

Voláteis e atividade larvícida em *Achyrocline satureioides* coletada em Cairu-BA**Volatiles and larvicidal activities in *Achyrocline satureioides* collected in Cairu-BA**

Jeferson Chagas do Nascimento^{1a*}, Hion Oliveira de Jesus^{1a}, Tiago Gomes dos Santos^{1a},
Diêgo Moreno Neiva Pereira^{1a}, Guadalupe Edilma Licona de Macedo^{1b}

¹Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, ^aDepartamento de Ciências e Tecnologias - DCT;

^bDepartamento de Ciências Biológicas – DCB, 45208-091, Jequié – Bahia, Brasil.

[*jefersonchag@uesb.edu.br](mailto:jefersonchag@uesb.edu.br)

Resumo

Neste trabalho são relatados a atividade tóxica, os principais constituintes químicos e o teor de óleos essenciais presentes na espécie *Achyrocline satureioides* coletadas em São Sebastião distrito de Cairu/BA, durante o verão e inverno de 2014. Observou-se que o teor de óleos da espécie sofre variação durante as estações avaliadas; os óleos essenciais presentes nas folhas, caules e inflorescência foram extraídos por hidrodestilação, os maiores teores, na sequência citada, foram encontrados no inverno (0,24; 0,006; 0,10%) quando comparados ao verão (0,11; 0,006; 0,05%). Os sesquiterpenos *trans*-cariofileno e o α -humuleno foram os constituintes majoritários encontrados em todas as amostras analisadas. Observou-se que nas folhas e inflorescências ocorre variação no teor dos dois componentes majoritários quando comparado às estações avaliadas; no verão o α -humuleno (37,16% nas folhas e 34,05% nas inflorescências) aparece como principal constituinte, já no inverno aparece o *trans*-cariofileno (37,65% nas folhas e 35,90% nas inflorescências); estes achados indicam se tratar de um novo quimiotipo na espécie investigada. A atividade larvícida encontrada frente a *Artemia salina* apresentou CL₅₀ de 3,2 ppm o qual demonstra alta toxicidade. Além disso, a literatura relata que as duas substâncias majoritárias encontradas nos óleos possuem atividade antiinflamatória, nesse sentido esse estudo aponta para uma significativa potencialidade farmacológica destes óleos.

Palavras-chave: óleos essenciais, quimiotipo, *Achyrocline satureioides*, *Artemia salina*, atividade larvícida.

Abstract

In this work we report the toxic activity, the main chemical constituents and the content of essential oils present in the species *Achyrocline satureioides* collected in São Sebastião district of Cairu / BA, during the summer and winter 2014. It was observed that the oil content of species varies during the seasons evaluated; The essential oils present in the leaves, stems and inflorescences were extracted by hydrodistillation, the highest contents in the sequence mentioned were found in winter (0.24; 0.006; 0.10%) when compared to summer (0.11; 0.006; 0.05%). *Trans*-caryophyllene sesquiterpenes and α -humulene were the major constituents found in all samples analyzed. It was observed that in leaves and inflorescences there is variation in the content of the two major components when compared to the evaluated seasons; in summer α -humulene (37.16% in leaves and 34.05% in inflorescences) appears as the main constituent, while in winter is the *trans*-caryophyllene (37.65% in leaves and 35.90% in inflorescences); These

findings indicate the existence of a new chemotype in the investigated species. Larvicidal activity found against *Artemia salina* presented LC₅₀ of 3.2 ppm which shows high toxicity. In addition, the literature reports that the two major substances found in oils have anti-inflammatory activity, so this study points to a significant pharmacological potentiality of these oils.

Keywords: essential oils, chemotype, *Achyrocline satureioides*, *Brine shrimp*, larvicidal activities.

Introdução

Os óleos essenciais extraídos de plantas são potenciais fontes de compostos farmacologicamente ativos, como analgésicos, anti-inflamatórios, antitumorais, antibióticos e digestivos [1 e 2]. Dada à importância farmacológica e sua utilização na indústria de alimentos, perfumaria, cosméticos e inseticidas [3], os óleos essenciais são comercializados em todo o mundo; este mercado tem movimentado recursos financeiros na ordem de milhões de dólares. No Brasil são exportados anualmente óleos essenciais de diversas espécies gerando divisas da ordem de milhões de dólares, o que representa uma contribuição para a balança comercial brasileira.

