

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**O ÓLEO ESSENCIAL DE FRUTOS MADUROS E IMATUROS DE
Schinus terebinthifolia RADDI – ATIVIDADE LARVICIDA E DANOS
HISTOLÓGICOS INDUZIDOS EM LARVAS DE *Stegomyia aegypti*
(LINNAEUS, 1762)**

DRIELLE LIMA DE ALMEIDA PRATTI

VILA VELHA
MARÇO - 2017

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**O ÓLEO ESSENCIAL DE FRUTOS MADUROS E IMATUROS DE
Schinus terebinthifolia RADDI – ATIVIDADE LARVICIDA E DANOS
HISTOLÓGICOS INDUZIDOS EM LARVAS DE *Stegomyia aegypti*
(LINNAEUS, 1762)**

Tese apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do grau de Doutora em Ecologia.

DRIELLE LIMA DE ALMEIDA PRATTI

VILA VELHA
MARÇO - 2017

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

P913o Pratti, Drielle Lima de Almeida.
O óleo essencial de frutos maduros e imaturos de *Schinus terebinthifolia* Raddi – atividade larvicida e danos histológicos induzidos em larvas de *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762) / Drielle Lima de Almeida Pratti – 2017.
82 f.: il.

Orientador: Ary Gomes da Silva.
Coorientador: Marcelo da Silva Moretti
Tese (doutorado em Ecologia de Ecossistemas) -
Universidade Vila Velha, 2017
Inclui bibliografias.

1. Ecologia. 2. Produtos naturais. 3. Dengue.
I. Moretti, Marcelo da Silva. II. Silva, Ary Gomes da Silva
III. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 577

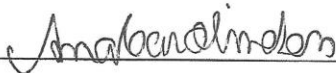
DRIELLE LIMA DE ALMEIDA PRATTI

O ÓLEO ESSENCIAL DE FRUTOS MADUROS E IMATUROS DE
Schinus terebinthifolia RADDI – ATIVIDADE LARVICIDA E DANOS
HISTOLÓGICOS INDUZIDOS EM LARVAS DE *Stegomyia aegypti*
(LINNAEUS, 1762)

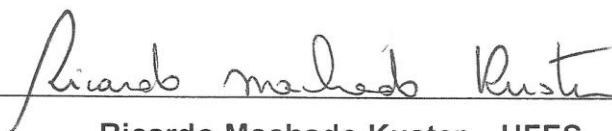
Tese apresentada à Universidade
Vila Velha, como pré-requisito do
Programa de Pós-graduação em
Ecologia de Ecossistemas, para a
obtenção do grau de Doutora em
Ecologia.

Aprovada em 6 de março de 2017,

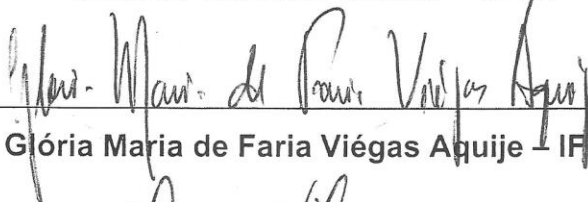
Banca Examinadora:



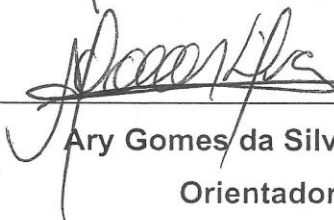
Ana Carolina Loss Rodrigues – UFES



Ricardo Machado Kuster – UFES



Glória Maria de Faria Viégas Aquije – IFES



Ary Gomes da Silva – UVV
Orientador

*Aos meus pais, marido e amigos
que caminharam comigo essa
jornada.*

AGRADECIMENTOS

Àquele que me deu vida, que é a minha razão de viver, aquele que me colocou aqui e me sustentou a fim de fazer a vontade dEle.

Aos meus progenitores que me ensinaram o caminho a seguir e hoje após ter crescido não me desviei desse caminho e que fizeram de tudo para eu chegar até aqui.

Ao meu amor e companheiro que lutou comigo do início ao fim, sempre me mostrando o lado bom e divertido da coisa.

Ao meu querido orientador que nesses quase 10 anos de parceria, tem confiado em mim e me dado grandes oportunidades de crescimento e desenvolvimento profissional e pessoal. Uma pessoa sem medida de carinho, compreensão, liberalidade, confiança, cuidado e inúmeras outras qualidades que possam caber dentro de alguém.

A minha querida irmã que me deu força e coragem, mesmo ela, muitas vezes, não os tendo para si própria. Que orou por mim e caminhou comigo.

Aos meus meninos e minhas meninas super-poderosas (más línguas dirão que eles não valem nem 1 real rsrs) que sempre estavam a postos quando eu gritava por socorro e quando eu não gritava também, que me diziam que eu era capaz e que iria conseguir quando nem eu mesma acreditava em mim. Pelas orações, pelo carinho, pela força, pela amizade, pelo amor e por tantas outras coisas... E realmente, não valem nem 1 real, pois não existe dinheiro no mundo que pague o valor de vocês. Amo vocês!

Aos meus amigos do cafofo que tanto me ajudaram todos esses anos.

Ao meu co-orientador e a todos do LEIA. Sou grata pela incrível ajuda e carinho que cada um me dispensou.

A todos alunos da turma 2013/1 do PPEE que me ajudaram no entendimento da “ecologia da coisa” (Meu lado farmacêutico sempre fala muito mais alto) e nos campos diversos, o que seria da fresca aqui sem vocês?! rsrs.

A todos alunos de TCC que tive o prazer de co-orientar e que me ajudaram na realização de muito do que apresentei aqui.

A minha célula que nesse último ano batalhou comigo.

Aos meus familiares, primas, primos, tias, tios, cunhadas, sogra e a cada amigo que parou um minuto se quer para interceder por mim.

A FAPES pela bolsa de estudos.

Aos membros da banca que puderam contribuir imensamente para esse trabalho.

Me falta memória para lembrar de muitos outros que estiveram comigo nesse período que me deram um sorriso, que se alegraram comigo, que se compadeceram da minha dor ou preocupação, que me sustentaram com um “Fica calma, vai dar tudo certo!”. A todos esses, notórios e anônimos, o meu MUITO OBRIGADA!!!

“Quem chega ao topo sozinho, fez alguma coisa errada no caminho”.

John Maxwell

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO GERAL.....	9
REFERÊNCIAS	18
CAPÍTULO I.....	27
HIGHLIGHTS.....	27
RESUMO.....	28
1. Introdução.....	29
2. Materiais e métodos	32
3. Resultados e discussão	35
4. Referências	47
CAPÍTULO II.....	53
RESUMO.....	54
1. Introdução.....	55
2. Resultados e discussão	57
3. Seção experimental	62
4. Referências	63
CAPÍTULO III.....	66
Resumo	67
Principais conclusões	67
Introdução	68
Materiais e métodos	70
Resultados e discussão.....	71
Referências	75

RESUMO

PRATTI, DRIELLE LIMA DE ALMEIDA, D.Sc. Universidade Vila Velha – ES, Março, 2017. **O óleo essencial de frutos maduros e imaturos de *Schinus terebinthifolia* Raddi – atividade larvícida e danos histológicos induzidos em larvas de *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762).** Orientador: Ary Gomes da Silva e Co-orientador: Marcelo da Silva Moretti.

Stegomyia aegypti é um Culicídeo de grande importância para a saúde pública mundial pois transmite doenças como a febre amarela, dengue, zika e Chikungunya. Podem se reproduzir em coleções de água presentes na natureza como também em criadouros antrópicos. É originário do continente africano, mas chegou ao novo mundo por meio das grandes navegações e comércio escravagista dos séculos XV a XVII. Nesses países, se adaptou e passou a se reproduzir instalando suas populações. No Brasil, ganhou importância sanitária em 1686 com uma epidemia de febre amarela e foi considerado erradicado anos mais tarde. Porém, em 1970 com o crescente êxodo rural foi re-introduzido causando graves epidemias. Nos últimos anos, todo o globo tem sofrido com a expansão territorial desse vetor, principalmente devido as mudanças climáticas. Medidas de controle desse inseto têm sido tomadas, com maior empenho nos países da região tropical e subtropical, onde as condições de sobrevivência e reprodução são maiores, com o uso de pesticidas químicos o que tem causado problemas ao ser humano, meio ambiente e animais. Assim, muitas pesquisas sobre métodos ambientalmente amigáveis estão sendo feitas, com intuito de diminuir esses malefícios dos inseticidas. De forma que o objetivo deste trabalho foi comparar a composição química e o efeito larvícida dos óleos essenciais de frutos maduros e imaturos de *Schinus terebinthifolia* Raddi frente a larvas de terceiro instar de *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762), verificando os danos histológicos causados às larvas.

Palavras-chave: Larvícida, dengue, *Schinus terebinthifolius*, produtos naturais, *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

PRATTI, DRIELLE LIMA DE ALMEIDA, D.Sc, Universidade Vila Velha – ES, March, 2017. **The essential oil of ripe and unripe fruits of *Schinus terebinthifolia* Raddi - larvicidal activity and histological damage induced in larvae of *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762).** Advisor: Ary Gomes da Silva e Co-advisor: Marcelo da Silva Moretti.

Stegomyia aegypti is a Culicidae of great importance for the global public health because it transmits diseases like yellow fever, dengue, Zika and Chikungunya. They can reproduce in collections of water present in nature as well as in anthropic breeding grounds. It originated from the African continent, but arrived in the new world through the great navigations and slave trade of the fifteenth to seventeenth centuries. In these countries, it adapted and began to reproduce itself by installing its populations. In Brazil, it gained sanitary importance in 1686 with an epidemic of yellow fever and was considered eradicated years later. However, in 1970 with the increasing rural exodus was re-introduced causing serious epidemics. In the last years, the whole globe has suffered with the territorial expansion of this vector, mainly due to the climatic changes. Control measures of this insect have been taken, with greater commitment in tropical and subtropical countries, where the conditions of survival and reproduction are greater, with the use of chemical pesticides which has caused problems to humans, the environment and animals. Thus, much research on environmentally friendly methods is being done in order to reduce these insecticide harms. The objective of this work was to compare the chemical composition and larvicidal effect of the essential oils of ripe and immature fruits of *Schinus terebinthifolia* Raddi against third instar larvae of *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762), to verify the histological damage caused to larvae.

Keywords: Larvicide, dengue, *Schinus terebinthifolius*, natural products, *Aedes aegypti*.

INTRODUÇÃO GERAL

Stegomyia aegypti (Linnaeus, 1762) corresponde a uma nova combinação de nomenclatura para *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) (REINERT, HARBACH, & KITCHING, 2004). É um díptero da família Culicidae de grande importância para a saúde pública mundial, pois é responsável por transmitir várias doenças (SYED ALI et al., 2012; WHO, 2014; GUBLER, 2004; GUZMAN & ISTÚRIZ, 2010; MARCONDES & XIMENES, 2015; BURT et al., 2012; ZARASKA, 2016). *St. aegypti* apresenta desenvolvimento holometábolo, ou seja, possui ciclo de vida que passa por ovo, larva, pupa e adulto, o que dura em torno de 1,5 a 3 semanas (GERIS et al., 2012), esse processo de desenvolvimento é altamente influenciado pela temperatura e umidade do ambiente (LAMBRECHTS et al., 2011).

O ovo possui formato elíptico, alongado e fusiforme com aproximadamente 1 mm de comprimento. No momento da oviposição ele tem coloração branca e após a postura adquire coloração escura. A fêmea realiza a oviposição em locais escuros e próximos à água (FORATTINI, 2003; NELSON, 1986). São resistentes à dessecação e seu período de quiescência pode durar de alguns meses até mais de um ano, o que facilita a dispersão passiva do inseto (SILVA et al., 2003).

As larvas eclodem após o desenvolvimento embrionário do ovo que ocorre em, aproximadamente, 48 horas após a postura em condições favoráveis de temperatura, umidade e luminosidade (GERIS et al., 2012). Passam por 4 estágios larvais, e por meio de ecdises, elas se desenvolvem até chegar na fase de pupa. A pupa apresenta o corpo dividido em cefalotórax e abdome, e este estágio é um processo de transição em que intensas transformações ocorrem para a formação do adulto (FORATTINI, 2003).

O mosquito adulto é reconhecido por suas características morfológicas externas específicas, como seu corpo de coloração escura com duas listras branco-prateadas no dorso e manchas de mesma coloração nas patas (GERIS et al., 2012). Apresenta, ainda, tufos de escamas prateadas próximas ao aparelho bucal (FORATTINI, 2003). O macho possui antenas plumosas e palpos mais longos que a fêmea, enquanto estes se alimentam de seiva, a fêmea é hematófaga, uma vez que necessita do sangue para promover a maturação dos ovos (SILVA et al., 1999, FORATTINI, 2003, BECKER et al., 2010, GERIS et al., 2012).

Esses mosquitos podem se reproduzir em coleções de água presentes na natureza, como buracos de árvores, axilas foliares e orifícios em rochas, porém, esta espécie se adaptou às áreas urbanas, com isso passou a viver intimamente ligado às condições peridomiciliares preferindo criadouros antrópicos como garrafas plásticas, vasos de plantas ou qualquer recipiente capaz de acumular água (BROWN et al., 2014).

St. aegypti é originária do continente Africano, especificamente da Etiópia, mas foi descrita no Egito por Linnaeus em 1762, por isso o epíteto específico ser “*aegypti*”. Inicialmente sua distribuição era restrita ao Velho mundo, mas atualmente abrange toda a região tropical e subtropical dos continentes (BROWN et al., 2011). Isso, devido às grandes navegações e ao tráfego comercial por volta dos séculos XV e XVII, em que formas imaturas de *St. aegypti* foram, possivelmente, transportadas em recipientes de armazenamento de água em navios. Essa espécie atingiu regiões geograficamente isoladas umas das outras (BROWN et al., 2014; POWELL & TABACHNICK 2013), caracterizando casos típicos de bioinvasão (CAPDEVILA-ARGÜILESS & ZILLETI, 2005).

A bioinvasão pode ser conceituada como o ato ou efeito do organismo invadir e se estabelecer em ambientes onde não havia registros anteriores para a espécie, seja de modo natural ou por atividade humana, rompendo assim com as barreiras de distribuição geográfica (IGNÁCIO et al., 2010). No Brasil o *St. aegypti* encontrou ambientes que foram favoráveis ao seu estabelecimento e reprodução, ultrapassando assim as barreiras reprodutiva e ecológica da bioinvasão.

As primeiras notificações da presença de *St. aegypti* em solo brasileiro datam de 1686, associado a uma epidemia de febre amarela na Bahia, embora houvesse uma epidemia anterior em 1685 em Recife, para a qual não houve registros explícitos da atuação desse vetor (OLDSTONE, 2010). Esse vetor foi supostamente erradicado, do Brasil em 1955 (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et al., 2004), porém, novos surtos epidêmicos foram relatados nos anos 70, época na qual o país vivia um grande êxodo rural devido ao crescimento comercial e de indústrias nas cidades, o que aliado ao crescimento desordenado, à falta de saneamento básico e infraestrutura, favoreceu a nova instalação do *St. aegypti* e principalmente sua domesticação (MENDONÇA, SOUZA & DUTRA, 2009).

Outros fenômenos têm favorecido a bioinvasão notável deste vetor em todo o mundo, o planeta terra tem sofrido atualmente mudanças climáticas, como o aumento da temperatura terrestre, que tem criado condições favoráveis para o desenvolvimento de vetores patogênicos como o *St. aegypti* (BECKER, 2008; GAGE et al., 2008; REITER, 2010; WILLIAMS et al., 2014) em locais onde no passado ele não se reproduziria, esse fenômeno é possível pois essas alterações no clima favorecem a ecologia, o comportamento e o desenvolvimento dos vetores, bem como a dinâmica de transmissão das doenças associadas a eles (GUBLER, 2001).

Diversas medidas têm sido tomadas com o intuito de combater essas doenças, entretanto, ainda pouco sucesso fora alcançado (BHATT et al., 2013). O controle farmacológico da dengue, por exemplo, é dificultado devido a existência de quatro sorotipos virais (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) cada um com determinado nível de gravidade infecciosa (PESSANHA et al., 2011), e um quinto sorotipo, denominado DENV-5, descrito recentemente na Malásia que foi associado a um único surto em humanos e que, aparentemente, circula entre macacos silvestres (MUSTAFA et al., 2015).

Apesar da vacina contra febre amarela já ser disponível em muitos países (FRIERSON, 2010) e a vacina contra dengue já estar sendo disponibilizada para algumas populações (PITISUTTITHUM E BOUCKENOOGHE, 2016), os riscos das outras doenças relacionadas ao *St. aegypti* é alto, entretanto, métodos preventivos contra elas ainda não foram elucidados (HALLENGÄRD et al., 2014; HOMBACH et al., 2016).

Com base nisso, o combate tem sido feito diretamente aos vetores, com o uso principalmente de inseticidas químicos (VAN DEN BERG et al., 2012). O DDT (diclorodifeniltricloroetano), desde a sua descoberta na década de 30, tem sido o inseticida mais largamente utilizado no combate a vetores, porém, a Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes (2012) destacou a toxicidade desse composto, bem como sua persistência no ambiente e consequente bioacumulação, e mostrou a necessidade de se buscar alternativas para o controle de vetores. Entretanto, a OMS (2007) ainda recomenda, com ressalvas, esse inseticida para pulverização residual de interiores contra o vetor da malária (*Anopheles*), mas com proteção aos trabalhadores de pulverização e os residentes em residências tratadas da exposição (WHO, 2011).

Outro problema referente ao uso de inseticidas é o desenvolvimento de resistência pelos insetos expostos (ANTONIO-NKONDJIO et al., 2011). A resistência é um processo dinâmico e complexo, dependendo diretamente de fatores genéticos, fisiológicos, comportamentais e ecológicos dos insetos, e indiretamente de fatores operacionais, incluindo as categorias de inseticidas utilizados, bem como o método de aplicação, concentração e cobertura (DENHOLM, ROWLAND, 1992). Segundo a OMS, resistência é definida como “a capacidade de um inseto suportar os efeitos de um inseticida, tornando-se tolerante aos seus efeitos tóxicos por meio de seleção natural e mutações” (WHO, 1979).

Essa característica do uso de inseticidas foi primeiramente descrita nos Estados Unidos, quando se relatou o aparecimento de populações de *Aedes* sp. resistentes ao tratamento com DDT (BROWN, 1986), depois dessa evidência, diversas pesquisas demonstraram a resistência de espécies de *Anopheles* (CISSE et al., 2015; NWANE et al., 2013; EDI et al., 2012) *Aedes* (FAUCON et al., 2015; MARCOMBE et al., 2012; VONTAS et al., 2012) e *Culex* (OSTA et al., 2012; NORRIS, NORRIS, 2011; LI et al., 2016) aos inseticidas existentes.

Mediante a tantos malefícios, muitas são as pesquisas por métodos eficientes contra vetores que, ao mesmo tempo, sejam ambientalmente amigáveis. Com isso, inseticidas botânicos têm sido sugeridos como uma alternativa viável para o controle de pragas principalmente devido à sua bioacumulação reduzida e baixa atividade contra organismos não-alvo (NERIO et al., 2010; CANTRELL et al., 2012).

Os produtos naturais mais utilizados tem sido os extratos de plantas e os óleos essenciais, que são misturas complexas de substâncias terpênicas e fenilpropanoides, reconhecidos pelo seu odor característico e alta volatilidade produzidos pelas plantas aromáticas como metabólitos secundários (ISMAN, 2006;

BAKKALI et al., 2008). Essa mistura de substâncias dificulta o aparecimento de resistência por parte dos insetos, o que faz com que os óleos essenciais sejam cada vez mais escolhidos para esse intuito (MACIEL et al., 2010). Os extratos de plantas são também uma ferramenta ambientalmente interessante, porque acredita-se que sejam biodegradáveis e tenham efeitos colaterais mínimos sobre organismos não-alvo, bem como sobre o meio ambiente (PAVELA et al., 2013; PAVELA, 2014).

A biossíntese das substâncias terpênicas que compõem os óleos essenciais, é feita pela via citoplasmática do mevalonato (MVA) a partir do acetil-CoA e da via plastídica do metileritritol pirofosfato (MEP) a partir do piruvato, formando o composto precursor de cinco carbonos, o Isopentenil pirofosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil pirofosfato (DMAPP) (MANN, 1987; DUDAREVA et al., 2006). A condensação de unidades de isopreno forma os terpenoides, que são classificados de acordo com a quantidade de carbonos, sendo os monoterpenos (10), sesquiterpenos (15), os diterpenos (20), os sesterpenos (25), os triterpenos (30) e os tetraterpenos (40). Já os fenilpropanoides definidos como compostos aromáticos com uma cadeia lateral de três carbonos, ligada ao anel benzênico, são formados pela via do ácido chiquímico a partir do ácido cinâmico (MANN, 1987)

Os óleos essenciais podem estar presentes em várias partes das plantas aromáticas como nas flores (laranjeira), folhas (capim-limão, louro) ou nas cascas dos caules (canelas), madeiras (sândalo, pau-rosa) e frutos (erva-doce) sendo então, armazenados e liberados por estruturas como pêlos glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Poaceae); canais oleíferos (Apiaceae) ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Pinaceae, Rutaceae). (SIMÕES; SPITZER, 2004; PERES, 2004).

As substâncias que constituem os óleos essenciais apresentam funções ecológicas importantes para o desenvolvimento e sobrevivência das plantas. São utilizadas para a proteção da planta contra predadores e fitopatógenos (BALDWIN et al., 2002; MCCORMICK, UNSIKER, GERSHENZON, 2012; AMINI et al., 2012), na atração de polinizadores e de animais dispersores de sementes a fim de garantir seu sucesso reprodutivo (PICHESKY E GERSHENZON, 2002; DAS et al., 2013).

