4(4):605-613.

BRUNETON, J. 1991. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. 1.ed. Espanha: Editorial Acribia, S.A., p.594.

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

CARVALHO, A.F.U., MELO, V.M.M., CRAVEIRO, A.A., MACHADO, M.I.L., BANTIM, M.B., RABELO, E.F., 2003. **Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* L**. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98, 541 e 544

- CAVALCANTI, E.S.B., MORAIS, S.M., LIMA, M.A.A., SANTANA, E.W.P., 2004. **Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz 99, 541e544.
- CHANSANG U, ZAHIRI NS, BANSIDDHI J, BOONRUAD T, THONGSRIRAK P, MULLA MS. 2005. **Mosquito larvicidal activity of aqueous extracts of long pepper (*Piper retrofractum* Vahl) from Thailand.** *Journal of Vector Ecology* 30 (2): 195-200 (PMID:16599152)
- CHAITHONG U, CHOOCHOTE W, KAMSUK K, JITPAKDI A, TIPPAWANGKOSOL P, CHAIYASIT D, CHAMPAKAEW D, TUETUN B, PITASAWAT B. 2006. **Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae).** *Journal of the Society for Vector Ecology* 31(1):138-144 doi: 10.3376/1081-1710.
- COLE, R. A. et al. 2007. **Chemical composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of *Eugenia zuchowskiae* from Monteverde, Costa Rica.** *Journal of Natural Medicines*, v. 61, n. 4, p. 414–417.
- CHOOCHOTE, et al. 2006. **Adulticidal activity against *Stegomyia aegypti* (Diptera: Culicidae) of three *Piper* spp.** Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
- CHRISTOPHERS, R. S. 1960. *Aedes aegypti* (L.) **the yellow fever mosquito.** Cambridge University Press, London. 739p.
- CRONQUIST, A. 1981. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants.** New York Colombia University Press, p.1262.
- DULMAGE, H.T.; YOUSTEN, A.A.; SINGER, S.; LACEY, L.A. 1990. *Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*.* UNDP/World Bank/WHO, Steering Committee to Biological Control of Vectors, Geneva, 59 p.
- FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; CATANI, V.; DE LIMA, M.S.; ALÉCIO, M.R. 2005. **Toxicidade do óleo de *Piper aduncum* L. a adultos de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae).** *Neotrop. Entomol.*, 34(3): 485-489.
- FACUNDO, V. A, POLLLI, A. R, RODRIGUES, R. V, MILITÃO, L. V. T, STABELLI, R. G, CARDOSO, G. T, 2006. **Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H. B. K.** *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 48(1):33-37, January-February,
- FERREIRA, F. A. S; ARCOS, A, N. 2012. **Efeitos da aplicação de *Bacillus sphaericus* (Neide, 1904) sobre anofelinos e entomofauna associada em tanques de piscicultura na periferia de Manaus, AM.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação de Entomologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA.

FIGUEIREDO, R.M.P. DE, THATCHER, B.D., LIMA, M.L. DE, ALMEIDA, T.C., ALECRIM, W.D. & GUERRA, M.V. DE F. 2004. **Doenças exantemáticas e primeira epidemia de dengue ocorrida em Manaus , Amazonas , no período de 1998-1999.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37: 476–479.

FILLINGER *et al*, 2003. **Efficacy and efficiency of new *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* and *Bacillus sphaericus* formulations against Afrotropical anophelines in western Kenya.** *Tropical Medicine and International Health* 8, 37–47.

FINNEY, D. J. 1971. **Probit analysis.** Cambridge (UK): Cambridge University Press;.
FORATTINE, O.P. 2002. **Culicidologia Médica.** Universidade de São Paulo, São Paulo Brasil. 880pp.

FORATTINI, O.P. 2002. **Culicidologia Médica.** Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.860pp.

FUNASA, Fundação Nacional de Saúde. 1999. **Reunião Técnica para discussão do status de resistência de *Aedes aegypti* e definir estratégias a serem implantadas para monitoramento da resistência no Brasil.** Brasília: Ministério da Saúde, pp 30.
FUNASA, Fundação Nacional de Saúde. 2001. **Controle biológico e manejo ambiental.**

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2013. **Notificação dos casos de Dengue no Brasil 2010-2013.** Boletim Eletrônico Epidemiológico Edição Especial. Brasília: Funasa;

FRIGHETTO, R. T. S. **Preparação e avaliação da bioatividade de extratos vegetais.** In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 16. 1997, salvador: seb; cruz das almas: embrapa-cnpmf, 1997. p. 10.