Nesse contexto, o Brasil é privilegiado, pois apresenta um variado número de espécies produtoras de óleos essenciais em sua flora. *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C., nativa na América do sul é uma importante espécie representante da família Asteraceae, vulgarmente conhecida como “macela”, “marcela do campo” e “marcela hembra”; é utilizada na medicina tradicional no Brasil e outros países vizinhos [4 e 5]. É comumente encontrada no Brasil no sul do estado de Minas Gerais, no nordeste do Uruguay e na Argentina na provincia de Buenos Aires [6]. Várias propriedades medicinais têm sido atribuídas à macela, tais como hepatoprotetora, antioxidante, antiviral, antimicrobiana, antitumoral, larvicida, inseticida, antiparasitária e tripanocida [1, 7 – 17].

O teor e a composição química de uma mesma espécie de planta pode variar em diferentes estações do ano, entre o horário de coleta, entre diferentes áreas geográficas e entre a técnica de extração utilizada; Essas variações estão relacionadas à fatores ambientais como temperatura, tipo de solo, umidade, clima, e fatores intrínsecos à planta, como condição patológica e idade [18 e 20]. O presente trabalho tem como objetivos a verificação da atividade tóxica dos óleos essenciais da espécie *Achyrocline satureioides* frente à *Artemia salina*, além da determinação do seu teor e de sua composição química. Análise da influência da variação sazonal de amostras coletadas na Ilha de São Sebastião, município de Cairu, estado da Bahia, Brasil, também foram investigadas.

Experimental

Material vegetal

O material botânico (folhas, caules e inflorescências) foi coletado nos arredores do campo de terra do distrito de São Sebastião, município de Cairu, estado da Bahia, nos meses de Janeiro e Agosto de 2014. A identificação da planta foi confirmada pela Dra. Guadalupe Lincona de Macedo, do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como sendo a espécie *Achyrocline satureioides*, com depósito no herbário da referida universidade HUESB com o número 9654.

Extração e análise química dos óleos essenciais

Para a extração dos óleos essenciais a espécie foi coletada e deixada secar a sombra durante uma semana; foram usados 50 g de folhas, 100 de caules e 20 de inflorescências, sendo submetidas, em triplicata a hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger, por um período de 120 minutos, utilizando 300 mL de água destilada. O óleo obtido foi seco em sulfato de sódio anidro (Merk). Os óleos diluídos em diclorometano grau HPLC, na concentração de 10.000 ppm, foram analisados em um equipamento CG-EM QP2010-SE da marca Shimadzu, operando a 70 eV, equipado com uma coluna de sílica fundida Rtx-5MS (30 m x 25 µm espessura do filme). As condições de análise foram: temperatura do injetor, 220 °C; do detector (interface), 240 °C, tendo como gás de arraste o hélio com fluxo de 1,8 mL.min⁻¹; temperatura inicial da coluna igual 40 °C (2 min), com elevação de 3 °C.min⁻¹ até 240 °C (5 min). Os constituintes foram identificados por comparação dos espectros de massas com aqueles disponíveis na biblioteca do equipamento (Wiley 7), e por comparação de seus índices de retenção (IR) em relação a uma série homóloga de alcanos (C9-C24) [21].

Testes de letalidade contra Artemia salina

O ensaio de letalidade de *Artemia salina* foi realizado utilizando métodos descritos anteriormente na literatura [22 e 23]. Ovos de *A. salina* foram incubados em água do mar natural obtida da região de São Sebastião, Cairu (BA), Brasil. Os óleos essenciais das folhas, foram testados em concentrações de 1, 5, 10, 20, 30 e 50 µg mL⁻¹. Após 24 horas de incubação nestas concentrações a 25 ° C, os nauplii que permaneceram vivos foram avaliados. Os dados coletados foram processados e os valores de CL₅₀ foram determinados por análise probit.

