



**UNIVERSIDADE DE VILA VELHA - ES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**AVALIAÇÃO COMPARADA DO ÓLEO ESSENCIAL DA  
OLEORRESINA DE DUAS COPAIBEIRAS BRASILEIRAS E SEUS  
EFEITOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO LARVAR DE *STEGOMYIA*  
*AEGIPTI* Linneaus, 1754**

**GERALDO GOMES DA SILVA**

**VILA VELHA  
MARÇO DE 2012**



**UNIVERSIDADE DE VILA VELHA - ES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO COMPARADA DO ÓLEO ESSENCIAL DA  
OLEORRESINA DE DUAS COPAIBEIRAS BRASILEIRAS E SEUS  
EFEITOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO LARVAR DE *STEGOMYIA*  
*AEGIPTI* Linneaus, 1754**

Dissertação apresentada a Universidade de Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**GERALDO GOMES DA SILVA**

Orientador:  
Prof. Dr. Ary Gomes da Silva

**VILA VELHA  
MARÇO DE 2012**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

S586a Silva, Geraldo Gomes.

Avaliação comparada do óleo essencial da oleorresina de duas copaibeiras brasileiras e seus efeitos sobre o desenvolvimento larvar de *Stegomyia aegypti* Linneaus, 1754 / Geraldo Gomes da Silva. – 2012.

119 f.:il.

Orientador: Prof. Dr. Ary Gomes da Silva.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Vila Velha, 2012.

1. Óleo essencial. 2. Copaibeiras brasileiras. 3. *Stegomyia aegypti*. I. Silva, Ary Gomes. II. Universidade de Vila Velha - ES. III. Título.

CDD 615

**AVALIAÇÃO COMPARADA DO ÓLEO ESSENCIAL DA  
OLEORRESINA DE DUAS COPAIBEIRAS BRASILEIRAS E SEUS  
EFEITOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO LARVAR DE *STEGOMYIA*  
*AEGIPTI* Linneaus, 1754**

**GERALDO GOMES DA SILVA**

Aprovada em 23 de março 2012,

Banca Examinadora:

---

**Prof. Dr. Ary Gomes da Silva – UVV/ES**

---

**Prof. Dr. Aloisio Falqueto – UFES**

---

**Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster – UFRJ**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecer, demonstrar gratidão talvez um dos sentimentos mais nobres, já que o ato de reconhecer uma ajuda é algo profundo que nasce de um sentimento interior ainda maior e que não tem valor físico que o caracterize.

Agradeço primeiramente a Deus, designo de todas as bênçãos e graças concedidas em minha vida e pelo aprendizado diário e seu amor incondicional.

A minha família, aos meus pais primeiramente, que acreditam no meu potencial e investiram na minha formação, educação e caráter. A minha mãe pelo seu incondicional, amor, carinho... Que muitas vezes disse *NÃO* com som de *SIM* querendo me incentivar para conquistar e ultrapassar os obstáculos e ao meu pai, a toda a sua sabedoria e conselhos compartilhados. Os meus irmãos, meus parceiros, a todo carinho, rizadas, confusões, conversas em fim grandes pessoas que são partes de mim e de tudo aquilo que eu sou.

Agradeço ao meu grande amigo e orientador Ary, essa pessoa fantástica, humilde, carismática, de grande coragem e boa aventura e acima de tudo uma enciclopédia científica em forma de gente, “risos”! Ary, obrigado mesmo pela oportunidade de usufruir dos conhecimentos passados por você. Por sua companhia, compreensão e paciência em todo esse tempo. Por ter acreditado acima de tudo no meu potencial e ter dado crédito ao meu trabalho e esforço.

Agradeço a amiga Jaqueline que sempre me incentivou, aconselhou e me ajudou a conquistar grandes etapas na vida profissional, abrindo as portas para que eu caminhasse pelo melhor caminho.

Agradeço ao professor Fred, por despertar o meu interesse na área de acadêmica, por servir de inspiração como grande profissional, por sua grande prestimosidade e pelas aulas da graduação no qual pude aproveitar os seus valiosos conhecimentos.

Agradeço aos meus amigos, em ordem alfabética para ninguém achar que tem grau de prioridade, “risos”! Luciana, Marcio, Neia, Renata, Romão e Viviam que estão comigo já há algum tempo uns mais outros menos, mas fizeram parte de muitos momentos da minha história desde as tristezas até as maiores vitórias e momento de felicidade. E estiveram lado a lado, companheiros para todas as horas, conversas, palhaçadas, fanfarragens, risadas e ai vai uma história que sempre está sendo sempre construída.

Agradeço a todos os meus amigos que eu fiz no mestrado, que se faz em muito, parte desta etapa cumprida. Sem eles não poderia usufruir de um ambiente agradável, de poder rir com as bobearas, palhaçadas e compartilhar os conhecimentos transmitidos por nossos mestres. Obrigado Paulo, por sua grande disposição e incentivo para me ajudar e também pelo companheirismo. Obrigado, Driele, companheira de sempre, pelo seu alto astral, companheirismo, incentivo e bondade. Obrigado Silas, por ser um grande amigo disposto a sempre ajudar.

