



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - PPGCF**

DÉBORA TERRA MARQUES MIRANDA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E LARVICIDA DE ÓLEOS FIXOS E
EXTRATOS BRUTOS DE CINCO ESPÉCIES VEGETAIS DA
AMAZÔNIA**

**Macapá
2018**

DÉBORA TERRA MARQUES MIRANDA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E LARVICIDA DE ÓLEOS FIXOS E
EXTRATOS BRUTOS DE CINCO ESPÉCIES VEGETAIS DA
AMAZÔNIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Dr. Prof^o Moacir de A. B. Monteiro Neto

Co-orientadora: Dra^a Prof^a Raquel Rodrigues Amaral

**Macapá
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborado por Mara Patrícia Corrêa Garcia CRB2/1248

615.321

M672a Miranda, Débora Terra Marques

Atividade antimicrobiana e larvicida de óleos fixos e extratos brutos de cinco espécies vegetais da Amazônia / Débora Terra Marques Miranda ; orientador, Moacir de Azevedo Bentes Monteiro Neto ; co-orientadora, Raquel Rodrigues Amaral. – Macapá, 2018. 67 f.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Antibacteriano. 2. Larvicida. 3. Resistência. 4. *Aedes aegypti*. I. Monteiro Neto, Moacir de Azevedo Bentes, orientador. II. Amaral, Raquel Rodrigues, co-orientadora. III. Fundação Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

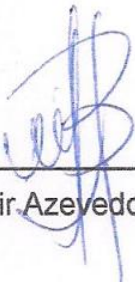
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – PPGCF**

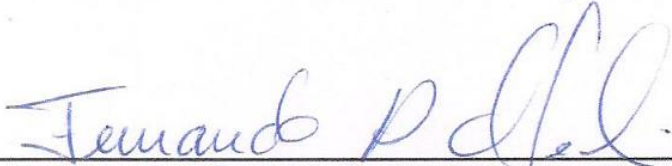
BANCA EXAMINADORA

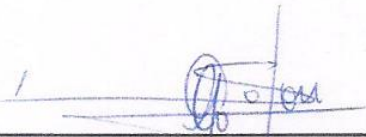
Aluno(a): Débora Terra Marques Miranda

Orientador(a): Profº Dr. Moacir Azevedo Bentes Monteiro Neto

Co-Orientador(a): Profª Dra. Raquel Rodrigues do Amaral


Orientador: Profº. Dr. Moacir Azevedo Bentes Monteiro Neto


Profº. Dr. Fernando Antonio de Medeiros
Professor Adjunto IV do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.


Profª. Dra. Lílian Grace da Silva Solon
Professora Adjunta II do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.

*Dedico este trabalho ao meu precioso Deus por
ter me concedido inteligência e sabedoria para avançar.
Por ter me dado forças para não desistir, por ter me
carregado no colo quando achei que não iria aguentar,
Por me chamar de filha amada e dizer: Estou contigo!*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, saúde, força, coragem e ter me permitido chegar até aqui, mesmo tendo que enfrentar ventos contrários.

À minha família, mãe, esposo e filhos, por todo carinho, compreensão e colaboração no decorrer de todo meu desenvolvimento pessoal e intelectual e perdendo minhas ausências.

À Universidade Federal do Amapá, por me oportunizar fazer parte do seu corpo docente, através do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Moacir Azevedo Bentes Neto, pela compreensão dos percalços enfrentados durante estes dois anos, pela sua amizade e por ter acreditado em mim, me aceitando em seu grupo de pesquisas.

À incansável Prof^a Raquel Rodrigues do Amaral, que não mediu esforços e nem conhecimento para me direcionar.

Ao Prof^o Raimundo Nonato Picanço Souto, por todo apoio que me deu desde o início, sendo mais que um ótimo Prof^o, tornando-se um grande amigo.

Ao Prof^o Irlon pelo apoio nas últimas testagens.

Ao Prof^o Rodrigo por ter me dado uma luz no fim do túnel.

À equipe dos Laboratórios de Pesquisa em Fármacos e o Arthrolab, por terem me recebido de braços abertos como se já nos conhecêssemos há muito tempo.

Aos meus maravilhosos estagiários, Jhone Curti e José Victor Sena que me auxiliaram em todos os momentos.

Às grandes amigas, Harlene Alves e Gerlangela Mendes, que através do apoio, incentivo e cobertura na minha ausência, pude tornar o meu sonho do mestrado uma realidade.

Ao meu grande amigo Antony pelo apoio acadêmico, moral e espiritual.

Aos amigos de perto e de longe, que sempre acreditaram no meu potencial e torceram pelo meu sucesso.

A todos que colaboraram direta e indiretamente para a concretização deste trabalho, compartilhando comigo seu tempo e seus conhecimentos.

*Quando plantamos uma árvore não significa que somos adoradores de plantas,
significa que estamos preocupados com nossa sobrevivência.*

Maura Vatan

Insanidade é fazer a mesma coisa sempre esperando um resultado diferente.

Albert Einstein

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	PLANTAS MEDICINAIS.....	1
1.2	PLANTAS DE ESTUDO.....	2
1.2.1	<i>Bertholletia excelsa</i> HBK (castanha-do-brasil)	2
1.2.2	<i>Astrocaryum aculeatum</i> Meyer (tucumã).....	5
1.2.3	<i>Pentaclethra maculoba</i> (Wild) O. Kuntze (pracaxi).....	8
1.2.4	<i>Parahancornia amapa</i> (Huber) Ducke (amapazeiro).....	10
1.2.5	<i>Amasonia campestris</i> (Aubl.) Moldenke (rabo de arara)	12
1.3	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	14
1.3.1	Atividade antimicrobiana dos óleos fixos e extratos brutos.....	14
1.3.2	Resistência bacteriana.....	15
1.3.3	Métodos de avaliação de atividade antibacteriana.....	16
1.3.4	Importância clínica das bactérias.....	18
1.4	ATIVIDADE LARVICIDA.....	18
1.4.1	Atividade larvicida de espécies vegetais.....	18
1.4.2	Resistência a inseticidas químicos.....	19
1.4.3	O mosquito <i>Aedes aegypti</i>	20
2	OBJETIVOS	26
2.1	GERAL.....	26
2.2	ESPECÍFICOS.....	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	MATERIAL VEGETAL.....	27
3.2	OBTENÇÃO DOS ÓLEOS FIXOS E EXTRATOS BRUTOS METANÓLICOS.....	27
3.3	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS E EXTRATOS.....	28
3.3.1	Microrganismos utilizados e preparo do inóculo bacteriano.....	28
3.3.2	Preparo (Diluição) dos óleos fixos e extratos brutos.....	29
3.3.3	Suscetibilidade e resistência no teste de difusão em ágar.....	30
3.3.4	Teste de difusão em ágar (disco).....	31
3.3.5	Teste de difusão em ágar (poço).....	31

3.3.6	Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	32
3.3.7	Análise de dados da atividade bacteriana.....	34
3.4	ATIVIDADE LARVICIDA DOS ÓLEOS E EXTRATOS.....	34
3.4.1	Bioensaios larvicida.....	34
3.4.2	Análise de dados da atividade larvicida.....	36
4	RESULTADOS.....	37
4.1	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS E EXTRATOS.....	37
4.2	ATIVIDADE LARVICIDA DOS ÓLEOS E EXTRATOS.....	43
5	DISCUSSÃO.....	47
6	CONCLUSÃO.....	55
	REFERÊNCIA.....	57

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Árvore da <i>B. excelsa</i>	3
FIGURA 2.	Ouriços da <i>B. excelsa</i> : A - Ouriços íntegro; B – Ouriços expondo as castanhas; C – Castanhas	4
FIGURA 3.	<i>A. aculeatum</i> : Árvore	6
FIGURA 4.	<i>A. aculeatum</i> : Frutos;	8
FIGURA 5.	Árvore da <i>P. maculoba</i>	9
FIGURA 6.	<i>P. maculoba</i> : Fruto.....	10
FIGURA 7.	Látex da <i>P. amapa</i>	11
FIGURA 8.	Árvore da <i>P. amapa</i>	12
FIGURA 9.	Arbusto da <i>A. campestris</i>	13
FIGURA 10.	<i>A. campestris</i> : Flores tubulares.....	13
FIGURA 11.	Resistência bacteriana.....	15
FIGURA 12.	Difusão por disco.....	17
FIGURA 13.	Difusão por poço.....	17
FIGURA 14.	Microdiluição em placa.....	17
FIGURA 15.	Mapa global da distribuição do <i>Aedes aegypti</i> em 2015. O mapa representa a probabilidade de ocorrência (de 0 azul para 1 vermelho) em uma resolução espacial de 5 km x 5 km.....	21
FIGURA 16.	Ciclo de Vida do <i>Ae. aegypti</i>	22
FIGURA 17.	<i>Ae. Aegypti</i> : Larvas.....	23
FIGURA 18.	<i>Ae. Aegypti</i> : Pupa.....	24
FIGURA 19.	<i>Ae. Aegypti</i> : Fase adulta.....	24
FIGURA 20.	Escala MacFarland de turbidez. Tubo E; 0,5 de turbidez (1,5 x 10 ⁸ UFC/mL)	29

FIGURA 21.	Medição do diâmetro dos halos.....	30
FIGURA 22	Difusão por disco: <i>B. excelsa</i> , <i>A. aculeatum</i> , <i>P. macroloba</i> e <i>P. amapa</i> contra <i>E. coli</i> (25922)	31
FIGURA 23.	Difusão por poço: <i>B. excelsa</i> , <i>P. macroloba</i> e <i>P. amapa</i> contra <i>S. aureus</i> (33591)	32
FIGURA 24.	Esquema representativo da terminação da CIM dos EBM's do estudo.....	33
FIGURA 25.	CIM da <i>A. campestris</i> contra <i>S. aureus</i> ATCC 29213, 25923, 33591 e <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853; (C+): vancomicina 0,2 mg/mL; (C-): DMSO. Concentração inicial de 125 mg/mL, devido a característica escura do extrato, dificultando a visualização em concentrações mais altas.....	34
FIGURA 26.	Extrato bruto metanólico de pracaxi: De A a H – Média do diâmetro dos halos (mm) das bactérias inibidas pelo extrato, pelas técnicas de difusão em ágar por disco e poço. Concentrações de controles e amostras em mg/mL. A) <i>S. aureus</i> -(ATCC 29213), B) <i>S. aureus</i> -(ATCC 25923), C) <i>S. aureus</i> -(ATCC 33591), D) <i>E. coli</i> (ATCC 25922), E) <i>P. mirabilis</i> (ATCC 15290), F) <i>K. pneumoniae</i> (ATCC 4352), G) <i>S. typhimurium</i> (ATCC 14028), H) <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853). Os dados são apresentados como média \pm SD (n = 3/grupos), (*) p 0,05 vs controle disco, (&) p 0,05 vs controle poço, (a) p 0,05 vs conc. 125 mg/mL disco, (b) p 0,05 vs. conc. 250 mg/mL disco, (A) p 0,05 vs conc. 125 mg/mL poço, (B) p 0,05 vs conc. 250 mg/mL poço, a análise estatística foi feita pelo teste ANOVA two-way e depois seguida de post-hoc Tukey.....	41
FIGURA 27.	Extrato bruto metanólico do amapazeiro: De A a D – Média do diâmetro dos halos (mm) das bactérias inibidas pelo extrato, pelas técnicas de difusão em ágar por disco e poço. Concentrações de controles e amostras em mg/mL. A) <i>S. aureus</i> -(ATCC 25923), B) <i>S. aureus</i> -(ATCC 33591), C) <i>E. coli</i> (ATCC 25922), D) <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853). Os dados são apresentados como média \pm SD (n = 3/grupos),(*) p 0,05 vs controle disco, (&) p 0,05 vs controle poço, (a) p 0,05 vs conc. 125 mg/mL disco, (b) p 0,05 vs conc. 250 mg/mL disco, (A) p 0,05 vs conc. 125 mg/mL poço, (B) p 0,05 vs conc. 250 mg/mL poço, a análise estatística foi feita pelo teste ANOVA two-way e depois seguida de post-hoc Tukey.....	42

FIGURA 28.	<p>Extrato metanólico do rabo-de-arara: De A a D – Média do diâmetro dos halos (mm) das bactérias inibidas pelo extrato, pelas técnicas de difusão em ágar por disco e poço. Concentrações de controles e amostras em mg/mL. A) <i>S. aureus</i>-(ATCC 29213), B) <i>S. aureus</i>-(ATCC 25923), C) <i>S. aureus</i>-(ATCC 33591), D) <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853). Os dados são apresentados como média \pm SD (n = 3/grupos), (*) p 0,05 vs controle disco, (&) p 0,05 vs controle poço, (a) p 0,05 vs conc. 125 mg/mL disco, (b) p 0,05 vs conc. 250 mg/mL disco, (A) p 0,05 vs conc. 125 mg/mL poço, (B) p 0,05 vs conc. 250 mg/mL poço, a análise estatística foi feita pelo teste ANOVA two-way e depois seguida de post-hoc Tukey.....</p>	43
FIGURA 29.	<p>Valor estimado da CL₅₀ de larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> expostos a três concentrações diferentes (12,5; 25,0 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) do óleo fixo da amêndoa da castanha-do-brasil, após 48 horas.....</p>	45
FIGURA 30.	<p>Valor estimado da CL₅₀ de larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> expostos a três concentrações diferentes (12,5; 25,0 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) do extrato bruto metanólico das cascas do caule do pracaxi, após 24 h.....</p>	45
FIGURA 31.	<p>Valor estimado da CL₅₀ de larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> expostos a três concentrações diferentes (12,5; 25,0 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) do extrato bruto metanólico das cascas do caule do pracaxi, após 48 h.....</p>	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Composição de macronutrientes e micronutrientes da castanha-do-brasil: Centesimal, minerais e vitaminas/100 gramas (parte comestível)	5
TABELA 2.	Composição de macronutrientes e micronutrientes do tucumã: Centesimal, minerais e vitaminas/100 gramas (parte comestível)	7
TABELA 3.	Concentrações em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dos produtos testes empregados no bioensaio da atividade larvicida contra o <i>Ae. Aegypti</i>	36
TABELA 4.	Rendimentos dos óleos fixos e extartos brutos metanólicos (%/kg) após tratamento inicial do material vegetal	37
TABELA 5.	Atividade antibacteriana dos óleos fixos e extratos metanólicos obtidos pela técnica de difusão em ágar (disco e poço) frente as cepas ATCC.....	38
TABELA 6.	Média dos diâmetros dos halos de inibição e desvio padrão (mm) dos extratos metanólicos brutos nas concentrações de estudo, pela técnica de difusão em ágar (disco e poço) frente as cepas ATCC.....	39
TABELA 7.	Determinação da CIM dos extratos e metanólicos do pracaxi, amapazeiro e rabo de arara pela técnica de microdiluição em placa de 96 poços.....	40
TABELA 8.	Percentual das médias de mortalidade de larvas no 3º instar da espécie <i>Ae. Aegypti</i> após exposição de 24 e 48h.....	44
TABELA 9.	Concentrações letais para 50% e 90% das larvas de 3º instar de <i>Ae. Aegypti</i>	44

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CE	Concentração de Estoque
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CL	Concentração Letal
CTT	Cloreto de Trinefilitetrazólio
DC	Dengue Clássica
DMSO	Dimetilsulfóxido
EBM	Extrato Bruto Metanólico
EBMs	Extratos Brutos Metanólicos
EPC	Equipamento de Proteção Coletiva
EPI	Equipamento de Proteção Individual
FIOCRUZ / RJ	Fundação Oswaldo Cruz / Rio de Janeiro
FHD	Febre Hemorrágica da Dengue
HAMAB	Herbário Amapaense
IEPA	Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá
M.S.	Ministério da Saúde
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NUCTECNAL	Núcleo de Ciência e Tecnologia de Alimentos
OF	Óleo Fixo
OFs	Óleos Fixos
SCD	Síndrome do Choque da Dengue
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
UNIFAP	Universidade Federal do Amapá

Atividade antimicrobiana e larvicida de óleos fixos e extratos brutos de cinco espécies vegetais da Amazônia

Introdução: Nas últimas décadas, a utilização de fármacos naturais ou sintéticos de forma abusiva e indiscriminada, tem levado muitas cepas de microrganismos a evoluírem a cepas resistentes e multirresistentes, tornando-se um problema mundial, sendo um confronto aos pesquisadores. De igual modo, o uso contínuo e indiscriminado de inseticidas químicos no combate a vetores transmissores de pragas e doenças, como por exemplo o *Aedes aegypti* transmissor da dengue, chikungunia, zica e febre amarela, promovem a seleção de resistência. **OBJETIVO:** O objetivo deste estudo foi investigar o efeito antibacteriano e larvicida *in vitro* dos óleos fixos (OFs) de *Bertholletia excelsa* HBK e *Astrocaryum aculeatum* Meyer e dos extratos metanólicos brutos (EBMs) da *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze, *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke e *Amasonia campestris* (Aubl.) Moldenke. **Métodos:** Os OFs da *B. excelsa* e do *A. aculeatum* foram obtidos por prensagem hidráulica. Os EBMs da *P. macroloba*, *P. amapa* e *A. campestris* através de solventes (metanol). Para a atividade antibacteriana, foi empregado o método de difusão em ágar (disco e poços) nas concentrações de 125, 250 e 500 mg/mL dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e 2,3-diclorometano (*A. aculeatum*) e a determinação da concentração inibitória mínima, pelo método de microdiluição em placas de 96 poços, contra cepas padronizadas das bactérias: *Staphylococcus aureus* (3 cepas), *Streptococcus pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Escherichia coli* (2 cepas), *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*. Para a atividade larvicida as larvas de *Aedes aegypti* (linhagem Rockefeller) no 3º instar, foram expostas as concentrações de 12.5, 25.0 e 50.0 µg.mL⁻¹ dos OFs e EBMs no período de 24 e 48 h e os dados obtidos foram submetidos à análise Probit para determinação da CL₅₀ e CL₉₀. **Resultados e discussões:** O EBM da *P. macroloba* apresentou potencial inibitório contra 80% das bactérias do estudo (*S. aureus* - 3 cepas, *E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium* e *P. aeruginosa*). Na atividade larvicida apresentou CL₅₀=9,338 e CL₉₀=73,528 após 24 h e CL₅₀=5,39649 e CL₉₀=46,2339 após 48 h de exposição larval. O EBM da *P. amapa* apresentou potencial inibitório contra 40% das bactérias do estudo (*S. aureus* - 2 cepas, *E. coli* e *P. aeruginosa*) e não apresentou atividade larvicida. O EBM da *A. campestris* apresentou potencial inibitório contra 40% das bactérias do estudo (*S. aureus* - 3 cepas e *P. aeruginosa*) e baixa atividade larvicida nas concentrações do estudo. Os OFs não apresentaram eficácia inibitória contra as bactérias do estudo, porém na atividade larvicida o OF da *B. excelsa* apresentou CL₅₀=28,89 após 48 h de exposição larval. O OF do *A. aculeatum* não apresentaram atividade larvicida. **Conclusões:** A espécie *P. macroloba* tem se mostrado farmacologicamente promissora, demonstrando melhor efetividade em ambas atividades, se destacando das demais. Os estudos sobre as propriedades farmacológicas das espécies *P. amapa* e *A. campestris* são escassos. Os resultados da atividade antimicrobiana para a espécie *A. campestris* são pioneiros, assim como na atividade larvicida para estas duas espécies.

Palavras-chave: Antibacteriano, Larvicida, Resistência, *Aedes aegypti*.

