

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL

**AVALIAÇÃO DOS DANOS MORFOLÓGICOS E ESTRUTURAIS
SOFRIDOS POR LARVAS DO TERCEIRO INSTAR DE *Stegomyia*
aegypti, EXPOSTAS AO ÓLEO ESSENCIAL DE *Schinus*
terebenthifolia Raddi (Linnaeus, 1762).**

GEARDSON WILLIAN DA SILVA COSTA DE OLIVEIRA

VILA VELHA JANEIRO - 2020

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL

**AVALIAÇÃO DOS DANOS MORFOLÓGICOS E ESTRUTURAIS
SOFRIDOS POR LARVAS DO TERCEIRO INSTAR DE *Stegomyia*
aegypti, EXPOSTAS AO ÓLEO ESSENCIAL DE *Schinus*
terebenthifolia Raddi (Linnaeus, 1762).**

Dissertação apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Vegetal.

GEARDSON WILLIAN DA SILVA COSTA DE OLIVEIRA

VILA VELHA JANEIRO – 2020

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

O48a Oliveira, Geardson Willian da Silva Costa de

Avaliação dos danos morfológicos e estruturais sofridos por larvas do terceiro instar de *Stegomyia aegypti*, expostas ao óleo essencial de *Schinus terebenthifolia* Raddi (Linnaeus, 1762) / Geardson Willian da Silva Costa de Oliveira – 2020.

38 f.; il.

Orientador: Ary Gomes da Silva.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal),
Universidade Vila Velha, 2020.

CDD 614.571

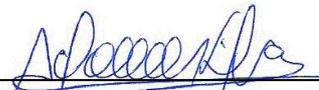
GEARDSON WILLIAN DA SILVA COSTA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DOS DANOS MORFOLÓGICOS E ESTRUTURAIS
SOFRIDOS POR LARVAS DO TERCEIRO INSTAR DE *Stegomyia
aegypti*, EXPOSTAS AO ÓLEO ESSENCIAL DE *Schinus
terebenthifolia* Raddi (Linnaeus, 1762).**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Vegetal.

Aprovada em 22 de janeiro de 2020,

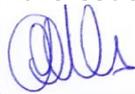
Banca Examinadora:



Ary Gomes da Silva (UVV-ES)



Alessandro Coutinho Ramos (UVV-ES)



Christiane Mileib Vasconcellos (UVV-ES)



Frederico Jacob Eutrópico (Multivix-ES)

AGRADECIMENTOS

Registro aqui a satisfação de agradecer a todos, que direto ou indiretamente participaram nesta minha caminhada permitindo assim chegar até aqui.

Com sorte e capacidade oferecer este trabalho a academia dotada de excelente corpo docente, funcionários e colegas colaboradores. Da sorte minha conhecê-los, e sendo assim, agradeço ao Criador a incalculável magnificência da sua grandiosa obra a qual somos parte. A meus pais biológicos e ao meu pai que me criou. A meus saudosos e compreensivos amigos. Aos colegas discentes André, Beatriz, Geanderson e a todos os colegas do Programa de Biotecnologia Vegetal da UVV e UENF a qual tive contato. Aos demais Programas da instituição a qual dividimos aulas, conhecimento e trabalhos. Ao Laboratório de Ecologia pelos equipamentos e espaço fornecidos.

Também agradeço ao meu orientador Ary Gomes da Silva por aceitar conduzir meu trabalho de pesquisa. Por fim agradeço a coordenadora, integrante presidente da banca Christiane Mileib por todo preparo e sugestões, assim como, Alessandro Coutinho e Frederico Jacob que me foram valiosos em elevar o grau apresentado por este trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1. <i>Schinus terebenthifolia</i> Raddi (Linnaeus, 1762).....	11
1.2. <i>Stegomyia aegypti</i>	13
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivo geral.....	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Coleta dos materiais vegetais.....	17
3.2. Extração do óleo essencial.....	17
3.3. Perfil fitoquímico dos óleos essenciais.....	17
3.4. Ensaio biológico com larvas de <i>Stegomyia aegypti</i>	18
3.5. Análise microscópica das larvas.....	19
3.6. Análises estatísticas dos dados.....	19
4. RESULTADOS.....	21
4.1. Obtenção e purificação dos óleos essenciais.....	21
4.2. Perfil fitoquímico dos óleos essenciais.....	21
4.3. Ensaio biológico com larvas de <i>Stegomyia aegypti</i>	22
4.4. Danos morfológicos e estruturais.....	24
5. DISCUSSÃO.....	27
5.1. Óleo essencial.....	27
5.2. Ensaio biológico com larvas de <i>Stegomyia aegypti</i>	28
5.3. Danos morfológicos e estruturais nas larvas.....	30
6. CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

RESUMO

GEARDSON WILLIAN DA SILVA COSTA DE OLIVEIRA, Universidade Vila Velha – ES, janeiro de 2020. AVALIAÇÃO DOS DANOS MORFOLÓGICOS E ESTRUTURAIS SOFRIDOS POR LARVAS DO TERCEIRO INSTAR DE *Stegomyia aegypti*, EXPOSTAS AO ÓLEO ESSENCIAL DE *Schinus terebenthifolia* Raddi (Linnaeus, 1762). Orientador: Ary Gomes da Silva.

O principal vetor de doenças como dengue, zika e chikungunya é o *Stegomyia aegypti* e a cada ano essas doenças têm aumentado o número de casos devido a inexistência de vacinas e ao uso de forma contínua e com concentrações cada vez maiores de inseticidas sintéticos. Esses inseticidas, principalmente os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretroides sintéticos são extremamente tóxicos e uma alternativa ao uso dessas substâncias são os óleos essenciais de *Schinus terebenthifolia*. Dentre as propriedades do óleo essencial da aroeira destacam-se o seu potencial inseticida, repelente e larvicida. Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar microscopicamente os danos morfológicos e estruturais em larvas de mosquito *Stegomyia aegypti* causados pela exposição à concentração letal média (CL₅₀) do óleo essencial de frutos imaturos de *Schinus terebenthifolia*. As larvas de *Stegomyia aegypti* foram expostas a concentrações crescentes de óleo essencial de *Schinus terebenthifolia* (concentração de 1,563; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 e 800 ppm). a fim de determinar a CL₅₀. Após a determinação da concentração letal (CL₅₀), as larvas foram submetidas a análise microscópica com a finalidade de determinar os danos morfológicos causados pelo óleo essencial. As larvas expostas ao óleo essencial na CL₅₀ apresentam perda expressiva da estruturação do tórax e do epitélio do mesêntero em sua porção proximal, mediana e distal, e do sifão respiratório que sofre perda praticamente total de sua organização.

PALAVRAS-CHAVE: *Aedes aegypti*; Larvicida; Óleo essencial; Aroeira.

ABSTRACT

GEARDSON WILLIAN DA SILVA COSTA DE OLIVEIRA, University of Vila Velha – ES, January of 2020. EVALUATION OF MORPHOLOGICAL AND STRUCTURAL DAMAGE SUFFERED BY LARVES OF THE THIRD INSTAR OF *Stegomyia aegypti*, EXPOSED TO THE ESSENTIAL OIL OF *Schinus terebenthifolia* Raddi (Linnaeus, 1762). Advisor: Ary Gomes da Silva.

The main vector of diseases such as dengue, Zika and Chikungunya is *Stegomyia aegypti* and each year these diseases have increased the number of cases due to the lack of vaccines and the continuous use of synthetic insecticides. These insecticides, mainly organochlorines, organophosphates, carbamates and synthetic pyrethroids are extremely toxic and an alternative to the use of these substances are the essential oils of *Schinus terebenthifolia*. Among the properties of the essential oil of Brazilian pepper stand out its potential insecticide, repellent and larvicide. Therefore, the objective of this work was to microscopically evaluate the morphological damage in larvae of *Stegomyia aegypti* mosquito caused by exposure to the lethal mean concentration (LC₅₀) of the essential oil of immature fruits of *Schinus terebenthifolia*. The larvae of *Stegomyia aegypti* were exposed to growing essential oil systems of *Schinus terebenthifolia* (concentration of 1.563; 3.125; 6.25; 12.5; 25; 50; 100; 200; 400 and 800 ppm) in order to determine the LC₅₀. After determining the lethal concentration (LC₅₀), the larvae were subjected to microscopic analysis to determine the morphological damage caused by the essential oil. The larvae exposed to essential oil in the LC₅₀ show a significant loss of the structure of the thorax and of the mesenteric epithelium in its proximal, median and distal portion, and of the respiratory siphon that suffers total loss of its organization.

KEYWORDS: *Aedes aegypti*; Larvicide; Essential oil; Brazilian pepper.

1. INTRODUÇÃO

Uma das mais antigas formas de tratamento contra enfermidades utilizadas pela humanidade são as plantas medicinais, sendo um recurso contra uma diversidade de doenças e desempenha um papel importante na medicina tradicional de vários países como na cultura Ayurveda (Índia), na medicina tradicional chinesa (Mehta *et al*; 2015) e na medicina tradicional brasileira (Santos *et al.* 2011).

A utilização das propriedades biológicas dos compostos extraídos de plantas aromáticas e medicinais tem se intensificado com o propósito de serem aplicados na conservação de alimentos e no controle de enfermidades de origem microbiana em humanos, animais e vegetais (Silva *et al.*, 2010). Esses compostos extraídos são chamados de óleos essenciais que são substâncias aromáticas presentes em muitos órgãos vegetais aos quais se concentram a maior quantidade de fitoconstituintes com propriedades biológicas ativas (Santos *et al*; 2009). Entre estas propriedades, vários foram descritos possuindo atividade: antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante, antiparasitária, inseticida (Ahmad e Beg, 2001; Benoit-Vical *et al*; 2001; Martínez *et al*; 1996).

Esses compostos químicos essenciais, chamados de metabólitos, são sintetizados pelas plantas a partir de nutrientes, minerais, CO₂, água e luz e podem ser divididos em dois grupos, os metabólitos primários (lipídios, protídios e glicídios) e os chamados metabólitos secundários que são compostos de estruturas complexas, de baixo peso molecular, encontrados em pequenas concentrações e em grupos distintos de plantas (Von Poser e Mentz, 2003). Dentre os principais constituintes dos óleos essenciais ou metabólitos secundários nas plantas, destacam-se os monoterpenos e sesquiterpenos (Taiz e Zeiger, 2009; Knaak, 2010).