Agradecimentos a FUNADESP e ao Tommasi analítica, pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

*"Os caminhos de Nosso Senhor só quem ama percorreu. Só quem sonha conheceu. São caminhos cheios de amor que nem sempre o sonhador é capaz de entender.*

*Alguém me disse que sonhou que estava numa praia caminhando com Jesus. E olhando as marcas na areia viu ao lado dos seus passos as pegadas de Jesus.*

*E aí ele falou: - Não te entendo, meu Senhor! E olhou para o chão. - Nos caminhos mais difíceis, eu não vejo as tuas marcas. Por que me deixaste só?*

*Jesus respondeu: - Os passos são só meus, jamais te abandonei. É que nos momentos mais difíceis de viver nos meus braços te levei."*

*(Pe. Zezinho)*



## RESUMO

A Dengue é uma doença causada por quatro sorotipos antígenicamente diferentes do arbovírus *Flavivirus*, transmitidos por mosquitos do gênero *Stegomyia*. Não existindo vacina que confira imunidade permanente aos sorotipos nem às suas variações genéticas, a principal medida de combate à doença é o controle vetorial através de inseticidas químicos. Diante desta estratégia, observou-se o surgimento de alterações da susceptibilidade de *St. aegypti* a organofosforados e piretróides em vários países e o surgimento da seleção de populações resistentes. Inseticidas biológicos e reguladores de crescimento foram alternativas de controle. Porém, outro método possível de controle do mosquito consiste no uso de compostos semioquímicos provenientes de extratos naturais e de óleos essenciais de plantas vem sendo estudado na busca de substâncias bioativas que diminuam a dependência aos químicos. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial larvicida dos óleos essenciais de *Copaifera langsdorffii* Desf., originária da Mata Atlântica, e *Copaifera multijuga* Hayne, originária da Floresta Amazônica contra *St. aegypti*. Das oleoresinas foram extraídos os óleos essenciais por hidrodestilação. Realizou-se a análise por cromatografia gasosa de alta resolução acoplada a espectrometria de massa - GC-MS - para a identificação dos componentes do óleo essencial de cada uma das copaibeiras. Nos bioensaios larvas de *St. aegypti* foram expostas a diferentes concentrações dos óleos e verificou-se a atividade larvicida e o período de atividade larvicida após exposição aos óleos nos intervalos 0, 24, 48 e 72 horas. A regressão próbitica estimou as  $CL_{50}$ ,  $CL_{95}$  e  $CL_{99}$ , e o melhor ajuste ao modelo, para o óleo essencial de ambas as espécies, foi obtido 24 horas a exposição das larvas ao óleo essencial. Assim, foram assumidas como  $CL_{50}$ ,  $CL_{95}$  e  $CL_{99}$ , respectivamente, para *C. langsdorffii*, os valores em ppm de  $97,63 \pm (4,45)$ ,  $128,19 \pm (14,02)$ ,  $452,26 \pm (74,44)$ ; e de  $314,91 \pm (15,32)$ ,  $751,18 \pm (54,02)$  e  $1076,75 \pm (107,11)$  para *C. multijuga*. Neste momento, o óleo essencial de *C. langsdorffii* se apresentou  $2,23 \pm (0,47)$  vezes mais potente que o de *C. multijuga*. Análise GC-MS indicou entre os compostos majoritários o  $\alpha$ -copaeno como o composto de maior capacidade para caracterizar as duas espécies de *Copaifera*. Enquanto o  $\beta$ -duprezianeno e o E-cariofileno como os compostos que permitem distinguir, respectivamente, *C. langsdorffii* de *C. multijuga*. Os resultados indicaram a potencialidade inseticida desses óleos contra larvas de *St. aegypti* em condições laboratoriais.

Palavras-chave: *Copaifera*, bálsamo, larvicida, *Aedes*, Culicidae, mosquitos, vetores, Leguminosae, Fabaceae.

## ABSTRACT

Dengue is a disease caused by four antigenically different serotypes of Flavivirus arbovirus transmitted by mosquitoes of the genus *Stegomyia*. If there is no vaccine that confers permanent immunity to serotypes or their genetic variations, the main measure to combat the disease is vector control using chemical insecticides. Given this strategy, we observed the appearance of alterations in susceptibility of *St. aegypti* to organophosphates and pyrethroids in several countries and the emergence of selection of resistant populations. Biological insecticides and growth regulators were control alternatives. However, another possible method for mosquito control is the use of semiochemicals compounds from natural extracts and essential oils from plants has been studied in search of bioactive substances decreased dependency to chemicals. The objective of this study was to evaluate the larvicidal potential of essential oils from *Copaifera langsdorffii* Desf., originating in the Atlantic Forest, and *Copaifera multijuga* Hayne, originally from the Amazon Rainforest against *St. aegypti*. Oleoresins of essential oils were extracted by hydrodistillation. Analysis was performed by high resolution gas chromatography coupled to mass spectrometry - GC-MS - for the identification of essential oil components of each copaibeiras. Bioassays *St. aegypti* larvae were exposed to different concentrations of oil and there was a larvicidal activity and the period of larvicidal activity after exposure to oil within the ranges 0, 24, 48 and 72 hours. Probitica regression estimated the LC<sub>50</sub>, LC<sub>95</sub> and LC<sub>99</sub>, and the best fit to the model, the essential oil of both species was obtained 24 hours exposure of larvae to the essential oil. Thus were assumed to LC<sub>50</sub>, LC<sub>99</sub> and LC<sub>95</sub>, respectively, for *C. langsdorffii* values in ppm  $\pm 97.63$  (4.45) 128.19 ( $\pm 14.02$ ), 452.26 ( $\pm 74.44$ ) and 314.91 ( $\pm 15.32$ ), 751, 18  $\pm$  (54.02) and 1076.75 ( $\pm 107.11$ ) for *C. multijuga*. At this time, the essential oil of *C. langsdorffii* presented  $\pm 2.23$  (0.47) times more potent than that of *C. multijuga*. - GC-MS analysis indicated the major compounds of the  $\alpha$ -copaene as the compound's ability to characterize the two species *Copaifera*. While  $\beta$ -duprezianeno and E-caryophyllene as compounds that can be distinguished, respectively, *C. langsdorffii* of *C. multijuga*. The results indicated the potential of these oils insecticide against *St. aegypti* larvae under laboratory conditions.