Antimicrobial and larvicidal activity of fixed oils and crude extracts of five Amazonian plant species

Introduction: In recent decades, the use of natural or synthetic drugs in an abusive and indiscriminate manner, has taken many strains of microorganisms from a series of resistors and multiresistants, becoming a worldwide problem, being a confrontation to the researchers. Similarly, the continuous and indiscriminate use of chemical insecticides does not apply to transmitters of pests and diseases, such as the *Aedes aegypti* transmitter dengue, chikungunia, zica and yellow fever, resistance selection.

OBJECTIVE: The objective of this study was to investigate the in vitro antibacterial and larvicidal effect of the fixed oils (FOs) of *Bertholletia excelsa* HBK and *Astrocaryum aculeatum* Meyer and the crude methanolic extracts (CMEs) of *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze, *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke and *Amasonia campestris* (Aubl.) Moldenke. **Methods:** The FOs of *B. excelsa* and *A. aculeatum* were obtained by hydraulic pressing. The CMEs of *P. macroloba*, *P. amapa* and *A. campestris* through solvents (methanol). For the antibacterial activity, the agar diffusion method (discs and wells) at the concentrations of 125, 250 and 500 mg/mL dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and 2,3-diethylchloroethane (*A. aculeatum*) were used and the determination of Minimum inhibitory concentration, by the 96-well plate microdilution method, against standard strains of bacteria: *Staphylococcus aureus* (3 strains), *Streptococcus pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Escherichia coli* (2 strains), *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa*. For the larvicidal activity the larvae of *Aedes aegypti* (Rockefeller Lineage) in the 3rd instar, the concentrations of 12.5, 25.0 and 50.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ were exposed of the FOs and CMEs in the period of 24 and 48 h and the data obtained were submitted to Probit analysis for LC₅₀ and LC₉₀ determination. **Results and discussion:** The CME of *P. macroloba* presented inhibitory potential against 80% of the bacteria in the study (*S. aureus* - 3 strains, *E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium* and *P. aeruginosa*). In the larvicidal activity it presented LC₅₀=9,338 and LC₉₀=73,528 after 24 h and LC₅₀=5,39649 and LC₉₀= 46,2339 after 48 h of larval exposure. The CME of *P. amapa* showed inhibitory potential against 40% of the study bacteria (*S. aureus* - 2 strains, *E. coli* and *P. aeruginosa*) and did not present larvicidal activity. The CME of *A. campestris* showed inhibitory potential against 40% of the study bacteria (*S. aureus* - 3 strains and *P. aeruginosa*) and low larvicidal activity at study concentrations. The FOs did not present inhibitory efficacy against the bacteria of the study, but in the larvicidal activity the FO of *B. excelsa* presented LC₅₀=28.89 after 48 h of larval exposure. The FO of *A. aculeatum* had no larvicidal activity. **Conclusions:** The species *P. macroloba* has been shown to be pharmacologically promising, showing a better effectiveness in both activities, standing out from the others. Studies on the pharmacological properties of *P. amapa* and *A. campestris* species are scarce. The results of the antimicrobial activity for the species *A. campestris* are pioneers, as well as in the larvicidal activity for these two species.

Key words: Antibacterial, Larvicide, Resistance, *Aedes aegypti*.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 PLANTAS MEDICINAIS

Desde os tempos antigos, diferentes espécies de plantas têm sido exploradas como importante recurso ao alcance do homem, sendo esta tradição difundida de geração para geração (LOPES et al., 2010; FEIJÓ et al., 2012). O conhecimento tradicional etnobotânico e etnofarmacológico, associado à pesquisa científica, desempenha um papel fundamental no processo de geração de inovações na indústria farmacêutica, seja na localização de novas plantas ou na sugestão de sua atividade farmacológica (CARNEIRO et al., 2014). Muitas plantas produzem metabólitos secundários que apresentam atividade inibitória de microrganismos e de crescimento de insetos (SILVA et al., 2017). Nas últimas décadas, as pesquisas relativas a substâncias bioativas, têm aumentado consideravelmente (GADELHA et al., 2013). O Brasil, em toda a sua extensão, apresenta uma flora bastante diversificada, com vegetações de diferentes características e muitos princípios ativos ainda desconhecidos (COSTA et al., 2015). Porém, é na região Norte, em especial na Floresta Amazônica onde se concentra uma das mais ricas biodiversidades do país, com cerca de metade das espécies vegetais do planeta, sendo de maior destaque na busca de alternativas terapêuticas e no sentido de descobrir inseticidas naturais, efetivos, seguros e menos tóxicos (FIORAVANTI, 2016). Em decorrência a isso, o comércio de produtos à base de plantas se tornou uma alternativa econômica muito lucrativa, em relação aos produtos sintéticos. Porém, este grande potencial econômico das plantas medicinais, tornou-se uma questão complexa. Um novo medicamento ou

inseticida natural pode ter um custo muito alto, mas pode dar um retorno muito maior. Neste estudo foram analisadas cinco espécies de uso tradicional da população do Estado do Amapá, que são: A *Bertholletia excelsa* HBK, Lecitidaceae (castanha-do-brasil), o *Astrocaryum aculeatum* Meyer, Arecaceae (tucumã), a *Pentaclethra maculosa* (Wild) O. Kuntze, Fabaceae (pracaxi), a *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke, Apocynaceae (Amapazeiro) e a *Amasonia campestris* (Aubl.) Moldenke, Lamiaceae (rabo-de-arara). Na atividade antimicrobiana, as bactérias Gram-negativas utilizadas são da família das *Enterobacteriaceae* que dentre outros agravos, também são responsáveis por doenças diarreicas, principal causa de morbimortalidade infantil (até 5 anos) na região Norte do Brasil (DIAS et al., 2010; ANVISA 2013) e as Gram-positivas são amplamente difundidas em ambientes hospitalares, caracterizando um desafio as Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH), Na atividade larvicida a avaliação foi sobre larvas de estágio três da espécie *Aedes aegypti* (linhagem Rockefeller), importante vetor de arboviroses da atualidade, tais como a dengue, chikungunya, zica e febre amarela (DONALISIO et al., 2017).

Visando este contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antibacteriano e larvicida de óleos fixos e extratos metanólicos de plantas popularmente conhecidas na Região Norte do Brasil.

1.2 PLANTAS DE ESTUDO

1.2.1 *Bertholletia excelsa* HBK (castanha-do-brasil)

Classificação botânica: Classe: Equisetopsida; Subclasse: Magnoliidae; Super-

Ordem: Asteranae; Ordem: Ericales; Família: Lecythidaceae; Gênero: *Bertholletia* (TRÓPICOS, 2017).

O gênero *Bertholletia* é derivado do nome do químico Berthollet (1748-1822), sendo a espécie descrita por Bonpland, em 1807, que propuseram a denominação excelsa pelo fato da espécie destacar-se frondosamente acima do dossel (BRAGA, 2007).

A área de distribuição geográfica desta planta estende-se pelos Estados do Maranhão, Mato Grosso, Pará, Acre, Rondônia, Amapá, Roraima e Amazonas (LORENZI; MATOS, 2002; SILVA et al., 2013) e em países vizinhos como Venezuela, Bolívia, Peru, Colômbia e Guianas (FERREIRA et al., 2006).

Popularmente conhecida como castanha-do-brasil, castanha-da-amazônia e castanha-do-pará. É uma espécie arbórea de grande porte, podendo medir de 50 a 60 m de altura (Figura 1). Seu tronco é escuro, liso com ramos apenas próximos da extremidade; as flores são brancas e grandes. o fruto é globoso (ouriço), chegando a pesar 1,5 kg e abriga de 12 a 22 sementes, que são as castanhas (Figura 2) e é considerada uma espécie nativa da Amazônia (BRASIL, 2007).

Figura 1. Árvore da *B. excelsa*.



Fonte: Autoria própria, 2018.

A castanha-do-brasil é uma rica fonte de ferro, zinco e possui as mais altas concentrações conhecidas de selênio (126 ppm), com propriedades antioxidantes (FREITAS; NEVES, 2010). Possui alto teor de potássio e a reduzida concentração de sódio, cuja composição pode favorecer o controle hidroeletrolítico e da pressão arterial, contribuindo assim para a manutenção da saúde (COSTA; JORGE, 2015).

Figura 2. Ouriços da *B. excelsa*: A – Ouriços íntegro; B – Ouriços expondo as castanhas; C – Castanhas.



Fonte: Autoria própria, 2018.

Dentre os minerais, o fósforo é o componente mais abundante em sementes da castanha-do-brasil (Tabela 1), seguido pelo potássio, magnésio e cálcio (SILVA et al., 2010).

O chá de sua casca é usado na Amazônia para tratamento do fígado, e a infusão de suas sementes para problemas estomacais (LORENZI; MATOS, 2002). Possui em seu OF extraído da amêndoa (prensagem) uma composição de 85% de ácidos graxos insaturados e 13% de ácidos graxos saturados, os quais auxiliam nos processos oxidativos de frações de gorduras prejudiciais ao organismo, como as frações de LDL colesterol (SANTOS et al., 2011). O ácido oleico, seu principal constituinte, é muito utilizado pela indústria de cosméticos.

Tabela 1: Composição de macronutrientes e micronutrientes da castanha-do-brasil: Centesimal, minerais e vitaminas/100 gramas (parte comestível).

	Composição	Valor
Macronutrientes (g)	Lipídeos	63,50
	Carboidratos	15,10
	Proteínas	14,50
	Fibra alimentar	7,90
Micronutrientes (mg) Minerais	Fósforo	853
	Potássio	651
	Magnésio	365
	Cálcio	146
	Zinco	4,20
	Ferro	2,30
	Cobre	1,70
	Manganês	1,10
	Sódio	1,00
	Selênio	0,425
Micronutrientes (mg) Vitaminas	Tocoferol β e γ	14,10
	Ácido ascórbico	10,00
	Tocoferol α	2,50
	Niacina	1,70
	Tocoferol δ	1,60
	Tiamina	1,09
	Piridoxina	0,44
	Riboflavina	0,12
	Retinol	0,07

Fonte: TACO, 2006; Balbi et al., 2014.

1.2.2 *Astrocaryum aculeatum* Meyer (tucumã)

Classificação botânica: Classe: Equisetopsida; Subclasse: Magnoliidae; Super-Ordem: Liliales; Ordem: Arecales; Família: Arecaceae; Gênero: *Astrocaryum* (TRÓPICOS, 2017).

No Brasil ocorre nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará e Rondônia. É uma espécie excepcionalmente tolerante a solos ácidos e pobres em nutrientes, carac

terística marcante do solo da região amazônica. Normalmente, são propagadas por sementes que, muitas vezes, apresentam germinação lenta, irregular e em baixa porcentagem (FERREIRA; GENTIL, 2006).

Conhecido popularmente como tucumã, tucum, tucumã-açu, tucumã-arara. O *A. aculeatum* é uma palmeira que chega a medir em torno de 20 metros de altura e 30 cm de diâmetro (Figura 3), geralmente solitária, apresenta um caule com faixas, espinhos negros, folhas ascendentes, flores dispostas de forma ereta com frutos de cor amarela e tons avermelhados, e de ampla distribuição na Amazônia, que por sua vez, apresenta grande biodiversidade do gênero *Astrocaryum* (BACELAR-LIMA et al., 2006; MILL; KAHN, 2010).

Figura 3. Árvore do *A. aculeatum*



Fonte: amazonoil, 2015.

O fruto tem formato ovoide (Figura 4), cujo mesocarpo é fibroso e possui alto teor lipídico, calórico e de β -caroteno (YUYAMA et al., 2008), apresentando 29% de ácidos graxos saturados e apenas 1% de poliinsaturados. Os ácidos monoinsaturados representam 68%, tendo como representante principal o ácido oleico que constituiu 67% da composição química (FERREIRA et al., 2008). O valor da vitamina A encontra

do em tucumã é maior do que outras frutas, como papaia, acerola e vegetais, como cenouras e brócolis (JOBIM et al., 2014) e apresenta substâncias bioativas como rutina e quercetin (Tabela 2). No óleo de tucumã são encontradas quantidades significativas de rutina, ácido gálico, ácido caféico e ácido clorogênico, todos com grande potencial anti-oxidante (SAGRILLO et al., 2015).

Tabela 2: Composição de macronutrientes e micronutrientes do tucumã: Centesimal, minerais e vitaminas/100 gramas (parte comestível).

	Composição	Valor (mg/g)
Macronutrientes (g)	Lipídeos	47,20
	Fibra alimentar	19,20
	Carboidratos	6,80
	Proteínas	5,50
Macro e micronutrientes (mg) Minerais	Cálcio	88,09
	Potássio	85,72
	Sódio	11,99
	Magnésio	7,32
	Fósforo	5,63
	Ferro	0,577
	Zinco	0,213
	Cobre	0,204
	Manganês	0,189
Micronutrientes (mg) Vitaminas	Ácido ascórbico	18,0
	Retinol	5,170
	Piridoxina	0,1
*Outros (mg/g)	β -caroteno	27,55
	Rutina	19,06
	Quercetina	6,53

Fonte: TACO, 2006; LEITÃO, 2008; SAGRILLO et al., 2015.

Uma relação positiva tem sido observada entre a ingestão de vegetais e frutas contendo carotenóides e prevenção de várias doenças crônico-degenerativas, como câncer, inflamação, doença, cataratas, e degeneração macular relacionada com a idade cardiovascular, entre outras (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007).

Figura 4. *A. aculeatum*: Frutos



Fonte: amazonoil, 2015.

1.2.3 *Pentaclethra macroloba* (Wild) O. Kuntze (pracaxi)

Classificação botânica: Classe: Equisetopsida; Subclasse: Magnoliidae; Super-Ordem: Rosanae; Ordem: Fabales; Família: Fabaceae; Subfamília: Mimosoideae; Gênero: *Pentaclethra* (TRÓPICOS, 2017).

Ocorre em todo o Brasil setentrional, Trinidad, Venezuela, Guianas e algumas regiões da América Central (PESCE, 2009). No Brasil, a ocorrência se dá nos estados do Roraima, Pará, Amazonas, Amapá em parte da Bahia e em toda a Região Amazônica (SILVA et al., 1989).

Conhecida popularmente como pracaxi, mulateiro, paracaxi, parauaxi, paroacaxi, pau-mulato, pracaqui. É uma árvore leguminosa fixadora de nitrogênio no solo, constituindo uma espécie pioneira que mistra um grande potencial na regeneração florestal e recuperação de áreas degradadas. Tronco de madeira avermelhada e resistente. Casca adstringente, folhas bipenadas, folíolos luzidios, flores alvas e vagens coriáceas e achatadas, cujas sementes venenosas são lançadas a grandes distâncias (FREITAS et al., 2003). Em florestas tropicais é uma árvore de dossel dominante, alcançando 30-35m (Figura 5).

Figura 5. Árvore da *P. macroloba*

Fonte: Autoria própria, 2017.

Seu fruto apresenta-se inseridos em grandes vagens (Figura 6), uma das características das leguminosas. Encontrada em áreas de altitude de 0-600 m com mais de 3500 mm de chuva por ano e entre 24°C-30°C de temperatura. Germina raramente em terra firme (LORENZI, 1998), porém ocorre preferencialmente em capoeiras e capoeirões situados em beiras de igapós e de rios onde o solo é inundado durante parte do ano (JOKER; SALAZAR, 2000). As sementes apresentam características medicinais, sendo úteis principalmente para cicatrizar úlceras e picadas de cobra (SILVA et al., 2005). Óleo, sabão e extrato são citados como tendo utilidade no tratamento da asma, inflamação, bronquite e cortes (JOHNSTON; COLQUHOUN, 1996). Sua casca é adstringente e o uso interno cura a diarreia e a disenteria (REVILLA, 2002). A casca e as folhas têm propriedades contra a diarreia, vermes, disenteria e lesões externas na Venezuela. O pó da casca é aplicado em úlceras e ferida, possuindo saponinas, esteróis, flavonóides, polifenóis, além de taninos como componentes (VIEIRA, 1996). Saponinas isoladas dos extratos etanólicos das sementes e casca dos galhos, apresentam atividades larvicida contra o mosquito *Ae. aegypti*, que é o vetor da febre amarela e da dengue (SANTIAGO et

al., 2005). Dentre os ácidos graxos encontrados na composição do óleo de pracaxi, o ácido behênico (16%) é referido como uma das maiores concentrações encontradas em óleo de origem vegetal (COSTA, 2014). É popularmente usado contra a erisipela, que é uma infecção da pele geralmente causada por bactérias.

Figura 6. *P. maculoba*: Fruto



Fonte: floraflora, 2011.

1.2.4 *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke (amapazeiro)

A área de distribuição desta espécie é no Norte da América do Sul, Guiana Francesa, Guiana, Suriname, Venezuela, no Delta do Amacuro e Brasil, mais especificamente na floresta amazônica. Conhecida popularmente como “Amapazeiro”, “mapá” ou “amapá”. Classificação botânica: Classe: Equisetopsida; Subclasse: Magnoliidae; Super-ordem: Asteranae; Ordem: Gentianales; Família: Apocynaceae; Gênero: *Parahancornia* (TRÓPICOS, 2017).

É uma árvore lactífera da qual obtêm-se um látex popularmente chamado de “leite do amapá” (Figura 7). Os gêneros *Parahancornia* e *Couma* apresentam um látex comestível não elástico, conhecido como amapá amargosa. Seu látex é considerado de uso medicinal contra afecções pulmonares e feridas na pele, gastrite, fraqueza, cicatrização e como tônico, especialmente por mulheres após o parto (SHANLEY; ME

DINA, 2005). O leite do amapá doce é um exsudato de sabor adocicado, procedente de espécies do gênero *Brosimum* (BEZERRA, 2013). No extrato metanólico do látex da *P. amapa* identificou-se grande quantidade de carboidratos, metilmioinositol e derivados de feniletanóides tendo como principal constituinte o cornosídeo (CARVALHO et al., 2008).

Figura 7. Látex da *P. amapa*.



Fonte: plantasquecuram, 2015.

O amapazeiro (Figura 8) possui folhas opostas, lanceoladas de 4 a 6 centímetros, ápice arredondado e obtuso, margens inteiras, pecíolo de 2,5 a 5 mm de comprimento, inflorescência cimosas terminais, junto a flores brancas, muito perfumadas, cálice tetrapartido. Segundo Henrique et al. (2014), do extrato diclorometânico dos galhos, foram isolados o β -sitosterol, estigmasterol, além de triterpenóides pentacíclicos, α -amirina, β -amirina, lupeol e friedelina e do extrato metanólico das cascas foi isolado o alcaloide indólico isositsiriquina.

Figura 8. Árvore da *P. amapa*.



Fonte: plantasquecuram, 2015.

1.2.5 *Amasonia campestris* (Aubl.) Moldenke (rabo de arara)

Esta espécie está amplamente distribuída nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil, ocorrendo desde o Amazonas até o Espírito Santo, sendo encontrada no Amapá, Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Pernambuco, Bahia e Goiás. Esta espécie habita no domínio amazônico em locais sombreados e bordas de florestas, em latossolos, e em ambientes savanóides; no cerrado, cerradão e campo rupestre, e em áreas de transição entre caatinga e cerrado (SANTOS, 2011).

Conhecida popularmente como Rabo-de-arara ou mendoca. Classificação botânica: Classe: Equisetopsia; Subclasse: Magnoliidae; Super-Ordem: Asteranae; Ordem: Lamiales; Família: Lamiaceae; Gênero: *Amasonia*. É um subarbusto de 0,2-1 m. Apresenta ramos de 4-7 mm diâmetro, castanhos a vináceos, com folhas geralmente agrupadas na região mediana, pecioladas, cilíndricas e subquadrangular, oboval a oblanceolada, com ápices agudas e margens serradas (Figura 9).