GARCEZ W S, GARCEZ F R, SILVA LMGE, SARMENTO UC. 2013. **Naturally occurring plant compounds with larvicidal activity against *Aedes aegypti*.** *Revista Virtual de Química* 5(3): 363-393 ICID: 1067481

GUIMARÃES, E.F. & GIORDANO, L.C.S. 2004. **Piperaceae no Nordeste Brasileiro** In: Estado do Ceará, Rodriguésia, v. 55, n.84, p. 21-46.

GUIMARÃES EF, SILVA MC. 2009. **Uma nova espécie e novos nomes em Piper seção *Ottonia* (Piperaceae) para o Sudeste do Brasil.** *Hoehnea* 36: 431-435 doi: 10.1590/ S2236-89062009000300004

GOULD EA, SOLOMON T, 2008. **Pathogenic flaviviruses.** *Lancet* 371: 500–509

GUBLER, D. J. 1997. **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever.** *Clinical Microbiology Reviews* 11(3): 480-496.

GUBLER, D. J.; REITER, P.; EBI, K. L.; YAP, W.; NASCI, R.; PATZ, J. A. 2001. **Climate Variability and Change in the United States: Potential Impacts on Vectorand**. Environm. Health Perspectives, 109 (2):223–233.

GOMES, A.S; SCIAVICO, C.J.S; 2006. **Priodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em laboratório e campo**. Rev. Soc. Bras. Trop., Uberaba, v.39, n.4.

LEAL, L F. 2000. **Estudo Químico e Avaliação da Atividade Farmacológica e Microbiológica de *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel**. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina,, p.158. Dissertação de Mestrado em Química.

LEORA SOFTWARE. 1987. **POLO-PC, A user's guide to probit and logit analysis computer program**, version By LeOra Software, Berkeley, CA.

LIMA, J. B.; PEREIRA-DA-CUNHA, M.; SILVA-JÚNIOR, R. C.; GALARDO, A. K. R.; SOARES, S. S.; BRAGA, I. A., 2003. RAMOS, R. P.; VALLE, D. **Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil**. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 68, n. 3, p. 329-333,

LOZOVEI, A.L. 2001. **Culicídeos (Mosquitos)** In: Marcondes, C.B. Entomologia médica e veterinária. São Paulo. Ed. Atheneu. (In portuguese) p. 50-103

LUNA, J. E. D.; MARTINS, M. F.; ANJOS, A. F.; KUWABARA, E. F.; NAVARRO-SILVA, M. A. 2004. **Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina**, Brasil. *Rev. Saúde Pública* 38. 842-843.

MARTINEZ-TORRES, E. 1998. **Dengue y dengue hemorrágico**. Editorial de la Universidad Nacional de Quilmes. Habana;

MARTIN, S.; PADILLA, E.; OCETE, M.A.; GALVES, J.; JIMENEZ, J.; ZARZUELO, A. **Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Bupleurum frutescens***. *Planta Medica*, v. 59, p.533-56. 1993

MARZOCHI, K. B. F. 1994. **Dengue in Brasil – Situation, Transmission and Control – A Proposal for Ecological Control**. *Mem. Inst. Esvaldo Cruz.* 89(2):235-245.

MATOS, F. J. A. 1988. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. Edições UFC,

MEDEIROS, E. S, RODRIGUES, I. B, ABREU, E. L, PINTO, A. C. S, NDERLI P. TADEI, W.P, 2013. **Larvicidal activity of clove (*Eugenia caryophyllata*) extracts and eugenol against *Aedes aegypti* and *Anopheles darlingi*** African Journal of Biotechnology Vol. 12(8), pp. 836-840, 20 February. Available online at <http://www.academicjournals.org/AJB> DOI: 10.5897/AJB12.2678 ISSN 1684–5315 ©2013 Academic Journals *Full Length Research Paper*

MEDEIROS, E. S, 2012. **Eficiência de extrato vegetal e do eugenol do cravo-da-índia, *Eugenia caryophyllata* THUMBERG (MYRTACEAE), para controle larval de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) E *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera,**

Culicidae) Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Amazonas, Manaus, UEA.