Resultados e Discussão

Os teores dos óleos essenciais encontrados nas folhas de *A. satureioides*, coletadas no verão e durante o inverno de 2014 tiveram rendimentos de $0,11^1 \pm 0,015\%$ (m/m) e $0,24 \pm 0,023\%$ (m/m), respectivamente, enquanto os encontrados nas inflorescências renderam $0,05 \pm 0,011\%$ (m/m) no verão e $0,10\%^2$ (m/m) no inverno. Para o caule o rendimento no verão foi de $0,0062\%^2$ (m/m) e $0,0065 \pm 0,0008\%$ (m/m) no inverno. Pela análise destes resultados observa-se que as quantidades de óleos essenciais extraídas das folhas e inflorescências da espécie *A. satureioides* são maiores no inverno que no verão, aproximadamente o dobro, mostrando desta forma que a sazonalidade pode ser um dos fatores que deve ser considerado em se tratando de uma possível exploração econômica. Outros fatores também podem estar relacionados a esta variação, tais como o índice pluviométrico, temperatura e desenvolvimento foliar [24]. Já para os óleos extraídos dos caules não foram observados diferenças significativas. Em estudos realizados anteriormente com esta espécie foram observados teores de 0,1% para os óleos essenciais extraídos da parte aérea [10], 0,3 % [6] e 0,44% [25].

A composição química dos óleos essenciais encontrados nas folhas, inflorescências e caules obtidos durante o verão e o inverno de 2014 para a espécie *A. satureioides* apresentam como constituintes majoritários os sesquiterpenos *trans*-cariofileno e o α -humuleno; as coletadas no verão trazem o α -humuleno como constituinte majoritário, já as coletadas no inverno o *trans*-cariofileno aparece como sendo o principal constituinte (Tabela I). Estudos realizados com esta espécie em outras regiões relatam os quimiotipos: α -pineno / *trans*-cariofileno [2, 6, 10, 17 e 20] e *trans*-cariofileno / α -copaeno [1]; isso nos leva a concluir que esta espécie pertence a um novo quimiotipo – *trans*-cariofileno / α -humuleno.

Pela análise da tabela I observa-se que nas folhas e inflorescências ocorre variação no teor dos dois componentes majoritários quando comparado às estações avaliadas; no verão o α -humuleno (37,16% nas folhas e 34,05% nas inflorescências) aparece como principal constituinte, já no inverno aparece o *trans*-cariofileno (37,65% nas folhas e 35,90% nas inflorescências). Para os óleos essenciais extraídos dos caules durante o verão de 2014 são encontrados como componentes majoritários o α -humuleno 36,20% e o *trans*-cariofileno 21,90%. Os cromatogramas dos óleos essenciais de *A. satureioides* analisados por CG-EM e os espectros de massas de íons totais dos componentes majoritários com seus respectivos tempo de retenção (Tr) identificados nos óleos estão apresentados nas Figuras 1, 2 e 3.

¹ média de três repetições $\pm$ SD

²única extração

Os resultados apresentados acima devem ser analisados com cuidado, porque, como discutido anteriormente, os indivíduos da mesma espécie podem conter diversos compostos voláteis diferentes. Estas variações estão relacionadas a fatores ambientais, como temperatura, tipo de solo, umidade, clima, altura e fatores intrínsecos à planta, como sua condição patológica e sua idade. O teor dos metabolitos pode também variar dependendo do método de extração utilizado [18, 19, 26-29].

Os resultados encontrados para os óleos essenciais presentes nas folhas de *A. satureioides* frente ao teste de letalidade utilizando *Artemia salina* apresentou uma CL₅₀ de 3,2 ppm, demonstrando dessa forma alta toxicidade e consequentemente podendo ser comparada a camptotecina e ao sulfato de vincristina, duas substâncias consideradas muito ativas [30]. Verificou-se 100% de mortalidade para o controle positivo e foi constatado que todas as larvas se mantiveram vivas no caso do controle negativo. Estudos anteriores indicam que o extrato obtido a partir da infusão das flores a 80 °C de *A. satureioides* apresentou baixo potencial toxicológico frente a *Artemia Salina* [12]. A literatura atribui atividades biológicas para o *trans*-cariofileno, a exemplo: atividade repelente contra mosquitos e outros insetos, atividade antiespasmódica e atividade anti-inflamatória [31-33]. Para o α -humuleno é relatado atividade anti-inflamatória [34].