Essas relações planta-inseto são a base das pesquisas com produtos naturais, uma vez que, sabendo disso, pesquisadores empenham suas buscas nesses produtos do metabolismo secundário das plantas, tentando desvendar uma substância ou conjunto de substâncias capazes de atuar como inseticida. Por exemplo, Govindarajan et al (2012) verificaram o efeito larvicida do óleo essencial de folhas de *Menta spicata* contra larvas de *Culex quinquefasciatus*, *St. aegypti*, e *Anopheles stephensi* e obtiveram as concentrações letais que ocasiona mortalidade em 50% do lote experimental (CL₅₀) de 62,62; 56,08 e 49,71 ppm respectivamente, mostrando baixas concentrações do óleo essencial promovendo bom resultado na mortalidade das larvas. Já Panneerselvam e Murugan (2013) avaliaram o efeito adulticida, repelente e ovicida de diversos tipos de extrato das folhas *Andrographis paniculata*, *Cassia occidentalis*, e *Euphorbia hirta*, que são plantas medicinais conhecidas na Índia, contra o mosquito *Anopheles stephensi* vetor da malária, e verificaram que estas plantas são promissoras para serem utilizadas nesta finalidade.

Outros pesquisadores compararam o efeito dos óleos essenciais com o efeito das substâncias isoladas, como Cheng et al. (2009) que observaram que o efeito tóxico do óleo essencial de *Cryptomeria japonica* (CL₅₀ = 28,4 ppm) sobre larvas de *St. aegypti* foi maior que o efeito do constituinte majoritário do mesmo óleo, o 16-kaurene (CL₅₀ = 57,0 ppm) e o elemol (CL₅₀ > 100,0 ppm), porém, compostos minoritários como

o 3-carene ($CL_{50} = 25,3$ ppm), terpinolene ($CL_{50} = 32,1$ ppm), α -terpinene ($CL_{50} = 28,1$ ppm) e γ -terpinene ($CL_{50} = 26,8$ ppm) apresentaram maior efetividade contribuindo então para o efeito larvicida do óleo como todo.

Uma outra espécie produtora de óleos essenciais é a *Schinus terebinthifolia* Raddi, pertencente à família Anacardiaceae, é uma árvore perene de médio porte e seus frutos são numerosos e na forma de drupa, com casca rosa escuro a vermelha envolvendo uma única semente de cor marrom. É conhecida popularmente como pimenta-rosa, aroeira da praia, aroeira vermelha, “brazilian pepper” e “christmas berry” (LENZI E ORTH, 2004). É nativa da América do Sul, sendo encontrada no Brasil, Paraguai e Argentina (SILVA et al., 2010b) e reconhecida na Europa por sua utilização na culinária internacional, principalmente a francesa (PÉRINO-ISSATIER et al., 2010). Muitas atividades biológicas e medicinais são atribuídas a esta planta, tais como antioxidante (BENDAOU et al., 2010), cicatrizante (ESTEVÃO et al., 2013), antitumoral (MATSUO et al., 2011), antimicrobiana (SILVA et al., 2010a; JOHANN et al., 2010), bem como antisséptico (MEDEIROS et al., 2007), anti-inflamatório (FEDELMYASATO et al., 2014), antibacteriano (COLE et al., 2014; GOMES et al., 2012) e larvicida (KWEKA et al., 2011; PRATTI et al., 2015; SILVA et al., 2010b).

Kweka et al. (2011) destacaram a atividade larvicida do óleo essencial dos frutos maduros da aroeira contra larvas de terceiro instar de uma espécie de mosquito vetor da malária, *Anopheles gambiae*, porém com uma CL_{50} de 2625,20 ppm. Silva et al. (2010b), testando o mesmo óleo contra larvas de terceiro instar de *St. aegypti*, observaram a CL_{50} de 366,91 ppm. Outros pesquisadores verificaram se o extrato salino das folhas de aroeira era tóxico para larvas de *St aegypti* e viram que o extrato produziu efeitos nocivos às células digestivas, enteroendócrinas e regenerativas no intestino médio das larvas, bem como induziu a desorganização estrutural do intestino

e eliminação de seu conteúdo. Porém, ao testarem a toxicidade ambiental em *Artemia salina*, um microcrustáceo, (MEYER et al., 1982), verificaram que o extrato de folhas de aroeira matou 100% dos náuplios de *A. salina* em todas as concentrações testadas (0,125-1,0%), indicando que o extrato foliar é potencialmente tóxico para o ambiente nas concentrações que matam as larvas de *St. aegypti*, fato que inviabiliza o uso desse tipo de extrato no ambiente (PROCÓPIO et al., 2015).

Mediante às ações biológicas e efeitos gerados por extratos e óleos essenciais das partes dessa planta contra mosquitos vetores, o objetivo deste trabalho foi comparar a composição química dos óleos essenciais de frutos imaturos, maduros e folhas de *Schinus terebinthifolia* Raddi; comparar o efeito larvicida dos óleos essenciais de frutos maduros e imaturos de *Schinus terebinthifolia* Raddi frente a larvas de terceiro instar de *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762), analisando os danos histológicos causados às larvas.

REFERÊNCIAS

- Amini, M.; Safaie, N.; Salmani, M. J.; Shams-Bakhsh, M. Antifungal activity of three medicinal plant essential oils against some phytopathogenic fungi. **Trakia Journal of Sciences**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2012.
- Antonio-Nkondjio, C.; Fossog, B.T.; Ndo, C.; Djantio, B.M.; Togouet, S.Z.; Awono-Ambene, P.; et al. *Anopheles gambiae* distribution and insecticide resistance in the cities of Douala and Yaoundé (Cameroon): influence of urban agriculture and pollution. **Malaria Journal**, v. 10, p. 154-166, 2011.
- Bakkali, F.; Idaomar, M.; Averbeck, D.; Averbeck, S. Biological effects of essential oils – A review. **Food Chem Toxicol**, n. 46, p. 446–475, 2008.
- Baldwin, I.T.; Halitschke, R.; Kessler, A.; Schittko, U. Merging molecular and ecological approaches in plant–insect interactions. **Curr Opin Plant Biol**, n. 4, p. 351–358, 2002.
- Becker, N. Influence of climate change on mosquito development and mosquito-borne diseases in Europe. **Parasitol Res**, n. 103, p. S19–S28, 2008.
- Becker, N.; Petric, D.; Zgomba, M.; Boase, C.; Madon, M.; Dahl, C.; Kaiser, A. *Mosquitoes and their control*. 2 ed. New York: Springer Science & Business Media, 2010.
- Bendaoud, H.; Romdhane, M.; Souchard, J.P.; Cazaux, S.; Bouajila, J. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus Molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. **Food Sci**, v. 76, n. 6, p. 466 – 472, 2010. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01711.x
- Bhatt, S.; Gething, P.W.; Brady, O.J.; Messina, J.P.; Farlow, A.W.; Moyes, C.L.; et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, n. 496, p. 504-507, 2013.
- Brown, A.W. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. **J Am Mosq Control Assoc**, v. 2, n. 2, p. 123-140, 1986.
- Brown, J.E.; Evans, B.; Zheng, W.; Abas, V.; Barrera-Martinez, L.; Egizi, A.; et al. Human impacts have shaped historical and recente evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. **Evolution**, v. 68, n. 2, p. 514-525, 2014.

- Brown, J.E.; McBride, C.S.; Johnson, P.; Ritchie, S.; Paupy, C.; Bossin, H.; et al. Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple “domestications” of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. **Proc Biol Sci**, n. 278, p. 2446-2454, 2011.
- Burt, F.J.; Rolph, M.S.; Rulli, N.E.; Mahalingam, S.; Heise, M.T.; Heise, M.T. Chikungunya: a re-emerging virus. **Lancet**, n. 379, p. 662–71, 2012. DOI:10.1016/S0140-6736(11)60281-X
- Cantrell, C.L.; Dayan, F.E.; Duke, S.O. Natural products as source for new pesticides. **J Nat Prod**, n. 75, p. 1231–1242, 2012.
- Capdevila-Argüelles, L.; Zilletti, B. *Issues in Bioinvasion Science EEI 2003: a contribution to the knowledge on invasive alien species*. Dordrecht, Holanda: Springer, 2005.
- Cheng, S.S.; Chua, M.T.; Chang, E.H.; Huang, C.G.; Chen, W.J.; Chang, S.T. Variations in insecticidal activity and chemical compositions of leaf essential oils from *Cryptomeria japonica* at diferente ages. **Bioresour Technol**, n. 100, p. 465–470, 2009. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.11.060
- Cisse, M.B.M.; Keita, C.; Dicko, A.; Dengela, D.; Coleman, J.; Lucas, B.; et al. Characterizing the insecticide resistance of *Anopheles gambiae* in Mali. **Malaria Journal**, n. 14, p. 327-337, 2015.
- Clavijo McCormick, A.; Unsicker, S.B.; Gershenzon, J. The specificity of herbivore-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 5, p. 303-310, 2012.
- Cole, E.R.; Santos, R.B.; Júnior, V.L.; Martins, J.D.L.; Greco, S.J.; Neto, A.C. Chemical composition of essential oil from ripe fruit of *Schinus terebinthifolius* Raddi and evaluation of its activity against wild strains of hospital origin. **Braz. J. Microbiol**, n. 45, p. 821 – 828, 2014.
- Das, A.; Lee, S.; Hyun, T.K.; Kim, S.; Kim, J. Plant volatiles as method of communication. **Plant Biotechnol Rep**, n. 7, p. 9–26, 2013.
- Denholm, I.; Rowland, M.W. Tactics for Managing Pesticide Resistance in Arthropods: Theory and Practice. **Annu Rev Entomol**, n. 37, p. 91-112, 1992.
- Dudareva, N.; Negre, F.; Nagegowda, D.A.; Orlova, I. Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. **Crit Rev Plant Sci**, v. 25, n. 5, p. 417-440, 2006.

Edi, C.V.A.; Koudou, B.G.; Jones, C.M.; Weetman, D.; Ranson, H. Multiple-Insecticide Resistance in *Anopheles gambiae* Mosquitoes, Southern Côte d'Ivoire. **Emerg Infect Dis**, v. 18, n. 9, p. 1508–1511, 2012.

Estevão, L.R.M.; Mendonça, F.S.; Evêncio, L.B.; Simões, R. S.; Barros, M.E.G.; Arantes, R.M.E. Effects of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) oil on cutaneous wound healing in rats. **Acta Cir. Bras.**, n. 28, p. 202 - 209, 2013.

Faucon, F.; Dusfour, I.; Gaud, T.; Navratil, V.; Boyer, F.; Chandre, F.; et al. Identifying genomic changes associated with insecticide resistance in the dengue mosquito *Aedes aegypti* by deep targeted sequencing. **Genome Res**, n. 25, p. 1347-1359, 2015.

Fedel-Miyasato, L.E.S.; Kassuya, C.A.L.; Auharek, S.A.; Formagio, A.S.N.; Cardoso, C.A.L.; Mauro, M.O. Evaluation of anti-inflammatory, immunomodulatory, chemopreventive and wound healing potentials from *Schinus terebinthifolius* methanolic extract. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 24, n. 5, p. 565–575, 2014. DOI:10.1016/j.bjp.2014.08.004

Forattini, O.P. *Culicidologia Médica*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003.

Frierson, J.G. The Yellow Fever Vaccine: A History. **Yale J Biol Med**, n. 83, p. 77-85, 2010.

Gage, K.L.; Burkot, T.R.; Eisen, R.J.; Hayes, E.B. Climate and Vector borne Diseases. **Am J Prev Med**, n.35, p.436-450, 2008.

Geris, R.; Ribeiro, P.R.; Brandão, M.S.; Silva, H.H.G.; Silva, I.G. Bioactive natural products as potential candidates to control *Aedes aegypti*, the vector dengue. In: Attar-Rahman, F.R.S. *Studies in natural products chemistry*. Amsterdã: Elsevier, 2012.

Gomes, F.S.; Procópio, T.F.; Napoleão, T.H.; Coelho, L.C.B.B.; Paiva, P.M.G. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **J. Appl. Microbiol**, n. 114, p. 672 - 679, 2012.

Govindarajan, M.; Sivakumar, R.; Rajeswari, M.; Yogalakshmi, K. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Mentha spicata* (Linn.) against three mosquito species. **Parasitol Res**, n. 110, p. 2023–2032, 2012. DOI: 10.1007/s00436-011-2731-7

Gubler, D.J. The changing epidemicology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, n. 27, p. 319–330, 2004.

Guzman, A.; Istúriz, R.E. Update on the global spread of dengue. **Int J Antimicrob Agents**, n. 365, p. 540–542, 2010. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2010.06.018

Hallengård, D.; Kakoulidou, M.; Lulla, A.; Kümmerer, B.M.; Johansson, D.X.; Mutso, M.; et al. Novel Attenuated Chikungunya Vaccine Candidates Elicit Protective Immunity in C57BL/6 mice. **J. Virol**, v. 88, n. 5, p. 2858-2866, 2014. DOI: 10.1128/JVI.03453-13

Ignacio, B.L.; Julio, L.M.; Junqueira, A.O.R.; Ferreira-Silva, M.A.G. Bioinvasion in a Brazilian Bay: Filling Gaps in the Knowledge of Southwestern Atlantic Biota. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. e13065, 2010. DOI:10.1371/journal.pone.0013065

Isman, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, n. 51, p. 45–66, 2006.

Joachim, H.; Martin, F.; Vasee, M.; Anthony, C.; Paule, K.M. Developing a vaccine against Zika. **BMJ**, n. 355, p. i5923, 2016. DOI: 10.1136/bmj.i5923

Johann, S.; Sá, N.P.; Lima, L.A.R.S.; Cisalpino, P.S.; Cota, B.B.; Alves, T.M.A.; et al. Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.**, n. 9, p. 1–6, 2010.

Kweka, E.J.; Nyindo, M.; Mosha, F.; Silva, A.G. Insecticidal activity of the essential oil from fruits and seeds of *Schinus terebinthifolia* Raddi against African malaria vectors. **Parasit. Vectors**, n. 4, p. 129-138.

Lambrechts, L.; Paaijmans, K.P.; Fansiri, T.; Carrington, L.B.; Kramer, L.D.; Thomas, M.B.; et al. Impact of daily temperature fluctuations on dengue virus transmission by *Aedes aegypti*. **PNAS**, n. 108, p. 7460–7465, 2011.

Lenzi, M.; Orth, A.I. Fenologia reprodutiva, morfologia e biologia floral de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae), em restinga da Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Biotemas**, n. 17, p. 67-89, 2004.

Li, C.X.; Guo, X.X.; Zhang, Y.M.; Dong, Y.D.; Xing, D.; Yan, T.; et al. Identification of genes involved in pyrethroid-, propoxur-, and dichlorvos- insecticides resistance in the

mosquitoes, *Culex pipiens complex* (Diptera: Culicidae). **Acta Trop**, v. 21, n. 157, p. 84-95, 2016.

Lourenço-de-Oliveira, R.; Vazeille, M.; Filippis, A.M.B.; Failloux, A.B. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, n. 98, p. 43-54, 2004.

Maciel, M.V.; Morais, S.M.; Bevilaqua, C.M.L.; Amóra, S.S.A. Extratos vegetais usados no controle de dípteros vetores de zoonoses. **Rev Bras Pl Med**, n. 12, p. 105-112, 2010.

Mann, J. *Secondary metabolism*. 2. ed. New York: Oxford University Press, 1987.

Marcombe, S.; Mathieu, R.B.; Pocquet, N.; Riaz, M.; Poupardin, R.; Sélion, S.; et al. Insecticide Resistance in the Dengue Vector *Aedes aegypti* from Martinique: Distribution, Mechanisms and Relations with Environmental Factors. **Plos One**, v. 7, n. 2, e30989, 2012.

Marcondes, C.B.; Ximenes, M.F. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes (Stegomyia)* mosquitoes. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 49, n. 1, p. 4-10, 2015.

Matsuo, A.L.; Figueiredo, C.R.; Arruda, D.C.; Pereira, F.V.; Scutti, J.A.B.; Massaoka, M.H.; et al. α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, n. 411, p. 449–454, 2011.

Medeiros, K.C.P.; Monteiro, J.C.; Diniz, M.F.F.M.; Medeiros, I.A.; Silva, B.A.; Piuvezam, M.R. Effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation: *Eucalyptus globulus* Labill, *Peltodon radicans* Pohl and *Schinus terebinthifolius* Raddi in inflammatory models. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 17, n. 1, p. 23-28, 2007. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100006>

Mendonça, F.A.; Souza, A.V.; Dutra, D.A. Saúde pública, urbanização e dengue no Brasil. **Sociedade & Natureza**, n. 21, p. 257-269, 2009.

Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R.; Putnam, J.E.; Jacobsen, L.B.; Nichols, D.E.; McLaughlin, J.L. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, n. 45, p. 31-34, 1982.

Morrison, A.C.; Zielinski-Gutierrez, E.; Scott, T.W.; Rosenberg, R. Defining Challenges and Proposing Solutions for Control of the Virus Vector *Aedes aegypti*. **PLoS Med**, v. 5, n.3, e68, 2008. DOI:10.1371/journal.pmed.0050068

Mustafa, M.S.; Rasotgi, V.; Jain, S.; Gupta, V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Med J Armed Forces India**, v. 71, n. 1, p. 67–70, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mjafi.2014.09.011>

Nelson, J.M. *Aedes aegypti: Biologia y Ecologia*. Organizacion Panamericana de la Salud. Washington, DC, 1986.

Nerio, L.S.; Olivero-Verbel, J.; Stashenko, E. Repellent activity of essential oils: a review. **Bioresource Technology**, n. 101, p. 372–378, 2010.

Norris, L.C.; Norris, D.E. Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* mosquitoes after the introduction of insecticide-treated bed nets in Macha, Zambia. **J Vector Ecol**, v. 36, n. 2, p. 411-420, 2011.

Nwane, P.; Etang, J.; Chouaïbou, M.; Toto, J.C.; Koffi, A.; Mimpfoundi, R.; et al. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Cameroon, Central Africa. **Parasites & Vectors**, n. 6, p. 41-54, 2013.

Oldstone, M.B.A. Yellow Fever. In *Viruses, plagues and history: Past, present and future*. New York: Oxford University Press; 2010.

Osta, M.A.; Rizk, Z.J.; Labbé, P.; Weill, M.; Knio, K. Insecticide resistance to organophosphates in *Culex pipiens* complex from Lebanon. **Parasites & Vectors**, n. 5, p. 132, 2012.

Panneerselvam, C. Kadarkarai Murugan Adulticidal, repellent, and ovicidal properties of indigenous plant extracts against the malarial vector, *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). **Parasitol Res**, n. 112, p. 679–692, 2013. DOI 10.1007/s00436-012-3185-2

Pavela, R. Insecticidal properties of *Pimpinella anisum* essential oils against the *Culex quinquefasciatus* and the non-target organism *Daphnia magna*. **J. Asia-Pacif. Entomol**, n. 17, p. 287–293, 2014.

Pavela, R., Zabka, M., Vrchotova, N., Triska, J., Kazda, J. Selective effects of the extract from *Angelica archangelica* L. against *Harmonia axyridis* (Pallas) – an important predator of aphids. **Ind. Crops Prod**, n. 51, p. 87–92, 2013.

Peres, L.E.P. In: *Metabolismo secundário*. São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.

Périno-Issartier, S.; Abert-Vian, M.; Petitcolas, E.; Chemat, F. Microwave turbo hydrodistillation for rapid extraction of the essential oil from *Schinus terebinthifolius* Raddi Berries. **Chromatographia**, v. 72, n. 3, p. 347–350, 2010.

Pessanha, J. E. M.; Caiaffa, W. T.; Cecilio, A. B.; Iani, F. C. M.; Nascimento, J.C.; Froon, E. G.; et al. Cocirculation of two dengue virus serotypes in individual and pooled samples of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, p. 103-105, 2011.

Pichersky, E.; Gershenzon, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Curr Opin Plant Biol**, n. 5, p. 237–243, 2002.

Pitisuttithum, P.; Bouckennooghe, A. The first licensed dengue vaccine: an important tool for integrated preventive strategies against dengue virus infection. **Expert Review of Vaccines**, v. 15, n. 7, p. 795-798, 2016. DOI: 10.1080/14760584.2016.1189331

Powell, J.R.; Tabachnick, W.J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* – A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, n. 108. p. 11-17, 2013.

Pratti, D.L.A.; Ramos, A.C.; Scherer, R.; Cruz, Z.M.A.; Silva, A.G. Mechanistic basis for morphological damage induced by essential oil from Brazilian pepper tree, *Schinus terebinthifolia*, on larvae of *Stegomyia aegypti*, the dengue vector. **Parasit. Vectors.**, n. 8, p. 136-145, 2015. DOI: 10.1186/s13071-015-0746-0

Procópio, T.F.; Fernandes, K.M.; Pontual, E.V.; Ximenes, R.M.; de Oliveira, A.R.C.; Souza, C.S.; et al. *Schinus terebinthifolius* Leaf Extract Causes Midgut Damage, Interfering with Survival and Development of *Aedes aegypti* Larvae. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, e0126612, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0126612

Reinert, J.F.; Harbach, R.E.; Kitching, I.J. Phylogeny and classification of Aedini (Diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages. **Zoological Journal of the Linnean Society**, n. 142, p. 289–368, 2004.

Reiter, P. Yellow fever and dengue: a threat to Europe? **Euro Surveill.** n. 15, 19509, 2010.

Silva, A.B.; Silva, T.; Franco, E.S.; Rabelo, S.A.; Lima, E.R.; Mota, R.A.; et al. Antibacterial activity, chemical composition, and cytotoxicity of leaf's essential oil from Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 41, p. 158-163, 2010a.