Dependendo da família botânica, os óleos essenciais podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como pêlos glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae), canais oleíferos (Apiaceae) ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Pinaceae, Rutaceae), podendo ser estocado em certos órgãos como flores, folhas, cascas dos caules, madeira, raízes, rizomas, frutos e sementes (Simões *et al.*, 2004). Na espécie *Schinus terebenthifolia* Raddi, os óleos essenciais encontram-se presentes nas folhas, frutos, galhos, cascas e inflorescência (Ibrahim *et al.* 2004; Santos *et al* 2004). Alguns trabalhos com a espécie *S. terebenthifolia*, destacam que as cascas, folhas e frutos podem ser utilizados como fonte de substâncias e com isso vem despertando grande

interesse para a pesquisa (Lima et al., 2006; Cerkus et al., 2007; Johann et al., 2007; El-Massry et al., 2009; Bendaoud et al., 2010; Bernardes et al., 2011; Johann et al., 2010a,b; Machado et al., 2012).

S. terebenthifolia (aroeira vermelha) pertence à família Anacardiaceae, é uma espécie nativa da costa brasileira, entretanto é encontrada em algumas regiões da Europa, África, Ásia, algumas partes da América Central e do Norte, principalmente nos Estados Unidos, onde foi introduzida para fins ornamentais. No Brasil ocorre espontaneamente na costa litorânea, em áreas remanescentes da Mata Atlântica, e em outros tipos de formações vegetais, devido a sua grande plasticidade ecológica (Barbosa et al., 2007; Cerkus et al., 2007; Santos et al., 2007; Carvalher-Machado, 2008; Affonso et al., 2012; Montanari et al., 2012).

A demanda de consumo dos frutos de *S. terebenthifolia* como condimento, tem aumentado muito, tanto no mercado nacional como no internacional. Seus frutos são utilizados em várias preparações, na forma de grãos inteiros ou moídos para o preparo de molhos, carnes de aves e peixes, salames, chocolates e massas (Degáspari, et al., 2004; Lenzi & Orth, 2004; Bertoldi, 2006). Atualmente o óleo essencial dos frutos de *S. terebenthifolia* tem recebido atenção pelas suas propriedades larvicida, inseticida e repelente contra o mosquito *Stegomyia aegypti*, transmissor do vírus da dengue (Cole, 2008) e inseticida para o mosquito *Anopheles gambiae* transmissor da malária e o mosquito doméstico *Culex quinquefasciatus* (KWEKA et al., 2011).

Os mosquitos são os principais agentes transmissores de doenças, como a malária, dengue, febre amarela, chikungunya, zika, filariose, encefalite japonesa, dentre outras (Govindarajan 2010). O *Stegomyia aegypti* é a mais importante espécie de mosquitos com impacto sobre a saúde pública em vários países do mundo, podendo ser encontrado em regiões tropicais e subtropicais das Américas, África e Ásia, assim como, sudeste dos Estados Unidos, ilhas do Oceano Índico e no norte da Austrália (Soumahoro et al 2010).

A dengue, doença transmitida pelo *S. aegypti*, ocorre em mais de 100 países e ocorre em áreas urbanas, peri-urbanas e rurais dos trópicos e subtropicais. É uma doença endêmica na África, nas Américas, no leste do Mediterrâneo, no Sudeste Asiático e no Oeste do Pacífico (Cole, 2008). O crescimento de casos de dengue nos países em desenvolvimento se deve principalmente ao crescimento desordenado e a falta de serviços básicos como estrutura de fornecimento de água,

esgoto e coleta de lixo, propiciando condições favoráveis à multiplicação do mosquito vetor (BRICKS, 2004).

Esta doença é a mais frequente das infecções arbovirais humanas, causado por um Flavivírus com 4 sorotipos distintos (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4), transmitidos pela picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes*, destacando-se o *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) como principal espécie transmissora (Arruda et al., 2003; Ferreira et al., 2005).

No Brasil, há registros de casos de dengue desde o ano de 1846 e em 2019 foram registrados cerca de 1.544.98 casos de dengue no Brasil, com casos ocorrendo em todos os estados brasileiros (Brasil 2020a). A doença apresenta um padrão sazonal, com maior incidência de casos entre os meses de janeiro a maio, período mais quente e úmido, típico dos climas tropicais. Todos os quatro sorotipos já foram registrados no Brasil, o sorotipo DEN-1 causou epidemias no Rio de Janeiro em 1986, o DEN-2, foi introduzido em 1990, e o DEN-3 no ano 2000, já o sorotipo DEN-4 foi erradicado no território brasileiro, porém foi um dos primeiros a ser isolado em 1981 no estado de Roraima em uma epidemia de dengue ocorrida em Boa Vista (Nogueira et al., 2001).

Para as doenças relacionadas ao vetor *Stegomyia aegypti*, até o mês de agosto de 2020, o Brasil registrou 918.773 casos de dengue; 63.928 casos de chikungunya e 5.783 casos de zika (Brasil 2020b). Considerando os dados para o estado do Espírito Santo, até o mês de agosto de 2020, a Chikungunya corresponde a 20,6% dos casos registrados no Brasil (13.188 casos), para a Dengue foram registrados 7.416 casos), e Zika 97 casos (Brasil 2020b). A elevada incidência de casos está associada a plasticidade ecológica do vetor *Stegomyia aegypti* e ao fato dessas doenças estarem adaptadas às dinâmicas sociais e ao ambiente das cidades (Johansen et al., 2016). Além disso a elevada incidência de casos pode estar associada ao uso intensivo e em concentrações cada vez maiores de inseticidas, acarretando uma maior resistência aos produtos nos mosquitos de *Stegomyia aegypti*, alterando o ciclo cronológico do ambiente e podendo atingir diretamente espécies que corroboram com o equilíbrio ambiental (Luna et al., 2013; Antonio-Nkondjio et al 2011; OMS, 2010).

Devido a inexistência de vacinas para esses tipos de doenças, o controle se baseie em ações antivetoriais (Lang, 2012; WHO, 2009), podendo ser realizado por meio de controle químico, físico, biológico ou integrado, usando métodos simultâneos (Neves et al 2007). O controle físico baseia-se na eliminação de criatórios

do mosquito, locais que acumulam água que serviriam de habitat para as larvas (Cavalcanti et al 2007; Costa et al 2005; Corrêa et al 2005). O controle biológico consiste em utilizar outros organismos capazes de combater os mosquitos e/ou larvas, como o trabalho de Hoffmann e Turelli (2013) que descreve a utilização de mosquitos infectados com a bactéria *Wolbachia*, a fim de bloquear a transmissão de agentes patogênicos.

Todavia, o controle químico é o mais aplicado, sendo feito por substâncias que interferem no ciclo de vida do vetor, prevalecendo o uso de inseticidas sintéticos, relacionados a quatro classes, os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretroides sintéticos, que são as classes recomendadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para pulverização interna (WHO 2012; Neves et al 2007). Esse tipo de controle apresenta-se de forma rápida e eficaz, entretanto, em longo prazo traz sérios prejuízos ao meio ambiente, devido sua toxicidade e capacidade de permanecerem longos períodos no meio, poluindo água, solo, ar e os seres vivos (Cavalcanti et al 2007; Dória et al 2008).

Frente a tantos malefícios gerados pelos inseticidas sintéticos e à elevada biodiversidade da flora brasileira, muitos pesquisadores têm se dedicado a estudos relativos ao uso de produtos naturais que demonstrem potencial inseticida, repelente e larvicida (Nerio et al 2010; Ghosh et al 2012; Silva et al 2010). Neste contexto a espécie *Schinus terebenthifolia* vem sendo bastante estudada em relação a ação larvicida do óleo essencial desta planta sobre larvas de *Stegomyia aegypti* (Pratti et al., 2015; Silva et al., 2010). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar microscopicamente os danos morfológicos e estruturais em larvas de mosquito *Stegomyia aegypti* causados pela exposição à concentração letal média dos óleos essenciais de frutos imaturos de *Schinus terebenthifolia*.

1.1. *Schinus terebinthifolia* Raddi (Linnaeus, 1762)

Schinus terebinthifolia Raddi popularmente conhecida como aroeira, é uma espécie florestal nativa do Brasil, cujos conhecimentos científicos são recentes. Pertence à família *Anacardiaceae*, é heliófita, perenifólia e dióica, comum em beira de rios, e várzeas úmidas de formações secundárias (Montanari et al., 2012; Cerkus et al., 2007; Lorenzi, 1998). Apresenta ampla distribuição na América do Sul e no Brasil ocorre por toda a costa litorânea, em áreas remanescentes da Mata Atlântica, e em outros tipos de formações vegetais, devido a sua grande plasticidade ecológica (AFFONSO et al., 2012; BARBOSA et al., 2007; CARVALHER-MACHADO, 2008; SANTOS et al., 2007; LENZI & ORTH, 2004).

Considerada uma árvore mediana, de 5 a 10 m de altura, é perenifólia e apresenta copa larga, o tronco pode atingir de 30 a 60 cm de diâmetro com casca grossa, mas é frequentemente menor em encostas e solos mais pobres. As folhas são compostas de 3 a 10 pares de folíolos imparipinados, aromáticos e medindo de 3 a 5 cm de comprimento por 2 a 3 cm de largura. Apresentam flores pequenas, masculinas e femininas, em panículas piramidais e frutos drupas, de coloração verde no início e de um vermelho brilhante e vivo quando maduro, de 4 a 5 mm de diâmetro, aromáticos e adocicados, conferindo uma beleza notável à árvore. A mesma pode ser cultivada a partir de sementes ou por estaquia (DEGÁSPARI et al., 2005; GILBERT; FAVORETO, 2011). A madeira da aroeira é utilizada na carvoaria e na construção de cercas, as cascas são utilizadas na extração de taninos para a indústria do curtume e as flores são melíferas (ALLARDICE et al., 1999).