Tabela I - Constituintes químicos dos óleos essenciais de *Achyroclines satureioides*

COMPOTOS	IR _{cal.}	IR _{lit.}	Porcentagem em relação à área				
			Folhas		Inflorescências		Caules
			JAN/ 2014	AGO/ 2014	JAN/ 2014	AGO/ 2014	JAN/ 2014
α -pineno	937	1939	2,67	7,90	8,85	0,80	tr
β -pineno	979	980	tr	0,32	0,70	0,25	-
β -mirceno	989	991	tr	tr	tr	0,20	-
limoneno	1023	1026	2,10	0,30	0,38	0,30	-
borneol	1163	1165	0,80	tr	-	-	-
α -terpineol	1188	1189	0,90	tr	-	-	-
α -copaeno	1368	1370	6,30	4,90	6,70	9,20	7,12
trans-cariofileno	1417	1418	20,70	37,65	23,88	35,90	21,90
aromadendreno	1439	1439	1,60	2,30	2,25	2,30	1,80
α-humuleno	1450	1452	37,16	13,60	34,05	22,30	36,20
alloaromadendreno	1457	1461	0,90	1,25	1,48	1,70	1,20
γ -muuroleno	1474	1478	2,90	2,80	2,60	2,90	3,50
β -selineno	1485	1489	1,30	0,90	1,30	0,95	1,41
valenceno	1493	1496	2,60	2,30	3,60	3,00	2,60
α -muuroleno	1493	1500	1,40	2,00	1,20	2,10	1,78
γ -cadineno	1510	1513	2,50	2,90	2,45	2,90	3,50
δ -cadineno	1519	1522	6,00	6,05	6,35	7,45	7,10
óxido de cariofileno	1578	1581	1,60	4,60	1,10	2,25	2,20
óxido de humuleno	1603	1608	0,90	1,17	0,40	1,15	2,34
δ -cadinol	1635	1638	0,80	0,52	1,00	1,70	1,60
α -cadinol	1648	1652	tr	0,55	tr	0,50	tr
Total			93,13	92,10	98,29	97,85	94,25

* Tr – traço (menos que 0.20%); IR_{cal.} = Índice de retenção Calculado, IR_{lit.} = Índice de retenção Literatura.