Figura 9. Arbusto da *A. campestris*

Fonte: chiviaggiainpara, 2015.

Com flores tubulares pequenas e amarelas acompanhadas de brácteas florais avermelhadas (Figura 10) (RAMIREZ, 2007; SANTOS, 2011). Suas raízes são muito utilizadas na medicina popular como antimalárico (COSTA, 2013), no tratamento de problemas no útero, hemorragias e inflamações de mulher (COELHO-FERREIRA, 2009) e na toxicidade aguda e atividade hipoglicemiante (GUIMARÃES JR, 2015).

Ressalta-se que estudos sobre o gênero *Amasonia* são muito escassos, tornando-o promissor para condução de estudos químicos, farmacológicos e toxicológicos.

Figura 10. *A. campestris*: Flores tubulares

Fonte: flickriver, 2016.

1.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

1.3.1 Atividade antimicrobiana dos óleos fixos e extratos brutos

Os antimicrobianos são uma classe de substâncias com ação farmacológica que mata ou inibe o desenvolvimento de microrganismo, como bactérias, fungos, vírus ou protozoários. Podem ser compostos naturais ou sintéticos. (GUIMARÃES et al., 2010). O uso de antimicrobianos (para tratamento e/ou profilaxia) promove a adaptação ou a morte dos microrganismos, em um fenômeno conhecido como pressão de seleção. Mesmo com toda tecnologia, há microrganismos que sobrevivem, pois possuem genes de resistência, que podem ser passados a outros microrganismos da mesma espécie ou até mesmo, de outras espécies (ANVISA, 2013). O uso de extratos vegetais e fitoquímicos com finalidade medicinal é uma das mais antigas formas de aplicação medicinal da humanidade (ARAÚJO; LEON, 2001). Bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, podem ter o seu crescimento controlado por óleos essenciais e extratos brutos de diversas espécies da planta. Segundo Sartoratto et. al. (2004), estes podem controlar o crescimento dos microrganismos relacionados à pele, à cárie dental. Nas indústrias de alimentos, cosméticos e fármacos, as plantas aromáticas têm grande importância. Folhas de *Origanum vulgare* L., *O. applii* L., *O. basilicum* L., *O. gratissimum* L., *Mentha spicata* L. e *Mentha piperita* L. var. *citrata* têm sido utilizadas como chás, embora o óleo essencial seja utilizado em cosméticos e fármacos. Os índices dos óleos essenciais em espécies diferentes são influenciados pelo material, pelas condições da cultura e pelo ambiente genético, e finalmente, a colheita e o processamento da colheita (SARTORATTO et al., 2004).

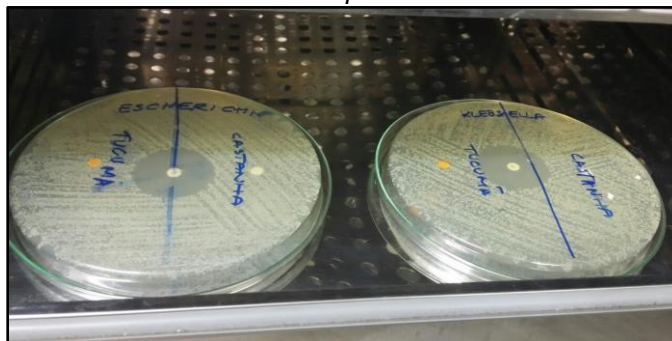
No Brasil, mesmo com sua rica biodiversidade, muitas plantas possuem poucos

estudos referentes à atividade antibacteriana, como por exemplo, o amapazeiro e o rabo-de-arara, plantas de escolha neste estudo.

1.3.2 Resistência bacteriana

Uma bactéria é considerada resistente quando consegue crescer em concentrações mais altas do que a maior concentração da droga no sítio da infecção (TORTORA et al., 2005; FERREIRA, 2007). Uma ação conjunta de múltiplos mecanismos pode produzir um acentuado aumento da resistência aos antimicrobianos (Figura 11). Com frequência bactérias utilizam mais de uma estratégia para evitar a ação dos antimicrobianos.

Figura 11. Resistência bacteriana da castanha-do-brasil e tucumã contra *E. coli* e *K. pneumoniae*.



Fonte: Autoria própria, 2017.

A resistência a determinado antimicrobiano pode constituir uma propriedade intrínseca de uma espécie bacteriana, sendo decorrente da ausência de estruturas de atuação de antimicrobianos ou a impermeabilidade, por parte de estruturas periféricas das bactérias, ou uma capacidade adquirida que ocorre por mecanismos genéticos diversos, tais como: produção de enzimas inativadoras, interferência com a entrada e

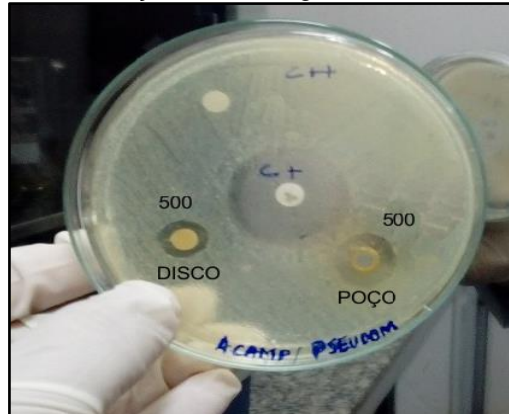
acúmulo de droga na bactéria, alteração do receptor para ação da droga, via metabólica alternativa. É originada através de uma alteração a nível genético da célula, de natureza cromossômica pelos processos de mutação, transdução e transformação ou extra cromossômica (plasmidial) (ANVISA, 2013).

Na tentativa de bloqueio na resistência bacteriana existem estratégias básicas comportamentais que podem contribuir, tais como: educação dos profissionais de saúde, implementação de isolamento por contato para pacientes colonizados/infectados, uso de Equipamento de Proteção Individual (EPI) e coletivo (EPC), higienização das mãos, desinfecção de superfícies, restrição/controle do uso de antimicrobianos. Estudos realizados por McGowan (2001) apontam que o maior fator para a disseminação da resistência microbiana, é a transmissão cruzada, principalmente pelas mãos dos profissionais de saúde, seguido da pressão de seleção do uso de antimicrobianos e a introdução de novos microrganismos. Segundo Duarte (2006), outro importante fator de risco para o aparecimento e disseminação da resistência microbiana é o uso abusivo e incorreto dos antimicrobianos no ambiente hospitalar e na comunidade.

1.3.3 Métodos de avaliação de atividade antibacteriana

Existem inúmeros bioensaios utilizados para avaliar a atividade antibacteriana de OFs e EBs de plantas, bem como de compostos isolados. Dentre os testes disponíveis e utilizados neste estudo são: Teste de difusão em ágar (disco e poço) de acordo com o protocolo M2-A8 (Figuras 12 e 13) (NCCLS, 2015a) e Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de acordo com o protocolo M7-A10 (Figura 14) (NCCLS, 2015b).

Figura 12. Difusão em ágar (disco e poço)
A. campestris contra *P. aeruginosa*.
Concentração de 500 mg/mL.



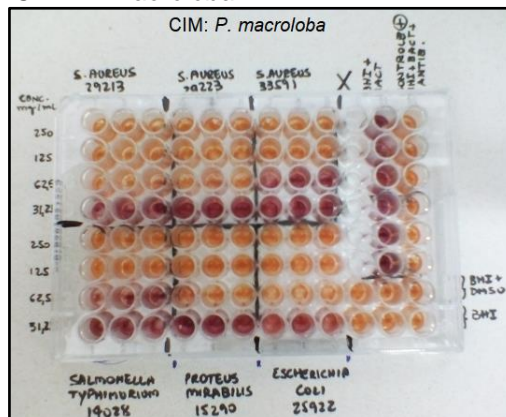
Fonte: Autoria própria, 2017.

Figura 13. Difusão em ágar (disco e poço)
P. macroloba contra *E. coli*.
Concentração de 500 mg/mL.



Fonte: Autoria própria, 2017.

Figura 14. Microdiluição em placa
CIM: *P. macroloba*



Fonte: Autoria própria, 2017.

1.3.4 Importância clínica das bactérias

As bactérias Gram negativas em estudo são pertencentes à família das Enterobacteriaceae. Esta é constituída por bacilos Gram negativos, classificados atualmente em 44 gêneros, 176 espécies e quatro grupos entéricos ainda não nomeados. É um grupo amplamente disperso na natureza. Seu potencial patogênico para o homem, animais e vegetais, assim como sua ecologia são variáveis (ANVISA, 2013). Amplamente estudadas sobre sua resistência em infecções hospitalares (SEIBERT et al., 2014; ATAÍDE et al., 2015), as enterobactérias tem grande representatividade (cerca de 80% ou mais) na rotina microbiológica de todos os Gram negativos isolados de importância clínica. Doenças diarreicas, infecções em feridas e queimaduras, infecção no trato respiratório, meningite, infecções urinárias (70% dos casos) e septicemias (50% dos casos), são causadas por várias espécies de enterobactérias patogênicas ao homem. (ANVISA, 2013).

As bactérias Gram positivas em estudo são amplamente difundidas em ambientes hospitalares, caracterizando um desafio as Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH), devido apresentaram ampla resistência aos antimicrobianos.

1.4 ATIVIDADE LARVICIDA

1.4.1 Atividade larvicida de espécies vegetais

Cerca de 400 a.C. o “pó da Pérsia”, assim conhecido o pireto, substância deri

vada do crisântemo (*Chrysanthemum cineraria folium* (Trev.) Bocc) já era utilizado no controle de pragas. Os primeiros fitoinseticidas usados foram a nicotina (*Nicotiana tabacum* L.), a rianodina (*Ryania speciosa* Vahl), a sabadina e outros alcalóides extraídos de *Schoenocaulon officinale* Schltdl. & Cham., as piretrinas extraídas do piretro *C. cinerariae folium* (Trev.) Bocc e a rotenona (*Derris* spp e *Lonchocarpus* spp) (RODRIGUEZ, 1992; ROEL, 2001). Na década de 1940, os inseticidas de origem natural foram muito utilizados no combate às pragas agrícolas. Como inseticidas, as plantas são fontes importantes de substâncias bioativas com estruturas químicas diferentes e com diversas atividades contra insetos (BRASIL, 2007). Dentre os inseticidas orgânicos, cujas substâncias ativas são provenientes de plantas destacam-se: o alcaloide nicotina, isolado de espécies de *Nicotiana*; os piretroides piretrina e aletrina, extraídos das flores de *Chrysanthemum cinerariae folium* (Trev.) Bocc, e o rotenóide rotenona, isolado de espécies dos gêneros *Derris* e *Lonchocarpus*, e, mais recentemente, o limonoide azadiractina, obtido de *Azadirachta indica* A. Juss (GUARDA et al., 2016).

Os testes laboratoriais têm como objetivo determinar o biopotencial larvicida do material vegetal. Para esta avaliação, larvas de mosquito criadas em laboratório de cepa e idade conhecida (ou instar) são expostas por 24 a 48 horas ou mais em água tratada com o larvicida em várias concentrações dentro de sua faixa de atividade sendo a mortalidade registrada, determinando assim a concentração letal (CL) do larvicida para 50% ou 90%. (WHO, 2005).

1.4.2 Resistência à inseticidas químicos

O homem e o meio ambiente, podem sofrer uma série de problemas devido aos

inseticidas sintéticos, gerando efeitos indesejáveis como o ressurgimento de pragas-alvo, o surgimento de pragas secundárias em função dos efeitos tóxicos sobre os inimigos naturais dessas pragas, desenvolvimento de resistência das pragas destes produtos, intoxicações dos trabalhadores rurais, contaminação da água e do solo, impactos negativos sobre os organismos não-alvo e presença de resíduos tóxicos nos alimentos (BISSET et al., 2003; MENEZES, 2005).

1.4.3 O mosquito *Aedes aegypti*

As espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* pertencem ao Filo Arthropoda (pés articulados), à Classe Hexapoda (três pares de patas), a Ordem Diptera (um par de asas anterior funcional e um par posterior transformado em halteres), à Família Culicidae e ao Gênero *Aedes* (BRASIL, 2001).

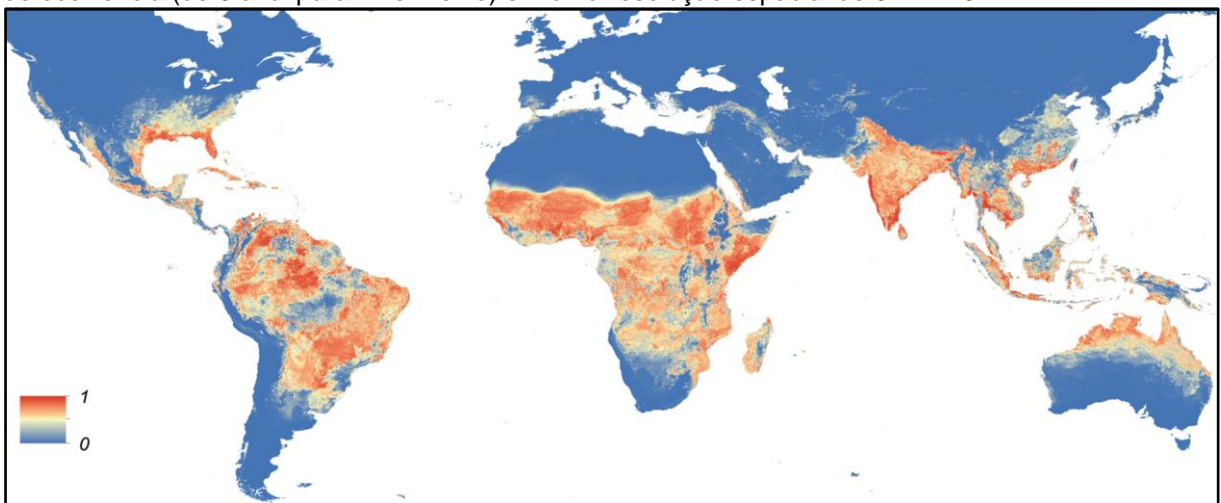
De acordo com estudos, o *Ae. aegypti* é originário da África onde diferenciou-se e adaptou-se aos centros urbanos, sendo que a variedade doméstica, somente tem sido encontrada nas Américas, a qual se acredita tenha sido transportada em barris que vinham dos navios de exploradores e colonizadores. Sendo oriundo da floresta tropical Asiática, o *Ae. albopictus*, posteriormente passou a adaptar-se ao ambiente urbanizado preferindo áreas abertas com florestas em torno das habitações (CATÃO, 2012).

O agente etiológico da febre amarela foi o primeiro microrganismo a ser denominado de vírus, em 1902 e o da dengue, em 1907, sendo descritos como filtráveis e submicroscópicos. No período da Segunda Guerra Mundial, ocorreu o isolamento do primeiro vírus da dengue por Kimura e Hotta e por Sabin e Schlesinger.

Estes últimos isolaram a cepa durante a ocorrência de uma epidemia no Havaí e, mais tarde, também conseguiram isolar o segundo sorotipo. Em 1956, em um curso epidêmico hemorrágico na Ásia, os tipos 3 e 4 foram descobertos. A partir daí os quatro sorotipos foram identificados e conhecidos como DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

A expansão geográfica mundial e a alta incidência da dengue (Figura 15), são influenciadas por vários fatores, como a falta de infraestrutura dos sistemas públicos de saúde, o acelerado desmatamento e/ou a expansão das zonas urbanas para áreas anteriormente de floresta, os descuidos no controle do vetor, entre outros (CATÃO, 2012; MACIEL et al., 2013).

Figura 15. Mapa global da distribuição do *Aedes aegypti* em 2015. O mapa representa a probabilidade de ocorrência (de 0 azul para 1 vermelho) em uma resolução espacial de 5 km x 5 km.

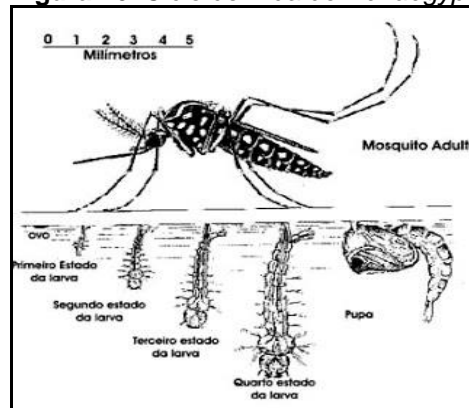


Fonte: elifesciences.org/content/content/4/e08347.

A dengue é transmitida através da picada do inseto fêmea do *Ae. aegypti* contaminado pelo vírus. A maturação dos ovos é viabilizada pelos repastos sanguíneos. O período de transmissibilidade da doença ocorre tanto no mosquito quanto no homem através de dois ciclos: período de incubação extrínseco e período de incubação intrínseco, respectivamente (BRASIL, 2009a).

O ciclo de vida do *Ae. aegypti* compreende quatro fases, a conhecer: ovo, larva (quatro estados), pupa e adulto (Figura 16).

Figura 16. Ciclo de Vida do *Ae. aegypti*



Fonte: ioc.fiocruz.br, 2015.

a) OVO

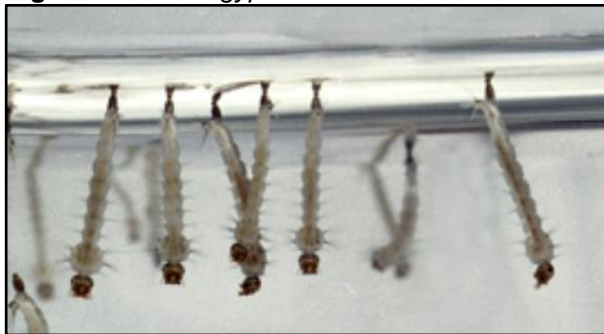
A fêmea do mosquito deposita os ovos na parede interna de recipientes próximos a superfície aquática sendo de coloração esbranquiçada, mas logo adquirem cor enegrecida brilhante (BRASIL, 2001). Caso o mosquito não encontre recipientes adequados, a fêmea, em casos excepcionais, pode voar a grandes distâncias em busca de outros locais para realizar a oviposição (BRASIL, 2009a). Seu tamanho varia de 0,6 a 0,7 mm e podem persistir na natureza por cerca de um ano e meio sem sofrer influências externas (CATÃO, 2012). Uma fêmea produz cerca de 120 ovos por postura. Por volta de 4 a 7 dias o embrião está apto a surgir caso a umidade e a temperatura estejam favoráveis (ACIOLE, 2009). O ovo é a forma mais resistente do ciclo biológico, fato que possibilita ampla sobrevivência ao mosquito, devido à resistência às adversidades climáticas (SILVA; SILVA, 1999).

b) LARVA

Por ser holometabólico, é neste estágio que ocorre o período de alimentação e crescimento e subdivide-se em quatro fases evolutivas. Estas dependem de condições ideais como temperatura, densidade das larvas no criadouro e disponibilidade de alimento. Desta forma, a duração dos instares pode não ultrapassar os cinco dias. Ao contrário, o quarto estágio pode perdurar por semanas (BRASIL, 2001).

A larva vem à superfície para respirar ficando em posição quase vertical (Figura 17). Para se deslocar, movimenta-se em forma de serpente. Sob luminosidade e movimentos bruscos na água, local onde se passa tal fase, a larva retorna ao fundo do depósito com rapidez (SANTA CATARINA, 2008).

Figura 17. *Ae. Aegypti*: Larvas



Fonte: ioc.fiocruz.br, 2015.

c) PUPA

Nesta fase o mosquito sofre sua última metamorfose até a fase adulta. A pupa se desenvolve por completo em dois dias. Sua cabeça une-se ao tórax (cefalotórax), portanto vem a possuir aspecto de vírgula (Figura 18) (ACIOLE, 2009).