MS- MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2015. SVS- **Secretaria de Vigilância em Saúde, Informe Epidemiológico da Dengue, Análise de situação e tendências**

MONGELLI E, COUSSIO J, CICCIA G. 2002. **Investigation of the larvicidal activity of Pothomorphe peltata and isolation of the active constituent.** *Phytotherapy Research* 16 (1): S71-S72 http://www.sbpmed.org.br/download/issn_06_4/8esp_205_211.pdf

MORAIS, S.M. CAVALCANTI, E.S.B., BERTINI, L.M., OLIVEIRA, C.L.L., RODRIGUES, J.R.B., LEAL-CARDOSO, J.H., 2006. **Larvicidal activity of essential oils from Brazilian Croton species against Aedes Aegypti L.** *Mosq. Control Assoc.* 22, 161 e 164.

MOREIRA, D.L.; KAPLAN, M.A.C.; GUIMARÃES, E.F. 1995. **Constituintes Químicos de Piper solmsianum C.DC.(PIPERACEAE).** *Revista Brasileira de Farmácia*, v.76, n.4, p.106 – 109.

MYERS N, MITTERMEIER RA, MITTERMEIER CG, FONSECA GAB, KENT J. 2000. **Biodiversity Hotspots for Conservation Priorities.** *Nature* 403: 853-858 doi: 10.1038/35002501

NAWAZ R, RATHOR HR, BILAL H, HASSAN S, KHAN IA. 2011. **Adulticidal Activity of Olea vera, Linum usitatissimum and Piper nigera against Anopheles stephensi and Aedes aegypti under Laboratory Conditions.** *Iranian Journal of Arthropod-borne Diseases* 5(2): 2-9 <http://jad.tums.ac.ir/index.php/jad/article/view/99/84>

NICOLAS L.; DOSSOU-YOVO J. 1987. **Differential effects of the Bacillus sphaericus strain 2362 on Culex quinquefasciatus and its competitor Culex cinereus in West Africa.** *Med Vet Entomol*; 1:23-7.

NOGUEIRA, R.M.R.; MIAGOSTOVICH, M.P.; H.G.1990. **Isolation of dengue vírus Type 2 in Rio de Janeiro.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 85:253.

OLIVEIRA. *et al*, 2013. **Chemical study and larvicidal activity against Aedes aegypti of essential oil of Piper aduncum L. (Piperaceae).** *Anais da Academia Brasileira de Ciências* (2013) 85(4): (Annals of the Brazilian Academy of Sciences) Printed version ISSN 0001-3765 / Online version ISSN 1678-2690 www.scielo.br/aabc

PALCHICK, S. 1996. **Chemical Control of Vectors In: The Biology of Disease Vectors.** Colorado: University Press of Colorado;

PARMAR, V.S. *et al*. 1997. **Phytochemistry of the Genus Piper.** *Pytochemistry*, v.46, n.4, p. 597-673,

PICCOLI, C. F. **Análise de mutações no fragmento do gene que expressa a proteína transmembrana de canal de sódio (kdr) e da suscetibilidade a inseticidas em**

populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). Dissertação de mestrado. Curitiba, 83p. 2012.

PINHEIRO, V. C. S. 2000. **Dengue em Manaus (AM): Recipientes Preferenciais de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Ditera Culicidae) e Avaliação das Medidas de Controle – Temefós e Termonebulização.** Dissertação de Mestrado. INPA / UEA.

PINHEIRO, F. P. & Corber, S. J. 1997. **Global situation of dengue and dengue hemorrhagic fever and its emergence in the Americas.** World Health Statistics Quarterly 50 (3-4): 161-169.

PINTO, A. C. S. et al 2012. **Adulticidal activity of dillapiol and semi-synthetic derivatives of dillapiol against *Aedes aegypti* (L.) (Culicidae).** Journal of Mosquito Research, v. 2, n. 1, 1-7,

PINTO, A. C. *et al.* 2013. **Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas.** Química Nova, v.25, n.1, p. 45-61,

PINTO, A.C.S., 2002. **Estudo fitoquímico e biológico de *Pothomorphe peltata* (L.) Miquel (Piperaceae),** Master's Dissertation-Natural Products Chemistry, UFAM, Manaus.

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

POHLIT, A. M. et al. 2004. **Screening of Plants Found in Amazonas State, Brazil for Activity Against *Aedes aegypti* larvae.** Acta Amazonica, v. 34, n. 1, p. 97–105.

RAMASAMY R, SURENDRAN SN, JUDE PJ, DHARSHINI S, VINOBA M, 2011. **Larval Development of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Peri-Urban Brackish Water and Its Implications for Transmission of Arboviral Diseases.** PLoS Neglected Tropical Diseases

RAPADO, N.L. **Efeito moluscicida de extratos de Piperaceae no vetor da esquistossomose *Biomphalaria glabrata*.** 2007. 37p. Tese Mestrado (Saúde pública) São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2007.