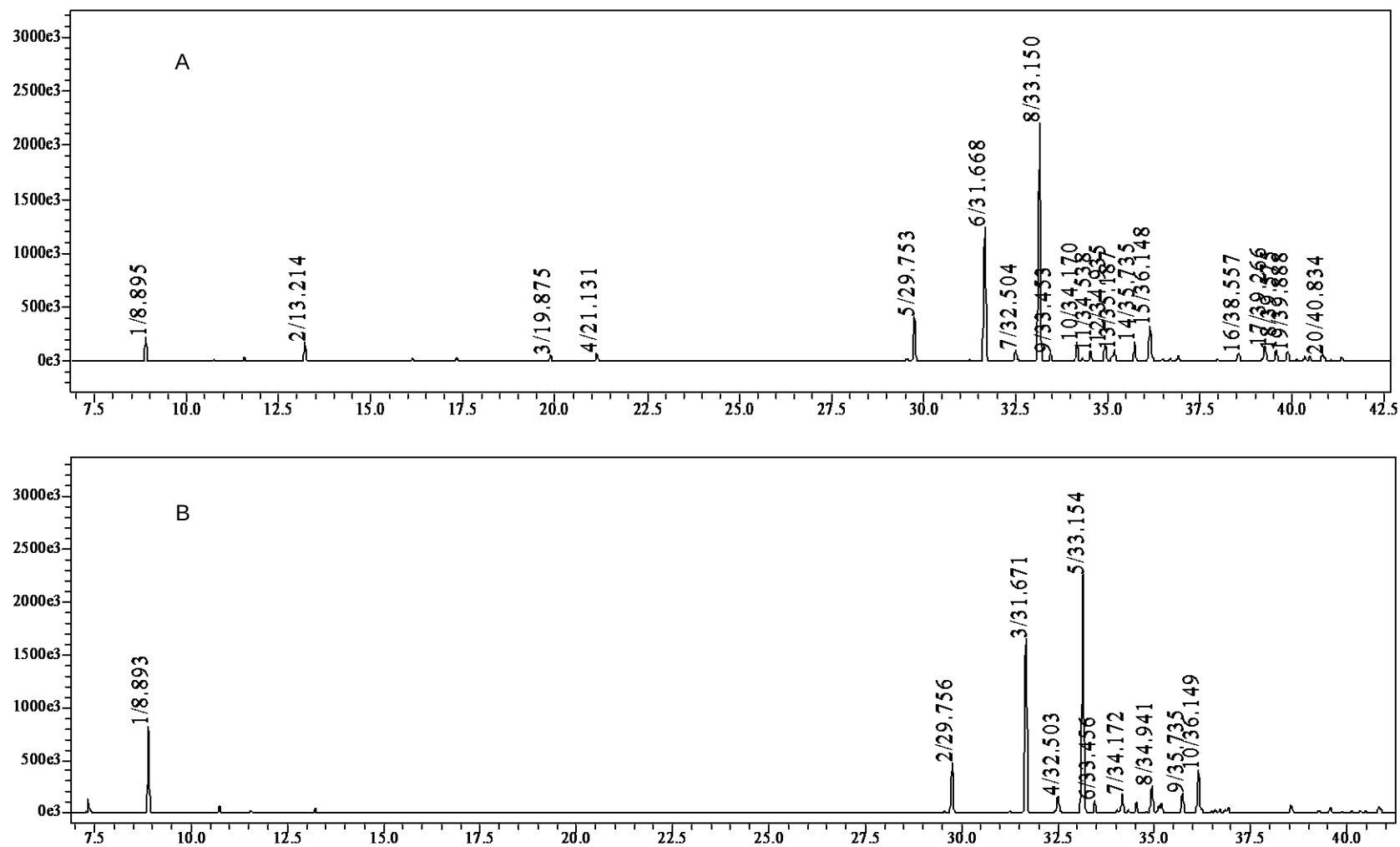


Figura 1: Cromatogramas dos óleos essenciais das folhas (A) e inflorescências (B) de *Achyrocline satureioides* coletados no verão de 2014.

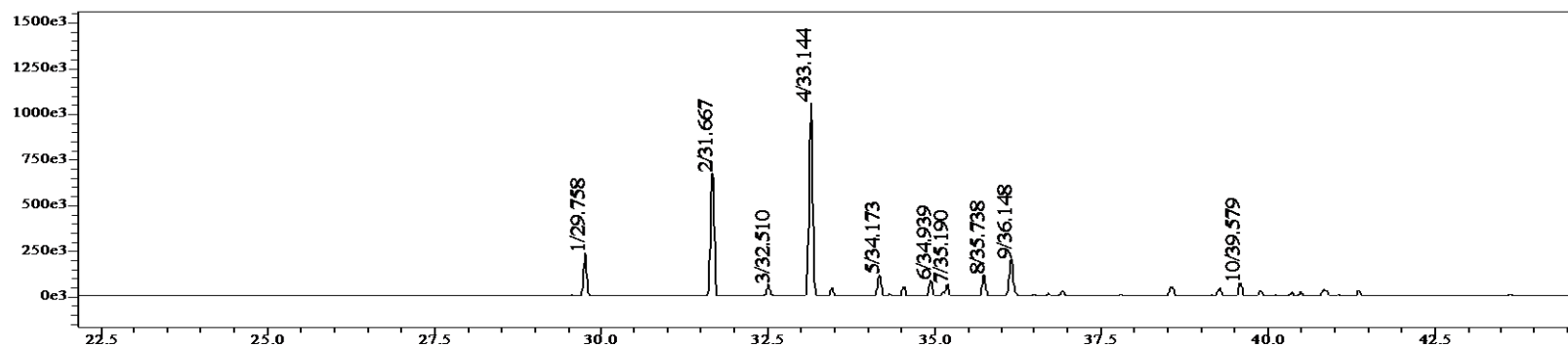


Figura 2: Cromatograma dos óleos essenciais dos caules de *A. saturoioides* coletados no verão de 2014.