Keywords: *Copaifera*, Balsam, larvicide, Aedes, Culicidae, mosquitoes, vectors, Leguminosae, Fabaceae.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO II

- Figura 1 – Perfil cromatográfico e estrutura química dos principais constituintes do óleo essencial de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Mata Atlântica)..... 51
- Figura 2 – Perfil cromatográfico e estrutura química dos principais constituintes do óleo essencial de *Copaifera multijuga* Hayne (Floresta Amazônica)..... 52
- Figura 3 – Avaliação comparada do perfil cromatográfico apresentado os marcadores sugeridos das espécies *Copaifera langsdorffii* Desf. (Mata Atlântica) e *Copaifera multijuga* Hayne (Floresta Amazônica)..... 57

### CAPÍTULO III

- Figura 1 – Perfil cromatográfico e estrutura química dos principais constituintes dos óleos essenciais de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Mata Atlântica) e de *Copaifera multijuga* Hayne (Floresta Amazônica)..... 73

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

- Tabela 1 – Dados encontrados na literatura sobre óleos essenciais com atividade larvívora frente a larvas de *St. aegypti*..... 37

### CAPÍTULO II

- Tabela 1 – Rendimento, densidade absoluta, diversidade química e equitabilidade do óleo essencial de oleoresina de *Copaifera langsdorffii* Desf. e *Copaifera multijuga* Hayne..... 49
- Tabela 2 – Composição centesimal comparada do óleo essencial das oleoresinas de *Copaifera multijuga* Hayne e *Copaifera langsdorffii* Desf..... 53
- Tabela 3 – Composição química qualitativa e centesimal dos óleos essenciais da oleoresina de *Copaifera langsdorffii* Desf. e *Copaifera multijuga* Hayne..... 56

### CAPÍTULO III

- Tabela 1 – Rendimento, densidade absoluta, diversidade química e equitabilidade do óleo essencial de oleoresina de *Copaifera langsdorffii* Desf. e *Copaifera multijuga* Hayne..... 71
- Tabela 2 – Composição química qualitativa e centesimal dos óleos essenciais da oleoresina de *Copaifera langsdorffii* Desf. e *Copaifera multijuga* Hayne determinados por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa..... 72

## LISTA DE TABELAS cont.

### CAPÍTULO III

- Tabela 3 – Mortalidade larval de *St. aegypti* em um gradiente de concentração dos óleos essenciais de *Copaifera multijuga* Hayne e *Copaifera langsdorffii* Desf..... 75
- Tabela 4 – Regressão logística binária entre a concentração e o tempo de exposição aos óleos essenciais de oleoresina das copaibeiras brasileiras em estudo e a mortalidade de larvas de *St aegypti*..... 76
- Tabela 5 – Análise da atividade larvicida dos óleos essenciais de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Mata Atlântica) e *Copaifera multijuga* Hayne (Amazônica) com suas respectivas concentrações letais (CL)  $\pm$  erro padrão da média (EP), e parâmetros como coeficiente angular (angular), coeficiente linear (constante) nível de significância ( $p$ ) e  $\chi^2$  de Hosmer-Lemeshow de ajuste do modelo probístico testado a mortalidade das larvas instantaneamente à exposição e após 24, 48 e 72 horas para as larvas de *Stegomyia aegypti* aos óleos..... 78

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

as – Altamente significativo

Bti – *Bacillus thuringiensis*

C – Sequência de Hidrocarboneto

°C – Graus Celsius

CL<sub>50</sub> – Concentração letal que ocasiona mortalidade de 50%

CL<sub>95</sub> – Concentração letal que ocasiona mortalidade de 95%

CL<sub>99</sub> – Concentração letal que ocasiona mortalidade de 99%

DC – Dengue Clássica

DENV-1 – Sorotipo 1 do Vírus da Dengue

DENV-2 – Sorotipo 2 do Vírus da Dengue

DENV-3 – Sorotipo 3 do Vírus da Dengue

DENV-4 – Sorotipo 4 do Vírus da Dengue

DMSO – Dimetilsulfóxido

eV - Eletrovolts

FHD – Febre hemorrágica do dengue

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde

g – Gramas

GC-MS – Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa

H' – Índice de diversidade de Shannon-Weaverr

J – Equitabilidade;