A aroeira recebe vários nomes populares, sendo conhecida popularmente como aroeira-brasileira, aroeira pimenteira, aroeira precoce, aroeira do campo, aroeira da praia, aroeira negra, aroeira branca, aroeira vermelha, aroeira mansa, aroeira do brejo, aroeira do sertão, fruto de raposa, fruto do sabiá, coração de bugre, cambuí, bálsamo, aroeira do Paraná, aguaraiaba e careiba (Affonso et al., 2012; Barbosa et al., 2007; Clemente, 2006). As denominações atribuídas internacionalmente à espécie são: Brazilian pepper, Brazilian holly, Brazilian pepper tree, Christmas berry e Florida holly (EUA), Mexican pepper, pimienta de Brasil (Porto Rico), Poivre de Bourbon, poivre rose, Poivrier d'Amérique (França), Rosa Pfeffer, Rosa Beeren, Brasilianischer Pfeffer (Alemanha), Pepe rosa, Schino brasiliano e Balsame delle Missioni (Itália) (Bertoldi, 2006).

O interesse científico-tecnológico, por esta espécie se deve ao seu potencial terapêutico (RIBAS *et al.*, 2006); atividade antioxidante (DEGÁSPARI *et al.*, 2004; CERUKS *et al.*, 2007); atividade antimicrobiana (DEGÁSPARI *et al.*, 2005; GEHRKE *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2007; FRANCO *et al.*, 2007); aproveitamento de seus óleos essenciais em aplicações farmacêuticas (SILVA *et al.*, 2011; CAMPOS *et al.*, 2010, ARAUJO, 2010). A casca, as folhas e frutos da espécie *S. terebinthifolia* vem sendo relatados como os principais órgãos utilizados para a obtenção dos óleos essenciais e de diversos outros compostos ativos, despertando assim um grande interesse para a pesquisa (BENDAOU et al., 2010; BERNARDES et al., 2011; CERUKS et al., 2007; EL-MASSRY et al., 2009; JOHANN et al., 2007; JOHANN et al., 2010a,b; LIMA et al., 2006; MACHADO et al., 2012). Estudos fitoquímicos de *S. terebinthifolia* detectaram a presença de compostos fenólicos simples, flavonoides, taninos, esteróides, triterpenos, antraquinonas, saponinas (DEGÁSPARI et al., 2005; BARBOSA et al., 2007; MOURA et al., 2007; SANTOS et al., 2007), além de terebinthona, o ácido hidroximasticadienóico, o ácido terebinthifólico e o ácido ursólico (LIPINSKI et al., 2012).

De todos os resultados da metabolização de compostos sintetizados pela planta, fazem parte do grupo de substâncias com maior número de compostos biologicamente ativos, os alcalóides e os óleos essenciais. Estes últimos atuam como inibidores da germinação, na proteção contra perda de água e aumento da temperatura, na proteção contra predadores e na atração de polinizadores (SANTOS et al., 2007). Na análise do óleo essencial obtido de frutos maduros, Gehrke et al. (2007) evidenciaram os monoterpenos α -3-careno e α -pineno, e os sesquiterpenos β -gurjuneno, *cis*- β -guaieno, *trans*- β -guaieno, α -muuroleno, *trans*-calameno, cubenol e epi- α -muurolol, já Barbosa et al. (2007) destacaram o α -cadinol, elemol e germacreno-D, como preponderantes. Nos frutos imaturos Barbosa et al. (2007) evidenciou o predomínio de sesquiterpenos α -cadinol, α -cadineno, epi- α -muurolol.

A espécie *S. terebinthifolia* é utilizada como planta medicinal há muitos anos, a aroeira está entre as 39 espécies medicinais citadas por naturalistas que viajaram pelo Brasil no século 19 e que são listadas na 1ª Farmacopéia Brasileira de 1926 (Brandão et al., 2008). As ações terapêuticas de *S. terebinthifolia* podem ser atribuídas a diversificada presença de substâncias que estão distribuídos em seus órgãos, como folhas, cascas, frutos, flores e sementes. Isso justifica o uso medicinal popular desta planta como, por exemplo, antiinflamatória, cicatrizante, géis para

tratamento ginecológico (BULLA et al., 2015; CARVALHO et al., 2013; BRANCO et al., 2006; RIBAS et al., 2006; DEGÁSPARI et al., 2005).

A atividade antimicrobiana foi relatada por diversos autores, principalmente para as espécies *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus albunse*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Bacillus subtilis* (CARVALHO et al., 2013; GUNDIDZA et al., 2009; SANTOS, 2007). A ação antifúngica de extratos de *S. terebinthifolia* ou de seus óleos essenciais foram relatadas para as seguintes espécies fúngicas, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Botrytis* spp, *Candida glabrata* e *Sporothrix schenckii* (CARVALHO et al., 2013; SANTOS et al., 2010; GUNDIDZA et al., 2009; JOHANN et al., 2007). Por sua vez, Bendaoud et al. (2010) mostraram que os componentes ativos do óleo essencial dos frutos da aroeira possuem atividade anticancerígena contra o modelo de câncer de mama humano (MCF-7).

Já Cole (2008) e Proccópio et al (2015), utilizando o óleo essencial de *S. terebinthifolia*, registrou atividade larvicida, inseticida e repelente contra o mosquito *Aedes aegypti*, transmissor do vírus da dengue, enquanto Kweka et al. (2011) evidenciaram a ação inseticida para o mosquito *Anopheles gambiae* transmissor da malária e o mosquito doméstico *Culex quinquefasciatus*. Há relatos que a planta também possui efeito tripanocida (SARTORELLI et al., 2012), uma possível ação antidepressiva (PICCINELLI et al., 2015), efeito hepatoprotetor (ABDOU et al., 2015) e fotoprotetor (BULLA et al., 2015). Em animais a *S. terebinthifolia* possui ação contra a peritonite secundária (MELO et al., 2014), emprego na cicatrização de gastrorrafias (SANTOS et al., 2006) e de lesões operatórias na bexiga (LUCENA et al., 2006).

1.2. *Stegomyia aegypti*

O mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762), pertence a Classe Insecta, Ordem Diptera e a Família Culicidae, seu ciclo de desenvolvimento ocorre em quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto e é o principal vetor do vírus da Dengue no Brasil. O habitat de *S. aegypti* está adaptado ao meio urbano, ligado às condições domiciliares ou peridomiciliares (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; SILVA, 2003). Farnesi et al. (2009). Ao longo de sua evolução, esse culicídeo desenvolveu um comportamento estritamente sinantrópico e antropogênico, sendo considerado a espécie de mosquito mais dependente do ambiente urbano e por isso vem evoluindo junto ao homem (NATAL, 2002). A urbanização sem controle e a

deficiência nos serviços de saneamento básico constitui um importante fator de permanência de *S. aegypti* nas cidades (SILVA et al., 2003; TAUIL, 2002). Segundo GÓMEZ et al. (2001) as residências que apresentam maiores probabilidade de abrigar larvas de mosquito são aquelas com menores condições de higiene.

Para Tilak et al (2004) a preferência do *S. aegypti* por depósitos artificiais contribui para o aumento da concentração populacional do mosquito, criando condições ideais para a oviposição. Esses ambientes artificiais se tornam um dos principais fatores responsáveis pela distribuição dos mosquitos nos criadouros e sua subsequente dispersão em diferentes áreas geográficas. Bessera et al. (2006) mostram que o desenvolvimento do mosquito é controlado por variáveis climáticas como temperatura, precipitação e umidade o que pode diminuir ou prolongar a sobrevivência do mosquito. Coutinho et al. (2004) evidencia que a sobrevivência dos mosquitos adultos tem sido apontada como um fator influente em epidemias e na sobrevivência do mosquito durante o inverno. Na natureza, o ciclo de vida do mosquito se completa em torno de 30 a 35 dias, dependendo das condições citadas acima (FUNASA, 2001). O ovo de *S. aegypti* quando entra em contato com a água demora 48 horas para eclodir, entretanto em condições adversas (ausência de água e baixa umidade) o ovo pode entrar em estado de latência por até 450 dias (FUNASA, 2001; TAUIL, 2002). Dessa forma, quando as chuvas começam, há no ambiente uma população de ovos de mosquito e assim a população se restabeleceria rapidamente.

Natal (2002) cita que a fêmea de *S. aegypti* é muito ágil ao picar e que em seus ciclos reprodutivos, após cada oviposição, a fêmea ficará faminta e responderá aos estímulos atrativos de um hospedeiro. Esses contatos conferem ao mosquito seu papel epidemiológico na transmissão de doenças, destacando-se a dengue. Esse mosquito é vetor eficiente do vírus da dengue especialmente por causa de seu comportamento hematófago intermitente, podendo assim se alimentar em mais de um hospedeiro durante um único ciclo gonotrófico (MACKENZIE et al., 2004). Por isso entender as formas de dispersão do mosquito podem contribuir para o controle do vetor e conseqüentemente para o controle de doenças.

A dispersão do mosquito ocorre devido ao transporte passivo das formas imaturas, principalmente dos ovos, que podem permanecer longos períodos em condições de dessecação, enquanto a dispersão ativa dos adultos é reduzida, sendo restrita a autonomia de voo de aproximadamente 100 metros (GADELHA; TODA 1985). Para Natal (2002) se os objetos plásticos não forem reciclados ou coletados e conduzidos a um destino adequado, é quase certo que, abandonados no ambiente,

serão ótimos criadouros do mosquito em questão. Por isso, para um efetivo controle populacional do mosquito, os cuidados como o meio ambiente são imprescindíveis. O combate e prevenção são feitos pelo monitoramento e controle da população do mosquito vetor, na tentativa de reduzir os índices de infestação (Gubler, 1989; WHO, 2009; Luz et al., 2011) e conseqüentemente, os casos da doença. No Brasil, três formas de controle populacional do vetor são amplamente utilizadas: controle químico por larvicida e adulticida e controle mecânico através da remoção dos criadouros (DONALÍSIO; GLASSER, 2002). Os controles feitos por inseticidas ao mesmo tempo em que são indispensáveis, causam resistência da população de mosquito (BRAGA; VALLE, 2007; BRAGA et al. 2004; MACORIS et al. 1997) e impacto ambiental, muitas vezes comprometendo a efetividade da aplicação (BARRETO, 2005), por isso o uso de produtos biológicos para o combate ao vetor são tão importantes.