Silva, A.G.; Almeida, D.L.; Ronchi, S.N.; Bento, A.C.; Scherer, R.; Ramos, A.C.; Cruz, Z.M.A. The essential oil of Brazilian pepper, *Schinus terebinthifolia* Raddi in larval control of *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762). **Parasit. Vectors**, n. 3, p. 79 - 85, 2010b.

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 Soc Bras Med Trop**, n. 32, p. 349-355, 1999.

Silva, I.G.; da Silva, H.H.G.; Lima, C.G. Comportamento de oviposição de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) em diferentes estratos e ciclo biológico. **Acta Biol. Par.**, n. 32, p. 1-8. 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/abpr.v32i0.617>

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

Stockholm Convention on Persistent Organic pollutants. 2012. Convention Text. Geneva: United Nations Environment Programme. Available: <http://chm.pops.int/Convention/ConventionText/tabid/2232/Default.aspx>

Syed Ali, M.; Ravikumar, S.; Beula, J.M. Bioactivity of seagrass against the dengue fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2012, p. 1-5, 2012.

Uliana, M.P.; Fronza, M.; da Silva, A.G.; Vargas, T.S.; de Andrade, T.U.; Scherer, R. Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. **Industrial Crops and Products**, n. 83, p. 235–240, 2016.

van den Berg, H.; Zaim, M.; Yadav, R.S.; Soares, A.; Ameneshewa, B.; Mnzava, A. Global Trends in the Use of Insecticides to Control Vector-Borne Diseases. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 4, p. 577 - 582, 2012.

Vontas, J.; Kioulos, E.; Pavlidi, N.; Morou, E.; Della Torre, A.; Ranson, H. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 104, n. 2, p. 126–131, 2012.

WHO – World Health Organization). DDT in Indoor Residual Spraying: Human Health Aspects. Environmental Health Criteria 241, 2011.

WHO – World Health Organization). The Use of DDT in Malaria Vector Control. WHO Position Statement, Geneva, 2007.

WHO – World Health Organization. A global brief on vector-borne diseases, Geneva, 2014.

WHO – World Health Organization. Environmental health criteria 9: DDT and its derivatives. In: Environmental Health Criteria. 1979.

Williams, C.R.; Mincham, G.; Ritchie, S.A.; Viennet, E.; Harley, D. Bionomic response of *Aedes aegypti* to two future climate change scenarios in far north Queensland, Australia: implications for dengue outbreaks. **Parasit Vectors**, n.7, p.447, 2014.

Zaraska, M. The Next Zika - Four insect–and tick-borne viruses that you may not have heard about are now worrying researchers. **Scientific American**, 2016. DOI: <https://www.scientificamerican.com/article/the-next-zika/> Acesso em: 27/12/2016

CAPÍTULO I

ANÁLISE METABOLÔMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE FRUTOS MADUROS E IMATUROS DE *Schinus terebinthifolia* RADDI

Manuscrito apresentado nas normas da revista *Phytochemistry letters*

Drielle Lima de Almeida Pratti ^{a,b}
Ary Gomes da Silva^a

^a Programa de pós-graduação em Ecologia de ecossistemas – Universidade Vila Velha. Av. Mercúrio, s/n, Residencial Coqueiral, Vila Velha, Espírito Santo, Brasil.

^b Autor correspondente – driellepratti@gmail.com

HIGHLIGHTS

- Os frutos maduros são compostos principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos residuais.
- Os frutos imaturos são predominantemente compostos de sesquiterpenos.
- Treze substâncias eram comuns a ambas amostras.
- A principal substância do fruto maduro foi o δ -3-careno e do fruto imaturo foi o limoneno.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi comparar a química do óleo essencial de frutos imaturos, e maduros de *Schinus terebinthifolia* Raddi obtidos por hidrodestilação e analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). Os frutos maduros são compostos principalmente de monoterpenos, com vestígios residuais de sesquiterpenos, enquanto que no óleo essencial dos frutos imaturos e das folhas ocorrem muitos sesquiterpenos. A principal substância do óleo essencial do fruto maduro e das folhas foi o δ -3-carene (46,67% e 68,78%), e do fruto imaturo foi o limonene (37,49%). A análise de agrupamento revelou que o óleo essencial dos frutos imaturos e maduros formaram grupos bastante distintos. Os resultados sugerem diferenças na composição química entre os frutos maduros e imaturos de *S. terebinthifolia* de acordo com seu estágio de maturação e elevam os subsídios para o extrativismo natural da aroeira.

Palavras-chave: *Schinus terebinthifolius*, Composição química, aroeira, Cromatografia.

1. Introdução

Metaboloma é um termo que tem sido utilizado para denominar, identificar e/ou quantificar o conjunto de metabólitos sintetizados por um sistema biológico (Fiehn, 2002). No caso das plantas inúmeras substâncias estão envolvidas em seus processos biológicos e são classificados em metabólitos primários ou secundários (Luckner, 2013).

Os metabólitos primários são aqueles que representam a estrutura do organismo em si, ou seja, são aquelas moléculas essenciais à vida, os carboidratos, lipídeos, proteínas e nucleotídeos. A partir dessas moléculas, algumas plantas são capazes de sintetizar, por meio de rotas biossintéticas, outras substâncias que vão participar do processo de interação da planta com o meio ambiente, esses são chamados metabólitos secundários (Luckner, 2013). Esses metabólitos estão envolvidos na manutenção e desenvolvimento da espécie vegetal, uns atuando na proteção e defesa da planta, repelindo pragas, herbívoros e patógenos, e outros na atração de polinizadores, animais dispersores de sementes e micro-organismos simbiotes (Pinto et al., 2002; McCormick, Unsiker, Gershenzon, 2012; Das et al., 2013).

O metabolismo secundário participa da produção, dentre outras substâncias, de óleos essenciais (OEs), que são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas obtidas de matérias-primas vegetais (Heinzmann, Spitzer e Simões, 2017). Constituídos por compostos de duas classes químicas principais e inteiramente distintas, os terpenóides e os fenilpropanóides. Bioquimicamente, terpenóides se originam a partir do ácido mevalônico que forma o precursor isopreno utilizado como componente básico para a síntese dos terpenóides, enquanto os fenilpropanóides são derivados da fenilalanina que é sintetizada pela via do ácido chiquímico na planta (Sangwan et al. 2001).

Os OEs estão presentes em diferentes extratos vegetais de partes vegetativas, como casca, caule e folhas de *Schinus terebinthifolia* Raddi (Anacardiaceae), comumente conhecida como aroeira, pimenta rosa ou pimenta brasileira, é nativa da América do Sul, especialmente do Brasil, Paraguai e Argentina. É uma árvore perene com fruto globoide do tipo drupa, aromático, doce, de cor verde quando imaturo e vermelho quando maduro (Carmello-Guerreiro e Paoli, 2002).

Na Medicina Tradicional Brasileira, *S. terebinthifolia* tem sido amplamente utilizada. Alguns trabalhos os indicam como anti-inflamatório (Fedel-Miyasato et al., 2014), antioxidante (Bendaoud et al., 2010; Uliana et al., 2016), antitumoral (Matsuo et al., 2011), cicatrizante (Estevão et al., 2013; Fedel-Miyasato et al., 2014), antifúngico (Johann et al., 2010), antibacteriano (Cole et al., 2014; Gomes et al., 2012; Uliana et al., 2016) e inseticida/ larvicida (Kweka et al., 2011; Pratti et al., 2015; Silva et al., 2010).

Atualmente, o uso do fruto de *S. terebinthifolia* tem sido destacado no mercado global como um tempero (Ruas et al., 2011; FAO, 2015), e tornou-se internacionalmente conhecido como Brazilian pepper ou Christmas berry (FAO, 2015). No entanto, essas frutas são commodities obtidas principalmente através do extrativismo natural, sem gestão sustentável. As comunidades extrativas do Brasil vendem frutas em torno de €0,50 por quilograma, enquanto podem custar €80,00 por quilograma no mercado internacional. A colheita natural de frutas é atualmente feita quebrando vários ramos contendo frutas em diferentes estádios de amadurecimento sem considerar qualquer necessidade de conservação para preservar os bancos de sementes naturais e para a sustentabilidade das espécies em seu ambiente natural (Álvares-Carvalho et al., 2016).

Esses frutos são ricos em OEs (1,5%), com relatos de amostras analisadas de seu óleo apresentando δ -3-carene (55,36%), α -pinene (15,62%) e silvestrene (10,69%) como principais componentes (Kweka et al., 2011, Silva et al., 2010). Além disso, análises fitoquímicas desses frutos revelaram a presença de alto conteúdo de taninos, biflavonóides e triterpenos ácidos (Barbosa et al., 2007).

A composição dos OEs é determinada por fatores genéticos, mas fatores ambientais podem causar variações significativas em seus componentes (Gouvea et al., 2012). O ambiente, por exemplo, gera estímulos que podem alterar a via metabólica estimulando a biossíntese de compostos diferentes. Todas as interações da planta com o ambiente podem modificar a produção de metabólitos, como o tipo de solo, a ação de insetos, temperatura, luminosidade, pluviosidade, época de colheita, estágio de desenvolvimento, idade da planta, dentre outros (Ramakrishna e Ravishankar, 2011). Barbosa et al (2007) descreveram uma variação sazonal na composição de OEs de frutos de *S. terebinthifolia* e sua atividade alelopática. No entanto, a época de colheita, o tempo, o modo de secagem do material vegetal e a

fase do ciclo de vida da planta também podem afetar a composição final e o conteúdo do óleo essencial (Bakkali et al., 2008).

Diante do exposto, o presente estudo tem como objetivo analisar comparativamente a composição química do óleo essencial de frutos imaturos e maduros de *Schinus terebinthifolia* Raddi, verificando as modificações ocorridas no processo de amadurecimento e buscando possíveis marcadores que permitam caracterizar padrões de estágio de maturação.

2. Materiais e métodos

2.1 Material vegetal

Os frutos maduros de *Schinus terebinthifolia* foram colhidos na região da Área de Proteção Ambiental de Setiba, Guarapari, Espírito Santo, Brasil, nas coordenadas 20°34'46"S e 40°25'02"W. Os frutos imaturos e as folhas foram colhidos de espécimes ocorrentes na restinga da Barra do Riacho no Município de Aracruz, Espírito Santo, Brasil, nas coordenadas 19°49'47.6"S 40°03'33.5"W limpos e separados de impurezas. Exsiccatas foram depositadas no herbário da Universidade Vila Velha, sob os números 1526 e 2164, respectivamente.

2.2 Extração dos óleos essenciais

A extração dos OEs foi realizada por hidrodestilação em aparelho de Clevenger a partir de 4 amostras de frutos maduros, 4 amostras de frutos imaturos e 3 amostras de folhas adultas de *S. terebinthifolia*. Os materiais vegetais foram previamente triturados com água deionizada e transferidos para o balão do sistema de Clevenger (Handa et al., 2008). Cada processo de extração durou cerca de uma hora, contada a partir da ebulição da amostra, sendo o aquecimento mantido na temperatura mínima necessária à ebulição. Após cada extração, as amostras obtidas dos OEs foram transferidas para um frasco de vidro, rotulado e levadas a freezer -20° para sua purificação. Após o congelamento da água remanescente, o OE que estava na fase líquida, foi drenado do frasco. A densidade de cada OE dos frutos foi determinada gravimetricamente por pesagem de 1mL de líquido a 20°C, em sala climatizada com temperatura controlada.

2.3 Perfil fitoquímico

A análise cromatográfica dos componentes dos OEs em estudo foi realizada através da cromatografia gasosa de alta resolução, acoplada à espectrometria de massas – GC/MS, no Laboratório de Química Fina da Tommasi Analítica. O volume de injeção foi de 2 µL, composto por 1,6 µL de uma solução de óleo essencial (30 mg/ml) e 0,4 µL de uma solução de uma série de hidrocarbonetos de C7-C30, como padrão interno, solubilizado em n-hexano. O sistema utilizado em GC-MS foi um cromatógrafo a gás, (ThermoScientific® Ultra GC) acoplado a um espectrômetro de massa (ThermoScientific®). A coluna de sílica fundida utilizada foi uma DB-5 (J & W Scientific) com as seguintes medidas 30 m × 0,25 mm × 0,25 mm. O gás Hélio foi utilizado como gás de arraste e a temperatura da coluna foi aumentada em 3°C por minuto entre 60°-

240°C. Os espectros de massa foram obtidos a 70 eV a uma taxa de varredura de 0,84 scan/seg, na faixa de m/z 40-500. Os tempos de retenção dos componentes da amostra e uma mistura de *n*-alcanos de C7-C30, co-injetados no sistema GC/MS no mesmo programa de temperatura, foram utilizados para o cálculo do Índice de Retenção de Kovats – KI (Adams, 2009) e do Índice de Retenção Aritmético de van der Dool e Kratz (1963).

Os arquivos gerados com os espectros de massa obtidos nas varreduras foram utilizados na identificação dos componentes dos OEs, pela utilização do programa Xcalibur, versão 2.0.7. A identificação foi baseada na similaridade espectral, feita através da comparação dos espectros obtidos com os presentes na biblioteca espectral e os disponíveis na literatura, e na comparação dos índices de retenção calculados, comparados com a literatura (Adams, 2009).

2.4 Análises estatísticas

O perfil fitoquímico qualitativo e quantitativo dos OEs foi determinando com base na composição do produto de extração de frutos maduros e frutos imaturos. A diversidade química para cada unidade morfológica trabalhada foi estimada pelo índice de Diversidade de Shannon-Weaver – H' . A equitabilidade foi determinada pelo índice de Pielou (BROWER et al., 1997). Os índices obtidos foram testados em relação a eventuais diferenças pela análise de variância – (ANOVA), com um critério de classificação, utilizando as fontes de OE como blocos de tratamento no modelo linear. As diferenças entre as médias foram discriminadas a posteriori pelo Teste de Scheffè. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade de igualdade entre os índices médios foi $p \leq 0,05$ (ZAR, 2010).

Na avaliação das afinidades, foi utilizada uma matriz com os sinais detectados em eletronsvolts (eV) para os componentes dos OEs, corrigida em escala pela transformação ranging que acomodou todos os dados numa amplitude entre zero e um, excluídos os componentes de ocorrência restrita em uma única amostra e os que estivessem presentes em todas elas. Para a avaliação qualitativa, os sinais detectados em eV foram convertidos numa matriz binária que expressasse a presença ou ausência do componente no OE, excluídos também os compostos de ocorrência restrita a uma amostra e os que estivessem presentes em todas. Na matriz quantitativa, a dissimilaridade foi estimada pelo coeficiente de distância de Manhattan Total. O óleo essencial de folhas de 3 pontos diferentes da área de coleta foi incluído

nas análises como falseadores da hipótese de agrupamento de óleos essenciais de frutos. O dendrograma foi construído pelo método de ligação de média de grupo. O coeficiente de Manhattan total, o dendrograma e seu respectivo coeficiente de correlação cofenética foram calculados utilizando o programa Fitopac versão 2.0 (SHEPHERD, 1995).

No estudo do gradiente químico foi aplicado o algoritmo da análise de espécies indicadoras (TWINSPAN) (Hill, 1979) utilizando os componentes químicos dos OEs de cada unidade morfológica trabalhada, como classificadores que foram categorizados como compostos indicadores, preferenciais e não preferenciais para os blocos formados pela maximização das discrepâncias encontradas nas mesmas matrizes qualitativa e quantitativa empregadas (Ter BRAAK, 1987).

3. Resultados e discussão

A partir do processo de hidrodestilação foram obtidos óleos de alta fluidez, incolor para os frutos imaturos e folhas, e amarelo para os frutos maduros. O melhor rendimento foi verificado para o OE dos frutos maduros ($2,73 \pm 0,25\%$) que foi o dobro do OEs dos frutos imaturos ($1,30 \pm 0,26\%$) (Tabela 1). Este resultado diverge dos obtidos por Barbosa et al (2007) que encontrou o mesmo rendimento para ambos os frutos. Não houve diferença significativa entre as densidades e equitabilidade médias dos óleos essenciais analisados (Tabela 1). Apesar disto, a diversidade química no OE dos frutos maduros foi superior à de frutos imaturos (Tabela 1).

Tabela 1. Rendimento, densidade absoluta, diversidade química equitabilidade do óleo essencial de frutos imaturos e maduros de *Schinus terebinthifolia* Raddi.

Parâmetro	Média (p/p) $\pm$ Intervalo de Confiança a 95%		Teste <i>t</i> <i>t</i> , gl, <i>p</i>
	Imaturos	Maduros	
Rendimento (%)	$1,301 \pm 0,261$	$2,729 \pm 0,253$	8,698; gl: 20; $p = 0,000^{**}$
Densidade (g.mL ⁻¹)	$0,868 \pm 0,013$	$0,865 \pm 0,002$	-0,464; gl: 20; $p = 0,647^{ns}$
Diversidade química (<i>H</i>)	$1,681 \pm 0,212$	$2,057 \pm 0,147$	4,631; gl: 6; $p = 0,004^*$
Equitabilidade (<i>J</i>)	$0,516 \pm 0,088$	$0,487 \pm 0,030$	-0,994; gl: 6; $p = 0,359^{ns}$

gl= graus de liberdade; ** diferença significativa para $p \leq 0,01$; * diferença significativa para $p \leq 0,05$; ^{ns} diferença não significativa pelo Test *t* a 5% de probabilidade.

A ausência de diferença significativa entre as equitabilidades químicas dos óleos essenciais de frutos imaturos e maduros é consistente com o fato de que, em ambos, 10 substâncias conseguem compreender mais de 90% da composição centesimal dos óleos extraídos. Na amostra dos frutos maduros destacam-se os principais constituintes: δ -3-carene 46,67%, α -pinene 14,98, sylvestrene 9,24% seguido de iso-sylvestrene 7,15%. Na amostra do OE dos frutos imaturos predominam limonene 37,49%, δ -3-carene 19,79%, sylvestrene 13,83% e germacrene D 4,68%. E no OE das folhas encontram-se o δ -3-carene 68,78%, E-caryophyllene 8,22%, myrcene 6,78%, α -pinene 4,05%, terpinolene 2,99% e limonene 2,80% (Tabela 2).

A maior diversidade química foi encontrada no fruto maduro, com detecção de 65 e 74 substâncias no óleo essencial. No óleo essencial dos frutos imaturos foram detectadas de 31 a 43 substâncias, praticamente a metade do número encontrado no fruto maduro. Na tabela 3 estão apresentados os teores de todas as substâncias identificadas nos óleos essenciais dos frutos imaturos e maduros de *Schinus terebinthifolia* Raddi.

Tabela 2. Composição centesimal dos compostos majoritários de frutos imaturos, maduros e folhas de *Schinus terebinthifolia* Raddi.