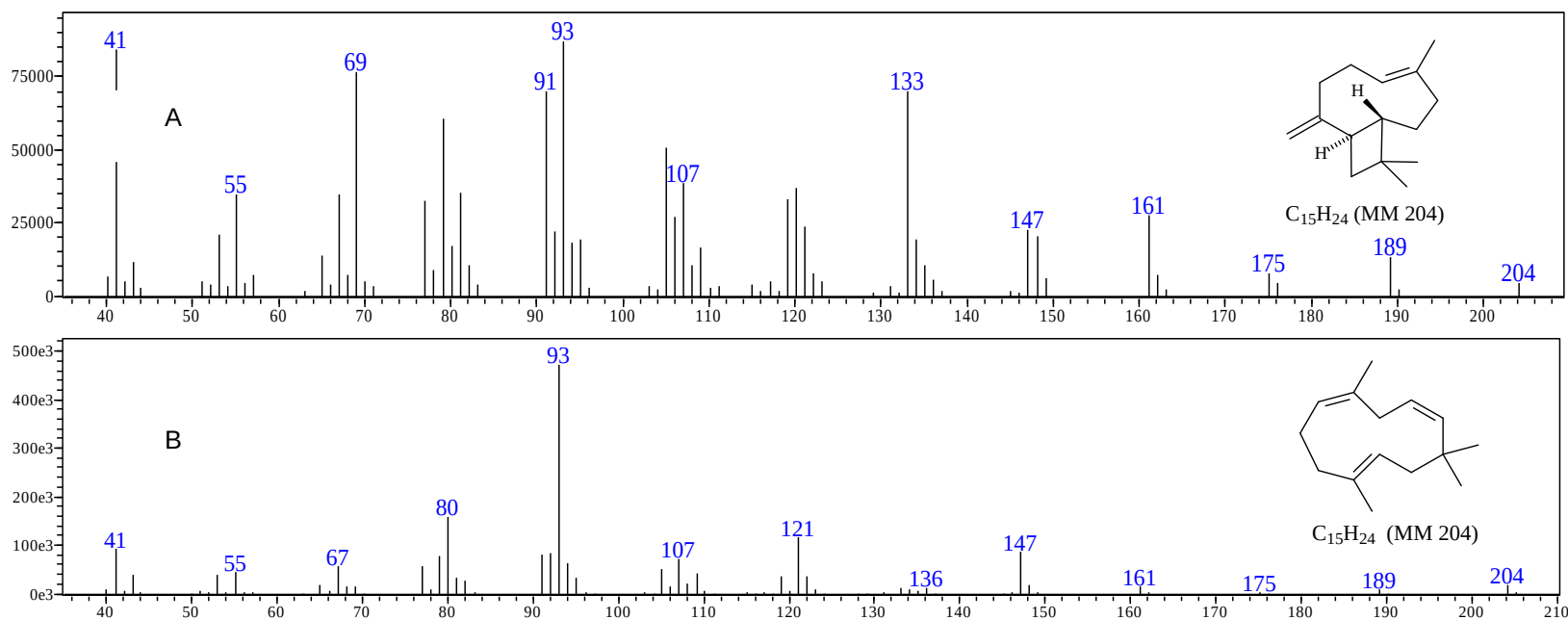


Figura 3: Espectros de massas de íons totais do *trans*-cariofileno (Tr = 31,66 min) (A) e do α -humuleno (Tr = 33,15 min) (B) em *A. saturoioides*.

Considerações Finais

Apesar desta espécie já ter sido estudada em outras regiões, foi importante investigar a ação biológica dos óleos essenciais frente a *Artemia salina*, seu teor, bem como as suas composições químicas. O teor dos óleos essenciais variou durante o verão e o inverno, e seus constituintes majoritários foram os sesquiterpenos *trans*-cariofileno e o α -humuleno; estes caracterizam um novo quimiotipo presente na espécie coletada na região nordeste do Brasil, na cidade de São Sebastião, município de Cairu, estado da Bahia. A atividade larvívora encontrada para os óleos presentes nas folhas frente a *Artemia salina* apresentou CL₅₀ de 3,2 ppm o qual demonstra alta toxicidade. Além disso, essas substâncias majoritárias presentes nos óleos essenciais apontam para uma significativa atividade farmacológica.

Agradecimento

Os autores agradecem à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, a fundação de pesquisa do estado da Bahia – FAPESB e a CAPES, pelo apoio financeiro e bolsas concedidas.