Casos de resistência do mosquito aos inseticidas têm sido reportados no Brasil e no mundo. Macoris et al. (1995), em Goiânia, relatam uma alteração de suscetibilidade ao Temephos, já que sua eficiência na mortalidade do mosquito foi baixa na concentração de 0.01mg/l, enquanto para outras cidades isso não aconteceu. A FUNASA (1999), atendendo a essa preocupação, realizou um estudo envolvendo mais cidades e inseticidas para evidenciar a alteração de suscetibilidade ao Temephos, Fenitrothion e Malation em algumas cidades do Brasil. Esses estudos motivaram a continuação do monitoramento de resistência no Brasil, no entanto, o país enfrenta ainda alguns problemas de infraestrutura nessa área (BRAGA; VALLE, 2007). Dessa forma, o controle biológico do vetor passa a ser uma alternativa viável e neste contexto, o óleo essencial das folhas de *S. terebinthifolia* demonstrou ser bastante eficiente.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os danos estruturais e ultraestruturais das larvas submetidas ao óleo essencial de frutos imaturos de *S. terebenthifolia*.

2.2. Objetivos específicos

Extração do óleo essencial dos frutos imaturos de *S. terebenthifolia*;

Determinação da densidade do óleo essencial extraído de frutos imaturos;

Determinação do perfil fitoquímico do óleo essencial dos frutos imaturos de *S. terebenthifolia*.

Avaliação dos danos produzidos nas larvas expostas a CL₅₀ do óleo essencial de frutos imaturos de *S. terebenthifolia*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta dos materiais vegetais

Os frutos maduros e imaturos de *Schinus terebenthifolia* Raddi foram coletados de espécimes ocorrentes na Área de Proteção Ambiental de Setiba – APA-Setiba – Guarapari, Brasil. O espécime foi identificado pelo Prof. Dr. Ary Gomes da Silva e a exsicata desta planta foi depositada no Herbário UVV-ES, sob o número de registro 1526.

3.2. Extração dos óleos essenciais

Cada extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação em aparelho de Clevenger a partir de 10 amostras de 100g de frutos imaturos de *S. terebenthifolia*. Cada processo de extração durou cerca de uma hora, contadas a partir da ebulição da amostra, com aquecimento mantido na temperatura mínima necessária à ebulição. Os frutos utilizados foram previamente triturados com água deionizada e transferidos para o balão do sistema de Clevenger (Handa et al 2008). As extrações foram realizadas no laboratório de Ecologia Funcional da UVV. Após cada extração, as amostras obtidas de óleos essenciais foram transferidas para um frasco de vidro, rotulado e sua purificação foi feita por separação da água remanescente por congelamento, o óleo essencial que estava na fase líquida, foi drenado do frasco. A densidade de cada óleo essencial foi determinada gravimetricamente por pesagem 1 mL de líquido a 20°C, em sala climatizada com temperatura controlada.

3.3. Perfil fitoquímico dos óleos essenciais

A análise cromatográfica dos componentes do óleo essencial 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, tanto em n-hexano como solvente. O sistema utilizado em GC-MS foi um cromatógrafo a gás, Thermo Scientific® Ultra GC acoplado a um espectrômetro de massa Thermo Scientific®. A coluna de sílica fundida utilizada foi uma DB-5 J & W Scientific (30 m × 0,25 mm × 0,25 mm). Tendo o Hélio 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/sec, na faixa de m/z 40-500 (Adams 2009). Os tempos de retenção dos componentes da amostra e uma mistura de n-alcenos 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 óleos essenciais, que foi realizada no Laboratório de Ecologia Funcional da UVV, por meio da 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 os disponíveis na literatura (Adams 2009).

3.4. Ensaio biológico com larvas de *Stegomyia aegypti*

Para o ensaio biológico os ovos de *S. aegypti* foram obtidos pela colocação de armadilhas, denominadas ovitrampas, nas dependências da Universidade, próximo a árvores e plantas no Campus. Essas ovitrampas consistem em baldes pretos de plástico com água e paletas de Eucatex® para que os ovos fiquem aderidos. Após a obtenção, os ovos foram incubados em 3L de água natural e suprimento alimentar para peixes para eclosão de larvas, que permaneceram neste ambiente até alcançar o 3º estágio de vida.

Para testar o efeito larvicida do óleo essencial de frutos imaturos de *S. terebenthifolia*, foram preparadas dez diluições do óleo essencial num gradiente de concentração de 1,563; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 e 800 partes por milhão (ppm). Cada tratamento foi utilizado cinco réplicas e cada réplica recebeu 10 larvas vivas. A contagem de larvas sobreviventes foi realizada após 0, 24, 48 e 72 horas após a inoculação, tendo como critério de sobrevivência a capacidade de locomoção ascendente para respirar (WHO, 2005). Como controle, foi realizado um ensaio para avaliar a sobrevivência das larvas, em solução de Dimetilsulfóxido – DMSO – a 0,5% em água deionizada.

Posteriormente, após estabelecer estatisticamente a concentração letal capaz de matar 50% do lote experimental, novo ensaio foi realizado com essa concentração, onde as larvas permaneceram nesse meio por 24h. Após esse tempo as larvas vivas e mortas foram separadas e fixadas em solução de FAA 50 (Ácido acético 3%, formaldeído 10%, álcool etílico 50% e água q.s.p 100mL).

3.5 Análise microscópica das larvas

Para os estudos anatômicos e histomorfológicos foram utilizadas as larvas fixadas em FAA 50 após os ensaios biológicos. Essas larvas foram 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 (Leica galen III) e as imagens foram obtidas através da câmera Samsung 12Mp, acoplada ao microscópio.

3.6 Análises estatísticas dos dados

A diversidade química do óleo essencial de frutos imaturos de *S. terebenthifolia* foi estimada pelo índice de Diversidade de Shannon-Weaver (H') e a equitabilidade foi estimada pelo índice J de Pielou, (Ludwing and Reynolds, 1988).

Como as taxas de mortalidade não puderam ser normalizada pelo arco-seno transformação, uma regressão logística binária foi realizada a partir de um modelo probístico, tendo as concentrações 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 concentração ou tempo de exposição ao óleo essencial através de um modelo probístico tendo como base de transformação o logaritmo neperiano (Hosmer e Lemeshow, 1989). As concentrações letais CL_{50} , CL_{90} , CL_{95} e CL_{99} foram calculadas a partir da equação de linha reta gerada pelo modelo probístico testado (Hosmer e Lemeshow, 1989).

Os resultados obtidos a partir do ensaio biológico produziram a determinação de frequência dos danos morfológicos e estruturais que levaram à mortalidade das larvas nas diferentes concentrações do óleo essencial. Como as porcentagens apresentaram restrições de normalidade, devido a circularidade e assimetria de distribuição em torno da média, os resultados obtidos foram

transformados pelo arco-seno da raiz quadrada das respectivas proporções, como tentativa de corrigir os eventuais desvios de normalidade (Zar, 2010).

A normalidade dos dados é uma premissa para os testes estatísticos paramétricos, ela foi verificada pelo teste de K^2 , baseado no teste sobre os desvios de simetria e curtose da curva de distribuição de probabilidades dos dados obtidos, em relação a hipótese de nulidade de uma distribuição normal. Outra premissa para os testes paramétricos, a homogeneidade de variância foi verificada pelo teste de Bartlett (Zar, 2010). As análises estatísticas foram feitas pelos Programas Systat versão 13.0 e Minitab versão 13.0.

4. RESULTADOS

4.1 Obtenção e purificação dos óleos essenciais

O óleo essencial dos frutos imaturos de *S. terebenthifolia* apresentou-se como um líquido oleoso de baixa viscosidade, incolor e translúcido. O rendimento do processo extrativo foi de 1,3%, a densidade foi de 0,868 g.mL⁻¹, a diversidade química (*H'*) 1,68 e a Equitabilidade (*J'*) foi de 0,516 (Tabela 1).

Tabela 1. Rendimento, densidade absoluta, diversidade química equitabilidade dos óleos essenciais dos frutos maduros e imaturos de *S. terebenthifolia* Raddi.

Parâmetro	Média ± IC 95%
Rendimento (%)	1,301 ± 0,261
Densidade (g mL ⁻¹)	0,868 ± 0,013
Diversidade química (<i>H'</i>)	1,681 ± 0,212
Equitabilidade (<i>J'</i>)	0,516 ± 0,088

4.2 Perfil fitoquímico dos óleos essenciais

No perfil fitoquímico do óleo essencial de frutos imaturos foram detectadas de 21 a 34 substâncias, sendo que 8 substâncias compreendem mais de 90% da composição centesimal dos óleos extraídos. Na composição química do óleo essencial de frutos imaturos revelou uma predominância dos monoterpenos (79,43%) com destaque para o limoneno 37,49%, δ -3-careno 19,79%, silvestreno 13,83%, α -tujeno 4,55%, mirceno 3,77% (Tabela 2).

Tabela 2. Composição química qualitativa e centesimal dos óleos essenciais dos frutos imaturos de *Schinus terebenthifolia* Raddi.

Substância	Área relativa (%)	Substância	Área relativa (%)
limoneno	37,49	mirceno	3,77
δ -3-careno	19,79	elemol	3,35
silvestreno	13,83	β -eudesmol	1,37
germacreno D	4,68	δ -elemeno	1,22
α -tujeno	4,55	outros	4,48
β -cariofileno	4,13	TOTAL	98,66

4.3 Ensaio biológico com larvas de *Stegomyia aegypti*

A mortalidade das larvas não foi um fenômeno exclusivamente atribuído à concentração do óleo essencial de *S. terebenthifolia* no meio de incubação. O tempo de exposição ao óleo também afetou de maneira significativa a taxa de mortalidade (Tabela 3).

Tabela 3 - Regressão logística binária entre a concentração e o tempo de exposição ao óleo essencial dos frutos imaturos de *Schinus terebenthifolia* Raddi a mortalidade de larvas de *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762).