JCR – Fator de impacto da Revista

K<sup>2</sup> – Teste de normalidade

KI – Índice de Retenção de Kovats

m – Massa

mg – Miligramas

ml – Mililitro

mg ml<sup>-1</sup> – Unidade de densidade

mm – Milímetros

ns – Não signigcativo

nts – Unidade para o índice de Diversidade de Shannon-Weaver quando se usa a base neperiana para o cálculo

p – Nível de significância

ppm – Partes por milhão

S – Sul

s – Significativo

SCD – Síndrome do choque do dengue

UVV – Universidade de Vila Velha

W – Oeste

WHO – Organização Mundial de Saúde

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	08
<b>ABSTRACT</b> .....	09
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	10
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	11
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	13
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
1.2.1 Dengue.....	20
1.2.2 Óleos Essenciais.....	21
1.2.3 Copaíba.....	24
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>3. ENCARTES DE PUBLICAÇÃO</b> .....	29
3.1 MANUSCRITO – A UTILIZAÇÃO DE DERIVADOS DE ESPÉCIES VEGETAIS NO CONTROLE DO VETOR DA DENGUE.....	29
RESUMO.....	30
1 INTRODUÇÃO.....	30
2 INSETICIDAS VEGETAIS.....	31
3 CONSIDERAÇÕES.....	38
4 REFERÊNCIAS .....	38



3.2 MANUSCRITO – AVALIAÇÃO COMPARADA DO ÓLEO ESSENCIAL DA OLEORESINA DE DUAS COPAIBEIRAS BRASILEIRAS ( <i>Copaifera langsdorffii</i> D E <i>Copaifera multijuga</i> Hayne) .....	44
RESUMO.....	45
1 INTRODUÇÃO.....	45
2 MÉTODOS EXPERIMENTAIS.....	47
3 RESULTADOS.....	48
4 DISCUSSÃO.....	58
5 CONCLUSÕES.....	59
6 REFERÊNCIAS .....	59
3.3 MANUSCRITO – AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA OLEORRESINA DE DUAS COPAIBEIRAS BRASILEIRAS SOBRE O DESENVOLVIMENTO LARVAL DE <i>Stegomyia aegypti</i> Linnaeus, 1754.....	62
RESUMO.....	63
1 INTRODUÇÃO.....	64
2 MÉTODOS.....	67
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
4 CONCLUSÕES.....	80
5 REFERÊNCIAS .....	81
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>87</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>90</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>92</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>104</b>
<b>ANEXO A - Normas da revista Parasites and Vectors (JCR 2,13).....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXO B - Normas da revista Journal of Natural Products (JCR 2,82).....</b>	<b>114</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Dengue é uma doença viral que tem consequências importantes na Saúde Pública mundial. Este problema tem crescido dramaticamente nas últimas décadas, e estima-se que cerca de dois quintos da população do mundo estão em risco de serem infectadas pelo vírus da dengue. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o principal vetor *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762) uma espécie altamente antropofílica que se adaptou ao ambiente urbano usando recipientes artificiais que recolhem água da chuva ou aqueles para uso doméstico no armazenamento de água como seu habitat larval (WHO, 2003).

Nomenclaturalmente, o vetor da dengue é muito referido, ainda nos dias de hoje, como *Aedes aegypti*. Porém, uma revisão taxonômica da tribo *Aedini* em 2004, propôs uma nova combinação para a espécie, que passou a integrar o gênero *Stegomyia*, baseado na construção de uma filogenia com base na morfologia de todos os estágios de vida, pela qual o gênero *Aedes* não se apresentou como monofilético. Entre outros, o até então subgênero *Stegomyia* foi elevado à condição de gênero, recebendo suas espécies novas combinações. Em consequência, a denominação adequada para o mosquito transmissor da dengue é *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762) (REINERT et al., 2004).

A alta densidade populacional do *St. aegypti* na área intertropical tem demandado várias intervenções pelas autoridades sanitárias, através da aplicação de inseticidas sintéticos como principal meio de controle do vetor. No entanto, o mosquito vem desenvolvendo resistência aos inseticidas organofosforados e carbamatos (BRAGA

et al., 2004; CAMPOS & ANDRADE, 2003; LIMA et al., 2003; MACORIS, et al., 2003). Considerando a necessidade de buscar métodos de controle que são menos ou mesmo atóxicos ao homem e ao meio ambiente, tem sido estimulada a busca de novos meios de controle da *St. aegypti*.

Deste ponto de vista, as plantas podem ser uma alternativa como agentes de controle, uma vez que constituem uma fonte rica de compostos químicos bioativos (CARVALHO et al., 2003; CHENG et al., 2004; SILVA et al., 2004; SIMAS et al., 2004; LIMA et al., 2006).