Referências

- [1] GILLIJ, Y. G.; GLEISER, R. M.; ZYGADLO, J. A.; Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina, *Bioresource Technology* 99, 2507–2515, 2008.
- [2] CARMO, G. M.; BALDISSERA, M. D.; VAUCHER, R. A.; RECH, V. C.; OLIVEIRA, C. B.; SAGRILLO, M. R.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; ALVES, M. P.; FRANÇA, R. T.; LOPES, S. T. A.; SCHWERTZ, C. I.; MENDES, R. E.; MONTEIRO, S. G.; DA SILVA, A. S. Effect of the treatment with *Achyrocline satureioides* (free and nanocapsules essential oil) and diminazene aceturate on hematological and biochemical parameters in rats infected by *Trypanosoma evansi*. *Experimental Parasitology* 149, 39–46, 2015.
- [3] CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. Óleos essenciais e química fina. *Química Nova*. 16 (3), 224-228, 1993.
- [4] KADARIAN, C.; BROUSSALIS, A. M.; MINO, J.; LOPEZ, P.; GORZALCZANY, S.; FERRARO, G. Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. *Pharmacological Research* 45, 57–61, 2002.
- [5] RUFFA, M. J.; FERRARO, G. E. ; WAGNER, M. L.; CALCAGNO, M. L.; CAMPOS, R. H.; CAVALLARO, L. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. *Journal of Ethnopharmacology* 79, 335–339, 2002.
- [6] LORENZO, D.; ATTI-SERAFINI, L.; SANTOS, A. C.; FRIZZO, C. D.; PAROUL, N.; PAZ, D.; DELLACASSA, E.; MAYNA, P. *Achyrocline satureioides* essential oils from southern Brazil and Uruguay. *Planta Medica* 66, 476-477, 2000.

- [7] ARREDONDO, M. F.; BLASINA, F.; ECHEVERRI, C.; MORQUIO, A.; FERREIRA, M.; ABIN-CARRIQUIRY, J. A. Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. *Journal of Ethnopharmacology* 91, 13–20, 2004.
- [8] BETTEGA, J. M. R.; TEIXEIRA, H.; BASSANI, V. L.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. Evaluation of the antiherpetic activity of standardized extracts of *Achyrocline satureioides*. *Phytotherapy Research* 18, 819–823, 2004.
- [9] CALVO, D.; CARIDDI, L. N.; GROSSO, M.; DEMO, M. S.; MALDONADO, A. M. *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC (Marcela): antimicrobial activity on *Staphylococcus spp.* and immunomodulating effects on human lymphocytes. *Revista Latinoamericana de Microbiologia* 48, 247–255, 2006.
- [10] CEZAROTTO, V. S.; GIACOMELLI, S. R.; FLORES, E. M. M.; MACK, J. M.; BARIN, J. S.; SILVA, U. F.; LINARES, C. E. B. Seasonal Variation, Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. *Latin American Journal of Pharmacy* 30 (8), 1536–41, 2011.
- [11] SABINI, M. C.; ESCOBAR, F. M.; TONN, C. E.; ZANON, S. M.; CONTIAGINI, M. S.; SABINI, L. I.; Evaluation of antiviral activity of aqueous extracts from *Achyrocline satureioides* against Western equine encephalitis virus. *Natural Product Research* 26, 405–415, 2012.
- [12] SALGUEIRO, A. C. F.; FOLMER, V.; DA ROSA, H. S.; COSTA, M. T.; BOLIGON, A. A.; PAULA, F. R.; ROOS, D. H.; PUNTEL, G. O. In vitro and in silico antioxidant and toxicological activities of *Achyrocline satureioides*. *Journal of Ethnopharmacology* 194, 6–14, 2016.
- [13] SOUZA, A. F.; BALDISSERA, M. D.; COSSETIN, L. F.; LANA, D. F. D.; MONTEIRO, S. G. *Achyrocline satureioides* essential oil loaded in nanocapsules ameliorate the antioxidant/oxidant status in heart of rats infected with *Trypanosoma evansi*. *Microbial Pathogenesis* 105, 30–36, 2017.
- [14] MACÊDO, M.; CONSOLI, R.; GRANDI, T.; DOS ANJOS, A.; DE OLIVEIRA, A.; MENDES, N. Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for larvicidal activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92, 565–570, 1997.
- [15] BRANDELLI, C. L. C.; GIORDANI, R. B.; DE CARLI, G. A.; TASCA, T. Indigenous traditional medicine: in vitro anti-giardial activity of plants used in the treatment of diarrhea. *Parasitology Research*. 104, 1345–1349, 2009.
- [16] ROJAS DE ARIAS, A.; FERRO, E.; INCHAUSTI, A.; ASCURRA, M.; ACOSTA, N.; RODRIGUEZ, E. Mutagenicity, insecticidal and trypanocidal activity of some Paraguayan Asteraceae. *Journal of Ethnopharmacology*. 45, 35–41, 1995.
- [17] BALDISSERA, M. D.; OLIVEIRA, C. B.; RECH, V. C.; REZER, J. F. P.; SAGRILLO, M. R.; ALVES, M. P.; DA SILVA, A. P. T.; LEAL, D. B. R.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; DA SILVA, A. S.; MENDES, R. E.; MONTEIRO, S. G. Treatment with essential oil of *Achyrocline satureioides* in rats infected with *Trypanosoma evansi*: Relationship between protective effect and tissue damage. *Pathology – Research and Practice*. 210, 1068–1074, 2014.
- [18] BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; CLEMENTE, A. D.; PAULA, V. F.; ISMAIL, F. M. D. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebintifolius* RADDI. *Química Nova* 30, 1959–1965, 2007.