RATHBURN Jr. C. B. 1985. **Insecticide formulations – types and uses: a review.** Journal of American Mosquito Control Association;1(1):80-84.

REITER, P., GUBLER, D. J. 1997. **Surveillance and control of urban dengue vectors.** CAB International, London, United Kingdom. p. 425–462.

REITZ, R. 2003. **Piperaceae. In: Flora Ilustrada Catarinense.** Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 4 – 7.

ROCHA, L.A; TAUIL, P.L. 2009. **Dengue em criança: aspectos clínicos e epidemiológicos, Manaus, Estado do Amazonas, no período de 2006 e 2007.** Rev. Soc. Bras. de Med.Trop., 42: 18-22.

ROGGERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. 1997. **Farmacognosia e Farmacobiocnologia**, São Paulo: Premier.

ROEL, A. R. 2001. **Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável**. Interações: revista internacional de desenvolvimento local, Campo Grande, v. 1, n. 2, p. 43-50,.

RODRIGUES, I. B; TADEI, W.P; JOSE, M. C. S; CARLOS, P. L, 2013. **Atividade Larvicida de *Bacillus sphaericus* 2362 contra *Anopheles* sp. (Diptera, Culicidae) em rios do Amazonas, Brasil**. Sociedade Entomológica do Brasil, *BioAssay*: 8:2. www.bioassay.org.br

SANTOS ,J.M.M, CONTEL, E.P.B, Ker WE 1980. **Biologia de Anofelinos Amazônicos. Ciclo biológico, postura e estádios larvais de *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae) da Rodovia Manaus/ Boa Vista**. *Acta Amazon.*, 11(4):789-797.

SANTOS, M. R. A; LIMA, R. A.; SILVA, A. G; LIMA, D. K. S; SALLET, L. A. P; TEIXEIRA, C. A. D; FACUNDO, V. A. **Composição química e atividade inseticida do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) sobre a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*)**. Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.15, n.4, supl.I, p.757-762, 2013.

SAMUEL P. P.; TYAGI B. K. 2006. **Diagnostic methods for detection & isolation of dengue viruses from vector mosquitoes**. Indian Journal Medical Research 123.. p. 615-628.

SARAIVA, R. C. G.; PINTO, A. C.; NUNOMURA, S. M.; POHLIT, A. M.; 2006. **Estudo fitoquímico de *Simaba polyphylla* (Cavalcante) e atividades biológicas**. *Quim. Nova*, 29, 264.

SECRETARIA DA SAÚDE (SEMSA) 2014. **Levantamento de infestação rápido por *Aedes aegypti* em Manaus (LIRA)**. Disponível em: <http://semsa.manaus.am.gov.br/profissionais-de-saude-discutem-reducao-de-casos-de-dengue-e-malaria-em-manaus/>

SIMAS, N.K., LIMA, E.C., CONCEIÇÃO, S.R., KUSTER, R.M., OLIVEIRA FILHO, A.M., 2004. **Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue e atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenoides e fenilpropanoides**. *Quim. Nova* 27, 210 e 237

SILVA *et al*, 2004 . **Efeito larvicida e toxicológico do extrato bruto etanólico da casca do caule de *Magonia pubescens* sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) em criadouros artificiais**. *Revista de Patologia Tropical* 32:73-86.

SILVA, *et al.*, 2010. **The essential oil of Brazilian pepper, *Schinus terebinthifolia* Raddi in larval control of *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762).** Parasites & Vectors, 3:79Boa Vista, Vila Velha, ES, CEP 29.102-770, Brazil <http://www.parasitesandvectors.com/content/3/1/79>

SINAN, 2004 . **Sistema de Informações Nacional de Agravos Notificados.**

SUCEN. 1997. Superintendência de Controle de Endemias – Secretaria de estado da saúde. **Manual de Vigilância Entomológica de *Aedes aegypti*.** São Paulo,. Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/down/vetores_geral/den_vetore.pdf>
Acesso em: 09/03/2011

SUSAM, 2011. Secretaria de Estado da Saúde. **Registro de casos de dengue no estado do Amazonas.**

SCARPASSA, V.M, TADEI W.P 1990. **Biologia de Anofelinos Amazônicos. XIII.** Estudo do ciclo biológico de *Anopheles nuneztovari*. *Acta Amazon.* , 20: 95-118.