Substância	Imaturo (%)	Substância	Maduro (%)	Substância	Folhas (%)
Limonene	37,49	δ -3-carene	46,67	δ -3-Carene	68,78
δ -3-carene	19,79	α -pinene	14,98	E- Caryophyllene	8,22
Sylvestrene	13,83	Sylvestrene	9,24	Myrcene	6,78
Germacrene D	4,68	Iso-sylvestrene	7,15	α -pinene	4,05
α -thujene	4,55	α -phellandrene	4,38	Terpinolene	2,99
E-caryophyllene	4,13	Germacrene D	2,14	Limonene	2,80
Myrcene	3,77	Myrcene	1,76	α -Humulene	0,69
Elemol	3,35	Silphiperfol-6-ene	1,52	β -selinene	0,45
β -eudesmol	1,37	Eugenol	1,39	γ -cadinene	0,39
δ -elemene	1,22	terpinolene	1,33	cis- β -guaiene	0,39
β -pinene	0,81	Methyl perillate	0,77	α -guaiene	0,26
Hedycaryol	0,71	β -ylangene	0,76	γ -terpinene	0,25
Cis-1,4-diene cadina	0,52	β -bisabolol	0,72	Dauca-5,8-diene	0,24
α -humulene	0,45	Cis-muurolo-3,5-diene	0,62	Dehydro Sabina ketone	0,20
Terpinolene	0,41	Hedycaryol	0,60	α copaene	0,19
δ -cadinene	0,37	δ -elemene	0,38	β -E-Ocimene	0,15
Total	97,48	Total	94,40	Total	96,91

Tabela 3: Índices de retenção, substâncias e composição centesimal (%) de consenso para as quatro amostras de óleo essencial de frutos maduros e imaturos de *Schinus terebinthifolia* Raddi, analisadas por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Índices de Retenção				Substância	Imaturo (%)	Maduro (%)
van der Dool e Kratz		Kovats				
Calculado	Adams	Calculado	Adams			
924	921	928	926	tricyclene	0,004	0
931	924	936	930	α -thujene	4,554	0
932	932	937	939	α -pinene	0	14,977
945	945	951	952	α -fenchene	0,210	0
945	945	951	952	α -fenchene	0,210	0
984	974	987	979	β -pinene	0,813	0
988	988	990	990	myrcene	3,772	1,756
1004	1002	1005	1002	α -phellandrene	0	4,384
1006	1007	1008	1008	iso-sylvestrene	0	7,152
1011	1008	1013	1011	δ-3-carene	19,793	46,666
1021	1020	1024	1024	<i>p</i> -cymene	0,094	0
1027	1024	1031	1029	limonene	37,494	0
1028	1025	1032	1030	sylvestrene	13,834	9,238
1087	1086	1089	1088	terpinolene	0,409	1,325
1110	1112	1112	1114	trans-thujone	0,005	0
1156	1155	1160	1160	isoborneol	0	0,287
1163	1162	1166	1166	δ -terpineol	0	0,111
1173	1174	1176	1177	terpinen-4-ol	0	0,034
1176	1176	1179	1179	<i>m</i> -cymen-8-ol	0	0,083
1180	1179	1183	1182	<i>p</i> -cymen-8-ol	0	0,221
1198	1196	1198	1197	safranal	0	0,105
1219	1219	1221	1221	cis-sabinene hydrate acetate	0	0,075
1225	1226	1227	1228	neoiso-dihydro carveol	0	0,053
1246	1244	1250	1248	car-3-en-2-one	0	0,114
1249	1250	1252	1254	cis-piperitone epoxide	0,060	0
1254	1254	1257	1257	linalool acetate	0,007	0
1283	1283	1285	1285	isobornyl acetate	0,140	0,243
1285	1284	1287	1285	bornyl acetate	0	0,117
1289	1288	1290	1290	lavandulyl acetate	0,086	0
1296	1297	1297	1298	carvacol ethyl ether	0	0,016
1301	1300	1302	1300	terpinyl acetate	0	0,006
1304	1303	1304	1304	E-cinnamyl alcohol	0	0,127
1311	1312	1312	1313	cis-pinocarvyl acetate	0	0,215
1319	1318	1321	1320	methyl thujate	0	0,044
1330	1332	1332	1334	cis-piperitol acetate	0	0,216
1336	1335	1339	1338	δ-elemene	1,220	0,376
1345	1345	1347	1347	silphinene	0	0,048
1347	1346	1350	1349	α -terpinyl acetate	0,034	0
1349	1350	1351	1352	citronellyl acetate	0	0,228
1352	1350	1355	1352	α -longipinene	0,040	0

Tabela 3 - cont: Índices de retenção, substâncias e composição centesimal (%) de consenso para as quatro amostras de óleo essencial de frutos maduros e imaturos de *Schinus terebinthifolia* Raddi, analisadas por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Índices de Retenção				Substância	Imaturo (%)	Maduro (%)
van der Dool e Kratz		Kovats				
Calculado	Adams	Calculado	Adams			
1355	1356	1357	1359	eugenol	0	1,392
1361	1361	1364	1364	cis-β-damascenone	0	0,254
1364	1366	1366	1368	piperitenone oxide	0,014	0
1374	1374	1375	1376	α-copaene	0,079	0
1377	1377	1378	1379	silphiperfol-6-ene	0	1,521
1379	1379	1381	1381	geranyl acetate	0	0,090
1383	1385	1384	1386	trans-myrtanol acetate	0,009	0
1385	1386	1386	1387	4α,7α,7aβ-nepetalactone	0	0,059
1390	1391	1391	1392	4a-α-7β-7a-α-nepetalactone	0,146	0
1392	1392	1393	1393	methyl perillate	0	0,766
1398	1400	1398	1400	β-longipinene	0,005	0
1407	1407	1407	1407	longifolene	0	0,100
1417	1417	1418	1419	E-caryophyllene	4,133	0
1418	1419	1420	1420	β-ylangene	0	0,756
1426	1428	1427	1429	dictamnol	0	0,041
1430	1429	1432	1431	cis-thujopsene	0	0,114
1426	1430	1428	1432	β-copaene	0,052	0
1434	1434	1436	1436	γ-elemene	0,243	0,280
1439	1439	1441	1441	aromadendrene	0	0,051
1447	1448	1449	1450	cis-muurola-3,5-diene	0	0,615
1452	1452	1454	1454	α-humulene	0,445	0,177
1454	1454	1456	1456	E-β-farnesene	0	0,046
1457	1458	1459	1460	allo-aromadendrene	0	0,043
1460	1461	1462	1463	cis-cadina-1(6),4-diene	0,025	0
1480	1480	1481	1481	germacrene D	4,682	2,138
1492	1492	1493	1492	δ-selinene	0	0,066
1493	1495	1493	1495	γ-amorphene	0	0,215
1494	1495	1495	1495	cis-cadina-1,4-diene	0,519	0
1505	1505	1505	1505	E,E-α-farnesene	0	0,023
1511	1511	1512	1512	δ-amorphene	0,024	0
1520	1521	1521	1522	β-sesquiphellandrene	0	0,084
1525	1522	1526	1523	δ-cadinene	0,365	0,227
1546	1546	1548	1548	hedycaryol	0,707	0,602
1545	1548	1549	1549	elemol	3,351	0
1549	1548	1550	1550	α-agarofuran	0	0,055
1552	1550	1554	1551	silphiperfol-5-en-3-one B	0	0,090

Tabela 3 cont: Índices de retenção, substâncias e composição centesimal (%) de consenso para as quatro amostras de óleo essencial de frutos maduros e imaturos de *Schinus terebinthifolia* Raddi, analisadas por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Índices de Retenção						Imaturo (%)	Maduro (%)
van der Dool e Kratz		Kovats		Substância			
Calculado	Adams	Calculado	Adams				
1551	1553	1555	1555	norpatchoulenol	0,072	0	
1555	1555	1556	1557	cis- α -isomethyl-ionol acetate	0	0,105	
1564	1567	1565	1568	E- <i>p</i> -methoxy-cinnamaldehyde	0	0,066	
1571	1570	1572	1571	dendrolasin	0	0,028	
1579	1577	1580	1579	trans-sesquisabinene hydrate	0,015	0,113	
1589	1590	1589	1591	E-dihydro-apofarnesol	0	0,058	
1593	1592	1593	1592	viridiflorol	0	0,024	
1594	1594	1598	1594	carotol	0,020	0	
1605	1604	1605	1604	khusimone	0	0,046	
1612	1612	1613	1613	cis-isolongifolanone	0	0,011	
1615	1614	1616	1615	E-isoeugenol acetate	0	0,026	
1615	1618	1615	1619	isolongifolan-7-alfa-ol	0,063	0	
1623	1625	1624	1626	trans-isolongifolanone	0	0,127	
1625	1627	1626	1628	1-epi-cubenol	0	0,161	
1628	1630	1629	1632	γ -eudesmol	0,970	0	
1634	1636	1636	1637	β -acorenol	0	0,108	
1644	1643	1646	1645	2-epi- β -cedren-3-one	0	0,062	
1649	1649	1650	1650	β -eudesmol	1,374	0	
1650	1650	1651	1651	cedr-8(15)-en-9-a-ol	0	0,143	
1663	1661	1665	1662	dihydro-eudesmol	0,075	0	
1674	1674	1675	1675	β-bisabolol	0,044	0,719	
1713	1713	1713	1714	longifolol	0	0,065	
1775	1775	1776	1776	2- α -hydroxy-amorpha-4,7(11)-diene	0	0,020	
1781	1777	1781	1778	Z- α -santalol	0	0,023	
1783	1783	1784	1784	hinesol acetate	0	0,021	
1793	1792	1793	1793	8- α -acetoxylemol	0	0,017	
1815	1813	1816	1813	cryptomeridiol	0	0,019	
1850	1848	1851	1849	1,10- β -epoxy-6-oxofuranoeremophilane	0	0,019	

Tabela 4: Índices de retenção, substâncias e composição centesimal (%) de consenso para as três amostras de óleo essencial de folhas de *Schinus terebinthifolia* Raddi, analisadas por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Índices de retenção				Substância	Folhas (%)
van der Dool e Kratz		Kovats			
Calculado	Adams	Calculado	Adams		
932	932	937	939	α pinene	4,054
987	988	990	990	Myrcene	6,780
1009	1008	1011	1011	δ-3-Carene	68,780
1028	1024	1032	1029	Limonene	2,886
1044	1044	1049	1050	β -E-Ocimene	0,151
1050	1054	1055	1059	γ terpinene	0,251
1084	1086	1086	1088	Terpinolene	2,987
1098	1095	1099	1096	linalool	0,053
1115	1117	1117	1120	Dehydro Sabina ketone	0,196
1130	1132	1133	1136	cis limonene oxide	0,040
1160	1166	1164	1170	ρ mentha-1,5-dien-8-ol	0,056
1251	1249	1254	1252	Piperitone	0,088
1367	1369	1369	1371	cyclosativene	0,037
1372	1374	1374	1376	α copaene	0,193
1387	1387	1388	1388	β cubebene	0,053
1416	1417	1417	1419	Caryophyllene (E)	8,220
1434	1437	1436	1439	α guaiene	0,256
1445	1449	1447	1451	Amorpha-4,11-diene	0,067
1451	1452	1453	1454	α Humulene	0,686
1471	1471	1472	1472	Dauca-5,8-diene	0,241
1476	1475	1478	1477	γ Gurjunene	0,118
1484	1489	1485	1490	β selinene	0,454
1491	1492	1492	1493	cis- β -guaiene	0,387
1494	1495	1495	1495	γ amorphene	0,028
1498	1498	1498	1498	α selinene	0,017
1514	1513	1515	1513	γ cadinene	0,390
1519	1520	1520	1522	7-epi- α -selinene	0,033
1528	1528	1529	1529	Zonarene	0,020
1532	1532	1533	1533	γ cuprenene	0,033
1570	1571	1571	1572	Caryolan-8-ol	0,063
1576	1582	1577	1583	Caryophyllene oxide	0,084
1614	1615	1615	1616	β himachalene oxide	0,049

Na figura 1 estão os cromatogramas dos OEs dos frutos maduros e imaturos *S. terebinthifolia*, onde as substâncias majoritárias são comparadas (Figura 1).

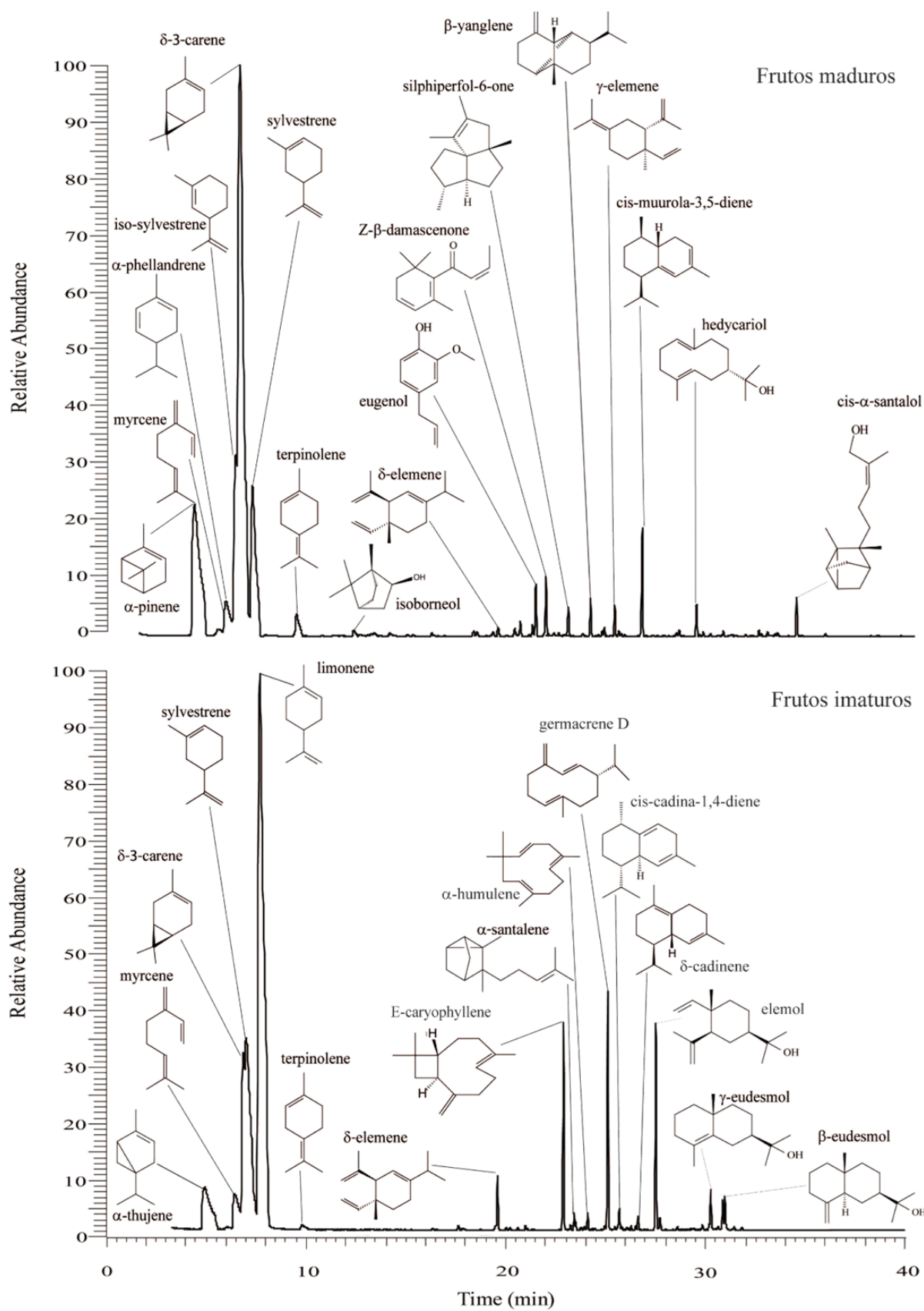


Figura 1: Cromatogramas comparados dos componentes do óleo essencial dos frutos imaturos e maduros de *Schinus terebinthifolia* Raddi.

Entre os componentes químicos majoritários do OE dos frutos maduros, as amostras revelaram elevado teor de monoterpenos. Nos OEs dos frutos imaturos e das folhas foram observados, qualitativamente, maior prevalência de sesquiterpenos (Tabela 2), comparado com o OE dos frutos maduros. Quantitativamente, os três OEs analisados tiveram como constituinte majoritário um representante monoterpênico, sendo o δ -3-carene para os frutos maduros e folhas, e o limonene para os frutos imaturos. Ennigrou et al (2016) observaram nos óleos dos frutos dessa espécie a predominância de monoterpenos principalmente α -phellandrene, α -pinene e limonene em frutos colhidos de espécimes ocorrentes no nordeste da Tunísia. Alpha-phellandrene, β -phellandrene e α -pinene foram os monoterpenos identificados em amostra de OE dos frutos maduros de *S. terebinthifolia* colhidos no sudeste da Tunísia (Bendaoud et al., 2010). E o OE das folhas analisado por Uliana et al (2016) confirma esse achado predominante em sesquiterpenos. A composição química dos óleos essenciais é variável e dependem de diversos fatores como a parte da planta analisada, a origem, a estação e o processamento (Paolini et al., 2010).

Dentre todas as substâncias identificadas nos óleos essenciais dos frutos, 13 delas foram comuns aos dois estágios de maturação estudados, sendo eles: myrcene, δ -3-carene, sylvestrene, terpinolene, isobornyl acetate, δ -elemene, γ -elemene, α -humulene, germacrene D, δ -cadinene, hedycaryol, trans-sesquisabinene hydrate e β -bisabol (Tabela 3). Destes, o δ -3-carene foi o componente majoritário das amostras de frutos maduros. As substâncias exclusivas dos frutos imaturos foram 30, entre as quais está o composto majoritário o limonene. No óleo dos frutos maduros 61 substâncias foram detectadas exclusivamente, mas entre os três compostos majoritários, apenas o α -pinene (Tabela 2) não foi detectado nas amostras de frutos imaturos (Tabela 3). Incluindo o OE das folhas na comparação, foram observadas 3 substâncias em comum nos 3 óleos: α -humulene, δ -3-carene, myrcene (Tabela 4 – negrito).

Independentemente de considerar o perfil fitoquímico qualitativo, que originou um dendrograma de agrupamento de amostras de óleos essenciais de frutos e folhas pela Distância Média de Manhattan (Figura 2a), ou o quantitativo, que originou um dendrograma correspondente pela Distância de Canberra incluindo as ausências comuns de componente (Figura 2b), fica evidente um padrão de agrupamento que separa os perfis de OEs de frutos maduros e imaturos, aproximando contudo os perfis de frutos imaturos e de folhas (Figura 2).

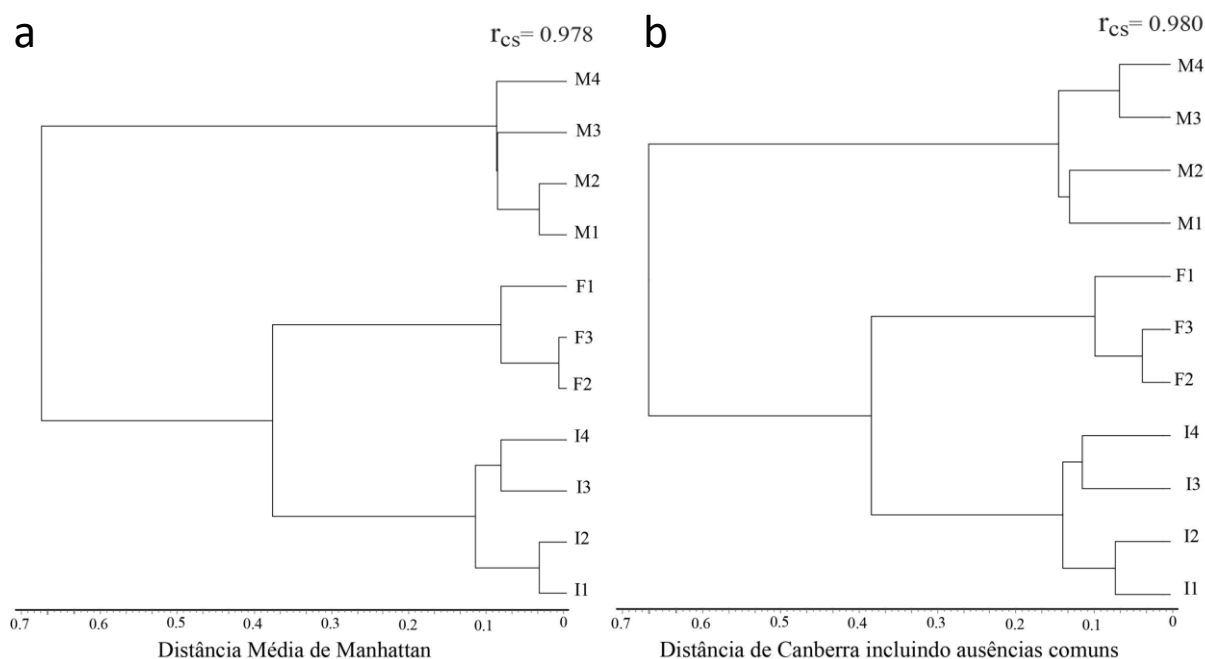


Figura 2. Dendrogramas de agrupamento das amostras de óleos essenciais de folhas e de frutos maduros e imaturos de *Schinus terebinthifolia* Raddi, construído pelo método de ligação me média de grupo (UPGMA). **a:** coeficiente de Distância média de Manhattan e **b:** coeficiente de Distância Canberra, incluindo as ausências comuns de componentes dos óleos essenciais. **M₁₋₄:** Amostras de fruto maduro; **F₁₋₃:** Amostras de folhas; **I₁₋₄:** Amostras de frutos imaturos.

Um olhar conservativo sobre este fato, caso não houvesse alguma pressão seletiva, poderia levar a esperar que não houvesse um perfil tão diferenciado. Esta visão se sustentaria quando se tem em conta que, na família Anacardiaceae, os OEs compõem uma oleorresina que é produzida por estruturas secretoras que ocorrem tanto no eixo vegetativo como nas estruturas reprodutivas de flores e da unidade de dispersão formada por frutos e sementes (Carmello-Guerreiro e Paoli, 2002). Esta ideia encontra outra sustentação no fato de que, em *S. terebinthifolia*, a dispersão dos frutos é ornitocórica (D'Avila et al., 2010, Jesus e Monteiro-Filho, 2014), considerando que as aves não são olfativamente orientadas e, portanto, praticamente insensíveis à estimulação olfativa (D'Avila et al., 2010).

A irradiação adaptativa das angiospermas foi profundamente afetada pela dispersão de sementes e, conseqüentemente, pela capacidade de estabelecimento de plântulas. A diversificação dos tipos de frutos foi acompanhada de uma ampla diversificação nos mecanismos de dispersão. Entretanto, a despeito da importância desses mecanismos, pouco se sabe sobre que forças evolutivas afetaram este processo, e nem se ele está efetivamente sujeito a restrições filogenéticas entre as angiospermas (Lorts et al., 2008). E a família Anacardiaceae não é uma exceção em meio a este contexto, tanto assim que a família não diversificou muito os tipos de frutos e nem os mecanismos de dispersão (Weeks et al., 2014).

Se o perfil fitoquímico do OE dos frutos imaturos se aproximou do perfil do OE das folhas, as amostras provenientes desses dois órgãos não se mesclaram na análise de agrupamento, sendo distinto os grupos de amostras de folhas e frutos imaturos (Figura 2). Também formaram padrões distintos o perfil fitoquímico das amostras de frutos imaturos e maduros (Figura 2).

Do ponto de vista ecológico, o envolvimento dos OEs na dispersão de frutos não fica totalmente descartado. Embora em Anacardiaceae não tenha ocorrido muita diversificação nos tipos de fruto (Weeks et al., 2014), e o gênero *Schinus* é uma exceção dentro da família, a espécie *Schinus molle* Johnst. apresentou dispersão de semente por uma formiga cortadeira, *Acromyrmex striatus* Roger (Formicidae: Attini) na região do Chaco, na Argentina (Varela e Pereira, 2003).

Detalhando mais a distinção entre os perfis fitoquímicos dos OEs de frutos maduros e imaturos, foi constatado que a análise de substâncias majoritárias (Figura 3) revelou que não necessariamente os compostos majoritários vão determinar, como componentes indicadores a identificação típica das fases de maturação dos frutos. Ao mesmo tempo, uma única divisão demonstrou-se capaz de separar os dois estágios de maturação amostrados, sendo o γ -eudesmol, o δ -cadinene e o *p*-cymene os compostos indicadores do estágio imaturo do fruto, enquanto a *Z*- α -santalol acetate, a *trans*-isolongifolanone, o hinesol acetate e a 2- α -hidroxy-amorpha-4,7(11)-diene foram os componentes indicadores do estágio maduro.