Figura 18. *Ae. Aegypti*: Pupa

Fonte: ioc.fiocruz.br, 2015.

d) ADULTO

O adulto representa a fase reprodutora do inseto (Figura 19). Posteriormente à fase pupal, o adulto procura pousar sobre as paredes do recipiente, ficando ali por horas, para possibilitar o endurecimento do exoesqueleto, das asas. O acasalamento se dá geralmente durante o voo e uma única inseminação é suficiente para fecundar todos os ovos que a fêmea venha a produzir durante toda a sua vida (BRASIL, 2001).

Figura 19. *Ae. Aegypti*: Fase adulta

Fonte: ioc.fiocruz.br, 2015.

As fêmeas alimentam-se de sangue e de sucos vegetais. A nutrição sanguínea é realizada para maturação dos ovos e quando o repasto não é completo o mosquito a realiza mais de uma vez entre duas posturas. Em condições ideais, o intervalo entre a alimentação e oviposição é de três dias (SANTA CATARINA, 2008).

Desta forma, quanto às manifestações clínicas têm-se: a manifestação da dengue pode ser assim elucidada: Dengue Clássica (DC) Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e Síndrome do Choque da Dengue (SCD). Na forma clássica (duração de 5 a 7 dias), a primeira manifestação é a febre (39 a 40°C), com início abrupto, associada a dores de cabeça, articulares, musculares e ao redor dos olhos, e exantema (vermelhidão generalizada), acompanhado, ou não, de coceira. A FHD apresenta seus sintomas iniciais semelhantes aos da DC, porém com posterior agravamento do quadro, diminuição da febre, aparecimento de manifestações hemorrágicas, trombocitopenia (diminuição de plaquetas) e perda de plasma. A SCD é um agravamento da FHD, frequentemente precedido por dor abdominal. Com curta duração, a SCD pode levar a óbito ou à recuperação rápida caso ocorra tratamento adequado (BRASIL, 2009a).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a atividade antibacteriana e larvicida dos óleos fixos da *B. excelsa*, (castanha-do-brasil), *A. aculeatum* (tucumã) e dos extratos brutos metanólicos da *P. macroloba* (pracaxi), da *P. amapa* (amapazeiro) e da *A. campestris* (rabo-de-arara).

2.2 ESPECÍFICOS

- a) Avaliar atividade antimicrobiana dos OFs e EBMs das espécies de estudo, pelo método de difusão em ágar (disco e poço);
 - b) Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos OFs e EBMs;
 - d) Avaliar atividade larvicida dos OFs e EBMs das espécies de estudo, sobre larvas de estágio três da espécie *Aedes aegypti* (Linhagem Rockefeller);
 - e) Estimar a CL₅₀ e CL₉₀ de espécie *Aedes aegypti* (Linhagem Rockefeller) por análise Probit.
-

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

Para o presente estudo, foram utilizadas cinco espécies vegetais: pracaxi (amêndoas), tucumã (polpa), pracaxi (cascas do caule), amapazeiro (cascas do caule) e o rabo-de-arara (raízes).

Os óleos fixos da castanha-do-brasil e do tucumã, foram fornecidos pelo Laboratório do Núcleo de Ciência e Tecnologia de Alimentos (NUCTECNAL), do Instituto de Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado do Amapá (IEPA).

As cascas do caule do pracaxi foram coletadas no distrito de Fazendinha, Macapá, Amapá, Brasil (GPS Lat. $-51^{\circ}09'54''\text{N}$; Long. $-0^{\circ}04'12''\text{W}$). Uma exsicata foi depositada no Herbário Amapaense (HAMAB), do IEPA, recebendo o número de 018803.

As cascas do caule do amapazeiro foram coletadas na Rodovia BR 156, km 9, linha D, no município de Macapá, Amapá, Brasil (GPS Lat. $-51^{\circ}13'37''\text{N}$; Long. $0^{\circ}06'76''\text{W}$). Uma exsicata foi depositada no HAMAB, recebendo o número de 18350.

As raízes da rabo-de-arara foram coletadas no Residencial Alphaville, Macapá, Amapá, Brasil (GPS Lat. $-0,041004''\text{N}$; Long. $-51.111626''\text{W}$), em um raio de 25 metros. Uma exsicata foi depositada no HAMAB, recebendo o número de 001-2016.

3.2 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS FIXOS E EXTRATOS BRUTOS METANÓLICOS

Os óleos fixos foram fornecidos pelo Laboratório NUCTECNAL, do IEPA. Foi

utilizada a técnica de extração por prensagem hidráulica para as amêndoas da castanha-do-brasil e para as polpas do tucumã.

Para a obtenção dos óleos fixos, os materiais vegetais foram distribuídos em bandejas e desidratadas em estufa (Q314 m, Quimis) a temperatura de 50°C por 10 horas e resfriado a temperatura ambiente. Os materiais secos foram pressionados em prensa hidráulica (FM3, Siwa) e os óleos fixos obtidos foram armazenados em frascos âmbar para posterior análise.

Os extratos brutos foram obtidos no Laboratório de Experimentação Animal (LEA), da Universidade Federal do Amapá-AP. Foi utilizada a técnica de extração por solvente (metanol), para as cascas do caule do pracaxi, para as cascas do caule do amapazeiro e para as raízes do rabo-de-arara.

Para obtenção dos extratos brutos, os materiais vegetais foram secos em estufa (EL 1.4, Biodonte) a uma temperatura de 40°C, por 72 h. O material seco foi fragmentado e triturado em moinho de facas (LQ.8, Metvisa) e macerado com metanol (solvente), numa proporção de 1:5 (1 kg de material vegetal / 5 L de metanol) com agitação a cada 24 h, durante sete dias (o amapazeiro sofreu agitação a cada 24 h por dez dias). Decorrido o tempo, a solução extrativa foi filtrada e concentrada em evaporador rotatório (802, Fisatom) a 65 rpm (50°C) e armazenado em um frasco âmbar para posterior análise.

3.3 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS E EXTRATOS

3.3.1 Microrganismos utilizados e preparo do inóculo bacteriano

Para este estudo, foram utilizadas espécies bacterianas de referência ATCC (American Type Culture Collection), cedidas da coleção de bactérias da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ (FIOCRUZ / RJ), sendo as Gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, ATCC 25923 e ATCC 33951, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 e as Gram negativas: *Escherichia coli* ATCC 10536 e ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 4352, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Proteus mirabilis* ATCC 15290.

As cepas ATCC foram semeadas em ágar Mueller-Hinton e incubadas a 35°C por 24 h, sendo as Gram positivas previamente colocadas em jarras de anaerobiose. Suspensões de 5 mL de solução salina estéril 0,9%, pH 7,2, com colônias de cada bactéria, foram preparadas a partir de cada cultivo, atingindo a equivalência de 0,5 de turbidez da escala de MacFarland (Figura 20) (NCCLS, 2003a).

Figura 20. Escala MacFarland de turbidez
Tubo E: 0,5 de turbidez ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL).



Fonte: fciencias, 2015.

3.3.2 Preparo (Diluição) dos óleos fixos e extratos brutos

Para realização dos ensaios, foram preparadas soluções dos OFs e EBMs nas

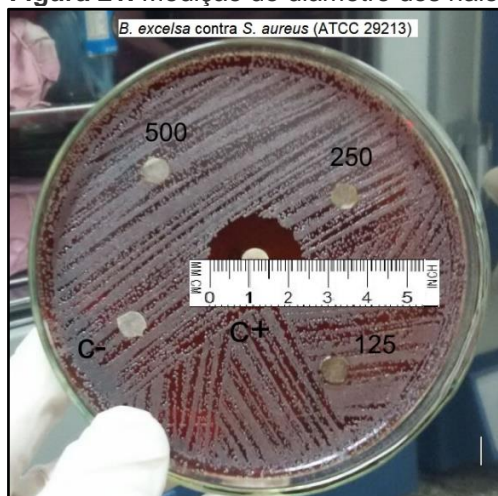
concentrações de 125, 250 e 500 mg/mL. Nas preparações das soluções foi utilizado o DMSO para dissolução do OF da *B. excelsa* e para os EBMs da *P. macroloba*, *P. amapa* e *A. campestris* na concentração máxima de 5%. Para dissolução do OF do *A. aculeatum* foi utilizado o 2,3-diclorometano na mesma concentração máxima.

Foram preparadas 2 mL de cada de produto testado, nas concentrações desejadas.

3.3.3 Suscetibilidade e resistência no teste de difusão em ágar

Para avaliação antibacteriana dos OFs e EBMs, empregou-se o teste de difusão em ágar (KIRBY; BAUER, 1966), considerando suscetível a concentração dos óleos e/ou extratos que apresentou halo de inibição ≥ 8 mm de diâmetro, medindo-se o diâmetro dos halos formados ao redor dos discos e poços, com auxílio de uma régua milimetrada (Figura 21). Ausência de halos ou com diâmetros inferiores foram considerados resistente (R) aos produtos testados (CARVALHO, 2014).

Figura 21. Medição do diâmetro dos halos



Fonte: Autoria própria, 2017.

3.3.4 Teste de difusão em ágar (disco)

Em placas de 90 mm contendo ágar Mueller-Hinton foram inoculadas, com o auxílio de um swab, as suspensões bacterianas. Discos de papel de filtro estéreis (6 mm) impregnados com 10 μ L das concentrações de cada OFs e EBMs e dos controles (positivo e negativo), foram dispostos sobre as placas inoculadas. As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 24 h (Figura 22). Como controle positivo para as bactérias Gram-positivas: disco de vancomicina (30 μ g) e para as bactérias Gram-negativas: disco de norfloxacina (10 μ g). Como controle negativo foi utilizado discos impregnados com os respectivos diluentes dos OFs e EBMs. Testes realizados em triplicata.

Figura 22. Difusão por disco: *B. excelsa*, *A. aculeatum*, *P. macroloba* e *P. amapa* contra *E. coli* ATCC 25922.



Fonte: Autoria própria.

3.3.5 Teste de difusão em ágar (poço)

Em placas de 90 mm contendo ágar Mueller-Hinton foram inoculadas, com o auxílio de um swab, as suspensões bacterianas. Foram perfurados poços com auxílio de alças descartáveis, onde foram dispensados 50 μ L de OFs e EBMs e dos controles

(positivo e negativo). As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 24 h (Figura 23). Como controle positivo para as bactérias Gram-positivas: vancomicina (0,2 mg/mL) e para as bactérias Gram-negativas: norfloxacina (0,2 mg/mL). Todos os testes foram feitos em triplicata. Como controle negativo foi utilizado os respectivos diluentes dos OFs e EBMs. Testes realizados em triplicata.

Figura 23. Difusão por poço: *B. excelsa*, *P. macroloba* e *P. amapa* contra *S. aureus* (33591).



Fonte: Autoria própria.

3.3.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Foram utilizadas placas de microdiluição de 96 poços (KASVI – K12-096), adicionando-se 100 µL do meio Brain Heart Infusion (BHI) com concentração dupla, em todos os poços. Foram adicionados à primeira linha da placa, 100 µL dos EBMs (uma placa para cada extrato), e homogeneizados, retirou-se 100 µL de cada poço da linha 1 para a linha 2 e assim sucessivamente até a linha 5, obtendo-se então, as concentrações (mg/mL) do extrato na linha 1=250, na linha 2= 125, na linha 3=62,5, na linha 4=31,25 mg/mL e na linha 5=15,625. Em seguida, adicionou-se uma alíquota de 10 µL dos inóculos bacteriano, que foram sensíveis aos OFs e EBMs, nos poços da microplaca e incubou-se a 35°C por 24 h. Decorrido o tempo, foram acresci

dos a cada um dos orifícios 10 μ L de solução aquosa de cloreto de trifeniltetrazólio (CTT) a 0,5%, e as microplacas foram novamente incubadas a 35°C por mais 4 h (Figura 24).

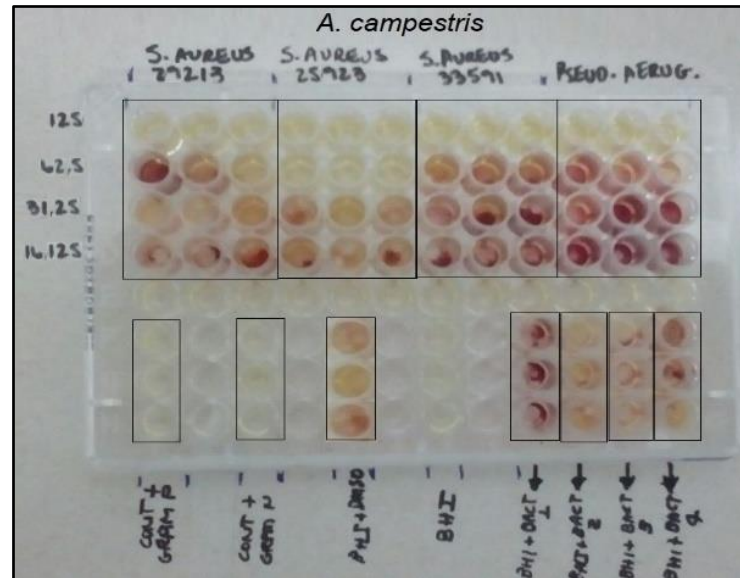
Figura 24: Esquema representativo da determinação da CIM dos EBM do estudo

	Bactéria 1			Bactéria 2			Bactéria 3			Bactéria 4		
mg/mL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A - 250	100 μ L BHI + 100 μ L EBM	100 μ L BHI + 100 μ L EBM	100 μ L BHI + 100 μ L EBM	100 μ L BHI + 100 μ L EBM	100 μ L BHI + 100 μ L EBM	100 μ L BHI + 100 μ L EBM	100 μ L BHI + 100 μ L EBM	100 μ L BHI + 100 μ L EBM	100 μ L BHI + 100 μ L EBM	100 μ L BHI + 100 μ L EBM	100 μ L BHI + 100 μ L EBM	100 μ L BHI + 100 μ L EBM
B - 125	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI
C - 62,5	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI
D - 31,25	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI
E -	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI	100 μ L BHI
F - Cont	100 μ L BHI+ 10 μ L C+/G+		100 μ L BHI+ 10 μ L C+/G-		100 μ L BHI+ 10 μ L C+/G-		100 μ L BHI		100 μ L BHI+ 10 μ L Bact 1	100 μ L BHI+ 10 μ L Bact 1	100 μ L BHI+ 10 μ L Bact 1	100 μ L BHI+ 10 μ L Bact 1
G - Cont	100 μ L BHI+ 10 μ L C+/G+		100 μ L BHI+ 10 μ L C+/G-		100 μ L BHI+ 10 μ L C+/G-		100 μ L BHI		100 μ L BHI+ 10 μ L Bact 1	100 μ L BHI+ 10 μ L Bact 1	100 μ L BHI+ 10 μ L Bact 1	100 μ L BHI+ 10 μ L Bact 1
H - Cont	100 μ L BHI+ 10 μ L C+/G+		100 μ L BHI+ 10 μ L C+/G-		100 μ L BHI+ 10 μ L C+/G-		100 μ L BHI		100 μ L BHI+ 10 μ L Bact 1	100 μ L BHI+ 10 μ L Bact 1	100 μ L BHI+ 10 μ L Bact 1	100 μ L BHI+ 10 μ L Bact 1
	Cont + Bact G+		Cont + Bact G-		Cont - DMSO		BHI	BHI + Bact 1	BHI + Bact 2	BHI + Bact 3	BHI + Bact 4	

Fonte: Autoria própria.

A CIM foi definida como a menor concentração do extrato em mg/mL, capaz de impedir o crescimento microbiano (Figura 25). Como controle positivo para as bactérias Gram-positivas: vancomicina (0,2 mg/mL) e para as bactérias Gram-negativas: norfloxacina (0,2 mg/mL). Como controle negativo o DMSO. Todos os testes foram feitos em triplicata.

Figura 25. CIM da *A. campestris* contra *S. aureus* ATCC 29213, 25923, 33591 e *P. aeruginosa* ATCC 27853; (C+): vancomicina 0,2 mg/mL; (C-): DMSO. Concentração inicial de 125 mg/mL, devido a característica escura do extrato, dificultando a visualização em concentrações mais altas.



Fonte: Autoria própria

3.3.7 Análise de dados da atividade antimicrobiana

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) para experimentos inteiramente aleatórios, com o cálculo da estatística F e de seus respectivos “*p-value*”. Nos casos em que $P < 0,05$, as médias de tratamento foram comparadas pelo método de *Tukey*, com o cálculo da diferença mínima significativa para $\alpha = 0,05$, através do software *Graph Pad Prim 6* (CARNEIRO et al., 2017).

3.4 ATIVIDADE LARVICIDA DOS ÓLEOS E DOS EXTRATOS

3.4.1 Bioensaio larvicida

As larvas de *Ae. Aegypti* da linhagem Rockefeller que foram utilizadas são da coleção do Laboratório Arthropoda da Universidade Federal do Amapá (ARTHROLAB). O processo foi iniciado com ovos de larvas da colônia, evoluídos para larvas do 3º estado (instar), para se evitar que durante os experimentos eles atingissem a fase de pupa. Foram mantidos em condições climáticas padrão em sala (3 m x 4 m) com temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa de $75 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 12 horas (MAGALHÃES, 2015). Os OFs e EBMs foram diluídos em solução de dimetilsulfóxido a 2% (DMSO, Synth ACS), exceto o OF de tucumã que foi diluído em 2,3-diclorometano. As concentrações dos óleos e extratos (12.5 , 25.0 e $50,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram preparadas a partir de uma concentração de estoque (CE) de $5000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 3), calculando o volume final a ser utilizado, pela fórmula:

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

Os bioensaios foram realizados em vidro Becker com capacidade total de 100 mL. As concentrações de OF e EBM foram adicionadas em 80 mL de água destilada para o estudo. A Tabela 3 apresenta as concentrações testadas nos bioensaios da atividade larvicida. Para a obtenção da concentração de $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, foram utilizados 0,25 mL da CE nos cinco testes (Grupo 3: T1, T2, T3, T4 e T5). Para a concentração de $25,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, foram utilizados 0,5 mL da CE nos cinco testes (Grupo 4: T1, T2, T3, T4 e T5). Para a concentração de $50,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, foram utilizados 1,0 mL da CE nos cinco testes (Grupo 5: T1, T2, T3, T4 e T5). A solução foi agitada para homogeneização, as larvas foram adicionadas em cada um dos grupos correspondentes e controles e o volume foi ajustado para 100 mL.

Tabela 3. Concentrações em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dos produtos testes empregados no bioensaio da atividade larvicida contra o *Ae. Aegypti*.

Grupo	AD	*Conc.	DIL	LV	T1	T2	T3	T4	T5
Cont. 1	100	-	-	10	-	-	-	-	-
Cont. 2	100	-	1,0	10	-	-	-	-	-
3	100	12,5	-	10	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
4	100	25,0	-	10	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
5	100	50,0	-	10	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Cont. 1: Controle 1; Cont. 2: Controle 2; AD: Água destilada (mL); *Conc.: concentrações obtidas a partir da CE ($\mu\text{g.mL}^{-1}$); DIL (utilizado na obtenção da CE): DMSO (mL); LV: Quantidade de larvas por grupo; T1, T2, T3, T4 e T5 (Testes): Volume utilizado da CE (mL).