- [19] NASCIMENTO, J. C. ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE *Piper klotzschianum* Kunth (PIPERACEAE) E *Croton grewioides* Baill (EUPHORBIACEAE). 2011. 175f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.
- [20] PIRES, V. P.; ALMEIDA, R. N.; WAGNER, V. M.; LUCAS, A. M.; VARGAS, R. M. F.; CASSEL, E. Extraction process of the *Achyrocline satureioides* (Lam) DC. essential oil by steam distillation: modeling, aromatic potential and fractionation. *Journal of Essential Oil Research* 31 (4), 286–296, 2019.
- [21] R. P. Adams, Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectroscopy Carol stream, Illinois, USA, 1995.
- [22] MEYER, B.N.; FERRIGINI, N.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med* 45, 31–34, 1982.
- [23] DAVID, J. P.; SILVA, E. F.; MOURA, D. L.; GUEDES, M. L. D. S.; ASSUNÇÃO, R. D. J.; DAVID, J. M. Lignans and triterpenes from cytotoxic extract of *Eriope blanchetii*. *Química Nova* 24, 730–733, 2001.
- [24] GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores que influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova* 30 (2), 374-381, 2007.
- [25] DUARTE, M. C. T.; LEME, E. E.; DELARMELINA, C.; SOARES, A. A.; FIGUEIRA, G. M.; SARTO RATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escheriachia coli*. *Journal of Ethnopharmacology* 111, 197-201, 2007.
- [26] MARTINS, F. T.; SANTOS, M. H.; POLO, M.; BARBOSA, L. C. A. Chemical variation in the essential oil of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit under cultivation condition. *Química Nova*. 29, 1203-1209, 2006.
- [27] SILVA, L.; CARREIRA, R. C.; ONIKI, G. H.; AGRIPINO, D. G.; YOUNG, M. C. M.; LADEIRA, A. M. Crescimento e análise do potencial antifúngico em plantas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. 9, 73-79, 2007.
- [28] CHARLES, D. J.; SIMON, J. E. Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of basil. *Journal American Society Horticulture Science* 115, 458-462, 1990.
- [29] SILVA, M. G. V.; MATOS, F. J. A.; LOPES, P. R. O.; SILVA, F. O.; HOLANDA, M. T. Composition of essential oils from three *Ocimum* species obtained by steam and microwave distillation supercritical CO₂ extraction. *Arkivoc* 6, 66-71, 2004.
- [30] ANDERSON, J. E.; GOETZ, C. M.; MCLAUGHLIN, J. L.; SUFFNESS, M. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical Analysis* 2 (3), 107-111, 1991.
- [31] JAENSON, T. G.; PALSSON, K.; BORG-KARLSON, A. K. Evaluation of extracts and oils of mosquito (Diptera: *Culicidae*) repellent plants from Sweden and Guinea-Bissau. *Journal of Medical Entomology* 43, 113–119, 2006.

- [32] DA SILVA, L. P. Ação antiespasmódica do *trans*-cariofileno e o bloqueio de canais para Ca^{2+} em músculo liso traqueal de rato. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE, 2010.
- [33] PASSOS, G. F.; FERNANDES, E. S.; CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. *Journal of Ethnopharmacology* 110, 323-333, 2006.
- [34] ROGÉRIO, A. P.; ANDRADE, E. L.; LEITE, D. F. P.; FIGUEREDO, P.; CALIXTO, J. B. Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene α -humulene in experimental airways allergic inflammation. *British Journal of Pharmacology* 158, 1074–1087, 2009.