Considerando os danos causados por doenças como a dengue em países tropicais e subtropicais (HALSTEAD, 2008), e a biodiversidade de espécies de plantas nos trópicos, os estudos sobre o uso de produtos naturais de plantas que demonstram efeito larvicida potencial tem aumentado (SILVA et al., 2004), porque os produtos naturais são geralmente considerados seguros por não perturbarem o equilíbrio ecológico natural, além de serem naturalmente disponíveis e economicamente viáveis (BAKKALI et al., 2008), e, na natureza, eles correspondem a compostos fitoquímicos que foram predominantemente secundários, produzidos pelas plantas para se proteger contra insetos herbívoros (SILVA et al., 2004).

Em todo o mundo, compostos do óleo essencial de citronela têm sido utilizados, pelo menos, como repelente de insetos desde 1901 (KATZ et al., 2008), e desde 1947, vários estudos têm revelado um grande número de inseticidas extraídos de vegetais que contém um amplo espectro de componentes bioativos (SHAALAN et al., 2005). Quando se concentra a atenção às espécies vegetais sulamericanas, vários estudos

realizados no final do século XX apontam para a potencial aplicação de seus extratos no controle da densidade populacional de *St. aegypti*, mas sem indicação de qualquer marcador fitoquímico envolvido nesse efeito (CICCIA et al., 2000).

Entre as espécies de plantas brasileiras, tem se mantido a tendência de fazer triagens para a atividade larvicida dos extratos vegetais (OMENA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010) e alguns autores têm demonstrado atividade biológica contra as larvas de *St. aegypti*. Usando óleos fixos, óleos essenciais e extratos etanólicos, também sem elucidação sobre sua constituição fitoquímica, 17 espécies de plantas brasileiras apresentaram atividade larvicida (MENDONÇA et al., 2005). Entre os componentes do perfil fitoquímico dos extratos testados estão os terpenos, principalmente mono- e sesquiterpenos, fenilpropanóides, presumidos como as substâncias com atividade larvicida (SIMAS et al., 2004).

Aos óleos essenciais têm sido atribuída a maior importância quanto à atividade larvicida de derivados de plantas e extratos estudados no Brasil, mesmo quando as plantas estudadas eram exóticas (CAVALCANTI et al., 2004), mas as espécies vegetais nativas utilizadas como fontes de óleo essencial ainda estão sob o principal foco de investigação (FURTADO et al., 2005; LIMA et al., 2006; SILVA et al., 2007; PORTO et al., 2008), principalmente por causa do interesse na busca de inseticidas ambientalmente seguros (SILVA et al., 2007).

Sendo assim, o presente estudo faz a análise do óleo essencial da oleorresina de duas copaibeiras, do ponto de vista fitoquímico e ecológico, e seus efeitos frente às larvas da *St. aegypti* como uma alternativa para o controle do vetor.

## 1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.2.1 Dengue

O dengue é hoje a arbovirose mais importante do mundo. Estes vírus pertencem à família Flaviridae e incluem quatro sorotipos (DENV-1, 2, 3 e 4), que podem causar febre indiferenciada classicamente (WHO, 2009; MONATH, 1994). Cerca de 2,5 bilhões de pessoas se encontram sob risco de infecção, particularmente em países tropicais onde a temperatura e a umidade favorecem a proliferação do mosquito vetor. Entre as doenças re-emergentes é a que se constitui no problema mais grave de saúde pública (TAUIL, 2002).

O seu espectro clínico é muito amplo, variando de formas assintomáticas ou oligosintomáticas até formas graves e letais. As causas da ocorrência de formas graves ainda não estão plenamente estabelecidas, existindo algumas teorias explicativas relacionadas à maior virulência da cepa de vírus infectante, à seqüência de infecções pelos diferentes sorotipos do agente etiológico, a fatores individuais do hospedeiro e a uma combinação de todas as explicações anteriores (WHO, 2009). Por outro lado, apesar de muito pesquisada, ainda não está disponível uma vacina preventiva eficaz. Da mesma forma, não se pode contar ainda com uma terapêutica etiológica e nem com uma quimioprofilaxia efetivas. No momento, o único elo vulnerável na cadeia de transmissão do dengue a uma medida preventiva é o vetor (TAUIL, 2002).

O mosquito *St. aegypti* é a principal espécie responsável pela transmissão do dengue. É um mosquito doméstico, antropofílico, com atividade hematofágica diurna (fêmeas) e se utiliza, preferencialmente, de depósitos artificiais de água limpa para colocar os seus ovos (WHO, 2003). Estes têm uma alta capacidade de resistir à dessecação, mantendo-se viáveis na ausência de água por até 450 dias. *Stegomyia aegypti* tem mostrado uma grande capacidade de adaptação a diferentes situações ambientais consideradas desfavoráveis e adultos já foram encontrados em altitudes elevadas e larvas em água poluída (TAUIL, 2002).

### **1.2.2 Óleos Essenciais**

Os óleos essenciais são produzidos por estruturas secretoras especializadas como as glandulares (bolsas características), células parenquimáticas, pêlos e canais oleíferos. Podem ser estocados em certos órgãos vegetais tais como nas folhas, casca e frutos, onde estas estruturas secretoras ocorrem (SIMOES et al., 2004).