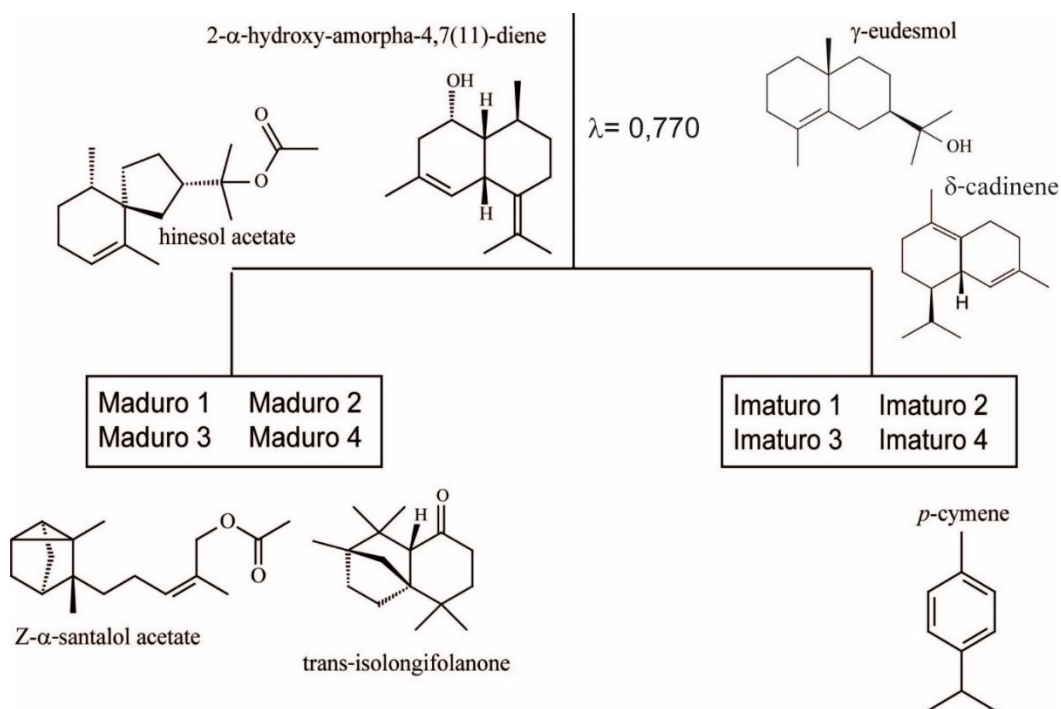


Figura 3. Diagrama de ordenação por análise de substâncias indicadoras (TWINSpan) entre os óleos essenciais de frutos maduros e frutos imaturos *Schinus terebinthifolia* Raddi.

Esses padrões fitoquímicos consistentemente segregados dos frutos maduros e imaturos chamam a atenção para a necessidade de introduzir práticas sustentáveis no extrativismo natural da aroeira. A remoção indiscriminada de ramos vegetais leva a perda de meristemas laterais florais (Mú-Urbe e Quesada, 2006). Este fato tem um impacto dramático sobre a vigilância das populações de plantas naturais, uma vez que resulta na perda de frutos e sementes, que são necessários para o recrutamento juvenil (Alvaréz-Casino et al 2010). Além de produzir uma matéria prima de baixa qualidade.

Variações de rendimento, bem como a produção de biomassa, são atribuídas a diversos fatores internos e externos como localização, clima, época da colheita, tipo da variedade, estrutura genética dentre outros (Kassahun et al., 2012; Ramakrishna e Ravishankar, 2011; Salamon, 2007). Em outras situações, essas variações podem ser devido a razões ambientais que podem envolver a origem geográfica, como consequência de estresse produzido por fatores abióticos como vento, umidade do ar e salinidade (Bettaieb et al., 2009; Gouvea et al., 2012; Taarit et al., 2011). A forma de cultivo pode também ocasionar variações na composição do OE (Paul et al., 2010), e mesmo o processo de extração não deve ser descartado (Sefidkon et al., 2007). Neste caso, o processo experimental de extração pode ser refutado como uma causa para esta variação, uma vez que os três compostos principais nas amostras de frutos maduros foram também encontrados anteriormente nas mesmas condições como descritas no presente trabalho (Silva et al., 2010; Kweka et al., 2011).

Recentemente Bourgou et al. (2012) investigando o efeito da maturação sobre a composição química do OE extraído da casca de quatro citrus: laranja amarga (*Citrus aurantium*), Limão (*Citrus limon*), laranja Maltaise (*Citrus sinensis*) e tangerina (*Citrus reticulata*) constataram variações químicas na composição e na produtividade dos óleos de 0,46 a 2,70% nos estádios final de maturação.

Trabalho conduzido por Msaada et al. (2009) também mostraram variações na composição e no rendimento do OE do coentro, sendo que o maior rendimento ocorreu no estágio final do amadurecimento com maior predominância na composição química dos monoterpenos, enquanto que Telci et al. (2006) encontraram resultados diferentes em seus trabalhos com erva doce, pois a medida que os frutos aumentavam de tamanho, mantinham seu conteúdo em óleo essencial.

Muitos estudos fitoquímicos foram conduzidos investigando a composição química e o rendimento de extração dos OEs de *Schinus terebinthifolia* Raddi e mostrou grande variação na diversidade e composição química. Nascimento et al

(2012) trabalhando com amostras de OE dos frutos, identificaram o limonene como constituinte majoritário no óleo essencial dos frutos imaturos (31,8%) e maduros (44,1%). Por outro lado, Barbosa et al (2007) elucidaram α -cadinol (20,6%) como marcador predominante no OE de frutos imaturos e δ -3-carene (29,2%) nos frutos maduros. E δ -3-carene 41,01%, α -phellandrene 14,40%, limonene 12,36%, α -pinene 10,36% foram encontrados por Gois et al (2016) no OE de frutos maduros. Comparando nosso estudo com a literatura, muitas das principais substâncias nos OEs desta planta são semelhantes (Barbosa et al., 2007; Silva et al., 2010; Kweka et al., 2011), no entanto, sofrem por vezes variações significativas nos seus conteúdos.

As densidades determinadas para os óleos essenciais estudados foram diferentes entre si, primeiro pela diferença no tempo de maturação mas também como o próprio conhecimento tradicional indica, eventos ambientais abióticos, como a precipitação pluviométrica, podem afetar características físico-químicas como a viscosidade dos óleos essenciais, e outras plantas secretoras de oleorresina não estão livres desta influência. Estes parâmetros podem mesmo ser característicos e específicos da procedência de cada fonte de matéria prima, sendo necessário padronizar o fracionamento de suas doses em massas, ao invés de volumes.

Os componentes majoritários encontrados podem ser utilizados como marcadores fitoquímicos para identificação dos óleos essenciais em estudo em avaliações de controle de qualidade e padronização destes para utilização com fins cosméticos e medicinais, visto suas propriedades farmacológicas. Para o óleo essencial de frutos maduros de *S. terebinthifolia* estas substâncias são os monoterpenos, δ -3-carene e o α -pinene e para o óleo essencial de frutos imaturos são o limonene e o δ -3-carene, que são possibilidades de marcadores químicos presentes na amostra do óleo essencial desta espécie.

Assim, nota-se que do ponto de vista ecológico esse processo de diferenciação entre os óleos essenciais de frutos maduros e imaturos é devido ao processo de maturação e não a dispersão da semente. Assim, práticas sustentáveis para o extrativismo de *Schinus terebinthifolia* Raddi são necessárias para que haja a conservação da espécie e a garantia de um produto final de boa qualidade.

4. Referências

- Adams, R.P. 2009. Identification of Essential oil Components by Gas chromatography/mass Spectrometry, quarta ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, USA.
- Álvares-Carvalho, S.V., Duarte, J.F., Santos, T.C., Santos, R.M., Silva-Mann, R., Carvalho, D. 2016. Structure and genetic diversity of natural Brazilian pepper populations (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Genet. Mol. Res.15 (2): gmr.15028123
- Álvarez-Cansino, L., Zunzunegui, M., Barradas, M.C.D., Esquivias, M.P. 2010. Gender-specific costs of reproduction on vegetative growth and physiological performance in the dioecious shrub *Corema album*. Ann. Bot. 106, 989-998.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils—a review. Food. Chem. Toxicol. 46, 446- 475.
- Barbosa, L.C.A., Demuner, A. J., Clemente, A. D., Paula, V. F., Ismail, F. M. D., 2007. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi. Quím. Nova. 30(8), 1959-1965.
- Bendaoud, H., Romdhane, M., Souchard, J.P., Cazaux, S., Bouajila, J., 2010. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus Molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils J. Food Sci. 75(6), 466 – 472. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01711.x
- Bettaieb, I., Zakhama, N., Aidi Wannes, W., Kchouk, M.E., Marzouk, B., 2009. Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. Sci. Hortic. 120(2), 271–275.
- Bourgou, S., Rahali, F.Z., Ourghemmi, I., Tounsi, M.S., 2012. Changes of peel essential oil composition of four Tunisian Citrus during fruit maturation. Sci World J. 2012 (528593), 1-11. doi:10.1100/2012/528593
- Brower, J.E.; Zar J.H.; Ende, C..N.V. (1997): Field and Laboratory Methods for General Ecology. 4 ed. Boston, WCB McGraw-Hill

Carmello-Guerreiro, S.M., Paoli, A.A.S., 2002. Ontogeny and Structure of the Pericarp of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). Braz. Arch. Biol. Technol. 45, 1516-8913.

Cole, E.R., Santos, R.B., Júnior, V.L., Martins, J.D.L., Greco, S.J., Neto, A.C., 2014. Chemical composition of essential oil from ripe fruit of *Schinus terebinthifolius* Raddi and evaluation of its activity against wild strains of hospital origin. Braz. J. Microbiol. 45, 821 – 828.

D'Avila, G., Gomes-Jr, A., Canary, A.C., Bugoni, L., 2010. The role of avian frugivores on germination and potential seed dispersal of the Brazilian Pepper *Schinus terebinthifolius*. Biota Neotrop., 10, 45-51.

Das, A., Lee, S., Hyun, T.K., Kim, S., Kim, J., 2013. Plant volatiles as method of communication. Plant Biotechnol Rep, v. 7, p. 9–26.

Ennigrou, A., Casabianca, H., Laarif, A., Hanchi, B., Hosni, K., 2016. Maturation-related changes in phytochemicals and biological activities of the Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) fruits. South African Journal of Botany, v. 108, p. 407–415. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2016.09.005>

Estevão, L.R.M., Mendonça, F.S., Evêncio, L.B., Simões, R. S., Barros, M.E.G., Arantes, R.M.E., Rachid, M.A., Evêncio-Neto, J., 2013. Effects of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) oil on cutaneous wound healing in rats. Acta Cir. Bras. 28, 202 - 209.

FAO. 2015. Discussion paper on the grouping of spices and culinary herbs. Codex Committee on Spices and Culinary Herbs. FAO/WHO Food Standard Programme. Goa, Food and Agriculture Organization of the United Nations: World Health Organization.

Fedel-Miyasato, L.E.S., Kassuya, C.A.L., Auharek, S.A., Formagio, A.S.N., Cardoso, C.A.L., Mauro, M.O., Cunha-Laura, A.L., Monreal, A.C.D., Vieira, M.C., Oliveira, R.J., 2014. Evaluation of anti-inflammatory, immunomodulatory, chemopreventive and wound healing potentials from *Schinus terebinthifolius* methanolic extract. Rev. Bras. Farmacogn. 24(5), 565–575. doi:10.1016/j.bjp.2014.08.004

Fiehn, O. 2002. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*. 48:155–171.

Gois, F.D., Cairo, P.L.G., Cantarelli, V.S., L.C.B., Costa, Fontana, R., Allaman, I.B., Sbardella, M., Carvalho Jr, F.M., Costa, L.B., 2016. Effect of Brazilian red pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) essential oil on performance, diarrhea and gut health of weanling pigs. *Livestock Science*. 183, 24–27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2015.11.009>.

Gomes, F.S., Procópio, T.F., Napoleão, T.H., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G., 2012. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. *J. Appl. Microbiol.* 114, 672 - 679.

Gouvea, D.R., Goboo-Neto, L., Lopes, N.P., 2012. The influence of biotic and abiotic factors on the production of secondary metabolites in medicinal plants, in Cechinel-Filho, Plant Bioactives and Drug Discovery: Principles, Practice and perspectives. Ed. John Wiley Inc. & Sons, New Jersey, pp. 419-452.

Handa, S.S. 2008. An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants. In: Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. Edited by: Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD. Italy: International Centre for Science and High Technology, 21-54.

Heinzmann, B.M., Spitzer, V., Simões, C. M. O. Óleos voláteis. In: Simões, C.M.O et al. *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 167-184.

Hill, M.O. (1979): Twinspan. A Fortran program for arranging multivariate data in an ordered two-way table by classification of the individuals and attributes. Ithaca: Cornell University.

Jesus, S., Monteiro-Filho, E.L.A., 2014. Frugivoria por aves em *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) e *Myrsine coriacea* (Myrsinaceae). *Ver. Brasil. Ornitol.*, 15, 585-591.

Johann, S., Sá, N.P., Lima, L.A.R.S., Cisalpino, P.S., Cota, B.B., Alves, T.M.A., Siqueira, E.P., Zani, C.L., 2010. Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 9, 1–6.

Kassahun, B.M., Zigene, Z.D., Teferi, Z., Mekonnen, S.A., Yalentesfa, B., Gebretenssay, F., Gebremeskel, H., Melka, B., 2012. Yield and yield components of rose scented Geranium (*Pelargonium graveolens*) as influenced by plant population density in Ethiopia. *Int. J. Med. Arom. Plants*. 2(1), 60 – 68.

Kweka, E.J., Nyindo, M., Mosha, F., Silva, A.G. Insecticidal activity of the essential oil from fruits and seeds of *Schinus terebinthifolia* Raddi against African malaria vectors. *Parasit. Vectors*. 4, 129-138.

Lorts, C.M., Briggeman, T., Sang, T., 2008. Evolution of fruit types and seed dispersal: a phylogenetic and ecological snapshot. *J. Sys.d Evol.*, 46, 396-404. doi: 10.3724/SP.J.1002.2008.08039

Luckner, M. Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants, and Animals. Second Revised and enlarged edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH. Pag 16. 2013.

Ludwig, J.A., Reynolds, J.F., 1988. Statistical ecology: a primer of methods and computing. Wiley Press, New York.

Matsuo, A.L., Figueiredo, C.R., Arruda, D.C., Pereira, F.V., Scutti, J.A.B., Massaoka, M.H., Travassos, L.R., Sartorelli, P., Lago, J.H.G., 2011. α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411, 449–454.

McCormick, A.C., Unsicker, S.B., Gershenzon, J., 2012. The specificity of herbivore-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. *Trends in Plant Science*, v. 17, n. 5, p. 303-310.

Msaada, K., Hosni, K., Taarit, M. B., Ouchikh, O., Marzouk, B., 2009. Variations in essential oil composition during maturation of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruits. *Journal Food Biochem*. 33, 603-612. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2009.00240.x

Mú-Urbe, C.A., Quesada, M. 2006. Preferences, patterns and consequences of branch removal on the dioecious tropical tree *Spondias purpurea* (Anacardiaceae) by the insect borer *Oncideres albomarginata chamela* (Cerambycidae). *Oikos* 112, 691-697.

- Nascimento, A. F., Camara, C. A., Moraes, M. M., Ramos, C. S., 2012. Essential oil composition and acaricidal activity of *Schinus terebinthifolius* from Atlantic Forest of Pernambuco, Brazil against *Tetranychus urticae*. Nat. Prod. Commun. 7(1),129-132.
- Paolini, J., Barboni, T., Desjobert, J., Djabou, N., Muselli, A., Costa, J., 2010. Chemical composition, intraspecies variation and seasonal variation in essential oils of *Calendula arvensis* L. Biochem. Syst. Ecol. 38, 865–874.
- Paul, A., Thapaa, G., Basub, A., Mazumdarb, P., Kalita, M.C., Sahoo, L., 2010. Rapid plant regeneration, analysis of genetic fidelity and essential aromatic oil content of micropropagated plants of Patchouli, *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. – An industrially important aromatic plant. Ind. Crops Prod. 32, 366-374.
- Pinto, A.C., Silva, D.H.S., Bolzani, V. da S., Lopes, N.P., Epifanio, R. de A., 2002. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. Quim. Nova. 25(1):45-61.
- Pratti, D.L.A., Ramos, A.C., Scherer, R., Cruz, Z.M.A., Silva, A.G., 2015. Mechanistic basis for morphological damage induced by essential oil from Brazilian pepper tree, *Schinus terebinthifolia*, on larvae of *Stegomyia aegypti*, the dengue vector. Parasit. Vectors. 8, 136-145. doi 10.1186/s13071-015-0746-0
- Ramakrishna, A., Ravishankar, G.A., 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants, Plant Signaling & Behavior, 6:11, 1720-1731, DOI:10.4161/psb.6.11.17613
- Salamon, I., 2007. Effect of the internal and external factors on yield and qualitative-quantitative characteristics of chamomile essential oil. Acta Hort. 749, 45-65. doi: 10.17660/ActaHortic.2007.749.3
- Sangwan N.S., Farooqi A.H.A., Shabih F., Sangwan R.S., 2001. Regulation of essential oil production in plants. Plant Growth Regulation. V. 34, p. 3–21.
- Sefidkon, F., Abbasi, K., Jamzad, Z., Ahmadi, S., 2007. The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad. Food Chem. 100, 1054-1058.
- Shepherd, G.J. (1995): Fitopac 1. Campinas: Departamento de Botânica, Unicamp.

- Silva, A.G., Almeida, D.L., Ronchi, S.N., Bento, A.C., Scherer, R., Ramos, A.C., Cruz, Z.M.A., 2010. The essential oil of Brazilian pepper, *Schinus terebinthifolia* Raddi in larval control of *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762). *Parasit. Vectors.* 3, 79 - 85.
- Taarit, M. B., Msaada, K., Hosni, K., Marzouk, B., 2011. Physiological changes and essential oil composition of clary sage (*Salvia sclarea* L.) rosette leaves as affected by salinity. *Acta Physiol. Plant.* 33, 153–162. doi 10.1007/s11738-010-0532-8
- Telci, I., Ibrahim, D., Ayse S., 2009. Variation in plant properties and essential oil composition of sweet fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) fruits during stages of maturity *Ind. Crops Prod.* 30, 126-130.
- ter Braak, C.J.F. (1987): Ordination. In: Jongman, R.H.G.; ter Braak C.J.F.; van Tongeren O.F.R. (eds.) *Data analysis in community and landscape ecology*, pp. 91-173. Wageningen, Pudoc.
- Uliana, MP, Fronza, M., Silva, A.G., Vargas, TS, Andrade, TU, Scherer, R. 2016. Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. *Industrial Crops and Products* 83, 235-240.
- van den Dool, H., Kratz, P.D., 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas–liquid partition chromatography. *J Chromatogr*, 11, 463- 471.
- Varela, R.O., Perera, T.C., 2003. Dispersal of *Schinus fasciculatus* seeds by the leaf-cutting ant *Acromyrmex striatus* in a shrubland of the dry Chaco, Argentina. *J. Trop. Ecol.*, 19, 91–94. doi: 10.1017/S0266467403003109.
- Weeks, A., Zapata, F., Pell, S.K., Daly, D.C., Mitchell, J.D., Fine, P.V.A., 2014. To move or to evolve: contrasting patterns of intercontinental connectivity and climatic niche evolution in “Terebinthaceae” (Anacardiaceae and Burseraceae). *Fron. Genet.*, 5, article 409. doi:10.3389/fgene.2014.00409
- Zar JH. *Biostatistical analysis*. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 2010.

CAPÍTULO II

ATIVIDADE LARVICIDA COMPARADA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE FRUTOS MADUROS E IMATUROS DE PIMENTA ROSA CONTRA LARVAS DO MOSQUITO DA DENGUE

Manuscrito apresentado nas normas da revista Journal of Natural Products

Drielle Lima de Almeida Pratti[†], Ary Gomes da Silva^{†,#}

[†] Universidade Vila Velha - Programa de pós-graduação em Ecologia de ecossistemas.

[#] Autor correspondente: arygomes@uvv.br. Endereço: Universidade Vila Velha. Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, Vila Velha, ES, Brasil - CEP 29.102-770.

RESUMO

O *Stegomyia aegypti* é um vetor de doenças graves ao ser humano e que apresenta grande plasticidade ecológica e fisiológica que o capacita a se adaptar a diversas condições impostas, fazendo com que sua distribuição geográfica fique cada vez mais abrangente. O combate a esse inseto é a melhor medida de controle das doenças transmitidas por ele. Muitos métodos estão sendo pesquisados a fim de diminuir os efeitos maléficos ao ambiente e humanos, principalmente utilizando produtos naturais, como os óleos essenciais. Por isso, objetivou-se comparar o efeito larvicida do óleo essencial de frutos imaturos e maduros de *Schinus terebinthifolia* Raddi frente a larvas de *Stegomyia aegypti*. Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação e foram realizados bioensaio com larvas desse inseto no terceiro estágio de vida utilizando diluições seriadas dos óleos essenciais de 1,56 a 800 ppm. Pode-se observar uma maior potencialidade do efeito larvicida do óleo essencial de frutos imaturos ($CL_{50} = 71,31$ ppm), mas o óleo essencial dos frutos maduros também se mostrou eficaz ($CL_{50} = 80,53$ ppm), fazendo com que esses óleos sejam uma alternativa de inseticida botânico com baixo ou nenhum dano ao ambiente e humanos.

Palavras-chave: Atividade biológica; Produtos naturais; *Aedes aegypti*; *Schinus terebinthifolius*, *Stegomyia aegypti*.