SCOTT IM, JENSEN HR, PHILOGÈNE BJR, ARNASON JT, 2008. **A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action.** *Phytochemical reviews* 7(1): 65-75 doi: 10.1007/s11101-006-9058-5

TABANCA, N. ; AVONTO, C. ; WANG, M.; PARCHER, J.F.; ALI, A.; DEMIRCI, B.; RAMAN, V.; KHAN, I.A. 2013. **Comparative investigation of *Umbellurica californica* and *Laurus nobilis* leaf essential oils and identification of constituents active against *Aedes aegypti*.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, p. 12283-12291.

TADEI, W.P.; Santos, J.M.M.; Rodrigues, I.B.; Rafael, M.S. 2010. **Pesquisa Científica e Tecnológica em saúde:** Laboratório de vetores Malaria e Dengue. Ministério da Ciência e Tecnologia. 283p.

TADEI, W.P. et al. 2007. **O Papel da Entomologia no Controle da Malária.** In: X reunião Nacional de Pesquisa em Malária. *Rer. Bras. Med. Trop.* v. 40 (Suplemento II), p. 22-26.

TADEI, W.P. et al. 1998. **Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the brazilian Amazon.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.59, p. 325-335.

TADEI, W.P. 2001. **Controle da malária na Amazônia.** Anais/ Resumo da 7 Reunião Especial da SBPC [CD ROOM]. Manaus: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência 1-6.

TADEI, W.P. RODRIGUES, I.B. LIMA, C.P. PINTO, R.C. OLIVEIRA, A.E.M. SANTOS, J.M.M. RAFAEL, M.S. TERRAZAS, W.C.M. & LOPES N.R. 2005. **Malária no rio Negro/ AM: importância do igapó na proliferação de *Anopheles darlingi* e sua relação com a transmissão.** *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 38(suplemento I):505.

TADEI, W.P.; Duraty-Thatcher, B. 2001. **Malaria vectors in the Brazilian Amazon: of the subgenus Nyssorhynchus**. Revista do Instituto de Medicina Tropical, 42: 87 – 94.

TAIZ & ZEIGER, 2013. **Fisiologia Vegetal**. 5 edição. v.3 São Paulo, Brasil, p. 257.

TRINDADE, F. T, SILVA, A. A, 2008. **Avaliação da Aividade larvívora dos extratos de *Piper tuberculatum* jacq. e *Piper alatabaccum* Trel & Yuncker sobre as larvas de *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae)**. Anais do programa institucional de bolsas de iniciação científica – PIBIC 2008/2009, realizado no período 16 a 20 de Novembro de 2008 em Porto Velho, Rondônia.

VASILAKIS, 2013 (<http://news.sciencemag.org/health/2013/10/first-new-denguevirus-type-50-years>). Acessado: 26/10/2013. 12hrs30min.

VENDRAMIM, J.D. 2000. **Plantas inseticidas e controle de pragas**. Informativo da Sociedade Entomológica do Brasil 25:1-5

WAGNER, H. 1996. **Plant Drug Analysis : A Thin Layer Chromatography Atlas**. Springer Science & Business Media.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2001. **Dengue haemorrhagic fever diagnosis, treatment, prevention and control**. 2nd edition. Geneva.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2015. **Global malaria situation**. Disponível em: www.who.int/globalatlas/autorlogin/malaria_login.asp Acesso em: 07 de jun. de 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2013 Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2014. DengueNet – WHO’s Internet-based System for the Global Surveillance of Dengue Fever and Dengue Haemorrhagic Fever (Dengue/DHF) [monograph on the Internet]. Geneva: WHO.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012. **Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020**. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75303/1/9789241504034_eng.pdf. Accessed October 2013.

YUNCKER, T.G. 1972. **The Piperaceae of Brazil**. I. *Piper*-Group I, II, III, IV. *Hoehnea* 2: 19-366.

YUNCKER, T.G. 1973. **The Piperaceae of Brazil**. II. *Piper*-Group V; *Ottonia*; *Pothomorphe*; *Sarcorrhachis*. *Hoehnea* 3: 29-284.

YUNCKER, T.G. 1974. **The Piperaceae of Brazil-III: *Peperomia***; Taxa of uncertain status. *Hoehnea* 4: 71-413.

YOUYOU, T. 2011; **The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine.** *NatureMedicine*, v. 17, n. 10, DOI:10.1038/nm.2471.