Foram utilizados o grupo controle (1) contendo somente água destilada e o grupo controle (2) contendo água destilada e o solvente utilizado, correspondente ao volume em mL da maior concentração utilizada. As leituras da mortalidade larval foram observadas após exposição de 24 e 48 h, considerando como larva morta a ausência total de movimentos e por meio da estimulação exaustiva externa do recipiente com pipetas Pasteur. Os testes foram realizados em quintuplicatas com 10 (dez) larvas em cada teste e controles.

3.4.2 Análise dos dados da atividade larvicida

Para determinar os valores de CL_{50} e CL_{90} da atividade larvicida dos dados obtidos, foi realizada uma Análise Probit. Além do efeito da substância testada, foi comprovado também se o efeito observado era dependente do tempo de contato das larvas com os OFs e EBMs. Foi considerado um efeito estatisticamente significativo se $p < 0,05$. A comparação da CL_{50} e CL_{90} dos OFs e EBMs foram feitas através do intervalo de confiança ao nível de 95% de confiança. Para o processamento da informação foi utilizado o software Statgraphic Centurium XXV.1 (StatEase® Co. MA. USA).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS E EXTRATOS

Os materiais vegetais inicialmente foram lavados, secos e pesados. A porcentagem do rendimento foi obtida por (kg) de material seco estão representados na Tabela 4.

TABELA 4. Rendimento dos óleos fixos e extratos brutos metanólicos (%/kg) após tratamento inicial do material vegetal.

	*Óleos fixos		**Extratos brutos metanólicos		
	Castanha-do-brasil	Tucumã	Pracaxi	Amapazeiro	Rabo-de-arara
Parte da Planta	Amêndoa	Polpa	Casca do caule	Casca do caule	Raízes
Método de Extração	Prensagem (frio)	Prensagem (frio)	Solvente (Metanol)	Solvente (Metanol)	Solvente (Metanol)
Rendimento	30,77%	22,21%	15,0%	19,0%	11,0%

*Óleos fixos obtidos e fornecidos pelo NUCTENAL – IEPA. **Extratos brutos metanólicos obtidos no LEA – UNIFAP.

Na avaliação da atividade antibacteriana, utilizando as técnicas de difusão em ágar (disco e poço) nas concentrações de 125, 250 e 500 mg/mL, as bactérias do estudo apresentaram-se resistentes (R) para os OFs da castanha-do-brasil e do tucumã (halos ausentes ou < 8 mm). No entanto, os EBMs do pracaxi, amapazeiro e do rabo-de-arara apresentaram-se susceptíveis (S) para as bactérias demonstradas na Tabela 5.

TABELA 5. Atividade antibacteriana dos óleos fixos e extratos metanólicos obtidos pela técnica de difusão em ágar (disco e poço) frente as cepas ATCC.

Microrganismos (Cepas ATCC)	Extratos metanólicos				Óleos fixos			
	Pracaxi	Amapazeiro	Rabo-de-arara	Castanha-do-brasil	Tucumã	Controle	(c+)	(c-)
	*125, 250, 500	*125, 250, 500	*125, 250, 500	*125, 250, 500	*125, 250, 500			
<i>S. aureus</i> (29213)	(d) (p)	(S), (S), (S) (S), (S), (S)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(S), (S), (S) (S), (S), (S)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(S) (S)	(R) (R)
<i>S. aureus</i> (25923)	(d) (p)	(R), (S), (S) (S), (S), (S)	(S), (S), (S) (S), (S), (S)	(R), (R), (R) (S), (S), (S)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(S) (S)	(R) (R)
<i>S. aureus</i> (33951)	(d) (p)	(S), (S), (S) (S), (S), (S)	(S), (S), (S) (S), (S), (S)	(R), (R), (R) (S), (S), (S)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(S) (S)	(R) (R)
<i>S. pneumoniae</i> (49619)	(d) (p)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(S) (S)	(R) (R)
<i>E. coli</i> (10536)	(d) (p)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(S) (S)	(R) (R)
<i>E. coli</i> (25922)	(d) (p)	(R), (R), (R) (S), (S), (S)	(R), (R), (R) (S), (S), (S)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(S) (S)	(R) (R)
<i>P. mirabills</i> (15290)	(d) (p)	(R), (R), (R) (S), (S), (S)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(S) (S)	(R) (R)
<i>K. pneumoniae</i> (4352)	(d) (p)	(S), (S), (S) (S), (S), (S)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(S) (S)	(R) (R)
<i>S. tiphymurium</i> (14028)	(d) (p)	(R), (R), (R) (S), (S), (S)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(S) (S)	(R) (R)
<i>P. aeruginosa</i> (27853)	(d) (p)	(R), (R), (R) (S), (S), (S)	(R), (R), (R) (S), (S), (S)	(R), (R), (R) (S), (S), (S)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(R), (R), (R) (R), (R), (R)	(S) (S)	(R) (R)

*Concentrações em mg/mL; (d) disco; (p) poço; (R) Resistente: ausência ou halo de inibição < 8 mm; (S) Suscetível: halo de inibição ≥ 8 mm; (c+) controle positivo (bactéria Gram-positiva): vancomicina (d): 30 µg e (p): 0,2 mg/mL e controle positivo (bactéria Gram negativa): norfloxacino (d) 10 µg e (p) 0,2 mg/mL; (c-): controle negativo (DMSO), exceto tucumã (2,3-diclorometano).

As médias e o desvio padrão dos OFs e EBMs que apresentaram eficácia inibitória frente as cepas ATCC, estão apresentados na Tabela 6 e os dados obtidos foram analisados estatisticamente (Figuras 26, 27 e 28).

O valor da CIM, foi considerada a menor concentração do extrato metanólico capaz de inibir o crescimento dos microrganismos, nas diluições de 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 mg/mL (Tabela 7).

Tabela 6. Média dos diâmetros dos halos de inibição e desvio padrão (mm) dos extratos metanólicos brutos nas concentrações de estudo, pela técnica de difusão em ágar (disco e poço) frente as cepas ATCC.

Cepas ATCC	*Conc.	Extratos brutos metanólicos						Controles		
		Pracaxi		Amapazeiro		Rabo-de-arara		(C+)		(C-)
		D	P	D	P	D	P	D	P	
SA ^a	C1	8,33±0,58	9,67±0,58	0±0	0±0	12,67±0,58	15,33±0,58			
	C2	8,33±0,58	12,33±0,58	0±0	0±0	15,33±0,58	16,67±0,58	15,33±0,58	15,67±0,58	0±0
	C3	13,67±1,15	17,67±0,58	0±0	0±0	18,33±0,58	18,33±0,58			
SA ^b	C1	0±0	8,67±0,58	9,0±0	9,33±0,58	8,0±0	10,67±0,58			
	C2	8,33±0,58	9,0±0	10,67±1,15	10,33±0,58	8,33±0,58	12,67±0,58	14,67±0,58	17,33±0,58	0±0
	C3	9,33±0,58	13,67±0,58	12,67±0,58	14,33±0,58	9,67±0,58	13,0±0			
SA ^c	C1	8,67±0,58	14,33±0,58	8,67±0,58	14,33±0,58	0±0	8,33±0,58			
	C2	10,67±0,58	14,67±0,58	10,0±0	15,67±0,58	0±0	11,0±0	28,67±0,58	22±0	0±0
	C3	13,0±0	18±1	10,67±0,58	16,67±0,58	0±0	12,67±0,58			
EC	C1	0±0	8,33±0,58	0±0	8,67±0,58	0±0	0±0			
	C2	0±0	8,0±0	0±0	10,67±0,58	0±0	0±0	16,67±1,15	20,33±0,58	0±0
	C3	0±0	10,33±0,58	0±0	13,0±0,55	0±0	0±0			
PM	C1	0±0	8,0±0	0±0	0±0	0±0	0±0			
	C2	0±0	9,33±0,58	0±0	0±0	0±0	0±0	21,33±0,58	20,67±1,15	0±0
	C3	0±0	12,67±0,58	0±0	0±0	0±0	0±0			
KP	C1	8,33±0,58	11,67±0,58	0±0	0±0	0±0	0±0			
	C2	8,67±0,58	13,67±0,58	0±0	0±0	0±0	0±0	30,33±0,58	22,67±0,58	0±0
	C3	9,0±0	14,67±0,58	0±0	0±0	0±0	0±0			
ST	C1	0±0	8,0±0	0±0	0±0	0±0	0±0			
	C2	0±0	9,67±0,58	0±0	0±0	0±0	0±0	20,67±0,58	21,67±0,58	0±0
	C3	0±0	12,33±0,58	0±0	0±0	0±0	0±0			
PA	C1	0±0	10,33±0,58	0±0	8,33±0,58	0±0	8,33±0,58			
	C2	0±0	11,67±1,15	0±0	8,33±0,58	0±0	10,67±0,58	16,67±1,15	17,33±0,58	0±0
	C3	0±0	10,67±0,58	0±0	9,33±0,58	0±0	12,33±0,58			

*Concentrações em mg/mL. C1:125 mg/mL; C2: 250 mg/mL; C3: 500 mg/mL; D: disco; P: poço; SA^a: *S. aureus* 29213; SA^b: *S. aureus* 25923; SA^c: *S. aureus* 33591; EC: *E. coli* 25922; PM: *P. mirabilis* 15290; KP: *K. pneumoniae* 4352; ST: *S. typhimurium* 14028; PA: *P. aeruginosa* 27853; (C+) cont. positivo (Gram-positiva): vancomicina (D): 30 µg e (P): 0,2 mg/mL e cont. positivo (Gram negativa): norfloxacino (D) 10 µg e (P) 0,2 mg/mL; (c-): controle negativo (DMSO).

TABELA 7. Determinação da CIM dos extratos metanólicos do pracaxi, amapazeiro e rabo-de-arara pela técnica de microdiluição em placa de 96 poços.

Microrg.	Extratos metanólicos			Controles	
	Pracaxi CIM	Amapazeiro CIM	Rabo-de-arara CIM	(C+)	(C-)
<i>S. aureus</i> (29213)	62,5	-	125	(S)	(R)
<i>S. aureus</i> (25923)	62,5	62,5	62,5	(S)	(R)
<i>S. aureus</i> (33951)	125	31,25	125	(S)	(R)
<i>E. coli</i> (25922)	62,5	125	-	(S)	(R)
<i>P. mirabilis</i> (15290)	62,5	-	-	(S)	(R)
<i>K. pneumoniae</i> (4352)	125	-	-	(S)	(R)
<i>S. typhimurium</i> (14028)	125	-	-	(S)	(R)
<i>P. aeruginosa</i> (27853)	125	250	125	(S)	(R)

CIM: Concentração inibitória mínima (mg/mL); (C+) Controle positivo (bactéria Gram-positiva): vancomicina, (bactéria Gram-negativa): norfloxacina; (C-): controle negativo (DMSO); (-) não se aplica; (S) ausência de crescimento; (R): crescimento bacteriano.

Os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) para experimentos inteiramente aleatórios, com o cálculo da estatística F e de seus respectivos “*p-value*”. Nos casos em que $P < 0,05$, as médias de tratamento foram comparadas pelo método de *Tukey*, com o cálculo da diferença mínima significativa para $\alpha = 0,05$. (Figuras. 26, 27 e 28).

Figura 26. Extrato bruto metanólico de pracaxi: De A a H – Média do diâmetro dos halos (mm) das bactérias inibidas pelo extrato, pelas técnicas de difusão em ágar por disco e poço. Concentrações de controles e amostras em mg/mL. A) *S. aureus*-(ATCC 29213), B) *S. aureus*-(ATCC 25923), C) *S. aureus*-(ATCC 33591), D) *E. coli* (ATCC 25922), E) *P. mirabilis* (ATCC 15290), F) *K. pneumoniae* (ATCC 4352), G) *S. typhimurium* (ATCC 14028), H) *P. aeruginosa* (ATCC 27853). Os dados são apresentados como média \pm SD (n = 3/grupos), (*) p 0,05 vs controle disco, (&) p 0,05 vs controle poço, (a) p 0,05 vs conc. 125 mg/mL disco, (b) p 0,05 vs. conc. 250 mg/mL disco, (A) p 0,05 vs conc. 125 mg/mL poço, (B) p 0,05 vs conc. 250 mg/mL poço, a análise estatística foi feita pelo teste ANOVA two-way e depois seguida de post-hoc Tukey.

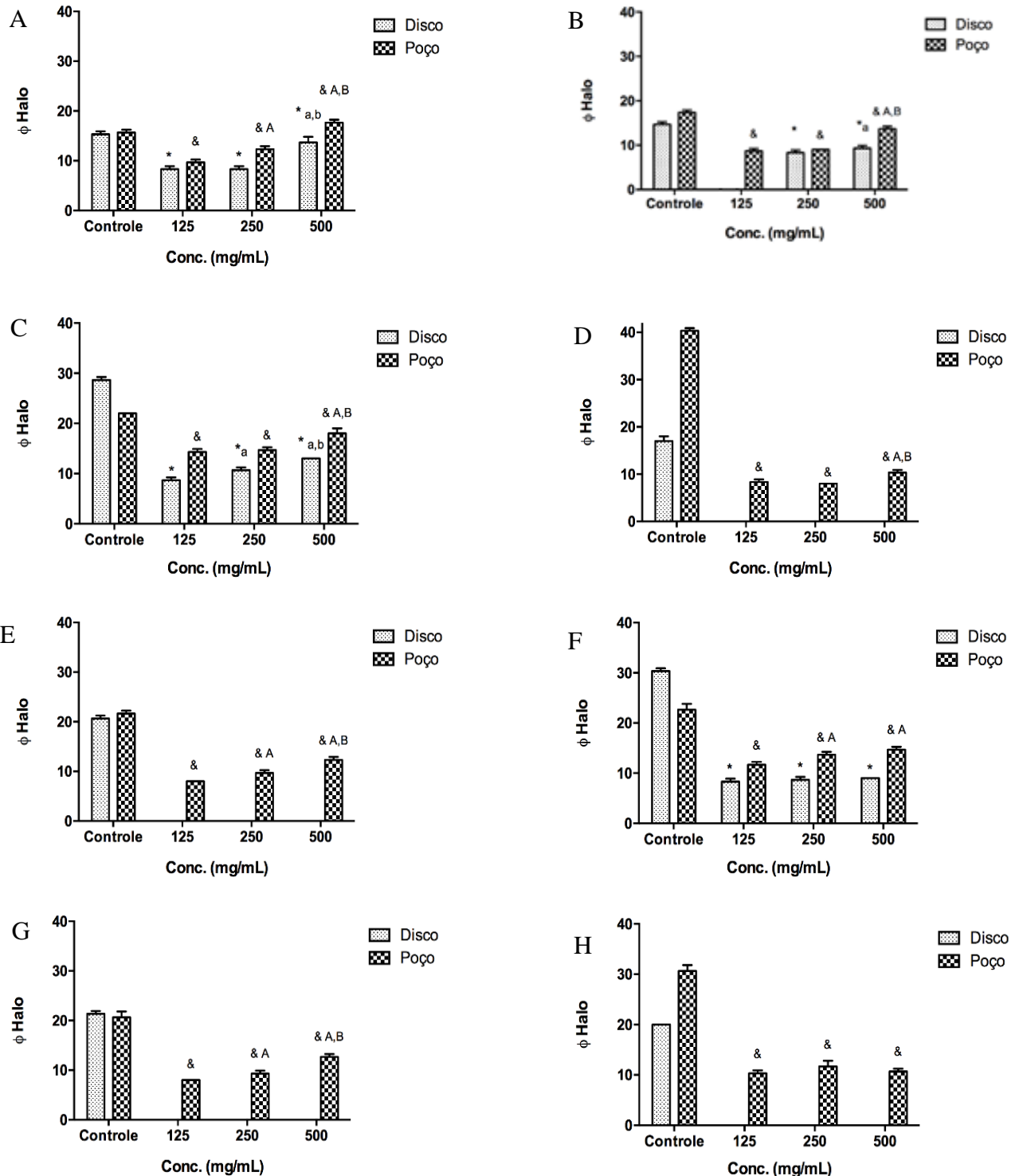


Figura 27. Extrato bruto metanólico do amapazeiro: De A a D – Média do diâmetro dos halos (mm) das bactérias inibidas pelo extrato, pelas técnicas de difusão em ágar por disco e poço. Concentrações de controles e amostras em mg/mL. A) *S. aureus*-(ATCC 25923), B) *S. aureus*-(ATCC 33591), C) *E. coli* (ATCC 25922), D) *P. aeruginosa* (ATCC 27853). Os dados são apresentados como média \pm SD (n = 3/grupos), (*) p 0,05 vs controle disco, (&) p 0,05 vs controle poço, (a) p 0,05 vs conc. 125 mg/mL disco, (b) p 0,05 vs conc. 250 mg/mL disco, (A) p 0,05 vs conc. 125 mg/mL poço, (B) p 0,05 vs conc. 250 mg/mL poço, a análise estatística foi feita pelo teste ANOVA two-way e depois seguida de post-hoc Tukey.