1. Introdução

As doenças transmitidas por vetores têm causado enorme preocupação em todo o mundo, uma vez que diversas enfermidades estão emergindo de forma avassaladora sem que haja preparo por parte dos sistemas de saúde para seu controle ou eliminação^{1,2}. O motivo principal para a disseminação descontrolada dessas doenças é o aumento do turismo e das possibilidades de trânsito entre os países, o que tem facilitado a inserção de novos vírus em locais diversos³, associado a isso, as mudanças climáticas também contribuem para a adaptação dos vetores a novos ambientes⁴.

Um vetor de grande importância para a saúde pública mundial é o *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762), ele é responsável pela transmissão de doenças graves e tem encontrado facilidade de se estabelecer em novos locais, fazendo com que as doenças alcancem outros continentes. Sua capacidade de adaptação se dá pela sua plasticidade fisiológica e ecológica, incluindo a habilidade de se reproduzir em água acumulada em pequenos reservatórios antrópicos⁵.

Além da dengue e febre amarela, o *St. aegypti* também transmite duas doenças descobertas em meados do século passado no continente africano, a Zika e a Chikungunya^{6,7}. Estas doenças se espalharam de modo rápido nos países do centro-sul americanos e Caribe gerando graves epidemias^{2,8}, semelhante ao que ocorre com a dengue que vem fazendo inúmeras vítimas em muitos países da faixa tropical e subtropical, além de se espalhar para a zona temperada do globo gerando preocupações nesses países que antes não eram acometidos por essa doença⁹. Recentemente, foi identificada uma possível infecção pelo vírus Mayaro, no Haiti e na região amazônica brasileira, uma doença que possui sintomas muito semelhantes aos da Chikungunya. O motivo de preocupação em torno desse vírus é que anteriormente ele somente era transmitido por mosquitos vetores silvestres que não alcançavam a zona urbana, porém, indícios mostram que, possivelmente, ocorreu uma mutação em seu ciclo urbano e aparentemente, agora, pode ser transmitido pelo *St. aegypti*¹⁰.

Atualmente não existem medicações específicas para o tratamento e/ou profilaxia dessas doenças¹¹, e apesar da vacina contra dengue estar começando a ser disponibilizada para algumas populações¹², as vacinas para as outras doenças estão em fase de desenvolvimento^{13,14} sendo assim, o melhor método de prevenção existente é evitar a picada do mosquito¹⁵. O combate ao vetor é feito principalmente por inseticidas químicos¹⁶, porém, o uso indiscriminado dessas substâncias tem gerado diversos efeitos adversos graves em humanos, animais e ao meio ambiente¹⁷, bem como, têm selecionado populações de insetos cada vez mais resistentes dificultando, portanto, o combate ao vetor¹⁸. Esses malefícios despertaram o interesse por

pesquisas a fim de encontrar métodos que sejam inócuos ao ambiente e humanos, e que reduzam a possibilidade dos mosquitos se tornarem resistentes. Nesse sentido, estudos com o uso de bactérias e mosquitos transgênicos fazem parte desses novos métodos em ascensão ¹⁹⁻²², bem como produtos naturais oriundos de plantas ²³⁻²⁵.

Muitos são os meios de combate ao mosquito adulto, mas considerando a transmissão transovariana do vírus da dengue e chikungunya em *St. aegypti*^{26,27} é importante que a interrupção da dinâmica populacional desta espécie ocorra em níveis mais baixos de seu desenvolvimento. Nessa lógica, estudos utilizando óleos essenciais têm crescido devido ao potencial tóxico às larvas desse mosquito ^{25, 28, 29}.

Os óleos essenciais (OEs) são subprodutos do metabolismo secundário de plantas, definidos como óleos voláteis que têm componentes aromáticos de odor forte característico. Existem cerca de 17.000 espécies de plantas produtoras de óleos essenciais³⁰, que utilizam estruturas secretoras complexas, como os tricomas glandulares, cavidades secretoras e ductos, para sintetizar e armazenar os OEs, que também estão presentes nas folhas, caule, flores, frutos, cascas ou raízes de plantas³¹. OEs são misturas complexas com cerca de 20-60 componentes em diferentes concentrações, dos quais somente dois ou três são os principais, com concentrações relativamente elevadas (20-70%), responsáveis por caracterizar o óleo e, geralmente, determinar suas propriedades biológicas²⁵.

Dentre as plantas produtoras de óleos essenciais, encontra-se a *Schinus terebinthifolia* Raddi que é uma espécie da família Anacardiaceae, conhecida popularmente como pimenta rosa, aroeira vermelha ou pimenta brasileira, nativa da América do Sul e América Central, muito utilizada na medicina popular dessas regiões para o tratamento das mais diversas enfermidades³². Diversos estudos conduzidos com diferentes partes da planta demonstraram propriedades biológicas importantes, por exemplo, atividade antimicrobiana do extrato hidroalcolico das cascas frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*³³, ação anti-inflamatória e cicatrizante do extrato metanólico das folhas quando testada em feridas de excisão de pele feitas em ratos³⁴, já o óleo essencial dos frutos, apresentou atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans*³⁵, neste mesmo produto foi estudada e comprovada, ainda, a ação larvicida^{29, 36}. O extrato etanólico e o óleo essencial das folhas se mostraram potencialmente antioxidantes *in vitro* ³⁷, e a atividade antitumoral foi demonstrada pelos extratos aquoso e metanólico em linhagens de células de câncer de próstata³⁸, dentre outras^{39, 40}.

Poucos estudos sobre a atividade biológica dos frutos imaturos foram realizados. Sabendo que a composição de óleos essenciais varia de acordo com inúmeros fatores tanto genéticos quanto ambientais como o clima, estação do ano, localização, tipo de solo, tempo de maturação e outros ⁴¹⁻⁴³, o objetivo do presente estudo é a analisar a ação larvívica dos óleos essenciais de frutos imaturos e maduros de *Schinus terebinthifolia* Raddi frente a larvas de *Stegomyia aegypti*, relacionando essa atividade ao perfil fitoquímico elucidado.

2. Resultados e discussão

Os óleos essenciais testados apresentaram considerável atividade larvívica, sendo que a mortalidade das larvas não foi um fenômeno exclusivamente atribuído à concentração dos óleos essenciais de *S. terebinthifolia* no meio de incubação, mas o tempo de exposição aos tratamentos também afetou de maneira significativa a taxa de mortalidade (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 - Regressão logística binária entre a concentração e o tempo de exposição ao óleo essencial dos frutos maduros de *Schinus terebinthifolia* Raddi na mortalidade de larvas de *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762).

Parâmetros	Coefficiente	EP	Z	P
Tempo de exposição ao óleo essencial = 0				
Constante	-2,430	0,177	-13,73	0,000 ^{as}
PPM	0,008	0,001	11,18	0,000 ^{as}
G = 86,70; gl = 1; p = 0,000 ^{as} ; χ^2 Hosmer-Lemeshow = 3,39; p = 0.495				
P(Morte) = $\Phi(Y')$				
Y' = -2,4300 + 0,008 PPM				
Tempo de exposição ao óleo essencial = 24				
Constante	-1,892	0,136	-13,91	0,000 ^{as}
PPM	0,023	0,002	11,25	0,000 ^{as}
G = 118,03; gl = 1; p = 0,000 ^{as} ; χ^2 Hosmer-Lemeshow = 61,80; p = 0,000				
P(Morte) = $\Phi(Y')$				
Y' = -1,892+ 0,023 PPM				
Tempo de exposição ao óleo essencial = 48				
Constante	-2,324	0,181	-12,85	0,000 ^{as}
PPM	0,038	0,003	11,74	0,000 ^{as}
G = 83,98; gl = 1; p = 0,000 ^{as} ; χ^2 Hosmer-Lemeshow = 16,88; p = 0,002				
P(Morte) = $\Phi(Y')$				
Y' = -2,324+ 0,038 PPM				
Tempo de exposição ao óleo essencial = 72				
Constante	-2,552	0,211	-12,08	0,000 ^{as}
PPM	0,047	0,004	11,06	0,000 ^{as}
G = 67,875; gl = 1; p = 0,000 ^{as} ; χ^2 Hosmer-Lemeshow = 14,28; p = 0,006				
P(Morte) = $\Phi(Y')$				
Y' = -2,552 + 0,047 PPM				

Tabela 1 cont- Regressão logística binária entre a concentração e o tempo de exposição ao óleo essencial dos frutos maduros de *Schinus terebinthifolia* Raddi na mortalidade de larvas de *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762).

Efeito PPM + Tempo				
Constante	-1,398	0,141		0,000 ^{as}
PPM	0,006	0,004	11,18	0,000 ^{as}
Tempo	0,035	0,003	11,18	0,000 ^{as}
G = 98,375; gl = 2; $p = 0,000^{as}$; χ^2 Hosmer-Lemeshow = 56,76; $p = 0,000$				
P(Morte) = $\Phi(Y')$				
$Y' = -2,552 + 0,006 \text{ PPM} + 0,035 \text{ Tempo}$				
as: altamente significativo				

Tabela 2 - Regressão logística binária do tempo de exposição (0, 24, 48 e 72 horas) ao óleo essencial dos frutos imaturos de *Schinus terebinthifolia* Raddi na mortalidade de larvas de *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762).

Parâmetros	Coefficiente	EP	Z	P
Tempo de exposição ao óleo essencial = 0				
Constante	-2,268	0,152	-14,90	0,000 ^{as}
PPM	0,003	0,0003	10,11	0,000 ^{as}
G = 98,73; gl = 1; $p = 0,000^{as}$; χ^2 Hosmer-Lemeshow = 12,41; $p = 0,015$				
P(Morte) = $\Phi(Y')$				
$Y' = -2,268 + 0,003 \text{ PPM}$				
Tempo de exposição ao óleo essencial = 24				
Constante	-0,895	0,083	-10,75	0,000 ^{as}
PPM	0,012	0,002	9,40	0,000 ^{as}
G = 232,77; gl = 1; $p = 0,000^{as}$; χ^2 Hosmer-Lemeshow = 3,11; $p = 0,539$				
P(Morte) = $\Phi(Y')$				
$Y' = -0,895 + 0,012 \text{ PPM}$				
Tempo de exposição ao óleo essencial = 48				
Constante	-0,743	0,080	-9,32	0,000 ^{as}
PPM	0,011	0,001	9,49	0,000 ^{as}
G = 246,76; gl = 1; $p = 0,000^{as}$; χ^2 Hosmer-Lemeshow = 20,16; $p = 0,000$				
P(Morte) = $\Phi(Y')$				
$Y' = -0,743 + 0,011 \text{ PPM}$				
Tempo de exposição ao óleo essencial = 72				
Constante	-0,916	0,089	-10,31	0,000 ^{as}
PPM	0,020	0,002	9,15	0,000 ^{as}
G = 213,84; gl = 1; $p = 0,000^{as}$; χ^2 Hosmer-Lemeshow = 0,0784; $p = 0,999$				
P(Morte) = $\Phi(Y')$				
$Y' = -0,916 + 0,020 \text{ PPM}$				
Efeito PPM + Tempo				
Constante	-1,590	0,073		0,000 ^{as}
PPM	0,004	0,000	1,13	0,000 ^{as}
Tempo	0,022	0,001	1,13	0,000 ^{as}
G = 832,54; gl = 2; $p = 0,000^{as}$; χ^2 Hosmer-Lemeshow = 211,83; $p = 0,000$				
P(Morte) = $\Phi(Y')$				
$Y' = -1,590 + 0,004 \text{ PPM} + 0,022 \text{ Tempo}$				
as: altamente significativo				

O modelo probístico testado revelou que a concentração e o tempo de exposição ao óleo essencial são capazes de afetar a mortalidade das larvas e a interação aditiva do efeito do tempo de exposição e da concentração (Tabela 1 e 2. PPM + Tempo) também foi altamente

significativa, mas o ajuste ao modelo probítico, medido pelo valor de p do χ^2 de Hosmer-Lemeshow, foi inferior ao mínimo de 0,25 aceito para um bom ajuste do modelo testado (Hosmer e Lemeshow, 1989).

Contudo, o efeito significativo do tempo de exposição sobre a mortalidade das larvas produziu um impacto significativo na determinação das concentrações letais. Uma vez que a CL_{50} diminuiu em valor absoluto e convergiu para um intervalo de confiança menor entre 0 e 24 horas de exposição (Tabelas 4 e 5).

A análise de covariância comparou o efeito larvicida de ambos óleos essenciais excluindo os tempos e concentrações onde todas as larvas morriam ou todas sobreviviam, já que nessas situações não ocorrem variabilidade. Com isso, pode-se observar a potencialidade do OE dos frutos imaturos maior que dos frutos imaturos em cada tempo estudado, representado pelo coeficiente de cada planta (Tabela 3).

Tabela 3 – Análise de covariância entre as mortalidades causadas pela exposição de larvas de *Stegomyia aegypti* aos óleos essenciais de frutos maduros (Planta 1) e imaturos (Planta 2) de *Schinus terebinthifolia* nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas.

Parâmetros	Coeficiente	EP	Z	P
Tempo de exposição ao óleo essencial = 0				
Constante	-1,795	0,099	-18,10	0,000 ^{as}
PPM Planta 1	0,004	0,0002	16,11	0,000 ^{as}
PPM Planta 2	-1,040	0,161	-6,44	0,000 ^{as}
G = -209,24; $\chi^2 = 40,36$; gl = 1; $p = 0,000$				
P(Morte) = $\Phi(Y')$				
Planta 1: $Y' = -1,795 + 0,004 \text{ PPM}$ – Planta 2: $Y' = -1,795 - 1,040 \text{ PPM}$				
Tempo de exposição ao óleo essencial = 24				
Constante	-1,573	0,099	-15,82	0,000 ^{as}
PPM Planta 1	0,017	0,001	14,98	0,000 ^{as}
PPM Planta 2	0,525	0,109	-4,83	0,000 ^{as}
G = -361,40; $\chi^2 = 20,45$; gl = 1; $p = 0,000$				
P(Morte) = $\Phi(Y')$				
Planta 1: $Y' = -1,573 + 0,017 \text{ PPM}$ – Planta 2: $Y' = -1,573 + 0,525 \text{ PPM}$				
Tempo de exposição ao óleo essencial = 48				
Constante	-1,460	0,094	-15,52	0,000 ^{as}
PPM Planta 1	0,017	0,001	15,64	0,000 ^{as}
PPM Planta 2	0,502	0,1063	4,73	0,000 ^{as}
G = -369,80; $\chi^2 = 58,98$; gl = 1; $p = 0,000$				
P(Morte) = $\Phi(Y')$				
Planta 1: $Y' = -1,460 + 0,017 \text{ PPM}$ – Planta 2: $Y' = -1,460 + 0,502 \text{ PPM}$				
Tempo de exposição ao óleo essencial = 72				
Constante	-1,860	0,119	-15,68	0,000 ^{as}
PPM Planta 1	0,029	0,002	15,41	0,000 ^{as}
PPM Planta 2	0,725	0,122	5,93	0,000 ^{as}
G = -301,15; $\chi^2 = 35,70$; gl = 1; $p = 0,000$				
P(Morte) = $\Phi(Y')$				
Planta 1: $Y' = -1,860 + 0,029 \text{ PPM}$ – Planta 2: $Y' = -1,460 + 0,725 \text{ PPM}$				
as: altamente significativo				

É importante notar que no primeiro contato das larvas com os OE (Tempo de exposição = 0) ocorre a morte instantânea gerada exclusivamente pela toxicidade aguda das concentrações

letais do OE, sendo o OE dos frutos imaturos 260 vezes mais tóxico que o OE dos frutos maduros (Tabela 3). O fato de ter ocorrido morte instantânea nas concentrações tóxicas, sugere uma intervenção num processo crítico para a larva.

Com o passar do tempo, as larvas que sobreviveram no tempo 0, começam a morrer por outros fatores que podem estar envolvidos na mortalidade, como por exemplo, o aparecimento de lesões crônicas, causadas pela exposição às concentrações subletais. Como descrito por Pratti et al (2015), que identificaram em larvas de *S. aegypti* danos oxidativos causados pela exposição ao OE de frutos maduros de *S. terebinthifolia*, é possível que a base metabólica dos danos observados em doses subletais seja consequente a algum processo que diminua o suprimento celular de ATP, muito provavelmente promovendo o desacoplamento da fosforilação oxidativa, uma vez que existem relatos, de morte por desacoplamento da cadeia respiratória em larvas de insetos ^{48,49}.

Uma vez que a OMS não estabelece um padrão para análise de produtos naturais com potencial larvicida, Cheng et al (2003) e Kiran et al (2006) determinaram um critério em que compostos com $CL_{50} < 100$ ppm são considerados ativos, ou seja, potencialmente larvicida. Seguindo esse padrão, pode-se observar que os óleos essenciais de frutos maduros ($CL_{50} = 80,53$ ppm) e imaturos ($CL_{50} = 71,31$ ppm) são considerados bons agentes larvicida ^{50,51} (Tabelas 4 e 5). Porém, Silva et al (2010) considerou em seu estudo o óleo essencial de frutos maduros ativo contra larvas de *St. aegypti* mesmo com uma $CL_{50} = 366,91$ ppm, 4 vezes maior que a encontrada no presente trabalho ²⁹, respaldado pelo critério defendido por Pitasawat et al (2007). As CL_{50} encontradas no presente estudo foram inferiores também ao obtido para o óleo essencial de *Pterodon polygalaeflorus* Benth (Fabaceae) cuja CL_{50} foi $134,90 \pm 0,25 \mu\text{g/mL}$ ⁵³.

Tabela 4 - Concentrações letais (CL) do óleo essencial dos frutos maduros de *Schinus terebinthifolia* e limites inferior e superior dos Intervalos de confiança a 95% (IC 95%) determinadas pelo modelo probístico em regressão logística binária testada para larvas de *Stegomyia aegypti* ao óleo.

Tempo (h)	Efeito	Dose (ppm) (Linf -Lsup IC 95%)
0	CL ₅₀	307,70 (278,30 – 343,83)
	CL ₉₀	469,99 (423,16 – 533,86)
	CL ₉₅	516,00 (463,20 – 588,75)
	CL ₉₉	602,31 (537,81 – 692,23)
24	CL ₅₀	80,53 (71,92 – 91,13)
	CL ₉₀	135,06 (120,42 – 155,11)
	CL ₉₅	150,52 (133,84 – 173,58)
	CL ₉₉	179,52 (158,86 – 208,37)
48	CL ₅₀	60,98 (61,46 – 75,09)
	CL ₉₀	94,60 (85,83 – 106,23)
	CL ₉₅	104,14 (94,23 – 117,44)
	CL ₉₉	122,02 (109,85 – 138,61)
72	CL ₅₀	54,63 (49,45 – 60,66)
	CL ₉₀	82,05 (74,38 – 92,37)
	CL ₉₅	89,83 (81,20 – 101,60)
	CL ₉₉	104,42 (93,87 – 119,05)

Tabela 5 - Concentrações letais (CL) do óleo essencial dos frutos imaturos de *Schinus terebinthifolia* e limites inferior e superior dos Intervalos de confiança a 95% (IC 95%) determinadas pelo modelo probístico em regressão logística binária testada para larvas de *Stegomyia aegypti* ao óleo.

Tempo (h)	Efeito	Dose (ppm) (Linf -Lsup IC 95%)
0	CL ₅₀	718,90 (639,01 – 825,82)
	CL ₉₀	1125,18 (990,77 – 1318,33)
	CL ₉₅	1240,36 (1088,77 – 1459,66)
	CL ₉₉	1456,40 (1271,80 – 1725,60)
24	CL ₅₀	71,31 (59,86 – 85,85)
	CL ₉₀	173,44 (148,08 – 211,18)
	CL ₉₅	202,40 (172,35 – 247,46)
	CL ₉₉	256,71 (217,66 – 315,71)
48	CL ₅₀	65,00 (53,42 – 78,97)
	CL ₉₀	177,13 (151,26 – 215,38)
	CL ₉₅	208,92 (177,97 – 255,07)
	CL ₉₉	268,54 (227,83 – 329,80)
72	CL ₅₀	45,63 (38,27 – 54,96)
	CL ₉₀	109,49 (93,37 – 133,73)
	CL ₉₅	127,60 (108,48 – 156,56)
	CL ₉₉	161,55 (136,70 – 199,53)

Para taninos, tem sido proposto que substâncias com CL_{50} variando entre 0,1 a 0,49 ppm são bons agentes larvicidas⁵⁴. Entretanto, para óleos essenciais a atividade inibidora tem se manifestado em concentrações maiores^{52,25}.

A resina exsudada por plantas do gênero *S. terebinthifolia* é usada, dentre outras funções, para repelir insetos⁵⁴. Seu óleo essencial apresenta em sua composição uma predominância de monoterpenos nos frutos e sesquiterpenos nas folhas^{55,56}. Os monoterpenos apresentam boa atividade larvicida e os sesquiterpenos tem capacidade para inibir a ecdise⁵⁷.

Trabalhos com *S. terebinthifolia*, destacam o α -terpineno e o limoneno como os compostos que caracterizam o óleo dos frutos⁵⁷. Destes compostos, o limoneno é um dos majoritários no óleo essencial do fruto de *S. terebinthifolia* e outros estudos devem ser realizados para a verificação da mesma propriedade larvicida neste e em outros compostos presentes no óleo essencial estudado, após seu respectivo isolamento.

3. Seção experimental

Bioensaio com larvas

Para o bioensaio foram utilizadas larvas de *St. aegypti*, em 3º estágio, obtidas pela incubação de ovos em 3L de água natural e suprimento alimentar para peixes. Os ovos foram obtidos pela colocação de armadilhas, denominadas ovitrampas⁴⁴. As ovitrampas foram dispostas nas dependências da Universidade Vila Velha, próximo a árvores e plantas.