Os óleos essenciais são um produto do metabolismo secundário e estão contidos em vários órgãos da planta. Possuem varias funções importantes para os vegetais dentro do seu ecossistema, pois atuam defendendo-o contra microorganismos e predadores (HENRIQUES et al., 2000) e como sinalizadores químicos em vários processos ecológicos, como a polinização (SILVA & LUTZ 2004), a dispersão de frutos e sementes (HARBORNE, 1993), ou mesmo a localização de hospedeiros por seus insetos galhadores (MOURA et al., 2009).

Os compostos voláteis fazem parte das emissões de sinais químicos detectáveis pelos sistemas de olfação e gustação de um grande número de espécies animais (HARBORNE, 1993), provocando respostas semelhantes tanto para os sistemas de polinização, como para a dispersão de frutos e sementes e para a herbivoria (SPENCER, 1988; SILVA & LUTZ, 2004). Similares por serem interações tróficas, a polinização e a herbivoria diferem entre si pelas consequências ecológicas. Enquanto a herbivoria se caracteriza pelo antagonismo entre as partes, a polinização é principalmente mutualista (WEIS & CAMPBELL, 1992).

Quando a herbivoria e a polinização são analisadas em relação à essência da motivação, do consumidor, a busca de algum tipo de recurso se apresenta como um ponto comum entre elas, sendo que PELLMYR e THIEN (1986) sugeriram que fragrâncias florais teriam evoluído a partir de inibidores de herbivoria. Apesar da repercussão ecológica e evolutiva da polinização não ser menos importante que a da herbivoria, os estudos sobre a química e bioquímica da polinização avançaram muito menos que os ligados à herbivoria (SPENCER, 1988; HARBORNE, 1993).

Estudos sobre a mediação química dessas interações tornam-se ainda mais relevantes quando são considerados os progressos na investigação de voláteis florais (WILLIAMS; WHITTEN, 1983; KNUDSEN et al., 1993). A busca de perfis químicos de aromas florais característicos para as síndromes de polinização continua, contudo, motivando pesquisadores (KNUDSEN & TOLLSTEN, 1993; KNUDSEN & TOLLSTEN, 1995). Cuidados no estabelecimento destes perfis químicos têm sido fortemente recomendados, principalmente quando são feitas

inferências de respostas dos visitantes florais a aromas percebidos pelo homem. O olfato humano é sensorialmente muito limitado (VOGEL, 1963), em relação a outros grupos de animais (DUSENBERY, 1992), e é mais comumente sensibilizado pelo conjunto de componentes majoritários das fragrâncias (KAISER, 1993) que, por sua vez, estão sujeitos a convergências ecológicas (KNUDSEN & TOLLSTEN, 1995). Nem mesmo listagens químicas de compostos majoritários permitem tal inferência, a não ser que os efeitos dos voláteis sobre o visitante em questão já estejam disponíveis na literatura.

Muitos destes voláteis florais têm sido também isolados em secreções de abelhas (VINSON et al. 1978; DUFFIELD et al., 1984, WILLIAMS et al. 1987), apresentando desde sua estrutura química preservada, até modificações decorrentes do metabolismo dos insetos. ROUBIK (1989) propôs que o estímulo primário que guia as abelhas até a flor é a detecção de aromas semelhantes aos seus próprios. O aprendizado representa, portanto, um componente adicional na localização da flor e sua associação com algum tipo de recurso floral (LEWIS, 1993).

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos químicos com características voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (MARTINS et al., 2002). Podem estar presentes em um só órgão ou em toda planta, o que pode variar de acordo com a família. Podem ser produzidos em células secretoras, cavidades, ductos, células epidérmicas e tricomas. Geralmente, possuem densidade menor que da água e são solúveis em compostos orgânicos (BAKKALI et al., 2008).



A composição química dos óleos essenciais sofre importante influência do ambiente e tipo de cultivo que o vegetal é submetido, especialmente nas espécies cuja estocagem ocorre em regiões mais superficiais (MACIEL et al., 2002). Os óleos podem conter, mais comumente, cerca de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações. Geralmente 2 ou 3 componentes apresentam-se em maior concentração (20 – 70%) que vão caracterizar o óleo e determinar sua propriedade biológica (BAKKALI et al., 2008).

Entre os componentes dos óleos essenciais estão substâncias de diferentes classes químicas funcionais. Podem incluir substâncias nitrogenadas como aminas e amidas alifáticas e aromáticas, compostos fenólicos como os fenilpropanóides, cinâmicos ou cumarínicos; e compostos sulfurados principalmente derivados alílicos. Porém a grande predominância é dos compostos terpenóides como os mono e sesquiterpenóides ou mesmo alguns diterpenóides mais voláteis (BAKKALI et al., 2008).