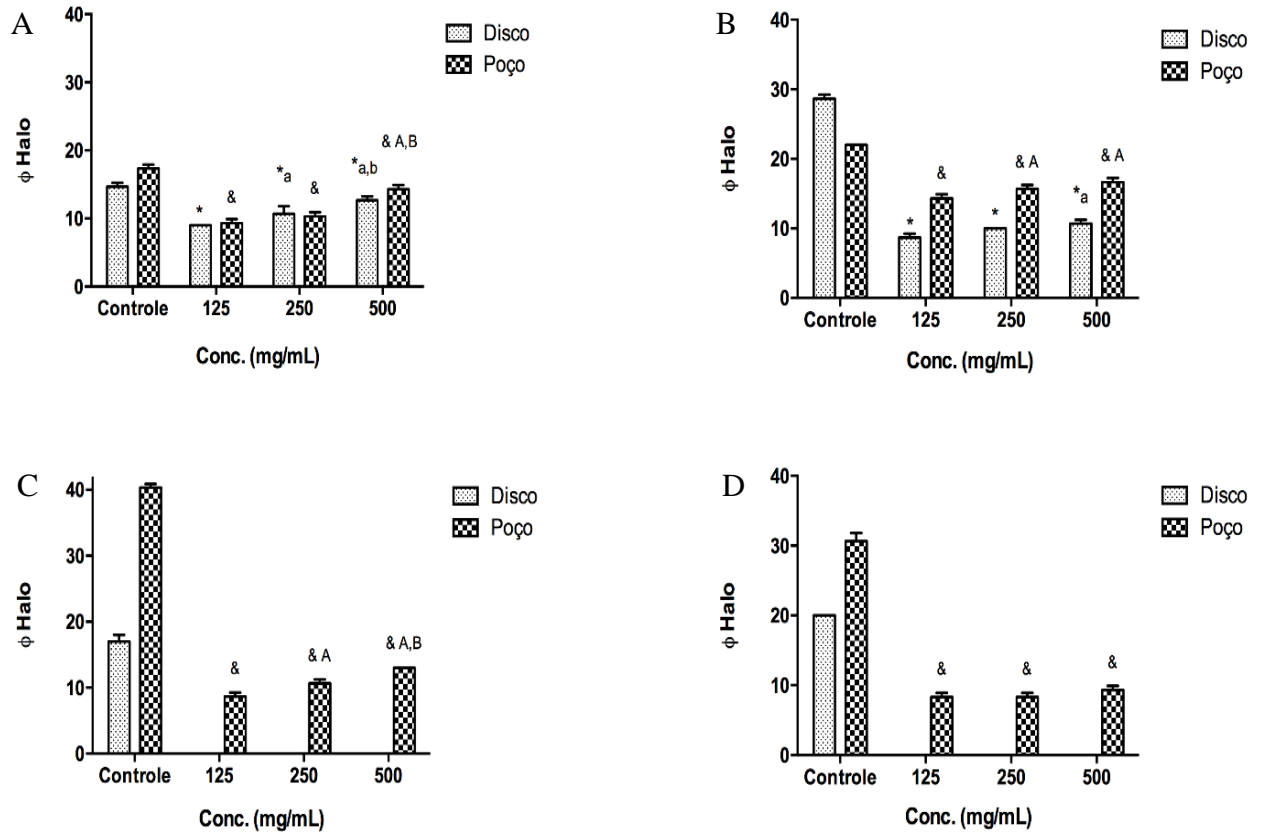
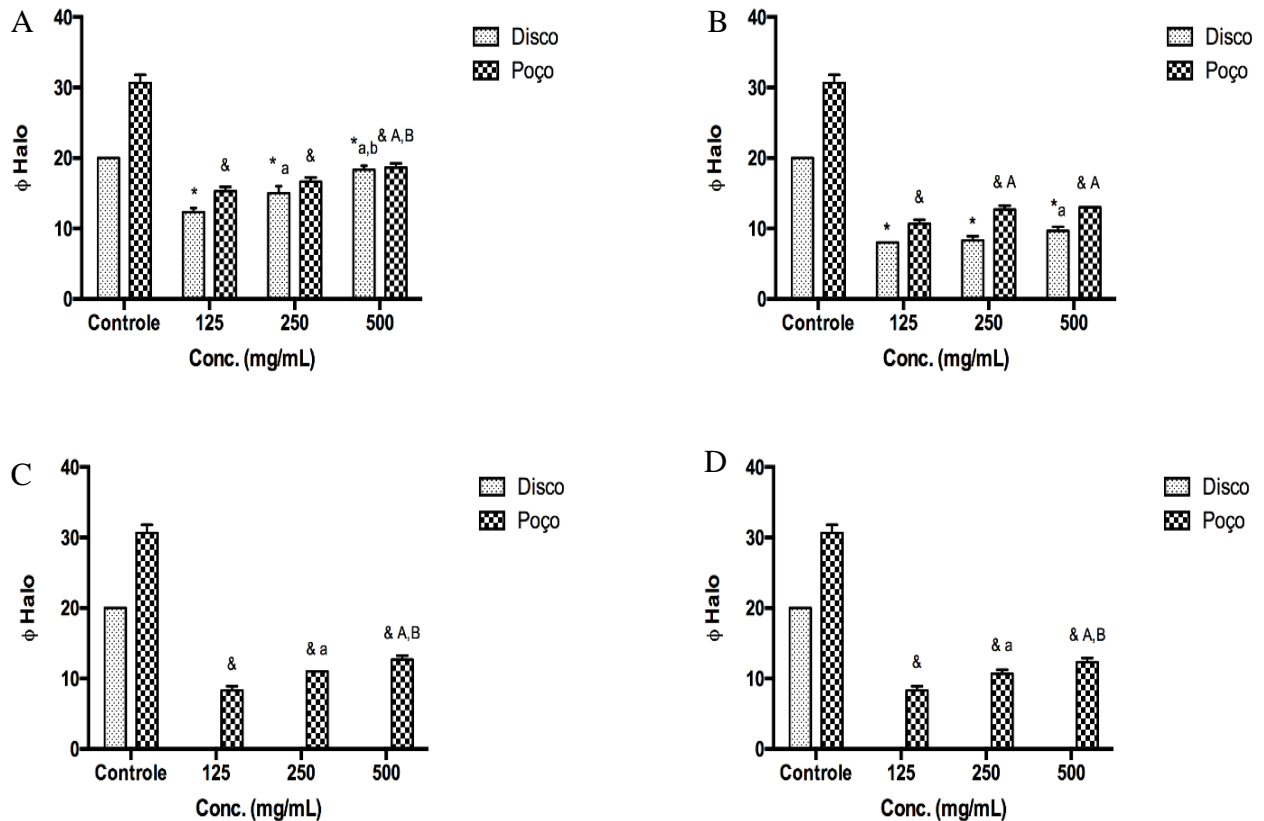


Figura 28. Extrato metanólico do rabo-de-arara: De A a D – Média do diâmetro dos halos (mm) das bactérias inibidas pelo extrato, pelas técnicas de difusão em ágar por disco e poço. Concentrações de controles e amostras em mg/mL. A) *S. aureus*-(ATCC 29213), B) *S. aureus*-(ATCC 25923), C) *S. aureus*-(ATCC 33591), D) *P. aeruginosa* (ATCC 27853). Os dados são apresentados como média \pm SD ($n = 3$ /grupos), (*) $p < 0,05$ vs controle disco, (&) $p < 0,05$ vs controle poço, (a) $p < 0,05$ vs conc. 125 mg/mL disco, (b) $p < 0,05$ vs conc. 250 mg/mL disco, (A) $p < 0,05$ vs conc. 125 mg/mL poço, (B) $p < 0,05$ vs conc. 250 mg/mL poço, a análise estatística foi feita pelo teste ANOVA two-way e depois seguida de post-hoc Tukey.



5.2 ATIVIDADE LARVICIDA DOS ÓLEOS E EXTRATOS

No bioensaio de atividade larvicida, os óleos fixos e extratos brutos metanólicos do estudo, três apresentaram atividade contra larvas no 3º instar da espécie *Aedes aegypti* (Linhagem Rockefeller) após exposição de 24 e 48 h. Na tabela 8, observa-se a análise do percentual das médias de mortalidade para cada espécie.

Tabela 8. Percentual das médias de mortalidade de larvas no 3º instar da espécie *Aedes aegypti* (Linhagem Rockefeller) após exposição de 24 e 48 h.

Grupo	Controle	*Conc.	**Larvas	Óleo fixo		Extrato metanólico			
				Castanha-do-brasil		Pracaxi		Rabo-de-arara	
				m-24 h	m-48 h	m-24 h	m-48 h	m-24 h	m-48 h
I	H ₂ O	-	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
II	H ₂ O	DMSO	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
III	H ₂ O	12,5	10	10	28	50	54	08	18
IV	H ₂ O	25,0	10	26	46	66	80	10	28
V	H ₂ O	50,0	10	46	76	78	90	18	46

*C: concentrações ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$); **Larvas: Quantidade de larvas expostas por grupo. m-24: Percentual da média de mortalidade larval após 24 h de exposição; m-48 h: Percentual da média de mortalidade larval após 48 h de exposição. Testes realizados em quintuplicatas.

Neste estudo, foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) do percentual de mortalidade das larvas de *Ae. aegypti*, para os tempos de exposição avaliados e o valor estimado da CL₅₀ e CL₉₀ para cada espécie, sendo apresentados na Tabela 9 (Análise Probit).

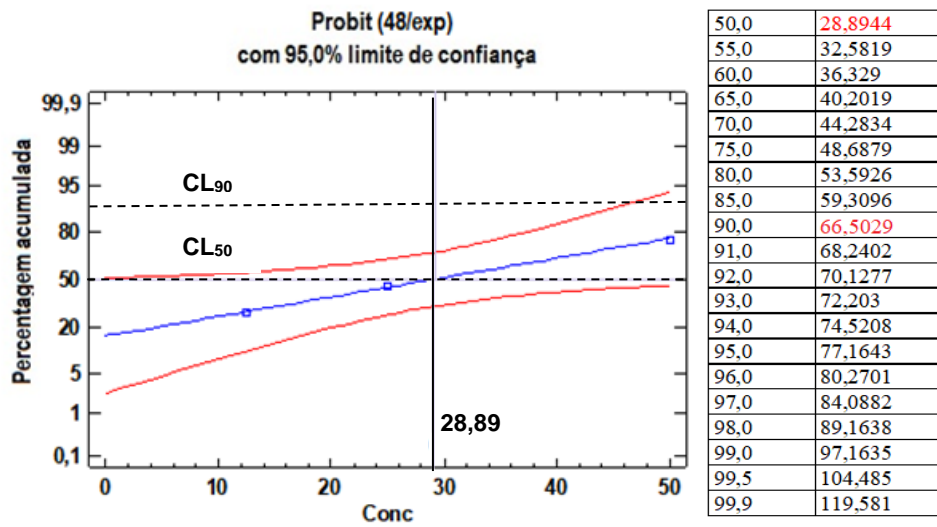
Tabela 9. Concentrações letais para 50% e 90% das larvas de 3º Instar de *Ae. aegypti*

	*24 h		*48 h	
	CL ₅₀	CL ₉₀	CL ₅₀	CL ₉₀
<i>B. excelsa</i>	52,1241	96,5375	28,8944	66,5029
<i>P. maculosa</i>	9,33833	73,5286	5,39649	46,2339
<i>A. campestris</i>	118,731	214,316	54,2119	114,569

*Períodos de exposição. CL₅₀ e CL₉₀: ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$); *B. excelsa*: OF; *P. maculosa* e *A. campestris*: EBM.

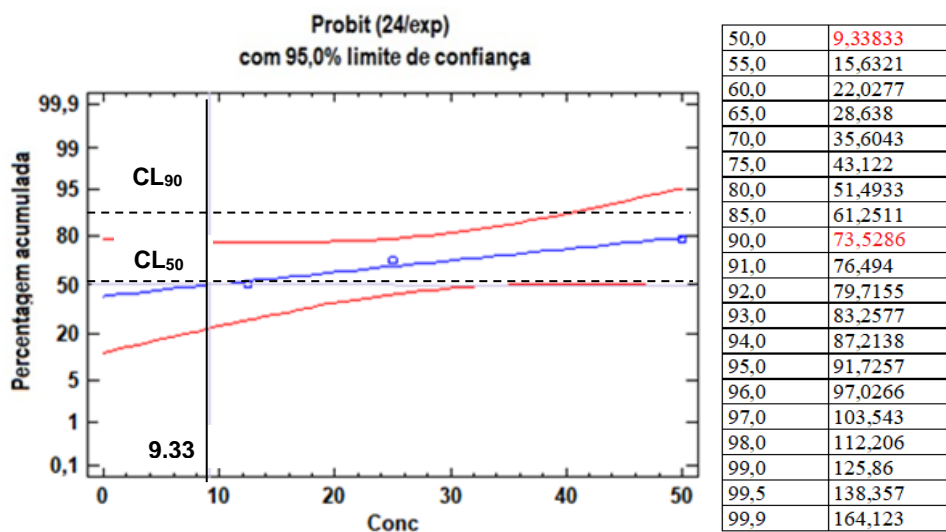
No óleo fixo das amêndoas da castanha-do-brasil, a concentração obtida foi de 28,89 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, após 48 h de exposição (Figura 29). A Concentração Letal (CL₅₀) estimada qualifica o óleo essencial como um bom agente larvicida em potencial (CHENG et al., 2003).

Figura 29. Valor estimado da CL₅₀ de larvas do mosquito *Aedes aegypti* expostos a três concentrações diferentes (12,5; 25,0 e 50 µg.mL⁻¹) do óleo fixo da amêndoa da castanha-do-brasil, após 48 horas.



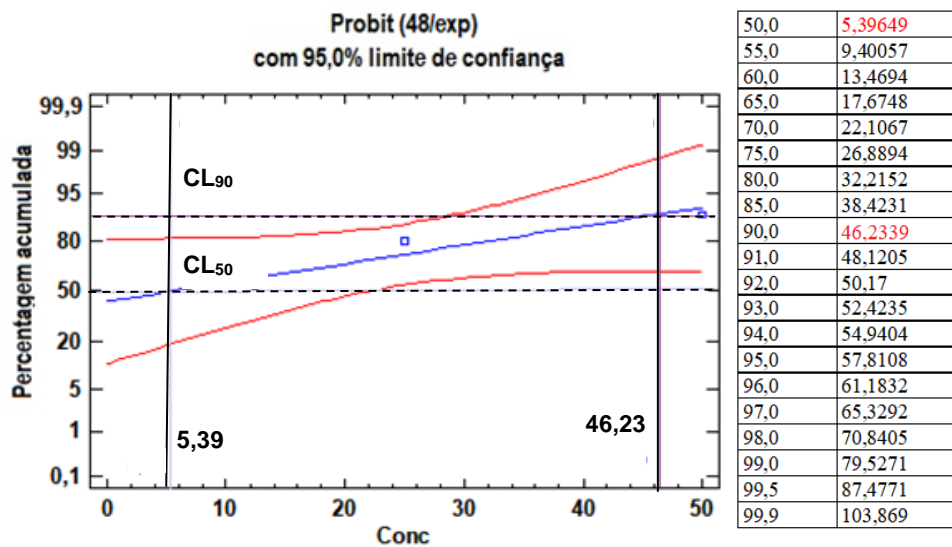
O valor estimado da concentração letal (CL₅₀) para o EBM do das cascas do caule do pracaxi em 24 h de exposição larval, correspondeu a uma concentração de 9,33 µg.mL⁻¹ (Figura 30), demonstrando efetividade larvicida, de acordo com Cheng et al. (2003) e Coelho et al. (2009).

Figura 30. Valor estimado da CL₅₀ de larvas do mosquito *Aedes aegypti* expostos a três concentrações diferentes (12,5; 25,0 e 50 µg.mL⁻¹) do extrato bruto metanólico das cascas do caule do pracaxi, após 24 h.



A determinação do valor estimado da CL₅₀ para o EBM das cascas do caule do pracaxi em 48 h de exposição larval, correspondeu a uma concentração de 5,39 µg.mL⁻¹ e CL₅₀ a uma concentração de 46,23 µg.mL⁻¹ (Figura 31), demonstrando alta efetividade como larvicida, de acordo com Cheng et al. (2003) e Coelho et al. (2009).

Figura 31. Valor estimado da CL₅₀ de larvas do mosquito *Aedes aegypti* expostos a três concentrações diferentes (12,5; 25,0 e 50 µg.mL⁻¹) do extrato bruto metanólico das cascas do caule do pracaxi, após 48 h.



DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Eleição do material vegetal

Pesquisas realizadas a partir do conhecimento popular e tradicional de uma população, tem sido utilizado como um dos critérios pela ciência na abordagem e descoberta de novos compostos bioativos, nas mais diversas plantas, para os mais diversos fins (CARNEIRO et al., 2014). As plantas de escolha deste estudo, são encontradas na Região Norte e são de uso como à população.

No Brasil, diante de toda a biodiversidade de seu território, distribuídos em seus seis biomas, segundo Carvalho et al. (2008), cerca de 1% apenas das plantas medicinais originárias do Brasil, tem seus princípios ativos identificados, demonstrando a necessidade de estudos científicos, sobre estas propriedades medicinais. Neste presente estudo, a avaliação da atividade antimicrobiana da espécie *A. campestris* é pioneiro.

Na busca por compostos bioativos de origem natural para um determinado fim terapêutico, se faz necessário considerar métodos extrativos eficientes, bem como a caracterização de compostos bioativos, se tornando mais um desafio para os pesquisadores (OLIVEIRA et al., 2016). Os métodos de escolha deste estudo foram prensagem hidráulica para os óleos e extração por solvente para os extratos, sendo utilizados em inúmeros trabalhos descritos na literatura para esta atividade (LEAL et al., 2011; BONA et al., 2014; JOBIM et al., 2014).

Avaliação da atividade antimicrobiana por difusão em ágar pelas técnicas de disco e de poço

Os métodos para avaliação antimicrobiana do estudo são amplamente utilizados nas pesquisas científicas, como métodos comprobatórios de atividade propriamente ditos ou como comparativos de melhor eficácia inibitória (OSTROSKY et al., 2008; BONA et al., 2014). Neste estudo os métodos foram utilizados para os dois fins: comprovação de atividade e comparação entre os métodos (disco e poço), sendo alcançado esses objetivos propostos.

Nos bioensaios de difusão em ágar pelo método do poço, verificou-se que em todos os extratos houve inibição na maioria das bactérias gram positivas, com formação de halos de inibição ao redor dos poços onde foram depositadas as soluções testadas. Na técnica do disco, foi possível observar que o número de bactérias gram positivas inibidas pelos extratos foi menor quando comparado ao poço ($p < 0,05$) (Tabela 5).

Houve diferença significativa das medidas dos halos de inibição entre as metodologias testadas, observando melhor performance dos extratos com a utilização da técnica de poço (Tabela 6). A diferença entre os métodos ficou mais evidente no extrato metanólico do pracaxi em relação aos extratos das demais espécies.

No estudo comparativo de técnicas empregadas (disco e poço) de Silveira et al. (2009), com o objetivo de avaliar se o tamanho do halo de inibição aumentava proporcionalmente ao aumento da concentração do extrato, foram realizadas análises estatísticas de variância seguindo o modelo ONE-WAY ANOVA e teste de Tukey, onde foi evidenciado que, no conjunto dos dados, houve proporcionalidade entre a concentração dos extratos e o diâmetro do halo de inibição para a maioria dos microrganismos avaliados, assemelhando-se com os dados obtidos por este estudo,

que pela análise estatística de variância seguindo o modelo ONE-WAY ANOVA e teste de Tukey, os extratos apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os métodos (disco e poço) e entre as concentrações do estudo, destacando-se o extrato da *P. macroloba* contra as bactérias Gram-positivas, que apresentou melhor atividade em relação ao controle na concentração de 500 mg/mL (relação dose-dependência).

Avaliação da atividade antimicrobiana de acordo com a composição fitoquímica

O extrato etanólico das cascas da *P. macroloba* possui em sua composição frações de taninos, que segundo Leal et al. (2011) possui atividade bacteriana contra *Staphylococcus sp.* Meticilina resistente, corroborando com os dados deste estudo, cujo *S. aureus* 33591 (MRSA), teve seu crescimento inibido pela ação do EBM desta espécie.

O extrato etanólico das cascas da *P. macroloba*, segundo Viana et al. (2004) possui saponinas triterpênicas. O estudo realizado por Schenkel et al. (2001), justifica a atividade antimicrobiana das saponinas, onde relata que o comportamento anfifílico das saponinas e a capacidade de formar complexos com esteroides, proteínas e fosfolípidos de membranas determinam um número variado de propriedades biológicas para essas substâncias, com destaque a ação sobre membranas celulares. As saponinas podem alterar a permeabilidade das membranas ou até mesmo levar a sua destruição (CASTEJON, 2011).

Os estudos supracitados fortalecem a hipótese de que os compostos sejam os responsáveis pelo potencial antimicrobiano desta espécie.

O extrato aquoso de *P. macroloba*, segundo Oliveira et al. (2013) obteve atividade na concentração de 250 mg/mL contra *S. aureus* 29213, o que equivale a concentração utilizada neste estudo, onde o EBM da *P. macroloba* obteve atividade

para a mesma bactéria na concentração de 250 mg/mL.

Estudos sobre a atividade antibacteriana da *P. amapa* são escassos. Porém estudos com plantas da família das Apocynaceas apresentaram atividade bacteriana, devido a presença de alcaloides (OLIVEIRA; ALMEIDA, 2016; CARRAZZA et al., 2013). Os alcaloides são constituintes muito comuns nessa família (PEREIRA et al., 2007).

De acordo com Henrique et al. (2014), o extrato metanólico das cascas da *P. amapa*, possui em sua composição o alcalóide indólico isositsiriquina, que segundo Oliveira et al. (2009) possui atividade antibacteriana, corroborando com os dados obtidos deste estudo.

No estudo de Santos (2013), o extrato metanólico das cascas do caule da *P. amapa*, nas concentrações de 51,2-1,6 µg/mL contra as bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 10536, não apresentaram atividade antimicrobiana. No presente estudo, as mesmas bactérias apresentaram eficácia inibitória, porém em concentrações superiores, demonstrando que a atividade antibacteriana do EBM desta espécie é dose-dependente.