Foi preparada uma série de tubos em cinco replicatas para o controle branco utilizado para avaliar a sobrevivência das larvas, em solução de Dimetilsulfóxido (DMSO) 0,5% em água deionizada, e para cada tratamento realizado, que consistiram de diluições de cada óleo essencial analisados no capítulo I, nas concentrações de 1.56, 3.125; 6.25; 12.5; 25; 50; 100; 200; 400 e 800 ppm. Cada replicata recebeu 10 larvas vivas⁴⁵, considerando a capacidade de locomoção ascendente para respiração como o critério de sobrevivência. As avaliações das larvas sobreviventes foram realizadas nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas após a inoculação, com segurança para evitar o aparecimento de mosquitos adultos.

Análise dos dados

A regressão logística binária foi realizada a partir de um modelo probístico, tendo as doses e a duração da exposição ao óleo essencial como variáveis independentes e mortalidade larval taxas como variável dependente. A hipótese nula testada foi de que a taxa de mortalidade larval foi

independente da dose ou tempo de exposição ao óleo essencial através de um modelo probítico tendo como base de transformação o logaritmo neperiano ⁴⁷. As concentrações letais CL₅₀, CL₉₀, CL₉₅ e CL₉₉ foram calculadas a partir da equação de linha reta gerada pelo modelo probítico testado ⁴⁷. As análises foram feitas pelo programa Minitab versão 17.0.

4. Referências

- (1) Kilpatrick, A.M.; Randolph, S.E. *Lancet*. **2012**, 380, 1946-1955.
- (2) Benelli, G.; Mehlhorn, H. *Parasitol Res*. **2016**, 115, 1747-1754. doi: 10.1007/s00436-016-4971-z
- (3) Pybus, O.G.; Tatem, A.J.; Lemey, P. *Proc. R. Soc. B*. **2015**, 282, 20142878. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2014.2878>
- (4) Shuman, E.K. *N Engl J Med*. **2010**, 362(12), 1061-1063.
- (5) Brown, J.E.; Evans, B.; Zheng, W.; Abas, V.; Barrera-Martinez, L.; Egizi, A.; Zhao, H.; Caccone, A.; Powell, J.R. *Evolution*. **2014**, 68(2), 514-525.
- (6) Chan, J.F.W.; Garnet, K.Y.; Choi, C.C.Y.; Yip, V.C.C.; Cheng, K.Y. *Journal of Infection*. **2016**, 72, 507-524. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2016.02.011>
- (7) Weaver, S.C.; Lecuit, M. *N Engl J Med*. **2015**, 372, 1231-1239. doi: 10.1056/NEJMr1406035.
- (8) Van Bortel, W.; Dorleans, F.; Rosine, J.; Blateau, A.; Rousseau, D.; Matheus, S.; Leparco-Goffart, I.; Flusin, O.; Prat, C.M.; Césaire, R.; Najioullah, F.; Ardillon, V.; Balleydier, E.; Carvalho, L.; Lemaître, A.; Noël, H.; et al. *Euro Surveill*. **2014**, 19(13), pii=20759.
- (9) Brady, O.J.; Golding, N.; Pigott, D.M.; Kraemer, M.U.G.; Messina, J.P. Reiner Jr, R.C.; Scott, T.W.; Smith, D.L.; Gething, P.W.; Hay, S.I. *Parasit Vectors*. **2014**, 7, 338-354.
- (10) Zaraska, M. Scientific American. <https://www.scientificamerican.com/article/the-next-zika/> 2016 Accessed on 12.27.2016
- (11) Fauci, A.S.; Morens, D.M. *N Engl J Med*. **2016**, 374(7), 601-604.
- (12) Pitisuttithum, P.; Bouckennooghe, A. *Expert Rev Vaccines*. **2016**, 15(7), 795-798, DOI: 10.1080/14760584.2016.1189331.
- (13) Hombach, J.; Friede, M.; Moorphy, V.; Costello, A.; Kieny, M.P. *BMJ*. **2016**, 355: i5923. doi: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.i5923>.
- (14) Smalley, C.; Erasmus, J.H.; Chesson, C.B.; Beasley, D.W.C. *Vaccine*. **2016**, 34(26), 2976-2981. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.076>.
- (15) World Health Organization. Zika virus. Fact sheet N°1. Updated January 2016
- (16) van den Berg, H.; Zaim, M.; Yadav, R.S.; Soares, A.; Ameneshewa, B.; Mnzava, A.; Hii, J.; Dash, A.P.; Ejov, M. *Environ Health Perspect*. **2012**, 120(4), 577-583.
- (17) Lees, R.S.; Knols, B.; Bellini, R.; Benedict, M.Q.; Bheecarry, A.; Bossin, H.C.; Chadee, D.D.; Charlwood, J.; Dabiré, R.K.; Djogbenou, L.; Egyir-Yawson, A.; Gato, R.; Gouagna, L.C.; Hassan, M.M.; Khan, S.A.; Koekemoer, L.L.; Lemperiere, G.; Manoukis, N.C.; Mozuraitis, R.; Pitts, R.J.; Simard, F.; Gilles, J.R.L. *Acta Tropica*. **2014**, 132, 2-11.
- (18) Antonio-Nkondjio, C.; Fossog, B.T.; Ndo, C.; Djantio, B.M.; Togouet, S.Z.; Awono-Ambene, P.; et al. *Malar J*. **2011**, 10, 154-166.
- (19) Hoffmann, A.A.; Montgomery, B.L.; Popovici, J.; Iturbe-Ormaetxe I.; Johnson, P.H.; Muzzi, F.; Greenfield, M.; Durkan, M.; Leong, Y.S.; Dong, Y.; Cook, H.; Axford, J.; Callahan, A.G.; Kenny, N.; Omodei, C.; McGraw, E.A.; Ryan, P.A.; Ritchie, S.A.; Turelli, M.; O'Neill, S.L. *Nature*. **2011**, 476, 454-457.
- (20) Alphey, L.; Benedict, M.; Bellini, R.; Clark, G.G.; Dame, D.A.; Service, M.W.; Dobson, S.L. *Vector Borne Zoonotic Dis*. **2010**, 10(3), 295-311. doi: 10.1089=vbz.2009.0014.
- (21) Robinson, A.S.; Knols, B.G.J.; Voigt, G.; Hendrichs, J. *Malar J*. **2009**, 8(2), 1-9 doi:10.1186/1475-2875-8-S2-S1.

- (22) Fu, G.; Lees, R.S.; Nimmo, D.; AWC, D.; Jin, L.; Gray, P.; Berendonk, T.U.; White-Cooper, H.; Scaife, S.; Phuc, H.K.; Marinotti, O.; Jasinskiene, N.; James, A.A.; Alphey, L. *PNAS*. **2010**, 107(10), 4550-4554.
- (23) Ghosh, A.; Chowdhury, N.; Chandra, G. *Indian J Med Res*. **2012**, 135, 581-598.
- (24) Benelli, G.; Murugan, K.; Panneerselvam, C.; Madhiyazhagan, P.; Conti, B.; Nicoletti, M. *Parasitol Res*. **2015**, 114, 391-397. doi 10.1007/s00436-014-4286-x.
- (25) Pavela, R. *Ind Crops Prod*. **2015**, 76, 174-187.
- (26) Le Goff, G.; Revollo, J.; Guerra, M.; Cruz, M.; Simon, Z.B.; Roca, Y.; Florès, J.V.; Hervé, J.P. *Parasite*. **2011**, 18, 277-280.
- (27) Dzul-Manzanilla, F.; Martínez, N.E.; Cruz-Nolasco, M.; Gutiérrez-Castro, C.; López-Damian, L.; Ibarra-López, J.; Martini-Jaimes, A.; Bibiano-Marín, W.; Tornez-Benitez, C.; Vazquez-Prokopec, G.M.; Manrique-Saide, P. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. **2015**, 110(2), 141-144. doi:10.1093/trstmh/trv106
- (28) Vera, S.S.; Zambrano, D.F.; Méndez-Sanchez, S.C.; Rodríguez-Sanabria, F.; Stashenko, E.E.; Luna, J.E.D. *Parasitol Res*. **2014**, 113, 2647-2654. doi: 10.1007/s00436-014-3917-6.
- (29) Silva, A.G.; Almeida, D.L.; Ronchi, S.N.; Bento, A.C.; Scherer, R.; Ramos, A.C.; Cruz, Z.M.A. *Parasit Vectors*. **2010**, 3, 79-85.
- (30) Regnault-Roger, C.; Vincent, C.; Arnason, J.T. *Ann. Rev. Entomol*. **2012**, 57, 405-424.
- (31) Fahn, A. *Adv. Bot. Res*. **2000**, 31, 37-75.
- (32) Santos, M.R.G.; Silva, J.H.S.; Caxito, M.L.C. *Int J Pharm Pharm Sci*. **2015**, 7(12), 1-7.
- (33) Sá, E.R.N.; Medeiros, C.I.S.; Oliveira, J.R.M.S.; Evangelista, A.J.J.; Magalhães, M.I.S.; Almeida Filho, G.C.; Paz, A.M.R.; Pessôa, H.L.F. *Adv Microbiol*. **2014**, 4, 761-765. <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2014.412083>.
- (34) Fedel-Miyasato, L.E.S.; Kassuya, C.A.L.; Auharek, S.A.; Formagio, A.S.N.; Cardoso, C.A.L.; Mauro, M.O.; Cunha-Laura, A.L.; Monreal, A.C.D.; Vieira, M.C.; Oliveira, R.J. *Rev Bras Farmacogn*. **2014**, 24, 565-575.
- (35) Piras, A.; Marzouki, H.; Falconieri, D.; Porcedda, S.; Gonçalves, M.J.; Cavaleiro, C.; Salgueiro, L. *Rec Nat Prod*. **2017**, 11(1), 9-16.
- (36) Kweka, E.J.; Nyindo, M.; Mosha, F.; Silva, A.G. *Parasit Vectors*. **2011**, 4, 129.
- (37) Uliana, M.P.; Fronza, M.; Silva, A.G.; Vargas, T.S.; Andrade, T.U.; Scherer, R. *Ind Crops Prod*. **2016**, 83, 235-240.
- (38) Queires, L.C.; Crépin, M.; Vacherot, F.; De la Taille, A.; Rodrigues, L.E. In vitro effects of polyphenols extracted from the aroeira plant (*Schinus terebinthifolius* Raddi) on the growth of prostate cancer cells (LNCaP, PC-3 AND DU145). *Brazilian Journal of Medicine and Human Health*, Salvador, jan. 2013; 1(1): 71-82.
- (39) Carvalho, M.G.; Melo, A.G.N.; Aragão, C.F.S.; Raffin, F.N.; Moura, T.F.A.L. *Rev. Bras. Pl. Med*. **2013**, 15(1), 158-169.
- (40) Lima, L.B.; Vasconcelos, C.F.B.; Maranhão, H.M.L.; Leite, V.R.; Ferreira, P.A.; Andrade, B.A.; Araújo, E.L.; Xavier, H.S.; Lafayette, S.S.L.; Wanderley, A.G. *J Ethnopharmacol*. **2009**, 126, 468-473.
- (41) Paolini, J.; Barboni, T.; Desjobert, J.; Djabou, N.; Muselli, A.; Costa, J. *Biochem. Syst. Ecol*. **2010**, 38, 865-874.
- (42) Gazim, Z.C.; Amorim, A.C.L.; Hovell, A.M.C.; Rezende, C.M.; Nascimento, I.A.; Ferreira, G.A.; Cortez, D.A.G. *Molecules*. **2010**, 15, 5509-5524. doi:10.3390/molecules15085509
- (43) Hussain, A.I.; Anwar, F.; Sherazi, S.T.H.; Przybylski, R. *Food Chem*. **2008**, 108, 986-995.
- (44) Fay, R.W.; Perry, A.S. *Mosquito News*. **1965**, 25(3), 276-281.
- (45) WHO – World Healthy organization. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13. 2005.
- (46) Zar JH. *Biostatistical analysis*. Upper Saddle River: Prentice-Hall; 2010.
- (47) Hosmer D.W.; Lemeshow S. *Applied logistic regression*; John Wiley: New York, 1989.

- (48) Pratti, D.L.A.; Ramos, A.C.; Scherer, R.; Cruz, Z.M.A.; Silva, A.G. *Parasit. Vectors*. **2015**, *8*, 136-145. doi 10.1186/s13071-015-0746-0
- (49) Dua, V.K.; Kumar, A.; Pandey, A.C; Kumar, S. *Parasit Vectors*. **2013**, *6*, 30-42.
- (50) Cheng, S.S.; Chang, H.T.; Chang, S.T.; Tsai, K.H.; Chen, W.J. *Bioresour Technol*. **2003**, *89*, 99-102. doi:10.1016/S0960-8524(03)00008-7
- (51) Kiran, S.R.; Bhavani, K.; Devi, P.S.; Rao, B.R.R.; Reddy, K.J. *Bioresour Technol*. **2006**, *97*, 2481–2484. doi:10.1016/j.biortech.2005.10.003
- (52) Pitasawat, B.; Champakaew, D.; Choochote, W.; Jitpakdi, A.; Chaithong, U.; Kanjanapothi, D.; Rattanachanpichai, E.; Tippawangkosol, P.; Riyong, D.; Tuetun, B.; Chaiyasit, D. *Fitoterapia*. **2007**, *78*, 205-210. doi: 10.1016/j.fitote.2007.01.003.
- (53) Pimenta, A. T. A., Santiago, G. M. P., Arriaga, A. M. C., Menezes, G. H. A. e Bezerra, S. B. *Rev Bras Farmacogn*. **2006**, *16*, 501-505. doi: 10.1590/S0102-695X2010005000052.
- (54) Silva, H. H. G., Silva, I. G., Santos, M. R. G., Filho, E. R. e Elias, C. M. *Rev Soc Bras Med Trop*. **2005**, *37*, 396-399. doi: 10.1590/S0037-86822004000500005.
- (55) Siani, A.C.; Sampaio, A.L.; Sousa, M.C.; Henriques, M.G.; Ramos, M.F. *Biotechnolog. Cienc. Desenvolv*. **2000**, *16*, 38-43. doi: 10.1590/S0102-695X2006000400013.
- (56) Rüdiger, A.L.; Siani, A.C.; Veiga Jr, V.F. *Pharmacogn Rev*. **2007**, *1*, 93-104.
- (57) Lima, M.G.A.; Maia, C.I.C.; Sousa, B.D.; Morais, S.M.; Freitas, S.M. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. **2006**, *48*, 4. doi: 10.1590/S0036-46652006000400007.

CAPÍTULO III

DANOS HISTOLÓGICOS CAUSADOS PELOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Schinus terebinthifolia* RADDI EM LARVAS DE *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762)

Manuscrito apresentado nas normas da revista Parasitology.

Drielle Lima de Almeida Pratti¹; Ary Gomes da Silva^{1,2}.

¹ Universidade Vila Velha - Programa de pós-graduação em Ecologia de ecossistemas

² Autor correspondente: arygomes@uvv.br. Endereço: Universidade Vila Velha. Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, Vila Velha, ES, Brasil - CEP 29.102-770.

Resumo

Doenças transmitidas por insetos são as maiores preocupações para a saúde pública. O *Stegomyia aegypti* é a mais importante espécie de mosquitos invasores. A inexistência de vacinas para todas as doenças faz com que o controle se baseie em ações antivetoriais. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar microscopicamente os danos histológicos em larvas de mosquito *Stegomyia aegypti* causados pela exposição à concentração letal média dos óleos essenciais de frutos maduros e imaturos de *Schinus terebinthifolia*. As larvas foram expostas a concentração de 106,51 ppm do óleo essencial de frutos imaturos e a 366,91 ppm do óleo essencial de frutos maduros por 24h, após esse tempo foram separadas em mortas e sobreviventes e incluídas em historresina para realização dos cortes histológicos que foram observados em microscópio ótico e fotografados. Tanto nas larvas mortas quanto nas sobreviventes, pode ser constatado que os danos estruturais apresentaram uma tendência de intensificação a partir da terminação mais distal. Porém, nas primeiras, as células apresentaram características necróticas com núcleo picnótico e desorganização citoplasmática. As larvas sobreviventes evidenciaram estrutura mais preservada a partir da porção mediana do mesêntero, apresentando-se sem alterações na região do tórax e cabeça. Mostrando que mesmo em doses subletais, os danos causados pela exposição ao óleo essencial levam a mortalidade dessas larvas em questão de tempo, impedindo assim a eclosão dos mosquitos adultos e, em consequência, a propagação de doenças.

Palavras-chave: *Aedes*, mosquito da dengue, larvicida, produtos naturais, *Schinus terebinthifolius*.

Principais conclusões

- Os óleos essenciais de *Schinus terebinthifolia* são bons agentes larvicida.
- Os óleos essenciais não se diferenciaram na proporção de danos causados.
- Os danos às células apresentaram características necróticas
- Ambos tratamentos apresentaram perda expressiva da estruturação do tórax e do epitélio do Mesêntero.
- Lesões crônicas podem ser a causa da mortalidade das larvas expostas a esses óleos essenciais.

Introdução

Febre amarela, dengue, zika, Chikungunya são exemplos de doenças vetoriais transmitidas por uma mesma espécie de mosquitos, o *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762) (Jentes et al., 2011; Marcondes e Ximenes, 2015; Leparac-Goffart et al., 2015), que é uma nova combinação nomenclatural para *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) (Reinert et al., 2004). Este vetor tem inspirado grande preocupação para a saúde pública mundial, uma vez que sua distribuição geográfica abrange todos os continentes, incluindo Europa e América do Norte (Kraemer et al., 2015). Essa alteração na dispersão geográfica do vetor, em países da zona temperada, com clima naturalmente impróprio a ele, foi influenciada, principalmente, pelas mudanças climáticas (Gubler, 2001; Shuman, 2010). Atualmente, não existem terapias medicamentosas preventivas, nem vacinas eficazes contra todas essas doenças, assim a forma mais eficiente de controlá-las é combatendo o mosquito vetor (Fauci e Morens, 2016; WHO, 2016).

Os pesticidas, de forma geral, são utilizados em áreas agrícolas, programas de saúde pública e áreas verdes urbanas, a fim de proteger as plantas e os seres humanos de diversas pragas (Nicolopoulou-Stamati et al., 2016). Na saúde pública, os inseticidas químicos são os mais utilizados pelo homem para controle de vetores, especialmente devido a fácil aplicação e baixo custo (van den Berg et al., 2012). Por essas características, seu uso se tornou indiscriminado e liberal fazendo com que se tornassem perigosos para a saúde humana e animal, o meio ambiente e a biodiversidade (Sarwar, 2015; Zheng et al., 2016).

A exposição de humanos aos pesticidas pode ocorrer de diversas formas: pela ingestão de alimentos contaminados, respiração, absorção pela pele e ainda transmissão pelo aleitamento materno (Pirsaheb et al., 2015). Sendo inclusive já relatadas ações diretas dessa exposição, no sistema nervoso central de crianças gerando dificuldades no desenvolvimento de partes do seu cérebro culminando em problemas de aprendizagem, déficit de atenção e hiperatividade, mesmo se a exposição ocorrer ainda no útero da mãe (Eskenazi et al., 1999; Rauh et al 2012). E adultos expostos a altas doses de pesticidas demonstraram ser mais propensos a desenvolverem doenças neurodegenerativas como Parkinson e déficits cognitivos (Mostafalou e Abdollahi, 2013).

Apesar dos efeitos negativos destas substâncias, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda as quatro classes de inseticidas químicos, organofosforados, organoclorados, carbamatos e piretroides, para pulverização de áreas habitadas por humanos e animais (WHO, 2012). Como a aplicação dessas substâncias é sobre solo e ar, elas podem se acumular em alimentos, solo e água, atingindo populações não-alvo e causando desequilíbrio ecológico (Hallmann et al., 2014; Hayes et al., 2006), além disso ocorre a acumulação entre os níveis da cadeia alimentar, como o encontrado por Mishra e Sharma (2011), que detectaram a presença de organoclorados em leite materno.

Além desses efeitos ecológicos negativos, com o decorrer dos anos os insetos se tornaram resistentes aos inseticidas químicos, sendo necessário o emprego de concentrações cada vez mais altas com o intuito de eliminar os vetores, consequentemente, os malefícios se tornaram ainda mais intensos, tanto para humanos quanto ao meio ambiente (Antonio-Nkondjio et al., 2011).

Dentre os impactos, a resistência a inseticidas é um dos principais problemas em programas de controle de vetores tradicionais, este problema ganha ainda mais destaque tendo em vista a explosão de epidemias decorrentes de vetores em todo o mundo. (Bhatt et al., 2013). Assim, a busca por métodos de controle alternativos vêm crescendo, medidas sustentáveis e ecológicas têm sido pesquisadas, com o intuito de reduzir a propagação dos vetores, eliminando o mosquito durante todas as fases de desenvolvimento (Larva, pupa e mosquito adulto), bem como impedindo a picada no ser humano (repelentes), nesse sentido os produtos naturais despontam como alternativa rica, devido a ampla gama de compostos químicos sintetizados nas plantas e a disponibilidade desses recursos na natureza (Gkinis et al., 2013; Govindarajan, 2011; Silva et al., 2010; Chowdhury, Ghosh, Chandra, 2008; Choochote et al., 2007; Trongtokit et al., 2005).

Diversos estudos com óleos essenciais de plantas têm apontado resultados promissores com potenciais efeitos contra vetores, dentre eles o óleo essencial de frutos de *Schinus terebinthifolia* Raddi que tem sido estudado como larvicida (Silva et al., 2010; Kweka et al., 2011). Portanto, este trabalho tem por objetivo avaliar microscopicamente os danos histológicos em larvas de mosquito *Stegomyia aegypti* causados pela exposição aos óleos essenciais de frutos maduros e imaturos de *Schinus terebinthifolia* Raddi, potencialmente larvicidas.