### **1.2.3 Copaíba**

As copaibeiras são árvores da família Leguminosae, subfamília Caesalpinoideae, que alcançam de 25 a 40 metros de altura, podendo viver até 400 anos (VEIGA Jr & PINTO, 2002). Do tronco dessas árvores é obtida uma oleorresina, popularmente conhecida como óleo de copaíba, que funciona como defesa da planta contra animais, fungos e bactérias (PONTES et al., 2003). A composição química da oleoresina pode variar dependendo, principalmente da espécie de copaíba, da

época de obtenção e das características geográficas e climáticas da região onde a árvore cresce (LAMEIRA et al., 2009). A oleorresina é basicamente uma mistura de sesquiterpenos (fração óleo essencial), principalmente  $\beta$ -cariofileno, e diterpenos (CASCON; GILBERT, 2000; VEIGA Jr et al., 2007).

Espécies do gênero *Copaifera* são nativas da região tropical da América do Sul, onde crescem principalmente na floresta amazônica, na mata atlântica e savanas da região central brasileira, e do oeste da África. São encontradas 16 espécies no Brasil, incluindo *Copaifera reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne, *C. langsdorffii* Desf. e *C. cearensis* Huber ex Ducke (VEIGA Jr; PINTO, 2002).

A partir do século XVI, os primeiros colonizadores das Américas relataram que as índias aplicavam este óleo no umbigo dos recém-nascidos e os guerreiros, após as batalhas, em seus ferimentos, sendo observada sua utilização como agente antiinflamatório e cicatrizante. Os colonos também descobriram que o óleo de copaíba pode ser utilizado como antisséptico das vias urinárias e respiratória (PINTO et al., 2007). O uso generalizado levou à introdução da copaíba como fitoterápico e produtos cosméticos tanto nos mercados brasileiro como no internacional (VEIGA Jr; PINTO, 2002). Uma série de estudos descobriram atividades farmacológicas do óleo resina de copaíba que comprovaram alguns dos seus usos (POSSA et al., 2007), inclusive como anti-inflamatórios (CARVALHO et al., 2005; VEIGA Jr et al., 2007), antimicrobianos (TINCUSI et al. , 2002), antinociceptiva (GOMES et al., 2007), antioxidante (LIMA SILVA et al., 2009) e antiparasitários (SANTOS et al., 2008).

Estudos toxicológicos da oleoresina de copaíba, no entanto, são relativamente escassos. A toxicidade oral aguda da oleoresina parece ser baixa, e  $DL_{50}$  determinada em camundongos e ratos foi superior a 2000 mg/kg de peso corporal (GOMES et al., 2007; SACHETTI et al., 2009). Um estudo realizado por Cunha et al. (2003) demonstrou que o ácido kaurenóico tem efeitos relaxantes uterinos em ratas que são, aparentemente, resultado de duas ações distintas, um bloqueio dos canais de cálcio e a abertura de canais de potássio sensíveis ao ATP.

Depois da introdução do óleo de copaíba nas farmacopéias como medicamento antipenorrágico, seu uso se generalizou na medicina popular como cicatrizante e antiinflamatório local e, internamente, como diurético, expectorante e antimicrobiano nas afecções urinárias e da garganta, neste caso misturado ao mel-de-abelhas e limão (LORENZI; MATOS, 2002).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a avaliação comparada do óleo essencial da oleoresina de duas copaibeiras brasileiras e seus efeitos sobre o desenvolvimento larval de *Stegomyia aegypti* Linnaeus, 1762.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair quantitativamente o óleo essencial das oleoresinas de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Mata Atlântica) e *Copaifera multijuga* Hayne (Amazônica);
- Analisar quimicamente os óleos essenciais das espécies de copaíbas visando à identificação de marcadores fitoquímicos que permitam a sua identificação e padronização quantitativa tanto para operações de controle de qualidade de matérias primas como para a utilização quantitativa em ensaios biológicos;
- Identificar quimicamente os componentes dos óleos essenciais das espécies em estudo a partir da consulta em biblioteca molecular para os espectros de massas obtidos e dos Índices de Retenção Aritméticos Wan der Dolle o de Kovats calculados;
- Determinar a composição química qualitativa e quantitativa centesimal dos óleos essenciais extraídos;

- Investigar o grau de divergência entre a composição química dos óleos essenciais extraídos de acordo com a espécie;
  
- Avaliar o efeito dos óleos essenciais das oleoresinas de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Mata Atlântica) e *Copaifera multijuga* Hayne (Floresta Amazônica) sobre o desenvolvimento larval de *St. aegypti*.
  
- Analisar estatisticamente o efeito dos óleos essenciais das espécies em estudo sobre o desenvolvimento larvar de *St. aegypti*, através da análise de covariância;

### 3. ENCARTES DE PUBLICAÇÃO

#### 3.1 MANUSCRITO:

#### **A utilização de derivados de espécies vegetais no controle do vetor da dengue**

Manuscrito apresentado nas normas da revista Parasites and Vectors (JCR 2,13)

Geraldo Gomes da Silva<sup>1</sup>, Ary Gomes da Silva<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário Vila Velha – UVV. Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, Vila Velha, ES, Brasil - CEP 29.102-770.