Parâmetros	Coeficiente	EP	Z	p
Concentração de óleo essencial (ppm)				
Constante	-0.70132	0.03459	-20.27	0.000
ppm	0.0032868	0.0001782	18.44	0.000
G = 577.167; gl = 1; p = 0.000; χ^2 Hosmer-Lemeshow = 210.790; p = 0.000				
Tempo de exposição ao óleo essencial (h)				
Constante	-0.83996	0.04938	-17.01	0.000
Tempo	0.015539	0.001065	14.59	0.000
G = 217.556; gl = 1; p = 0.000; χ^2 Hosmer-Lemeshow = 124.355; p = 0.000				
Concentração de óleo essencial (ppm) + Tempo de exposição ao óleo essencial (h)				
Constante	-1.59923	0.06784	-23.57	0.000
ppm	0.0039874	0.0002091	19.07	0.000
Tempo	0.021600	0.001270	17.01	0.000
G = 889.933; gl = 2; p = 0.000; χ^2 Hosmer-Lemeshow = 274.843; p = 0.000				
Concentração de óleo essencial (ppm) + Tempo de exposição ao óleo essencial (h) + Concentração*Tempo				
Constante	-1.38830	0.06941	-20.00	0.000
ppm	0.0019151	0.0002322	8.25	0.000
Tempo	0.008919	0.001490	5.99	0.000
ppm*Tempo	0.00027691	0.00001983	13.97	0.000
G = 1245.400; gl = 3; p = 0.000; χ^2 Hosmer-Lemeshow = 68.061; p = 0.000				

O modelo probítico testado revelou que a concentração e o tempo de exposição ao óleo essencial são capazes de afetar a mortalidade das larvas, sendo que a interação multiplicativa do efeito do tempo de exposição e da concentração foi altamente significativa (Tabela 4). Apesar do efeito altamente significativo do tempo de exposição sobre a mortalidade das larvas, 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.

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 e com melhor ajuste do χ^2 de Hosmer-Lemeshow entre 0 e 24 horas de exposição (Tabela 4).

Para a espécie *S. aegypti*, a mortalidade de larvas foi dose-dependente da concentração de óleo essencial. Apesar do tempo de exposição influenciar de forma significativa, a concentração do óleo essencial é o fator que mais contribui para a mortalidade da espécie. Esse resultado indica potencialidade inseticida desse óleo contra larvas de *S. aegypti in vitro*.

Tabela 4 - Atividade larvicida do óleo essencial dos frutos imaturos de *Schinus terebenthifolia*, com suas concentrações letais (CL) \pm Intervalo de confiança a 95% (IC 95%) e parâmetros como coeficiente angular (Cof. angular), coeficiente linear (Cof. linear) nível de significância (p) e χ^2 de Hosmer-Lemeshow de ajuste do modelo probítico testado a mortalidade das larvas à exposição após 0, 24, 48 e 72 horas para as larvas de *Stegomyia aegypti* ao óleo.

Tempo (h)	Concentração (ppm) \pm IC 95%			
	CL_{50}	CL_{90}	CL_{95}	CL_{99}
0	584,55 \pm 41,85	806,35 \pm 49,21	869,23 \pm 52,77	987,179 \pm 60,52
24	106,55 \pm 21,18	328,35 \pm 32,61	391,23 \pm 37,46	509,18 \pm 47,26
48	85,76 \pm 20,77	307,56 \pm 31,19	370,44 \pm 35,95	488,39 \pm 45,67
72	76,96 \pm 20,80	298,77 \pm 30,80	361,64 \pm 35,52	479,59 \pm 45,19
Tempo (h)	G^*	Cof. angular	Cof. linear	χ^{2**}
0	118,8***	0,003***	-2,182***	16,12***
24	292,29***	0,012***	-0,897***	3,53 ^{ns}
48	268,69***	0,011***	-0,743***	20,16***
72	577,17***	0,003***	-0,701***	210,8***

* gl = 1; ** gl = 4; *** $p < 0,01$; ns = não significativo

4.4 Danos morfológicos e estruturais

Os danos estruturais para todos os ensaios (Figura 1 a; b; c; d) apresentam uma tendência de intensificação a partir da porção mais distal, ou seja, do sifão (Figura 1 VI) que integra o aparato respiratório da larva, em direção à cabeça da larva (Figura 1 I). Nas larvas que morreram (Figura 1 d) as células apresentam características necróticas com perda expressiva da estruturação do tórax (Figura 1 d-II) e do epitélio do mesêntero desde a porção proximal até a distal (Figura 1 d-III; IV; V) que é a que se encontra mais próxima do sifão respiratório que sofre perda praticamente total de sua organização (Figura 1 d-VI).

Mesmo nas larvas sobreviventes à exposição à CL_{50} , o sifão sofre perdas estruturais muito semelhantes às das larvas que morreram expostas à essa mesma concentração de óleo essencial (Figura 1 c-VI; d-VI). Nas larvas sobreviventes à exposição à CL_{50} , os danos celulares foram se intensificando em direção à cabeça da larva de *S. aegypti*, fato evidenciado pela intensa vacuolização das células epiteliais componentes do mesêntero, chegando a ocorrer perda de células por descamação em direção à luz do mesêntero (Figura 1 c-IV; c-V).

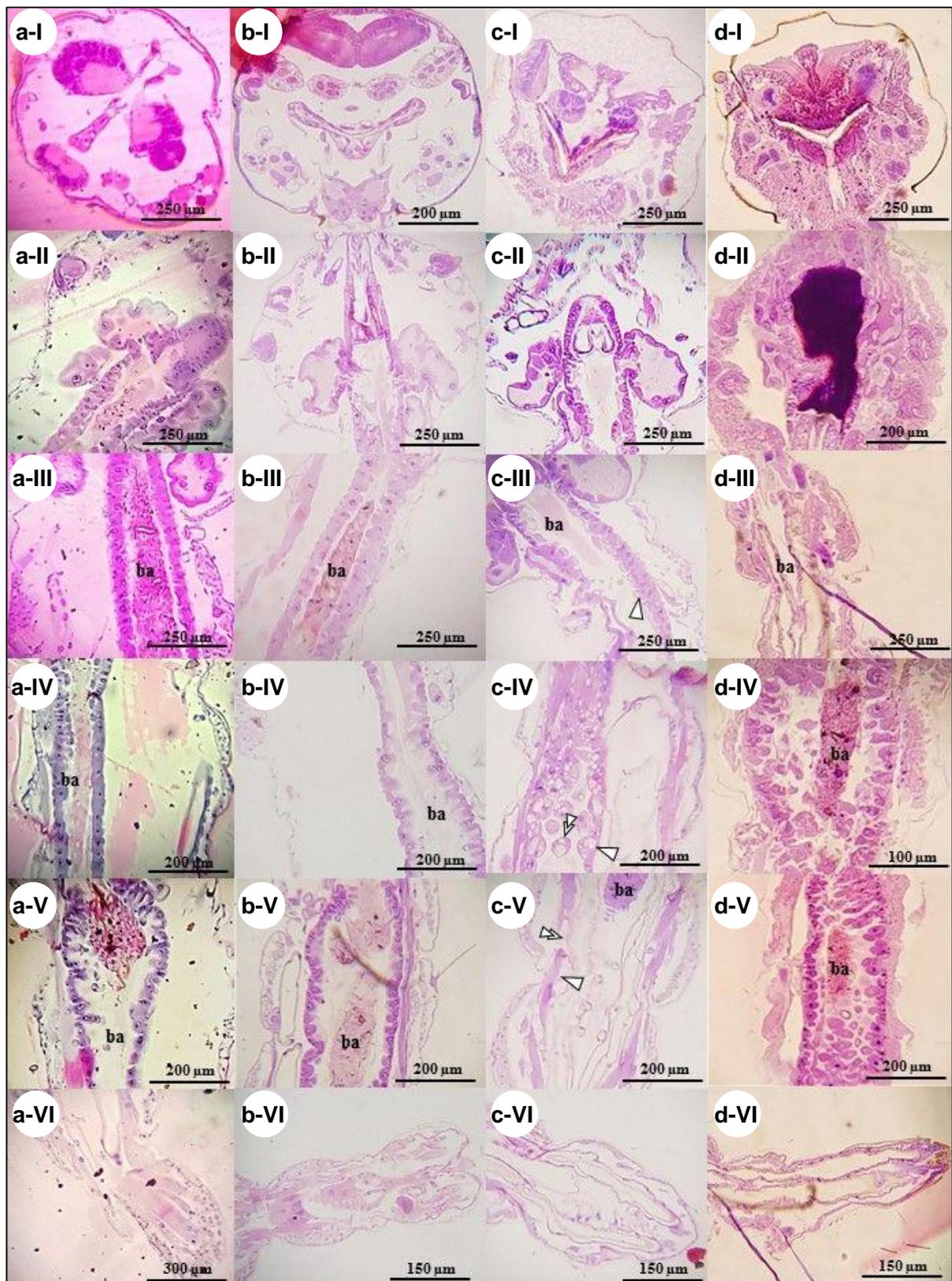


Figura 1. Fotomicrografia em microscopia de luz em transmissão em campo claro de larvas de terceiro instar de *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762). **a**: larvas sobreviventes após 24 horas de exposição a água destilada; **b**: larvas sobreviventes após 24 horas de exposição a água destilada + DMOS 0,5%; **c**: larvas sobreviventes após 24 horas de exposição a CL₅₀ do óleo essencial de frutos imaturos de *Schinus*

terebenthifolia; **d**: larvas mortas após 24 horas de exposição a CL₅₀ do óleo essencial de frutos imaturos de *Schinus terebenthifolia*; **I**: cabeça; **II**: tórax; **III**: mesêntero proximal; **IV**: mesêntero mediano; **V**: mesêntero distal; **VI**: sifão respiratório. Seta simples: vacuolização; seta dupla: vacuolização das células epiteliais do mesêntero, seguida de descamação (dupla seta) para a luz do órgão.

5. DISCUSSÃO

5.1 Óleo essencial

A presença dos óleos essenciais pode estar associada a um só órgão ou em toda planta. Estes óleos podem ser produzidos em células secretoras, cavidades, ductos, células epidérmicas e tricomas e geralmente possuem densidade menor que a da água, dado esse evidenciado para o óleo essencial em questão, e ainda são solúveis em compostos orgânicos (Bakkali *et al.* 2008). Os óleos essenciais da espécie *S. terebinthifolius* Raddi estão presentes principalmente nas folhas e nos frutos sendo que a concentração nos frutos pode chegar a ser cinco vezes superior ao das folhas (Clemente, 2006).

A equitabilidade encontrada evidencia a maneira pela qual o número de substâncias químicas está distribuído em suas proporções nas espécies em estudo, indicando o grau de simetria na distribuição proporcional de massas entre os componentes dos óleos essenciais. Os valores menores que 1 expressam uma concentração cada vez mais irregular entre os componentes na medida em que se aproximam de zero, o que é muito comum nos óleos essenciais nos quais se identificam facilmente cerca de 20 a 60 substâncias em diferentes concentrações (Bakkali *et al.* 2008). Geralmente 2 ou 3 destas substâncias apresentam-se em maior concentração (20 – 70%) e deste modo, vão caracterizar o óleo e determinar sua propriedade biológica (Bakkali *et al.* 2008).