Materiais e métodos

Análise microscópica das larvas

Para os estudos histomorfológicos foi realizado novo ensaio biológico como descrito no capítulo II, sendo as diluições de cada óleo essencial realizadas na concentração letal que ocasiona mortalidade em 50% do lote experimental de larvas, calculada. Foram colocadas 10 larvas vivas em tubo de ensaio, em 5 replicatas para cada tratamento e controle realizados. O tratamento durou 24 horas e após esse tempo, as larvas mortas foram separadas das vivas e fixadas em FAA 50 por 2 horas e posteriormente desidratadas em série etanólica, em concentrações graduais e crescentes (50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 3 vezes 100%) a cada hora. Logo após, foi realizada a pré-infiltração do material em solução de historesina diluída em etanol em uma proporção de 2:1 por 24h. Após este período, o material foi submetido ao processo de infiltração por 48h, sendo em seguida incluído em bloco de historesina. O material foi seccionado em micrótomo rotativo sendo obtidas secções transversais e longitudinais do corpo da larva. As secções foram coradas com solução de safranina em água por 30 segundos e em azul de toluidina 1% em solução tamponada em fosfato por 60 segundos. As lâminas foram seladas com Entelan® (Merck) e lamínula de vidro. A observação foi realizada em microscópio óptico de campo claro (Leicagalen III) e as imagens foram obtidas com escala gráfica de 3000 µm utilizando câmera Samsung 12Mp acoplada ao microscópio.

Resultados e discussão

Danos histológicos

O mesêntero das larvas de *Stegomyia aegypti* é caracterizado por células cúbicas em unicamada cobrindo toda a luz intestinal (Figura 1: c₁, d₁, e₁). O tratamento com o OE na concentração letal média para essas larvas evidenciou uma completa desorganização celular, com produção de vesículas e hipertrofia das células na direção do lúmen (Figura 1: c₃, d₃, e₃ e Figura 1: c₄, d₄, e₄).

Os mesmos padrões de danos foram encontrados nas larvas expostas a ambos OEs. Comparando as larvas que sobreviveram (Figura 1: a₁, b₁, c₁, d₁, e₁, f₁) no ensaio controle quando expostas exclusivamente à água, assim como no ensaio branco (Figura 1: a₂, b₂, c₂, d₂, e₂, f₂) quando foram expostas ao meio constituído com solução de DMSO a 0,5%, bem como à CL₅₀ dos OEs (Figura 1: a₃, b₃, c₃, d₃, e₃, f₃) com as morreram após a exposição à CL₅₀ por 24h (Figura 1: a₄, b₄, c₄, d₄, e₄, f₄) pode ser constatado que os danos estruturais apresentam uma tendência de intensificação a partir da terminação mais distal, ou seja, do sifão (Figura 1: f₁₋₄) que integra o aparato respiratório da larva, em direção à cabeça da larva (Figura 1: a₁₋₄). No caso das larvas que morreram (Figura 1: a-f₄) as células apresentam características necróticas com perda expressiva da estruturação do tórax (Figura 1b₄) e do epitélio do mesêntero em sua porção proximal (Figura 1c₄), mediana (Figura 1d₄) e distal (Figura 1e₄) que é a que se encontra mais próxima do sifão respiratório (Figura 1f₄) que sofre perda praticamente total de sua organização.

Mesmo nas larvas sobreviventes à exposição à CL₅₀ (Figura 1f₃), o sifão sofre perdas estruturais muito semelhantes às das larvas que morreram nesta mesma concentração de OE (Figura 1f₄). A partir do sifão, os danos celulares foram se intensificando em direção à cabeça da larva, evidenciando nas larvas sobreviventes uma intensa vacuolização das células epiteliais componentes do mesêntero indicando um provável estado de lise celular, chegando a ocorrer perda de células por descamação em direção à luz do mesêntero. Todas essas lesões podem prejudicar os processos digestivos e de absorção no mesêntero das larvas levando ao comprometimento da sobrevivência e afetando assim o desenvolvimento larval do inseto.

Outros larvicidas derivados de plantas têm demonstrado efeitos deletérios no intestino médio de *St. aegypti*, como o extrato salino das folhas de *S. terebinthifolia*,

que faz com que as larvas eliminem o conteúdo intestinal na tentativa de excretar as substâncias tóxicas sem absorvê-las e que com a exposição continuada leva a lesões intestinais como as observadas no presente trabalho (Procópio et al., 2015). A acetogenina, um metabólito secundário presente em *Annona squamosa* causou vacuolização e hipertrofia celular no intestino médio de *St. aegypti* (Costa et al., 2014). Vacuolização, danos celulares, assim como a lise celular e a morte foram relatados como alguns dos efeitos do extrato etanólico de *Melia azedarach* no intestino médio de larvas de *Culex quinquefasciatus* (Al-Mehmadi e Al-Khalaf, 2010).

A morte instantânea de larvas em concentrações iguais ou superiores a 800 ppm, a diminuição da espessura do exoesqueleto e a perda de integridade dos órgãos internos nas porções finais do corpo da larva foram os sinais mais evidentes numa avaliação dos efeitos do OE de frutos de *S. terebinthifolia* sobre larvas de *St. aegypti* (Pratti et al., 2015).

Os danos observados nas larvas que morreram na concentração média sugerem que alguma intervenção num processo crítico para a larva ocorreu e, neste caso, os principais danos foram os provocados aos túbulos de Malpighi, pois são eles os responsáveis pelo processo de excreção, não só de eletrólitos e metabólitos, mas também do grande volume de água, naturalmente excretados pelas larvas de insetos que se desenvolvem na água (Bradley, 1987).

Porém, nas larvas sobreviventes, ou que se mostraram dentro do tempo analisado mais resistentes à concentração exposta, também fica evidente que existe um efeito tóxico tolerado em certo limite, mesmo com danos celulares evidentes nas regiões do sifão respiratório, túbulos de Malpighi e mesêntero. É possível ainda que os danos gerados nestas estruturas venham progressivamente a se refletir em perda de integridade estrutural e funcional nos outros segmentos da larva.

Pratti et al (2015) identificaram a diminuição do espessamento do exoesqueleto de larvas de *St. aegypti* expostas ao OE de frutos de *S. terebinthifolia* e relacionaram esse efeito a diminuição da síntese de quitina, pois eles observaram que as principais alterações morfológicas ocorreram na região do sifão respiratório, túbulos de malpighi e intestino, propondo então que a base metabólica dos danos observados em doses subletais fossem consequente a algum processo que diminua o suprimento celular de ATP, muito provavelmente promovendo o desacoplamento da fosforilação oxidativa,

uma vez que existem relatos, de morte por desacoplamento da cadeia respiratória em larvas de insetos (Dua et al., 2013).

Semelhantemente no presente estudo e confirmando as propostas de Pratti et al (2015) para o mecanismo de toxicidade do OE de frutos de *S. terebinthifolia*, as células do mesêntero e sifão respiratório são altamente dependentes de suprimento de ATP para seu funcionamento fisiológico, envolvendo transporte de eletrólitos e nutrientes (Kato et al., 2006) e elas evidenciaram lesões importantes, caracterizadas por descamação e vacuolização consequências, então, de danos oxidativos.

Desta forma, o uso de óleos essenciais como larvicidas, se mostrou tóxico causando danos irreparáveis em nível celular no epitélio do mesêntero da larva, indicando ser este o local de absorção dos compostos e que, independentemente do tipo de substância utilizada, as alterações destrutivas são muito semelhantes. Assim, a utilização de óleos essenciais pode ser uma alternativa larvicida viável no combate às larvas de vetores de doenças, visto que numa baixa concentração o conjunto de substâncias do óleo promoveu danos progressivos que levaram a morte das larvas, impedindo assim a eclosão de adultos.

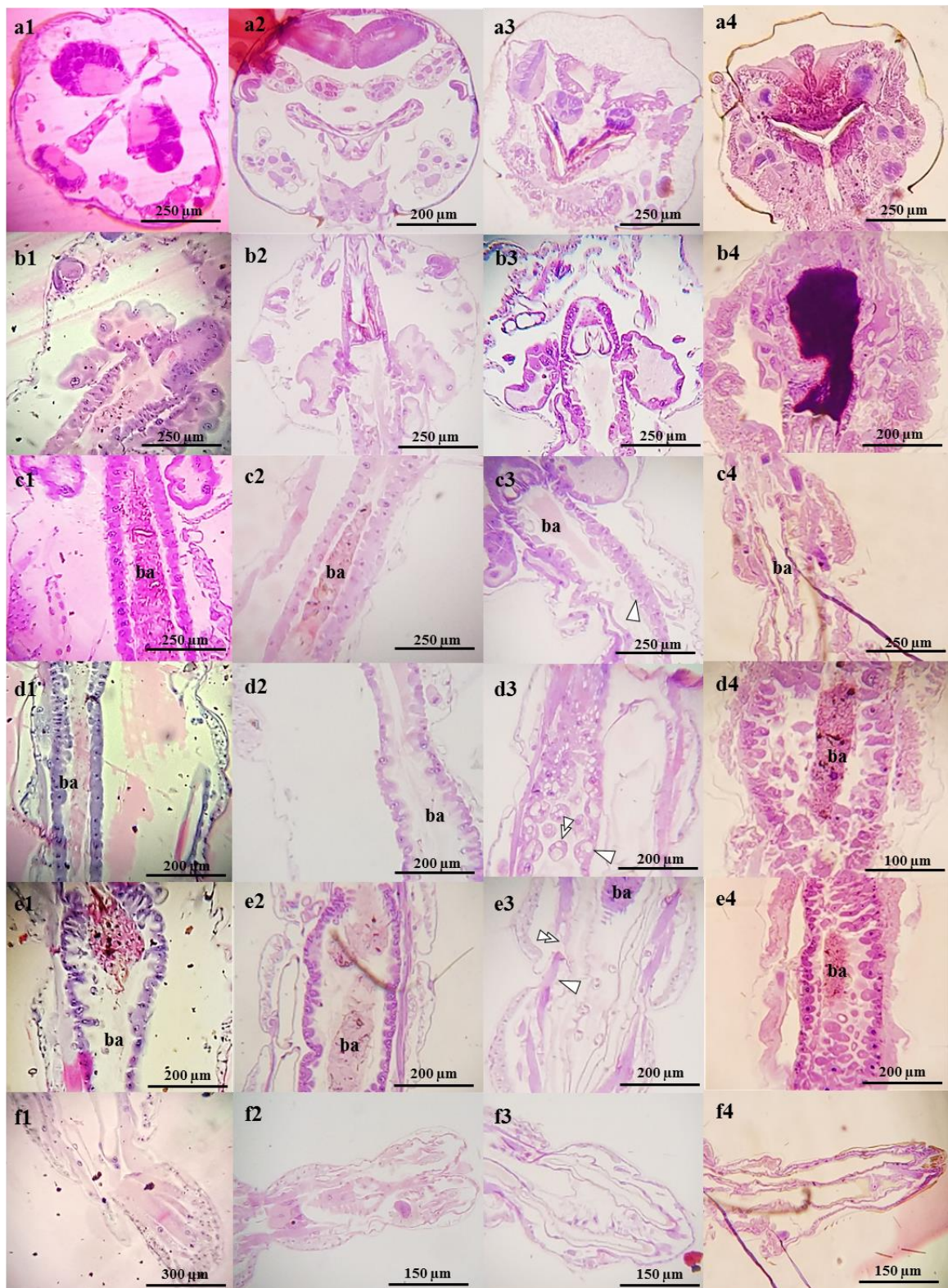


Figura 1: Fotomicrografia em microscopia de luz em transmissão em campo claro de larvas de terceiro instar de *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762) sobreviventes ainda com bolo alimentar (ba) no trato digestório após 24h de exposição a: **1:** água destilada; **2:** água destilada + DMSO 0,5%; **3:** CL₅₀ do óleo essencial de frutos maduros e imaturos de *Schinus terebinthifolia* Raddi. **4.** Larvas mortas após exposição 24h de exposição à CL₅₀ do óleo essencial de frutos maduros e imaturos de *Schinus terebinthifolia* Raddi. **a:** cabeça; **b:** tórax; **c:** mesêntero proximal; **d:** mesêntero mediano; **e:** mesêntero distal; **f:** sifão respiratório. Os danos celulares mais frequentemente observados foram a necrose (f3 e f4), acometendo principalmente o sifão das larvas sobreviventes (f3) e mortas (f4) após exposição à CL₅₀; além da vacuolização (seta) das células epiteliais do mesêntero, seguida de descamação (dupla seta) para a luz do órgão.

Referências

- Al-Mehmadi, R. M. and Al-Khalaf, A. A.** (2010). Larvicidal and histological effects of *Melia azedarach* extract on *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). *Journal of King Saud University – Science* **22(2)**, 77–85. doi:10.1016/j.jksus.2010.02.004.
- Antonio-Nkondjio, C., Fossog, B. T., Ndo, C., Djantio, B. M., Togouet, S. Z., Awono-Ambene, P., et al.** (2011). *Anopheles gambiae* distribution and insecticide resistance in the cities of Douala and Yaoundé (Cameroon): influence of urban agriculture and pollution. *Malaria Journal* **10**, 154-166. doi: 10.1186/1475-2875-10-154.
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., et al.** (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature* **496**, 504-507. doi: 10.1038/nature12060.
- Bradley, T.J.** (1987). Physiology of osmoregulation in mosquitoes. *Ann. Rev. Entomol.* **32**, 439-462.
- Choochote, W., Chaithong, U., Kamsuk, K., Jitpakdi, A., Tippawangkosol, P., Tuetun, B., et al.** (2007). Repellent activity of selected essential oils against *Aedes aegypti*. *Fitoterapia* **78**, 359–364. doi:10.1016/j.fitote.2007.02.006.
- Chowdhury, N., Ghosh, A. and Chandra, G.** (2008). Mosquito larvicidal activities of *Solanum villosum* berry extract against the dengue vector *Stegomyia aegypti*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **8**, 10-17. doi: 10.1186/1472-6882-8-10.
- Costa, M. S., Cossolin, J. F. S., Pereira, M. J. B., Sant’Ana, A. E. G., Lima, M. D., Zanuncio, J. C., Serrão, J. E.** (2014). Larvicidal and Cytotoxic Potential of Squamocin on the Midgut of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Toxins (Basel)* **6(4)**, 1169–1176. doi: 10.3390/toxins6041169.
- Dua VK, Kumar A, Pandey AC, Kumar S.** (2013). Insecticidal and genotoxic activity of *Psoralea corylifolia* Linn. (Fabaceae) against *Culex quinquefasciatus* Say, 1823. *Parasites and Vectors.* **6**, 30-42.
- Eskenazi, B., Bradman, A. and Castorina, R.** (1999). Exposures of children to organophosphate pesticides and their potential adverse health effects. *Environ Health Perspect* **107(Suppl 3)**, 409–419. PMID: PMC1566222.
- Fauci, A. S. and Morens, D. M.** (2016). Zika Virus in the Americas — Yet Another Arbovirus Threat. *The New England Journal of Medicine* **374**, 601-604. doi: 10.1056/NEJMp1600297.
- Gkinis, G., Michaelakis, A., Koliopoulos, G., Loannou, E., Tzakou, O. and Roussis, V.** (2014). Evaluation of the repellent effects of *Nepeta parnassica* extract, essential oil, and its major nepetalactone metabolite against mosquitoes. *Parasitology Research* **113(3)**, 1127-34. doi: 10.1007/s00436-013-3750-3.
- Govindarajan, M.** (2011). Evaluation of *Andrographis paniculata* Burm.f. (Family: Acanthaceae) extracts against *Culex quinquefasciatus* (Say.) and *Aedes aegypti*

(Linn.) (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **4**(3), 176-81. doi: 10.1016/S1995-7645(11)60064-3.

Gubler, D. J. (2001). Climate Variability and Change in the United States: Potential Impacts on Vector and Rodent-Borne Diseases. *Environmental Health Perspectives* **109**, 223-233. doi:10.1016/S1995-7645(11)60064-3.

Hallmann, C. A., Foppen, R. P. B., Van Turnhout, C. A. M., De Kroon, H. and Jongejans, E. (2014). Declines in insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations. *Nature* **511**, 341–343. doi:10.1038/nature13531.

Hayes, T. B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., Lee, M., Mai, V. P., Marjuoa, Y., Parker, J. and Tsui, M. (2006). Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact?. *Environmental Health Perspectives* **114** (Suppl 1), 40-50. doi:10.1289/ehp.8051.

Jentes, E. S., Poumerol, G., Gershman, M. D., Hill, D. R., Lemarchand, J., Lewis, R. F., Staples, J. E., Tomori, O., Wilder-Smith, A. and Monath, T. P. (2011). The revised global yellow fever risk map and recommendations for vaccination, 2010: consensus of the Informal WHO Working Group on Geographic Risk for Yellow Fever. *The Lancet. Infectious Diseases* **11**, 622-632. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70147-5.

Kato N, Mueller CR, Fuchs JF, Wessely V, Lan Q, Christensen BM. (2006). Regulatory mechanisms of chitin biosynthesis and roles of chitin in peritrophic matrix formation in the midgut of adult *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **36**, 1–9.

Kraemer, M. U., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A. Q., Shearer, F. M., Barker, C. M., et al. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife* **30**(4), e08347. doi: 10.7554/eLife.08347.

Leparc-Goffart, I., Nougairede, A., Cassadou, S., Prat, C. and De Lamballerie, X. (2014). Chikungunya in the Americas. *Lancet* **383** (9916), 514. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60185-9.

Marcondes, C. B. and Ximenes, M. F. (2015). Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes (Stegomyia)* mosquitoes. *Revista da Sociedade Brasileira e Medicina Tropical* **49**(1), 4-10. doi:10.1590/0037-8682-0220-2015.

Mishra, K. and Sharma, R.C. (2011). Assessment of organochlorine pesticides in human milk and risk exposure to infants from North-East India. *Science of the Total Environment* **409**, 4939–4949. doi:10.1016/j.scitotenv..07.038.

Mostafalou, S. and Abdollahi, M. (2013). Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology* **268**(2), 157–177. doi: 10.1016/j.taap.2013.01.025.

Pirsaheb, M., Limoe, M., Namdari, F. and Khamutian, R. (2015). Organochlorine pesticides residue in breast milk: a systematic review. *Medice Journal Islamic Republic Iran* **7** (29), 228. PMID: PMC4606957.

Pratti, D.L.A., Ramos, A.C., Scherer, R., Cruz, Z.M.A., Silva, A.G. (2015). Mechanistic basis for morphological damage induced by essential oil from Brazilian

pepper tree, *Schinus terebinthifolia*, on larvae of *Stegomyia aegypti*, the dengue vector. *Parasit. Vectors*. **8**, 136-145. doi 10.1186/s13071-015-0746-0

Procópio, T. F., Fernandes, K. M., Pontual, E. V., Ximenes, R. M., de Oliveira, A. R., Souza Cde, S., Melo, A. M., Navarro, D. M., Paiva, P. M., Martins, G. F. and Napoleão, T. H. (2015). *Schinus terebinthifolius* Leaf Extract Causes Midgut Damage, Interfering with Survival and Development of *Aedes aegypti* Larvae. *PLoS One* **10(5)**, e0126612. doi:10.1371/journal.pone.0126612.

Rauh, V. A.; Perera, F. P., Horton, M. K., Whyatt, R. M., Bansal, R., Hao, X. and Liu, J., et al. (2012). Brain anomalies in children exposed prenatally to a common organophosphate pesticide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - PNAS* **109(20)**, 7871–7876. doi: 10.1073/pnas.1203396109

Reinert, J. F., Harbach, R. E. and Kitching, I. J. (2004). Phylogeny and classification of Aedini (Diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages. *Zoological Journal Linnean Society* **142**, 289-368. doi: 10.1111/j.1096-3642.2004.00144.x

Sarwar, M. (2015) The Killer Chemicals as Controller of Agriculture Insect Pests: The Conventional Insecticides. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science* **1 (3)**, 141-147.

Shuman, E. K. (2010). Global Climate Change and Infectious Diseases. *The New England journal of medicine* **362(12)**, 1061-1063. doi: 10.1056/NEJMp0912931.

Silva WJ, Dória GAA, Maia RT, Nunes RS, Carvalho GA, Blank AF, Alves PB, Marçal RM, Cavalcanti SCH. (2012). Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. *Biochem Syst Ecol.* **35**, 670-675.

Silva, A. G., Almeida, D. L., Ronchi, S. N., Bento, A. C., Scherer, R., Ramos, A. C., Cruz, Z. M. A. (2012). The essential oil of Brazilian pepper, *Schinus terebinthifolia* Raddi in larval control of *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762). *Parasites & Vectors* **3**, 79. doi: 10.1186/1756-3305-3-79.

Trongtokit, Y., Rongsriyam, Y., Komalamisra, N. and Apiwathnasorn, C. (2005). Comparative Repellency of 38 Essential Oils against Mosquito Bites. *Phytotherapy Research* **19**, 303–309. doi: 10.1002/ptr.1637.

Van den Berg, H., Zaim, M., Yadav, R. S., Soares, A., Ameneshewa, B., Mnzava, A., Hii, J., Dash, A. P. and Ejov, M. (2012). Global Trends in the Use of Insecticides to Control Vector-Borne Diseases. *Environmental Health Perspectives* **120 (4)**, 577-582. doi: 10.1289/ehp.1104340.

World Health Organization (2012). *Global Plan for Insecticide Resistance Management in Malaria Vectors (GPIRM)*. WHO Global Malaria Programme. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

World Health Organization (2016). *Zika virus*. Fact sheet N°1. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Zheng, S., Chen, B., Qiu, X., Chen, M., Ma, Z. and Yu, X. (2016). Distribution and risk assessment of 82 pesticides in Jiulong River and estuary in South China. *Chemosphere* **144**, 1177-1192. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.09.050.