A *A. campestris* é uma espécie com escassos estudos científicos de sua composição fitoquímica e atividades. Estudos foram encontrados apenas em sua biologia sistemática e reprodutiva (RAMIREZ, 2007), sua ação antimalárica (COSTA, 2017) e sua ação como hipoglicemiante (GUIMARÃES, 2015).

Estudos sobre a atividade antibacteriana da família Lamiaceae demonstraram eficácia inibitória contra as bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e ATCC 33951 (MRSA) (SILVA et al., 2010), corroborando com os resultados obtidos pela *A. campestris* (Lamiaceae) neste estudo, onde o EBM demonstrou eficácia inibitória nas concentrações de 125, 250 e 500 mg/mL, respectivamente, contra as bactérias: *S. au*

reus 25923 (Halo-(disco): 8,00; 8,33 e 9,67 mm; (poço): 10,67; 12,67 e 13,00 mm. CIM-62,5 mg/mL), *S. aureus* 33591 (Halo-(poço): 8,33; 11,00 e 12,67 mm. CIM-125 mg/mL).

Os óleos fixos de *B. excelsa* e *A. aculeatum* não apresentaram atividade antimicrobiana.

Avaliação endêmica da dengue no Brasil

Nos últimos anos, a dengue é considerada a arbovirose mais importantes do mundo. Estimava-se que, anualmente 50 a 100 milhões de pessoas são infectadas pelo vírus da dengue (WHO, 2012). Nos seres humanos, a dengue pode causar manifestações clínicas leves e médias, como a dengue clássica, ou graves, como a febre hemorrágica (BRASIL, 2009a). É transmitida pela picada da fêmea do mosquito *Ae. aegypti*, vetor também de outras importantes arboviroses da atualidade, tais como a chikungunya, zica e febre amarela (DONALISIO et al., 2017). Em 2017 no Brasil, foram registrados 251.711 casos prováveis de dengue, e em 2016, 1.483.623 (M.S., 2018). Diversos estudos têm demonstrado ao longo dos anos, o alto potencial larvicida de óleos e extratos de plantas endêmicas da Amazônia (DIAS, 2013). O presente estudo objetivou a contribuição de novas possíveis espécies com esta atividade.

Potencialidade larvicida dos óleos e extratos

A potencialidade dos óleos essenciais varia segundo a espécie vegetal, a origem, a composição e os mecanismos de ação contra a praga em questão (LEYVA, et al., 2009). Este estudo, três das cinco espécies avaliadas demonstraram potencial larvicida e obtiveram eficiência contra o *Ae. Aegypti* (CHENG et al., 2003; COELHO et al., 2009).

De acordo com os estudos de Cheng et al. (2003), para óleos essenciais substâncias ou compostos ineficientes apresentam concentração $> 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, eficientes: de 50 a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e altamente eficientes substâncias ou compostos com valor de $\text{CL}_{50} < 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Dentre as espécies estudadas, apenas a *P. macroloba* apresenta referência literária como larvicida natural (SANTIAGO et al., 2005), sendo o estudo no seu óleo fixo, atribuindo as saponinas tripterpênicas a atividade larvicida, metabólito secundário também encontrado em seus extratos (VIANA et al., 2004), corroborando com os dados obtidos de eficiência larvicida desta espécie do presente estudo.

Na família das Fabaceae, segundo Dias (2013), algumas espécies apresentaram atividade larvicida contra o *Ae. aegypti*, como a *Bauhinia acuruana* Moric. Estudos de Garcez et al. (2013), relatam atividade larvicida em extratos de 18 espécies da família das fabaceas, tendo as saponinas triterpênicas como principal metabólito secundário com esta atividade.

No estudo de Coelho et al. (2009), avaliou-se a ação larvicida em 67 extratos vegetais, numa concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sobre larvas do terceiro estágio de *Ae. Aegypti*, em condições de laboratório. Segundo o estudo, apenas o extrato diclorometânico da folha de *Kielmeyra coriácea* Mart causou mortalidade média superior a 90% das larvas testadas. Por meio da análise Probit, verificou-se $\text{CL}_{50} = 112,79 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo considerada altamente eficiente. Outros sete extratos provocaram a mortalidade média igual ou superior a 50%, foram consideradas eficientes, sugerindo seguimento dos estudos dos metabólitos secundários para a avaliação da substância larvicida.

O extrato metanólico das cascas da *P. macroloba* no presente estudo demonstr

trou valor estimado de CL₅₀ correspondente a uma concentração de 9,33 µg.mL⁻¹ em 24 h de exposição larval. Após 48 h demonstrou CL₅₀ correspondente a uma concentração de 5,39 µg.mL⁻¹ e CL₉₀ correspondente a uma concentração de 46,23 µg.mL⁻¹, sendo considerada altamente eficiente como larvicida, de acordo com os dados abordados por Coelho et al. (2009).

O OF da *B. excelsa* possui como composição majoritária os ácidos graxos, sendo: 13,8% de palmítico, 8,7% de esteárico, 31,4% de linoleico e 45,2% de oleico, contendo uma pequena quantidade de ácidos palmitoleico e mirístico (MUNIZ et al., 2015).

Para Gonçalves et al. (2002), a *B. excelsa* é composta essencialmente de ácidos graxos poliinsaturados com a proporção de 37,42% de oléico e 37,75% de linoléico, totalizando 75,17% dos ácidos graxos totais, bem como, 24,83% de ácidos saturados como o palmítico, o esteárico e o araquidônico, com 13,15%; 10,36% e 1,32%, respectivamente.

Embora existam muitos estudos sobre a atividade larvicida em ácidos graxos de óleos fixos contra *Ae. Aegypti* (FURTADO et al., 2005; GARCEZ et al., 2013), na literatura não foram encontrados estudos sobre esta ação nesta espécie.

A *A. campestris* foi descrita neste estudo pela primeira vez sobre esta atividade. Para tanto, o estudo da família botânica foi abordado sobre esta atividade.

A *A. campestris* possui em sua composição fitoquímica fenóis, taninos, alcalóides, purinas, esteróides e triterpenóides (COSTA et al., 2017). Estudos da família Lamiaceae segundo Dias et al. (2013), demonstraram atividade larvicida para algumas espécies, tais como *Mentha spicata* L. (metabólito secundário principal: carvone), *Nepeta cataria* L. (metabólito secundário principal: nepetalactone) e *Thymus*

vulgaris L. (metabólito secundário principal: não identificado). Para a espécie *A. campestris* não foram encontrados estudos referentes a esta atividade para uma comparação literária.

O estudo da *P. amapa* é pioneiro para atividade larvicida, não sendo encontrados pesquisas a ela relacionadas nesta área. Para tanto, o estudo da família botânica foi abordado sobre esta atividade.

Na família Apocynaceae, os alcaloides são encontrados com frequência, pois são muito comuns nesta família (PEREIRA et al., 2007). A *P. amapa* possui em sua composição fitoquímica, o alcaloide isositiquirisina (HENRIQUE et al., 2014). No estudo de Coelho et al. (2009), espécies da família Apocynaceae foram testadas. O extrato diclometânico das folhas da *Aspidosperma tomentosa* Mart (peroba-do-cerrado) apresentou atividade larvicida (Mortalidade de 6,7% após 24 h). Os extratos hexano, hidroalcolóico e etanólico da casca do caule e o extrato etanólico da madeira do caule da *Condylocarpum isthmicum* (Vel.) A.DC. li. Caete (cipó-de-leite), não apresentaram atividade larvicida (Mortalidade de 0%). Apesar do extrato metanólico da *P. amapa* apresentar alcaloides em sua composição fitoquímica, no presente estudo se mostrou ineficiente para a ação larvicida.

O extrato metanólico da polpa do *A. aculeatum*, segundo Pinto (2012), apresentou baixa letalidade das larvas de *Ae. aegypti* após 24 h de exposição. Porém, após 48 h o extrato não se mostrou ativo. Corroborando com o resultado obtido pelo presente estudo, onde houve ineficiência do óleo fixo *A. aculeatum* contra as larvas de *Ae. Egypti* nas concentrações do estudo.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Embora tenha sido utilizado óleo fixo e extrato bruto, onde há inúmeros metabólitos secundários em suas composições fitoquímicas que possam exercer as ações de pesquisa deste trabalho, o estudo obteve êxito, uma vez que, essa premissa é fortuitamente alegada quando nos reportamos a diversos achados na literatura referentes a resultados obtidos pelas técnicas utilizadas neste trabalho, corroboraram com os achados desta pesquisa.

Na utilização do método de difusão em ágar pelas técnicas de disco e poço, os resultados obtidos demonstraram melhor eficácia inibitória na técnica de poço, onde há maior superfície de contato entre o óleo e/ou extrato e o meio inoculado com a suspensão bacteriana, aumentando sua probabilidade de difusão.

Os óleos fixos não apresentaram atividade antimicrobiana nas técnicas de difusão em ágar, efeito este que pode ser fundamentado por sua natureza apolar (predominância de ácidos graxos), não ser miscível a natureza da água (polar) contida no meio de cultura Mueller-Hinton, dificultando a difusão.

Um aspecto relevante do método de difusão em ágar pela técnica do poço, é a profundidade do mesmo, que não deve atingir o fundo da placa, para que o óleo e/ou extrato não se propague difundindo-se erroneamente no fundo da placa (entre a placa e o meio de cultura), causando falsos resultados. Como alternativa para a avaliação da ação antimicrobiana em óleos fixos, o método de microdiluição em placas é mais seguro, diminuindo e/ou descartando situações com polaridades diferentes.

Os extratos metanólicos da *P. macroloba*, da *P. amapa* e da *A. campestris*, apresentaram atividade contra cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, de igual modo se-

gundo os estudos de Guimarães et al. (2016), para a espécie *P. macroloba*.

Na determinação da concentração inibitória mínima, ressalta-se a importante concentração obtida pelo extrato metanólico da *P. amapa* (31,25 mg/mL) frente a bactéria *S. aureus* ATCC 33951 (Meticilina resistente).

A espécie *P. macroloba* (Willd) O. Kuntze destacou-se dos extratos metanólicos da *P. amapa* e da *A. campestris*. Na atividade antimicrobiana, obteve 80% de atividade sobre as bactérias de estudo (*S. aureus* ATCC 29213: disco (d) e poço (p); *S. aureus* ATCC 25923: (d) e (p); *S. aureus* ATCC 33951: (d) e (p); *E. coli* ATCC 25922: (p); *P. mirabilis* ATCC 15290: (p); *K. pneumoniae* ATCC 4352: (d) e (p); *S. typhimurium* ATCC 14028: (p) e *P. aeruginosa* ATCC 27853: (p).

Na atividade larvicida o extrato metanólico da *P. macroloba* obteve valor estimado de CL₅₀ de 9,33 µg.mL⁻¹ para 24 h e 5,39 µg.mL⁻¹ após 48 h e valor estimado de CL₉₀ correspondente a uma concentração de 46,23 µg.mL⁻¹ após 48 h, sendo considerada altamente eficiente como larvicida, de acordo com os dados abordados por Coelho et al. (2009).

Diante dos resultados alcançados, principalmete com o extrato metanólico da *P. macroloba*, eficiente nas duas atividades: antimicrobiana e larvicida, ressalta-se a importância da necessidade de novas alternativas usando produtos de origem natural, especialmente se levarmos em conta que estes podem minimizar a dependência aos inseticidas químicos sintéticos (BARRETO, 2005). Partindo do princípio de que o extrato metanólico da *P. macroloba* é um produto natural e, portanto, menos nocivo à saúde das pessoas e dos animais domésticos (GUARDA et al., 2016), pode-se afirmar que esta espécie é uma promissora fonte de substâncias antimicrobianas e larvicidas.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

-
- ACIOLE, S. D. G. Avaliação da Atividade Inseticida dos Óleos Essenciais das Plantas Amazônicas Annonaceae, Boraginaceae e de Mata Atlântica Myrtaceae como Alternativa de Controle às Larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). 2009. 86p. Dissertação (Biologia Humana e Ambiente). Universidade de Lisboa. Faculdade de Ciências. Departamento de Biologia Animal, Lisboa, 2009.
- ANVISA. Manual de microbiologia clínica para o controle assistência à saúde Módulo 6: Detecção e identificação e bactérias de importância médica. cap. 3, 2013.
- ARAÚJO, C. A. C.; LEON, L. L. Biological activities of *Curcuma longa* L. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. v. 96, p.723-728, 2001.
- BACELAR-LIMA, C. G.; MENDONÇA, M. S.; BARBOSA, T. C. T. S. Morfologia Floral de uma População de Tucumã, *Astrocaryum aculeatum* Meyer (Arecaceae) na Amazônia Central. Acta Amazonica, v. 36, n. 4, p. 407–412, 2006.
- BALBI, M. E.; PENTEADO, P. T. P.; CARDOSO, G.; SOBRAL, M. G.; SOUZA, V. R. Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Bonpl.): Chemical composition and its health benefits. Visão Acadêmica, v. 15, n. 2, 2014.
- BARRETO, C. F. *Aedes aegypti*- Resistência aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle. Rev Eletrônica Faculdade Montes Belos, Goiás, v. 1, n. 2, p.62-73, nov. 2005.
- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. L. C. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. Estudos Avançados, São Paulo, v. 22, n. 64, dez. 2008.
- BEZERRA, V. S.; MATTIETTO, R. A.; COELHO, E. A. A.; AGUIAR, F. F. Pasteurization of the milk-of-amapá for control of enzymatic browning. Ciência Rural, Santa Maria, v.43, n.9, p.1715-1720, 2013.
- BISSET J. A.; RODRIGUES, M. M.; CÁCERES L.. Niveles de resistência a inseticidas y sus mecanismos em cepas de *Aedes aegypti* de Panamá. Rev Cubana Tropical. 55: 191-195, 2003.
- BONA, E. A. M. DE; PINTO, F. G. S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. Comparison of methods for evaluation of antimicrobial activity and determination of minimum inhibitory concentration (mic) of aqueous and ethanol plant extracts. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.81, n.3, p. 218-225, 2014.
- BRAGA, E. T. M. Diversidade morfológica e produção de *Bertholletia excelsa* H. B. K. (Lecythidaceae) no sudeste do estado do Acre. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 23 a 28 de setembro de 2007, Caxambu – MG. 2007.
-

BRASIL. FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dengue: instruções para pessoal de combate ao vetor: Manual de normas técnicas. 3.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL. SUPERINTENDÊNCIA DO DESENVOLVIMENTO DA AMAZÔNIA. Estudo de mercado de matéria-prima: corantes naturais (cosméticos, indústria de alimentos), conservantes e aromatizantes, bio-inseticidas e óleos vegetais e essenciais (cosméticos e oleoquímica). Belém, rev. p. 219, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Diretrizes nacionais para a prevenção e controle de epidemias de dengue. Brasília: Ministério da Saúde; (Série A. Normas e Manuais Técnicos.) 2009a.

CARNEIRO, A. B. A.; PINTO, E. J. S.; RIBEIRO, I. F.; MAGALHÃES, M. R. G.; MONTEIRO-NETO, M. A. B. Efeito da *Astrocaryum aculeatum* (Tucumã) na toxicidade da Doxorrubicina: modelo experimental *in vivo*. Acta Paulista de Enfermagem. 30(3): 233-9. 2017.

CARNEIRO, F. M.; JOSÉ, M.; ALBERNAZ, L. C.; DARC, J.; COSTA, P. Tendências Dos Estudos Com Plantas Medicinais No. Rev Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais, v. 3, n. 2, p. 44–75, 2014.

CARRAZZA, T. G.; CANABRAVA, H. A. N.; CARRAZZA, L. G.; SANT'ANA, D. S.; OLIVEIRA, M. T.; ALVES, L. R. Atividade antimicrobiana de extratos da Mangabeira (*Hancornia speciosa* GOMES). PUBVET, Londrina, V. 5, N. 7, Ed. 154, Art. 1034, 2011.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. Rev Brasileira de Farmacognosia, v.18, p.314-319, 2008.

CARVALHO, M. G.; ALBUQUERQUE, L. A.; ALVES, C. C. F.; CASCON, V. Cornoside and other constituents from the latex of *Parahancornia amapa* (Hub.) Ducke (Apocynaceae) a medicinal plant in Northern Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18: 667-669, 2008.

CARVALHO, A. F.; SILVA, D. M.; SILVA, T. R. C.; SCARCELLI, E.; MANHANI, M. R. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos etanólico e de ciclohexano a partir das flores de camomila (*Matricaria chamomilla* L.). Rev Brasileira de Plantas Mediciniais, v.16, n.3, p.521-526, 2014.

CASTEJON F. V. Taninos e Saponinas. Goiânia-GO. 28p. Revisão de Literatura – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Goiás, 2011.

CATÃO, R. de C. Dengue no Brasil: abordagem geográfica na escala nacional. São Paulo: cultura acadêmica, 2012.

- CHENG, S. S.; CHANG, H. T.; CHANG, S. T.; CHEN, W. J. Bioactivity of selected plant essential oil against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresour Technol.* 89(1):99-102, 2003.
- CHOU, C. B.; HEDIN, L. O.; PACALA, S. W. Functional groups, species and light Interact with nutriente Limitation during tropical rainforest sapling bottleneck. *J Ecol.* p. 106:157–167, 2018.
- COELHO, A. A. M.; DE PAULA, J. E.; ESPÍNOLA, L. S. Atividade larvicida de extratos vegetais sobre *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), em condições de laboratório. *Rev Socied Entomológ do Brasil.* p.1-6. 2009.
- COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). *Journal of Ethnopharmacology.* v. 126, p. 159-175, 2009.
- COSTA, A. L. P.; CAMPOS, M. B.; BARBOSA, L. P. J. L.; BEZERRA, R. M.; BARBOSA, F. H. F. Preliminary phytochemical and qualitative analysis of antimicrobial Activity of bark hydroalcoholic tincture of *Bertholletia excelsa* Humb. & Bomphe (Lecytidaceae) against to gram-positive microorganisms. *Rev Ciência Equatorial*, 2(1):26-34, 2002.
- COSTA, Z. G. A.; ROMANO, A. P. M.; ELKHOURY, A. N. M.; FLANNERY, B. Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil. *Rev Pan-Amazônica de Saude.* 2(1):11–26. 2010.
- COSTA, E. V. M. Estudo etnobotânico sobre plantas utilizadas como antimaláricas no Estado do Amapá, avaliação da atividade antimalárica e toxicidade aguda por via oral de *Amasonia campestris* (Aubl.) Moldenke. 2013. 142p. Tese (Doutorado – Biodiversidade Tropical) – PPGGIO, Universidade Federal do Amapá, Macapá, Amapá. 2013.
- COSTA, D. P.; PERALTA, D. F. Bryophytes diversity in Brazil. *rodriguésia.* v. 66, n. 4, p. 1063-71. 2015.
- COSTA, E. V. M.; RAMOS, G. Q.; GOES, L. D. M.; SANTOS, C. B. R.; ANDRADE-NETO, V. F.; CARVALHO, J. C. T. *In vivo* and *in vitro* evaluation antiplamodial activity of *Amasonia campestris* (Aubl.) Moldenke. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology.* p. 377-384. 2017.
- COSTA, M. N. F. DOS S.; MUNIZ, M. A. P.; NEGRÃO, C. A. B.; COSTA, C. E. F.; LAMARÃO, M. L. N.; MORAIS, L.; SILVA JUNIOR, O. C.; COSTA, R. M. R. Characterization of *Pentaclethra macroloba* oil. *J Therm Anal Calorim* (2014) 115: 2269-75.
- COSTA, T.; JORGE, N. Compostos bioativos benéficos presentes em castanhas e nozes. *UNOPAR científica. Ciências Biológicas e da Saúde,* v. 13, n. 3, p. 195-203, 2015.
-

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion Journal of biotechnology*, 23(2):174-81, 2012.

DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Identification and Quantification of Carotenoids, By HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian Fruits. *J. Agric. Food Chem.*, v. 55, p. 5062–5072, 2007.

DIAS, C. N. Avaliação da atividade larvicida em *Aedes Aegypti* L. (Diptera: Culicidae) de óleos essenciais de espécies vegetais: um estudo de revisão e bioprospecção. 2013. 121 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2013.

DIAS, D. M.; SILVA, A. P.; HELFER, A. M.; MACIEL, A. M. T. R.; LOUREIRO, E. C. B.; SOUZA, C. O. Morbidity and mortality caused by gastroenteritis in Pará State, Brazil. *Rev Pan-Amazônica de Saúde*, v. 1, n. 1, p. 53–60, 2010.

DONALISIOL, M. R.; FREITAS A. R. R.; VON ZUBEN A. P. B. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. *Publ Health J.* 51:30, 2017.

DUARTE, M. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *Multiciência*, v. 7, p. 16, 2006.

FEIJÓ, A.M. et al. Plantas medicinais utilizadas por idosos com diagnóstico de Diabetes mellitus no tratamento dos sintomas da doença. *Rev Brasileira de Plantas Medicinai*s (2012). v.14, n.1, p.50-56.

FERREIRA, A. M.; SOUZA, B. M. V. DE.; RIGOTO, M. A.; LOUREIRO, M. R. D. The use of fatty acids in wound care: an integrative review of the Brazilian literature. *Rev Escola de Enfermagem USP*, 46(3):752-60, 2012.

FERREIRA, B. L. A. Identificação da atividade antibiótica e relação estrutura-atividade de moléculas de origem sintética e animal. 2007. 110f. Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia) – Universidade Federal Fluminense, Niterói – RJ. 2007.

FERREIRA, E. DE S.; SILVEIRA, C. S.; LUCIEN, V. G.; AMARAL, A. S. Caracterização físico-química da amêndoa, torta e composição dos ácidos graxos majoritários do óleo bruto da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K). *Alim Nutr*, v. 17, n. 2, p. 203-208, 2006.

FERREIRA, E. DE S.; SILVEIRA, C. S.; LUCIEN, V. G.; AMARAL, A. S. Caracterização físico-química do fruto e do óleo extraído de tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart) *Alim Nutr*, v.19, n.4, p. 427-433, 2008.

FERREIRA, S. A. N.; GENTIL, D. F. O. Extração , embebição e germinação de sementes de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) *Acta Amazonica*, v. 36, n. 2, p. 141–145, 2006.

FIORAVANTI, C. A maior diversidade de plantas do mundo. Rev Pesquisa FAPESP. Ed. 241. p. 42-47, 2016.

FREITAS, J. B.; NEVES, M. M. V. Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. Rev de Nutrição, Campinas, v. 23, n. 2, p. 269-279, 2010.

FREITAS, J. L.; MALHEIROS, M. A. B.; VASCONCELOS, P. C. S. Processos fenólicos de Taperebá (*Spondias mombin* L.) e Pracaxi (*Pentaclethra macroloba* (Wild) O. Kuntze) em ecossistema floresta de várzea na ilha do Pará, Afuá, Pará. Rev Ciência Agrária, n. 39, p.163-172, 2003.

FURTADO, R. F.; LIMA, M. G. A.; ANDRADE-NETO M.; BEZERRA, J. N. S.; SILVA, M. G. V. 2005. Larvicidal activity of essential oils against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). Neotropical Entomology 34(5):843-847.

GADELHA, C. S.; PINTO JUNIOR, V. M.; BEZERRA, K. K. S.; PEREIRA, B. B. M.; MARACAJÁ, P. B. Bibliographical study on the use of medicinal and herbal plants in Brazil. Rev Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável. v. 8, n. 5, p. 208 - 212, (Edição Especial), 2013.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; SILVA, L. M. G. E.; SARMENTO, U. C. Substâncias de Origem Vegetal com Atividade Larvicida Contra *Aedes aegypti*. Rev Virtual de Química, Mato Grosso do Sul, v.5, n. 3, p.363-393, maio-jun. 2013.

GONÇALVES, J. F. C. Primary metabolism components of seeds from Brazilian Amazon tree species. Brazilian Journal Plant Physiology, 14(2):139-42, 2002.

GUARDA, C.; LUTINSKI, A.J.; ROMAN-JUNIOR, W. A.; BUSATO, M. A. Atividade larvicida de produtos naturais e avaliação da susceptibilidade ao inseticida temefós no controle do *Aedes Aegypti* (diptera: culicidae). Rev Interciência. v. 41, n. 4, p. 243-247, 2016.

GUIMARÃES JR, B. S. Avaliação pré-clínica da toxicidade aguda e atividade hipoglicemiante do extrato metanólico das raízes de *Amasonia campestris* Lamiaceae. 2015. 55p. Dissertação (Mestrado – Área de Ciências da Saúde) – Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Macapá, Amapá.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. Quimica Nova, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

HENRIQUE, M. C.; SOUZA, A. Q. L.; BANHOS, E.; NUNOMURA, R. C. S.; NUNOMURA, S. M. Evaluation of the antimicrobial activity of extracts *Abuta grandifolia* (Mart.) Sandwith (Menispermaceae) and *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke. Braz Soc Chem Review (2004), p. 34

- HENRIQUE, M. C.; NUNOMURA, R. C. S.; NUNOMURA, S. M.; SILVA, S. G. Constituintes químicos isolados dos galhos e cascas de amapazeiro (*Parahancornia Amapa*, Apocynaceae). *Rev Acta amazônica*, 44(4):533-38, 2014.
- JOBIM, M. L.; SANTOS, R. C. V.; ALVES, C. F. S.; OLIVEIRA, R. M.; MOSTARDEIRO, C. P.; SAGRILLO, M. R.; SOUZA-FILHO, O. C.; GARCIA, L. F. M.; MÂNICA-CATTANI, F.; RIBEIRO, E. E.; CRUZ, I. B. M. Antimicrobial activity of Amazon *Astrocaryum aculeatum* extracts and its association to oxidative metabolism. *Microbiological Research*, 169(4):314-23, 2014.
- JOKER, D.; SALAZAR, R. *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze, Danida Forest Seed Centre, p. 2, 2000. (Nota técnica).
- JOHNSTON, M.; COLQUHOUN, A. Preliminary ethnobotanical survey of kurupukari: an amerindian settlement of central guyana. *Economic Botany*, New York, v.50, n.2, p:182-194, Nov. 1996.
- KARAMAN, İ.; ŞAHİN, F.; GÜLLÜCE, M.; ÖĞÜTÇÜ, H.; ŞENGÜL, M.; ADIGÜZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *J Ethnopharmacol* 85: 231-235, 2003.
- KIRBY, W. M. M.; BAUER, A. W.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic Susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 36:493-496. 1966.
- KOCH, I.; RAPINI, A.; SIMÕES, A. O.; KINOSHITA, L. S. SPINA, A.P.; CATELLO, A. C. D. 2015. Apocynaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB41743>>. Acesso em: 20 de novembro de 2016.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. Diagnóstico microbiológico. 5ª. Edição, Medsi: Rio de Janeiro, p. 1465, 2001.
- LEAL, I. C. R.; IVALDO JUNIOR, I.; PEREIRA, E. M.; LAPORT, M. S.; KUSTER, R. M.; SANTOS, K. R. N. *Pentaclethra macroloba* tannins fractions active against methicillin-resistant staphylococcal and Gram-negative strains showing selective toxicity. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 21(6): 991-999, 2011.
- LEITÃO, A. M. Caracterização morfológica e físico-química de frutos e sementes de *Astrocaryum aculeatum* Meyer (Arecaceae) de uma floresta secundária. 2008, 91 f. Tese (Doutorado em Botânica). INPA/UFAM. Manaus. 2008.
- LEYVA, M.; MARQUETTI, M. C.; TACORONTE, J.E.; SCULL, R. TIOMNO, O. MESA, A. MONTADA, A. Actividad larvicida de aceites esenciales de plantas contra *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Rev Biomed*, n. 20, p. 5-13, 2009.
- LOPES, G. A. D.; FELICIANO, L. M.; DINIZ, R. E. S.; ALVES, M. J. Q. F. Plantas medicinais: indicação popular de uso no tratamento de hipertensão arterial sistêmica (HAS). *Rev Ciência em Extensão* (2010). v.6, n.2, p.143-55.
-

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, v. 2, p. 368, 1998.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa: Plantarum. p. 624, 2002.

LUCIA, A.; GONZALEZ, A. P.; SECCACINI, E.; LICASTRO, S.; ZERBA, E.; MASUH, H. Larvicidal effect of Eucalyptus grandis essential oil and turpentine and their major components on *Ae. aegypti* larvae. Journal of the American Mosquito Control Association, n. 23, p. 293-303, 2007.

MACIEL, I. J.; SIQUEIRA, J. B.; MARTELLI, C. M. T. Epidemiologia e desafios no controle do dengue. Rev Patologia Tropical. 2008 mai-jun;37(2):111–30.

MAGALHÃES, M. S. Avaliação da atividade larvicida do extrato hidroalcolólico da espécie *Anacardium occidentale* Linneu. 2015. 60p. Dissertação (Mestrado – Área de Ciências da Saúde) – Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Macapá, Amapá. 2015.

MIRANDA, J. A. L.; ROCHA, J. A.; ARAUJO, K. M.; QUELEMES, P. V.; MAYO, S. J.; ANDRADE, I. M. Atividade antibacteriana de extratos de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.17, n.4, supl. III, p.1142-1149, 2015.

MCGOWAN, J. E. Economic impact of antimicrobial resistance. Emerging infectious diseases, v. 7, n. 2, p. 286–92, 2001.

MENEZES, E. L. A. Inseticidas Botânicos: Seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola, Seropédica, Rio de Janeiro: Emprapa Agrobiologia, 2005.

MILL, B.; KAHN, F. Characterization of leaf anatomy in species of *Astrocaryum* and *Hexopetion* (Arecaceae). Main, v. 17, n. 1, p. 81–94, 2010.

M.S. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. v. 49, n. 20, 2018. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/maio/07/2018-018.pdf>. Acesso em 01 mai. 2018.

MUNIZ, M. A. P.; SANTOS, M. N. F.; COSTA, C. E. F.; MOARIS, L.; LAMARÃO, M. L. N.; RIBEIRO-COSTA, R. M.; SILVA-JUNIOR, J. O. C. Physicochemical characterization, fatty acid composition, and thermal analysis of *Bertholletia excelsa* HBK oil. Pharmacognosy Magazine, 11(41): 147–151, 2015.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. CLSI document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003a.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-

6), v.23, n.1, 2015a. Disponível em: <[http:// www.sbac.org.br/pt/pdfs/biblioteca/clsi_OPASM2_A8.pdf](http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/biblioteca/clsi_OPASM2_A8.pdf)>. Acesso em: 02 dez. 2017.

NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard. Tenth Edition. NCCLS document M7-A10 (ISBN 1-56238-988-2), v.35, n.2, 2015b. Disponível em: <[http:// www.sbac.org.br/pt/pdfs/biblioteca/clsi_OPASM7_A10.pdf](http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/biblioteca/clsi_OPASM7_A10.pdf)>. Acesso em: 04 dez. 2017.

OLIVEIRA, N. T.; ALMEIDA, S. S. M. S. Análise fitoquímica, citotóxica e antimicrobiana do extrato bruto etanólico das folhas da espécie *Ambelania acida* AUBLET (APOCYNACEAE). Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota), [S.l.], v. 6, n. 1, p. 20-25, jun. 2016.

OLIVEIRA, V. B.; ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C. F.; PAULA, C. S.; DUARTE, A. F. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.18, n.1, supl. I, p.230-239, 2016.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 18(2):301-07, 2008.

PEREIRA, M.; ALCANTARA, A. F. C.; JACOME, R. L. R. P.; RASLAN, D. S. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Anpidosperma* (apocynaceae). Rev Quim Nova, Vol. 30, No. 4, 970-983, 2007.

PESCE, C. Oleaginosas da Amazônia. 2ª. ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2009.

PINTO, P. S. Caracterização molecular de óleos fixos de alguns frutos da região Amazônica, 2012. 113f. Tese (Doutorado em química) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.

RAMÍREZ, N. Reproductive biology of *Amasonia campestris* (Aubl.) Moldenke (Verbenaceae) in the Venezuelan Central Llanos. Acta bot. Venez., Caracas, v. 30, n. 1, p. 385-414, 2007.

REVILLA, J. Plantas úteis da bacia amazônica. v.2. Manaus: INPA/ SEBRAE, 2002

RODRIGUEZ, M. M.; BISSET, J. A.; FERNANDES, D.; PEREZ, O. Resistência a insecticidas em larvas y adultos de *Aedes aegypti*: prevalenciade la esterasa A4 asociada com la resistência a temefos. Rev Cubana de Medicina Tropical. 56: 54-60. 2004.

ROEL, A. R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. Rev Internacional de Desenvolvimento Local, Campo Grande, v.1, n.2, p. 43-50, 2001.

SAGRILLO, M. R.; GARCIA, L. F.; DE SOUZA FILHO, O. C.; DUARTE, M. M.; RIBEIRO, E. E.; CADONÁ, F. C. Tucuma fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human lymphocytes. *Food Chemistry*. 173:741. 2015.

SANTA CATARINA (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. Superintendência de Vigilância em Saúde. Diretoria de Vigilância Epidemiológica- DIVE. Guia de Orientação para Treinamento de Técnicos de Laboratório de Entomologia, Santa Catarina, 2008.

SANTIAGO, G. M. P.; VIANA, F. A.; PESSOA, O. D. L.; SANTOS, R. P.; POULIQUEN, Y. B. M.; ARRIAGA, A. M. C.; ANDRADE-NETO, M.; BRAZ-FILHO, R. Avaliação da atividade larvicida de saponinas triterpênicas isoladas de *Pentaclethra maculoba* (Willd.) Kuntze (Fabaceae) e *Cordia piauhiensis* Fresen (Boraginaceae) sobre *Aedes aegypti*. *Rev Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, n. 3, p. 187–190, 2005.

SANTOS, N. Q. Bacterial resistance in the contexto of hospital infection. *Text Context Enferm* (2004). 13(n.esp):64-70.

SANTOS, J. S. Sistemática do gênero *Amasonia* l. *nom. cons.*(Lamiaceae). 2011.117f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal Microbiology*, v. 35, n.4, p. 275-280, 2004.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, cap.27, p. 597-619, 2001.

SERRÃO, E. J. P.; MONTEIRO-NETO, M. A. B.; MALCHER, E. S. T.; CONRADO, B. F.; CARNEIRO, A. B. A.; SILVA, I. L. S.; TERAMUSSI, G. M.; PEREIRA, B. C.; RIBEIRO, I. F.; SOUZA, K. H. S. Determinação da atividade antioxidante e avaliação do efeito genotóxico e/ou antigenotóxico do óleo fixo da Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) em eritrócitos de camundongos swiss. 2017. 107p. Dissertação (Mestrado – Área de Ciências da Saúde) – Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Macapá, Amapá.

SHANLEY, P.; MEDINA, G. *Frutíferas e plantas úteis na vida Amazônica*. Ed. Cifor. Belém. 2005. p. 296.

SILVA, A. A.; SANTOS, M. K. V.; GAMA, J. R. V.; NOCE, R.; LEÃO, S. Potencial do extrativismo da castanha-do-pará na geração de renda em comunidades da mesorregião baixo Amazonas, Pará. *Floresta e Ambiente*, v. 20, n. 4, p. 500–509, 2013.

SILVA, C. P.; RICCI T. G.; ARRUDA, A. L.; PAGLIOSA, F. M. Extratos Vegetais de Espécies de Plantas do Cerrado Sul-Matogrossense com Potencial de Bioherbicida e Bioinseticida. Rev Uniciências, v. 21, n. 1, p. 25-34, 2017.

SILVA e SÁ, D. RIBEIRO, G. E.; RUFINO, L. R. A.; OLIVEIRA, N. M. S.; FIORINI, J. E. Atividade Antimicrobiana da *Uncaria Tomentosa* (Willd). Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences, 35(1): 53-57, 2014.

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

SILVA, J. O.; COPPEDE, J. S.; FERNANDES, V. C.; SANT'ANA, C. D.; TICLI, F. K.; MAZZI, M. V.; GIGLIO, J. R.; PEREIRA, O. S.; SOARES, A. M., SAMPAIO, S. V.; Antihemorrhagic, antinucleoltic and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethra macroloba*. Journal of Ethnopharmacology 100: 145-152, 2005.

SILVA, L. L.; HELDWEIN, C. G.; REETZ L. G. B.; HÖRNER, R.; MALLMANN, C. A. HEINZMANN, B. M. Composição química, atividade antibacteriana in vitro e toxicidade em *Artemia salina* do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae. Braz. J. Pharmacogn. 20(5): 700-705, 2010.

SILVA, M. F. DA; CARREIRA, L. M. M.; TAVARES, A. S.; RIBEIRO, I. C.; JARDIM, M. A. G.; LOBO, M. G. A.; OLIVEIRA, J.. As leguminosas da Amazônia brasileira: lista prévia. Acta Botanica Brasilica, v. 2, n. 1, p. 193–237, 1989.

SILVA, R.F., ASCHELI, J.L.R., SOUZA, J.M.L. Influência do processo de beneficiamento na qualidade de amêndoas de castanha-do-brasil. Ciência e Agrotecnologia. 34(2):445-50. 2010.

SILVEIRA, L. M. S.; OLEA, R. S. G.; MESQUITA, J. S.; CRUZ, A. L. N.; MENDES, J. C. Antimicrobial activity methodologies applied to plants extracts: comparison between two agar diffusion techniques. Brazilian Journal of Pharmacology, 90(2):124-28, 2009.

TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. Núcleo de estudos e pesquisa em alimentação. Tabela brasileira de composição de alimentos – TACO [Internet]. 2ªed. Campinas; 2006. Disponível em: http://www.unicamp.br/nepa/taco/Contar/taco_versao2.pdf. Acessado em 25 de novembro de 2017.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. 827p.

TROPICOS [Internet]. Disponível em <https://http://www.tropicos.org/Name/17900013>. Acessado em 02 de outubro de 2017.

VIANA, F. A.; BRAZ-FILHO, R.; POULIQUEN, I. B. M.; ANDRADE-NETO, M.; SANTIAGO, G. M. P.; RODRIGUES-FILHO, E. Triterpenoid saponins from Stem Bark of *Pentaclethra macroloba*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 15 (3):595-602, 2004.

VIEIRA, I. C. G.; GAVÃO, N.; ROSA, N. A. Caracterização morfológica de frutos e germinação de sementes de espécies arbóreas nativas da Amazônia. *Boletim Paraense Emílio Goeldi*, Belém, v.12, n. 2, 185p, Fev. 1996.

YUYAMA, L. K. O.; MAEDA, R. N.; PANTOJA, L.; AGUIAR, J. P. L.; MARINHO, A. Processamento e avaliação da vida-de-prateleira do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) desidratado e pulverizado. *Ciência e Tecnologia em Alimentos*, v. 28, n. 2, p. 408–412, 2008.

WHO. Guidelines for Laboratory and Field testing of Mosquito larvicides. WHO/CDS/WHOPEP /GCDPP/2005.13. p.41.

WHO. World health statistic. Cause-specific mortality and morbidity 2012. WHO/CDS/ WHOPEP /GCDPP/2012. P.63-84.