Os resultados de rendimento do óleo essencial obtidos no presente trabalho mostram-se divergentes com o trabalho de Bertoldi (2006), que em seus experimentos de extração de óleo essencial a partir de frutos secos de *Schinus terebenthifolia* encontrou uma variação de rendimento de 5,60% a 7,70% (v/p), em função do local de coleta dos frutos. Entretanto os dados são semelhantes com o trabalho de Pieribattesti *et al.* (1981) que obteve um rendimento de 1,50% a partir dos frutos de *Schinus terebenthifolia*.

Variações qualitativas e quantitativas na composição do óleo essencial de uma mesma espécie vegetal podem estar relacionadas com vários fatores, como variação genética (Kulkarni *et al.* 1997; Siani *et al.* 2004), a origem geográfica e fatores abióticos como vento, intensidade luminosa, temperatura, nível de nutrição, disponibilidade de água e salinidade (Kokkini *et al.* 1994; Lima *et al.* 2003), além da forma de cultivo (Paul *et al.* 2010).

O óleo essencial obtido apresentou densidade específica inferior à da água, uma vez que se verificou uma nítida separação de fases, ficando o óleo essencial na parte superior do tubo coletor durante a hidrodestilação. O valor encontrado foi semelhante ao descrito em outros trabalhos com *Schinus terebenthifolia*: 0,87 g/cm³ (24°C) (Sing et al., 1998) e 0,86 g/cm³ (temperatura não informada) (Malik et al. 1994), em trabalho com folhas e inflorescências, e, folhas e galhos, respectivamente.

Em relação a diversidade de substâncias, houve um predomínio de monoterpenos, resultado que coincide com os trabalhos de Pieribattesti et al. (1981), Gehrke et al. (2007) e Barbosa et al. (2007) que registraram os monoterpenos como perfil fitoquímico predominante no óleo essencial dos frutos de *Schinus terebenthifolia* Raddi. Todavia há registros de trabalhos cujo perfil fitoquímico predominante são os sesquiterpenos (Ibrahim et al. 2004).

Um dos primeiros estudos com óleo essencial de pimenta brasileira foi realizado por Clemente (2006) e foi registrado que seus constituintes principais foram α -pineno (12,94%), β -pineno (5,02%), α -felandreno (13,04%), δ -3-careno (29,22%) e β -felandreno (18,08%). Cole (2008) registrou os principais componentes do óleo o δ -3-careno (30,37%), limoneno (17,44%), α -felandreno (12,60%), α -pineno (12,59%), mirceno (5,82%) e ando-cimeno (3,46%). Em outro estudo, os principais constituintes foram sabineno, α -pineno, cariofileno e germacreno D (Dos Santos 2007).

Entre os monoterpenos identificados em *Schinus terebenthifolia*, Silva et al. (2010) encontrou o δ -careno (41,01%), α -felandreno (14,40%), limoneno (12,36%) e α -pineno (10,36%). Silva et al. (2010) identificou como majoritários o δ -3-careno (55,43%), o α -pineno (16,25%), o silvestreno (10,67%). Gehrke et al. (2007) analisando o óleo essencial em frutos observaram os monoterpenos δ -3-careno e α -pineno representando aproximadamente 40% dos constituintes. Da mesma forma, Silva et al. (2011) demonstraram a predominância majoritária o α -pineno.

5.2 Ensaio biológico com larvas de *Stegomyia aegypti*

As larvas de *Stegomyia aegypti* foram susceptíveis à composição do óleo essencial de forma dose-dependente, o que abre possibilidades para a utilização do óleo como importante alternativa para controle biológico de larvas. De acordo com a Cheng et al. (2003), substâncias com valores de CL₅₀ menores que 100 µg/mL são consideradas bons agentes larvicidas. A CL₅₀ obtida para o óleo essencial dos frutos imaturos de *Schinus terebenthifolia* (106,55 µg/mL) apresentou-se próxima a este

valor, o que viabiliza o uso do óleo para tal finalidade. No entanto, o baixo rendimento de óleo pode ser um fator limitante para utilização como larvicida.

A análise por CG/EM do óleo essencial de *Schinus terebenthifolia* Raddi revelou dentre seus principais constituintes o limoneno (37,49%) e o δ -3-careno (19,79%), o que pode justificar, ainda que parcialmente, a ação larvicida do óleo, com estes compostos atuando de forma isolada ou sinergicamente com outros constituintes.

Omena et al. (2000) verificaram que os monoterpenos limoneno e felandreno apresentaram-se ativos em concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, em menos de 24 horas, para matar 100% das larvas. Ibrahim et al. (2001) afirmam que o limoneno é comprovadamente ativo contra larvas de 4^o ínstar do mosquito *Culex quinquefasciatus*, já Mohsen et al. (1989) encontraram valores de CL_{50} variando de 7,8 a 30,6 $\mu\text{g/mL}$ e para larvas de 2^o ínstar valores e de 6,6 a 26,1 $\mu\text{g/mL}$. Cheng et al. (2005), verificaram que o δ -3-careno, extraído das folhas de *Cryptomeria japonica* (cedro japonês), apresenta grande potencial como agente larvicida contra o *Aedes aegypti* ($\text{CL}_{50} = 10,7 \mu\text{g/mL}$).

A resina exsudada por plantas do gênero *Protium* é usada dentre outras funções para repelir insetos. Seu óleo essencial apresenta em sua composição uma predominância de monoterpenos nos frutos e sesquiterpenos nas folhas (Citó et al. 2006; Pontes et al. 2007; Rüdiger, Siani, Veiga Jr, 2007). Os monoterpenos apresentam boa atividade larvicida e os sesquiterpenos tem capacidade para inibir a ecdise (Lima et al. 2006).

A inibição da ecdise em larvas de dípteros tem sido frequentemente relatada para extratos de plantas. Por exemplo, a ação da azadiractina, uma substância extraída de *Azadirachta indica* (A. Juss.), atua no sistema neurosecretor de *S. aegypti*, promovendo uma alteração dos teores da ecdisona e intervindo, portanto, na síntese e liberação do hormônio protoacicotrópico (PPTH) do *corpus allatum*, que é o responsável pela produção de ecdisona pelas glândulas protorácicas. A azadiractina bloqueia a liberação deste hormônio, o que leva a um aumento de sua concentração dentro do *corpus allatum*, o que em última análise, leva a um efeito *feedback*, juntamente na intervenção na liberação da alatotropina pelos corpora cardíacos, interferindo desta maneira nos teores de hormônio juvenil da hemolinfa (Martinez e van Emden, 2002).

5.3 Danos morfológicos e estruturais nas larvas

A diminuição da espessura do exoesqueleto e a perda de integridade dos órgãos internos nas regiões do sexto, sétimo e oitavo segmentos do corpo larval foram os sinais mais evidentes dos efeitos do óleo essencial sobre a larva de *S. aegypti*. O fato de ter ocorrido morte instantânea nas concentrações tóxicas, sugere uma intervenção num processo crítico para a larva e, neste caso, os principais danos seriam 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).

A diminuição do espessamento do exoesqueleto, mais evidente nas concentrações próximas às CL₅₀ pode estar relacionada a uma diminuição da capacidade de síntese de quitina (Mezendorfer e Zimoch, 2003), um processo que é particularmente sensível às concentrações celulares de ATP. O sifão respiratório, intestino e túbulos de Malpighi, órgãos particularmente lesados, também apresentam membranas celulares altamente dependentes de suprimento de ATP para seu funcionamento fisiológico, envolvendo transporte de eletrólitos e nutrientes (Kato *et al.* 2006). É possível que a base metabólica dos danos observados em concentrações 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 (Dua *et al.* 2013).

Foi possível evidenciar a mortalidade larval dose-dependente após exposição ao óleo essencial de *S. terebenthifolia*. Usualmente a atividade biológica dos óleos essenciais tem sido atribuída a seus componentes majoritários (Bakkali *et al.* 2008), entretanto a participação das outras substâncias presentes no óleo essencial não pode ser descartada, uma vez que o sinergismo entre estes pode ocorrer (Silva *et al.* 2007; Intirach *et al.* 2012).

6. CONCLUSÃO

O óleo essencial apresentou um predomínio de monoterpenos em sua composição (79,43%) sendo o limoneno (37,49%) e o δ -3-careno (19,79%) os compostos mais abundantes. O óleo essencial apresentou valores de densidade específica próximos ao descrito na literatura e um rendimento divergindo com alguns dados publicados, entretanto a variação do rendimento pode estar associada a fatores bióticos e abióticos. A atividade larvicida do óleo essencial foram evidenciadas contra o *Stegomyia aegypti*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. P. (2009). Identification of Essential oil Components by Gas chromatography/mass Spectrometry, 4 ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, USA.
- AFFONSO, C. R. G., FERNANDES, R. M., OLIVEIRA, J. M. G. de, MARTINS, M. do C. de C., LIMA, S. G. de, SOUSA JÚNIOR, G. R. de, FERNANDES, M. Z. de L. C. M., ZANINI, S. F. (2012). Effects of the essential oil from fruits of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) on reproductive functions in male rats. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(1), 180-185.
- AHMAD, I., BEG, A. Z. (2001). Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J. Ethnopharmacol.* 74, 113–123.
- ANTONIO-NKONDJIO, C., FOSSOG, B. T, NDO, C., D JANTIO, 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.
- ARRUDA, W.; OLIVEIRA, G. M. C.; SILVA, I. G. (2003). Alterações morfológicas observadas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) submetidas à ação do extrato bruto etanólico da casca do caule da *Magonia pubescens* St. Hil. *Entomologia y Vectores*, v.10, n.01, p.47-60.
- BAKKALI, F., IDAOMAR, M., AVERBECK, D., AVERBECK, S. (2008). Biological effects of essential oils. A review. *Food Chem Toxicol* 46, 446-475.
- BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; CLEMENTE, A. D.; DE PAULA, V. F.; ISMAIL, F. M. D. (2007). Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolia* Raddi. *Química Nova*, v.30, n.08, p.1959-1965.
- BENDAOU H, ROMDHANE M, SOUCHARD JP, CAZAUX S, BOUJILA J. (2010). Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. *Journal of food science*, v.75, n.6, p.466-472.
- BENOIT-VICAL, F., VALENTIN, A., MALLIÉ, M., BESSIÈRE, J.-M. (2001). Antiplasmodial activity of *Cochlospermum planchonii* and *C. tinctorium* Tubercle Essential Oils. *J. Essent. Oil Res.* 13, 65–67.
- BERNARDES, N., GLÓRIA, L., NUNES, C., PESSANHA, F., MUZITANO, M., OLIVEIRA, D. (2011). Quantification of the levels of tannins and total phenols and evaluation of the antioxidant activity of fruits of pepper tree. *Revista Vértices*. 13. 117-128.
- BERTOLDI, M. C. Atividade antioxidante in vitro da fração fenólica, das oleoresinas e do óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Viçosa-MG, Universidade Federal de Viçosa, 2006, 96p. Tese de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa (UFV).
- BESSERRA, E.B.; DE CASTRO JR., F.P.; SANTOS, J.W.; SANTOS, T.S.; FERNANDES, C.R.M. (2006). Biologia e Exigências Térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Provenientes de Quatro Regiões Bioclimáticas da Paraíba. *Neotropical Entomology*, v. 35, n. 6, p. 853-860.
- BRADLEY, T. J. (1987). Physiology of osmoregulation in mosquitoes. *Ann. Rev. Entomol* 32, 439-462.
- BRANDÃO, M.G.L.; ZANETTI, N.N.S.; OLIVEIRA, P.; GRAEL, C.F.F.; SANTOS, A.C.P.; MONTE-MOR, R.L.M. (2008). Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the official Pharmacopoeia. *Journal of Ethnopharmacology*, v.120, p.141-148

- BRASIL (2020a). Ministério da saúde. Boletim epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde v. 51, n. 2.
- BRASIL (2020b). Ministério da saúde. Boletim epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde v. 51, n. 34.
- BRICKS, L. F. (2004). Vacinas para a dengue: perspectivas. *Pediatria (São Paulo)*, v.26, n.04, p.268-281.
- CAVALCANTI, L. P. G., PONTES, R. J. S., REGAZZI, A. C. F., JÚNIOR, F. J. P., FRUTUOSO, R. L., SOUSA, E. P., FILHO, F. F. D., LIMA, J. W. O. (2007). Competência de peixes como predadores de larvas de *Aedes aegypti*, em condições de laboratório. *Revista Saúde Pública* 41, 638-644.
- CAVALHER-MACHADO, S. C.; ROSAS, E. C.; BRITO, F. A.; HERINGE, A. P.; OLIVEIRA, R. R.; KAPLAN, M. A.; FIGUEIREDO, M. R.; HENRIQUES, M. G. (2008). The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. *International Immunopharmacology*, v. 8, p. 1552-60.
- CERUKS, M., ROMOFF, P., FÁVERO, O. A., LAGO, J. H. G. (2007). Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Química Nova*, v.30, p.597-599.
- CHENG, S. S.; CHANG, H. T.; CHANG, S. T.; TSAI, K. H.; CHEN, W. J. (2003). Bioactivity of selected plant essential oil against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresource Technology*, v.89, n.01, p.99-102.
- CHENG, S. S.; CHUA, M. T.; TSAI, K. H.; CHEN, W. J.; CHANG, S. T. (2005) Chemical composition and mosquito larvicidal activity of essential oils from leaf of *Cryptomeria japonica* D. Don. *The International Forestry Review*, v.07, n.05, p.389.
- CITÓ, A. M. G. L., COSTA, F. B, LOPES, J. A. D., OLIVEIRA, V.M.M., CHAVES, M. H. (2006). Identificação de constituintes voláteis de frutos e folhas de *Protium heptaphyllum* (Albi) March. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 8(4), 4-7.
- CLEMENTE, A.D. Composição química e atividade biológica do óleo essencial da pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi.). 63p. Tese (Doutorado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.
- COLE E.R. Estudo fitoquímico do óleo essencial dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolia* RADDI) e sua eficácia no combate ao dengue. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo - Brasil, Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas. 2008.
- CONSOLI, R.A.G.B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. (1994). Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ.
- DEGÁSPARI, C.H. WASZCZYNSKYJ N. SANTOS, R. J. (2004). Atividade antioxidante de extrato de fruto de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Visão Acadêmica*. v.5, n.2, p.83-90.
- DÓRIA, G. A. A., SILVA, W. J., MAIA, A. R. T., NUNES, R. S., CARVALHO, G. A., BLANK, A. F., ALVES, P. B., MARÇAL, R. M., CAVALCANTE, S. C. H., (2008). Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. *Bioresource Technology* 99, 3251–3255.
- DOS SANTOS A.C.A, ROSSATO M, AGOSTINI F, DOS SANTOS P.L, SERAFINI L.A, MOYNA P, DELLACASSA E. (2007). Avaliação química mensal de três exemplares de *Schinus terebinthifolia* Raddi. *Rev Bras Biociências*. 5:1011-1013.
- DUA, V. K., KUMAR, A., PANDEY, A. C., KUMAR, S. (2013). Insecticidal and genotoxic activity of *Psoralea corylifolia* Linn. (Fabaceae) against *Culex quinquefasciatus* Say, 1823. *Parasites and Vectors* 6, 30.
- EI-MASSRY, K. F., EI-GHORAB, A. H., SHAABAN, H. A., SHIBAMOTO, T. (2009). Compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared

- from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.57, p.5265-5270.
- FARNESI, L.C.; MARTINS, A.J.; VALLE, D.; REZENDE, G.L. (2009) Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 104, n.1, p. 124-126.
- FERREIRA, M. L. B.; CAVALCANTI, C. G.; COELHO, C. A.; MESQUITA, S. D. (2005). Manifestações neurológicas de dengue: estudo de 41 casos. Arquivos de Neuro-Psiquiatria, v.63, n.02b, p.488-493.
- GEHRKE, I. T. S.; STOLZ, E. D.; MOREL, A. F. Identificação dos principais constituintes do óleo essencial de *Schinus terebinthifolia* da região noroeste do RS. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia, SP.
- GHOSH, A., CHOWDHURY, N., CHADRA, G. (2012). Plant extracts as potential mosquito larvicides. Indian J Med Res 135, 581-598.
- GÓMEZ, F. E.; SUÁREZ, C. M. H.; CÁRDENAS, R. C. (2001). Factores que modificam los índices larvários de *Aedes aegypti* em Colima, México. Revista Panamericana de Salud Publica, 10(1): 6-12.
- GOVINDARAJAN, M. (2010). Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena anisata* (Willd.) Hook. f. ex Benth (Rutaceae) against three mosquito species. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 874-877.
- HALSTEAD, S. B. (2008). Dengue: overview and history. In: Halstead, S. B., editor. Dengue. London: Imperial College Press; 28 Pasvol, G., Hoffman, S. L. (series Editors): Tropical Medicine: Science and Practices, vol 5.
- 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.
- HARTANTI, M.D.; SURYANI, TIRTADAJA, I.A. (2010). Dengue virus transovarial transmission by *Aedes aegypti*. Universa Medicina; 36 (2), 65-70.
- HOFFMANN, A. A., TURELLI, M. (2013). Facilitating *Wolbachia* introductions into mosquito populations through insecticide resistance selection. Proc R Soc B 280, 20130371.
- HOSMER, D. W., LEMESHOW, S. (1989) Applied logistic regression. New York: John Wiley.
- IBRAHIM, M. A.; KAINULAINEN, P.; AFLATUNI, A.; TIILIKKALA, K.; HOLOPAINEN, J. K. (2001). Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. Agricultural and Food Science in Finland, v.10, p.243-259.
- IBRAHIM, M. T.; FOBBE, R.; NOLTE, J. (2004). Chemical composition and biological studies of Egyptian *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolia* Raddi oils. Bulletin of the Faculty of Pharmacy, v.42. n.02, p.289-296.
- INTIRACH, J., JUNKUM, A., TUETUN, B., CHOOCHOTE, W., CHAITHONG, U., JITPAKDI, A., RIYONG, D., CHAMPAKAEW, D., PITASAWAT, B. (2012). Chemical constituents and combined larvicidal effects of selected essential oils against *Anopheles cracens* (Diptera: Culicidae). Psyche, 591.
- JOHANN, S., CISALPINO, P. S., WATANABE, G. A., COTA, B. B., de SIQUEIRA, E. P., PIZZOLATTI, M. G., ZANI, C. L., de RESENDE, M. A. (2010a). Antifungal activity of extracts of some plants used in Brazilian traditional medicine against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Pharmaceutical Biology, v.48, p.388-96.
- JOHANN, S., SÁ, N. P., LIMA, L. A., CISALPINO, P. S., COTA, B. B., ALVES, T. M., SIQUEIRA, E. P., ZANI, C. L. (2010b). Antifungal activity of schinol and a new

- biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, v.9, p.30.
- JOHANN, S., PIZZOLATTI, M. G., DONNICI, C. L., RESENDE, M. A. de (2007). Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.38, p.632-637.
- JOHANSEN, I. C., CARMO, R. L. DO, ALVES, L. C. (2016). Desigualdade social intraurbana: implicações sobre a epidemia de dengue em Campinas, SP, em 2014. *Cadernos Metr pole*, 18(36), 421-440.
- KATO, N., MUELLER, C. R., FUCHS, J. F., WESSELY, V., LAN, Q., CHRISTENSEN, B. M. (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.
- KNAAK, N.; FIUZA, L.M. (2010). Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos Neotropical *Biology and Conservation*, v. 5, n. 2, p. 120-132.
- KOKKINI, S., KAROUSOU, R., VOKOU D. (1994). Pattern of geographic variation of *Origanum vulgare* trichomes and essential oil content in Greece. *Biochem. Sys. Ecol* 22, 517-528.
- KULKARNI, R. N., BASKARAN, K., RAMESH, S., KUMAR S. (1997). Intra-clonal variation for essential oil content and composition in plants derived from leaf cuttings of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.). *Ind. Crops Prod* 6, 107-112.
- KWEKA, E. J., NYINDO, M. MOSHA, F. SILVA, A. G. (2011). Insecticidal activity of the essential oil from fruits and seeds of *Schinus terebinthifolia* Raddi against African malaria vectors. *Parasites & vectors*, v.4, n.1, p.129.
- LANG J. (2012) Development of Sanofi Pasteur tetravalent vaccine. *Rev Inst Med Trop S* 54 (18), 15-17.
- LEE, H. L., ROHANI, A. (2005). Transovarial transmission of Dengue Virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in relation to dengue outbreak in an urban area in Malaysia. *Dengue Bulletin* 29, 106-111.
- LENZI M, ORTH A.I. (2004). Fenologia reprodutiva, morfologia e biologia floral de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae), em restinga da Ilha de Santa Catarina, Brasil. *Biotemas* 2004,17, n 2:67-89.
- LIMA, H. R. P.; KAPLAN, M. A. C.; CRUZ, A. V. M. (2003). Influência dos fatores abióticos na produ o e variabilidade de terpenóides em plantas. *Floresta e Ambiente*, v.10, n.02, p.71-77.
- LIMA, M. R. F. de, XIMENES, E. C.P. A., LUNA, J. S., SANT'ANA, A. E. G. (2006). The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(3), 300-306.
- MACHADO, J. A., REBELO, M. A., FAVARO, L. I. L., VILA, M. M. D. C., GERENUTTI, M. (2012). In vitro evaluation of the antimicrobial potential association of *Schinus terebinthifolius* Raddi and *Syzygium aromaticum* L. *IOSR Journal of Pharmacy*, v.2, n.3, p.438-443.
- MACKENZIE, J.S.; GUBLER, D.J.; PETERSEN, L.R. (2004). Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nature Medicine*, 10: 98 - 109.
- MALIK, M. S.; MAHMUD, S.; SATTAR, A. (1994). Studies on the essential oil of *Schinus terebinthifolius*. *Science International (Lahore)*, v.06, n.04, p.351-352.
- MARTÍNEZ, M.J., BETANCOURT, J., ALONSO-GONZÁLEZ, N., JAUREGUI, A. (1996). Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* 52, 171–174.

- MARTINEZ, S. S., VAN EMDEN, H. F. (2001). Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by azadirachtin. *Neotropical Entomology* 30, 113-125.
- MEHTA, P., SHAH, R., LOHIDASAN, S., MAHADIK, K.R. (2015). Pharmacokinetic profile of phytoconstituent(s) isolated from medicinal plants-A comprehensive review. *J. Tradit. Complement. Med.* 5, 207–227.
- MOHSEN, Z. H.; AL-CHALABI, B. M.; KASSIR, J. T. (1989). Factors influencing the larvicidal activity of limonene against *Culex quinquefasciatus* Say (Dipt., Culicidae). *Journal of Applied Entomology*, v.108, p.107-110.
- MONTANARI, R. M., BARBOSA, L. C. A., DEMUNER, A. J., SILVA, C. J., ANDRADE, N. J., ISMAIL, F. M. D., BARBOSA, M. C. A. (2012). Exposure to Anacardiaceae volatile oils and their constituents induces lipid peroxidation within Food-Borne bacteria cells. *Molecules*, v.17, p.9728-9740.
- NATAL, D. (2002). Bioecologia do *Aedes aegypti*. *Biológico* 64: 205-207.
- NERIO, L. S., OLIVERO-VERBEL, J., STASHENKO, E. (2010) Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology* 101, 372–378.
- NEVES, A. P., MELO, A. L., GENARO, O., LINARDI, P. M. (2007). *Parasitologia Humana*, 11ª ed. Atheneu, São Paulo, Brasil.
- NOGUEIRA, R. M. R., MIAGOSTOVICH, M. P., FILIPPIS, A. M. B. DE, PEREIRA, M. A. S., SCHATZMAYR, H. G. (2001). Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(7), 925-926.
- OMENA, M. C.; LIMA, M. R. F.; SANT'ANA, A. E. G. Estudo da atividade de terpenóides sobre larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). In: 23ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2000, Poços de Caldas, MG.
- 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. *Industrial Crops Production* 32, 366-374.
- PIERIBATTESTI, J. C.; CONAN, J. Y.; GRONDIN, J.; VINCENT, E. J.; GUERERE, M. (1981). Contribution a l'étude chimique des baies roses de bourbon. *Annales des Falsifications de l'Expertise Chimique et Toxicologique*, v.74, n.793, p.11-16.
- PIMENTA, A. T. A., SANTIAGO, G.M.P., ARRIGA, A. M. C., MENEZES, G.H.A., BEAERRA, S. B. (2006). Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvicida de *Pterodon polygalaeflorus* Benth (Leguminosae) sobre *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16 (4), 501-505.
- PONTES, W. J. T., OLIVEIRA, J. C. G., CÂMARA, C. A. G., LOPES, A. C. H. R., GONDIM, M. C. G., OLIVEIRA, J. V., BARROS, R., SCHWARTZ, M. O. E. (2007). Chemical composition and acaricidal activity of the leaf and fruit essential oils of *Protium heptaphyllum*(Aubl.) Marchand (Burseraceae). *Acta Amazonica* 37 (1), 103 - 110.
- 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 terebenthifolia*, on larvae of *Stegomyia aegypti*, the dengue vector. *Parasites & Vectors* 8, 136-145.
- RÜDIGERA, A.L., SIANI, A.C., VEIGA, Jr V.F., (2007). The chemistry and pharmacology of the South America genus *Protium* Burm. f. (Burseraceae). *Pharmacognosy Reviews* 1, 93 – 104.
- SANTOS, A.C.A. DOS., ROSSATO, M., AGOSTINI, F., SERAFINI, L.A., SANTOS, P.L. DOS., MOLON, R., DELLACASSA, E., MOYNA, P. (2009). Chemical composition of the essential oils from leaves and fruits of *Schinus molle* L. and

- Schinus terebenthifolia* Raddi from southern Brazil. J. Essent. Oil Bear. Plants 12, 16–25.
- SANTOS, M. R. A., LIMA, R. A., FERNANDES, C. F., SILVA, A. G., LIMA, D. K. S., TEIXEIRA, C. A. D., FACUNDO, V. A. (2007). Atividade inseticida do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre *Acanthoscelides obtectus* Say e *Zabrotes subfasciatus* Boheman. Revista Fitos, v. 3, n. 1, p. 77-84.
- SANTOS, R. L., GUIMARAES, G. P., NOBRE, M. S. C., PORTELA, A. S. (2011). Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. Rev. bras. plantas med., Botucatu, v. 13, n. 4, p. 486-491.
- SANTOS, S. C., RIBEIRO, J. P., GUIMARÃES, D. O. SILVA, M.O. FERRI, P.H. GARCIA, A. C. F., PIRES, J. S., CASTROS, A. C. M., SILVA, M. R. R., PAULA, J. R. (2004). Antifungal activity of *Eugenia uniflora* L. fractions against *Paracoccidioides brasiliensis* (Splendore) Almeida, Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. V.7, n.1, p.30-33.
- SIANI, A. C., GARRIDO, I. S., MONTEIRO, S. S., CARVALHO, E. S., RAMOS, M. F. S. (2004). *Protium icicariba* as a source of volatile essences. Biochemical Systematics and Ecology 32, 477-489.
- 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 terebenthifolia* Raddi in larval control of *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762). Parasites & Vectors 3:79-85.
- SILVA, A. A.; MIRANDA, C. F.; FERREIRA, J. R. & ARAÚJO, E. J. de A. (2003). Fatores sociais e ambientais que podem ter contribuído para a proliferação de dengue em Umuarama, Estado do Paraná. Acta Scientiarum, Health Sciences 25(1): 81-83.
- SILVA, A.B.; SILVA, T.; FRANCO, E.S.; RABELO, S.A.; LIMA, E.R.; MOTA, R.A.; CÂMARA, A.A.G. da; PONTES-FILHO, N.T.; LIMA FILHO, J.V. (2010). Antibacterial activity, chemical composition and cytotoxicity of leaf's essential oil from Brazilian pepper tree (*Schinus terebenthifolia* Raddi). Brazilian Journal of Microbiology, v.41, p.158-163.
- SILVA, H. H. G., SILVA, I. G., SANTOS, M. R. G., FILHO, E. R., ELIAS C. M. (2004). Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 37 (5), 396-399.
- SILVA, M.A., PESSOTTI, B.M.S., ZANINI, S.F., COLNAGO, G.L., NUNES, L.C., RODRIGUES, M.R.A., FERREIRA, L.F. (2010). Brazilian red pepper oil on the performance and intestinal morphometry of broilers. Ciência Rural. 40, 2151-2156.
- SILVA, W. J., DÓRIA, G. A. A., MAIA, R. T., NUNES, R. S., CARVALHO, G. A., BLANK, A. F., ALVES, P. B., MARÇAL, R. M., CAVALCANTI, S. C. H. (2007). Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. Biochem Syst Ecol 35, 670-675.
- SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. (2004). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Editora da UFRGS/UFSC, Porto Alegre, Florianópolis, 821p
- SINGH, A. K.; SINGH, J.; GUPTA, K. C.; BROPHY, J. (1998). Essential oil of leaves and inflorescence of *Schinus terebenthifolia*: an exotic plant of India. Journal of Essential Oil Resource, v.10, n.06, p.697-699.
- SOUMAHORO, M-K., FONTENILLE, D., TURBELIN, C., PELAT, C., BOYD, A., FLAHAULT, A., HANSLIK, T. (2010). Imported chikungunya virus infection. Emerg Infect Dis, 16, 162-163.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal, 3ed, Porto Alegre: Artmed, 2004, 719p.

- TAUIL, P. L. (2002). Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. Caderno de Saúde Pública, 18: 867-871.
- TILAK, R.; GUPTA, M. V.; SURYAM, M. V.; YADAV, J. D.; GUPTA, B. K.K. D. (2004). A laboratory investigation into oviposition responses of *Aedes aegypti* to some common household substances and water from conspecific larvae. Medical Journal Armed Forces India, 61: 227-229.
- VON POSER, G.L., MENTZ, L.A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P.R. (Eds.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ed.- Porto Alegre; Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS; Ed. UFSC; 2003.833p.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION (2009). Dengue guidelines treatment, prevention and control. New edition. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION (2012). Global Plan for Insecticide Resistance Management in Malaria Vectors (GPIRM). World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WILDER-SMITH, A., OOI, E., VASUDEVAN, S. G., GUBLER, D. J. (2010). Update on Dengue: Epidemiology, Virus Evolution, Antiviral Drugs, and Vaccine Development. Cur Infect Dis Rep 12, 157–164.
- ZAR, J. H. (2012) Biostatistical analysis, New Jersey, Prentice Hall.