\*Autor correspondente

Endereços de e-mail:

GGs: geraldo.far@hotmail.com; AGS: arygomes@uvv.br

# A utilização de derivados de espécies vegetais no controle do vetor da dengue

## Resumo

A intensiva utilização de inseticidas sintéticos contra vetores de arboviroses tem selecionado populações de mosquitos resistentes aos princípios ativos que compõem estes produtos, incluindo populações de *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762). O controle dessa espécie baseia-se principalmente na utilização de inseticidas químicos organofosforados e piretróides. Há vários estudos utilizando extratos de plantas ou seus derivados como uma alternativa a esses inseticidas sintéticos, a fim de diminuir a velocidade de seleção de populações resistentes aos inseticidas químicos. Neste artigo, vamos analisar o estado atual do conhecimento sobre espécies vegetais, com efeito, larvicida e discutir os avanços promissores na pesquisa fitoquímica.

## 1. Introdução

*Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762), uma nova combinação nomenclatural para *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762, (Diptera: Culicidae) apresenta grande interesse para a saúde humana devido à sua capacidade em transmitir doenças como o dengue e a febre amarela [1]. Suas populações conseguem se adaptar a novas condições impostas pelo homem [2], como por exemplo, capacidade de desenvolver suas larvas em uma ampla variedade de ambientes [3] e vem se tornando grande preocupação para saúde pública [4].

O dengue ocorre no mundo todo [4,5] e o controle da doença se baseia na erradicação do mosquito vetor. O seu combate ou controle pode ser realizado por diversas formas, como através de controle químico, físico, biológico ou integrado [6,7]. O controle químico é o mais utilizado, sendo feito com inseticidas e pesticidas

sintéticos [7]. Esse tipo de controle é rápido e eficaz, entretanto, em longo prazo traz sérios prejuízos ao meio ambiente, devido à alta toxicidade destas substâncias e à capacidade de permanecerem longos períodos no meio, poluindo água, solo e ar [8,9,10]. Outro grande problema em relação às substâncias químicas sintéticas é sua capacidade de selecionar populações de *St. aegypti* cada vez mais resistentes [8]. Isto por sua vez resulta no aumento da frequência e dosagem dos inseticidas, o que ocasiona maior resistência dos vetores assim como danos ambientais [11].

Devido a esses prejuízos ocasionados, tem aumentado estudos relativos ao uso de produtos naturais e biodegradáveis com atividade larvicida, sendo as plantas a principal fonte para o controle de culicídeos [12,13,11]. Os produtos naturais protegem o equilíbrio ecológico, além de serem disponíveis e economicamente viáveis [14]. Os metabólitos secundários, compostos biossintetizados pelas plantas são considerados fonte potencial para o controle de mosquitos. Entre eles o óleo essencial é o que tem recebido destaque [11,15].

O presente trabalho tem como objetivo fazer uma revisão sobre os estudos que utilizaram inseticidas botânicos no controle da dengue.

## **2. Inseticidas vegetais**

Os derivados de planta, extratos e óleos são amplamente conhecidos pela sua diversidade química e pela sua variada aplicação na indústria. As plantas possuem uma rica fonte de compostos químicos bioativos que podem ajudar no controle de pragas. O conhecimento popular sobre o uso e a eficácia das plantas contribui de forma relevante para a divulgação de suas propriedades, despertando o interesse de pesquisadores de diferentes áreas do conhecimento [16].



Muitas plantas são importantes fornecedoras de metabólitos secundários com atividade inseticida. Essas substâncias são de baixo peso molecular, sendo muitas vezes produzidas em pequena quantidade, tais como alcalóides, terpenóides e derivados fenilpropanóides, e funcionariam naturalmente como agentes defensivos contra predadores [17]. Os metabólitos secundários podem ser utilizados como um método alternativo aos inseticidas sintéticos, pois normalmente agem em doses baixas e com ações específicas, além de poucos serem tóxicos a mamíferos [18, 19].

Trabalhos recentes têm demonstrado a busca e o desenvolvimento de extratos brutos ou óleos essenciais ou, ainda, de compostos isolados que atuam contra mosquitos, inclusive contra *St. aegypti*. Um exemplo é o estudo de Cavalcanti *et. al.* (2004) que avaliaram a atividade larvicida de nove óleos essenciais de plantas encontradas no Nordeste brasileiro, observando que os óleos de *Ocimum americanum* L. e *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) obtiveram a melhor eficácia contra *St. aegypti*, CL<sub>50</sub> de 67 ppm e 60 ppm, respectivamente [20]. No trabalho de Silva *et al.* (2010) foi comprovada a atividade larvicida do óleo essencial de *Schinus terebinthifolia* Raddi sobre larvas de *Stegomyia aegypti* (uma nova combinação para *Aedes aegypti*). A concentração inibitória mínima do óleo foi 862,20 µg ml<sup>-1</sup> e a dose letal média (LD<sub>50</sub>) foi entre as concentrações 172,44 – 344,88 µg ml<sup>-1</sup> estes dados apontam a utilização de dispersões do óleo essencial em água para atividade larvicida para *St. aegypti* [19]. Outro estudo com uma população diferente da mesma espécie *S. terebinthifolia* Raddi sobre larvas dos vetores da malária, *Anopheles gambiae*, *Anopheles arabiensis* e *Culex quinquefasciatus*, realizado por Kweka *et al.* (2011), também comprovou a atividade larvicida do óleo essencial desta espécie em concentrações de 202,15 a 2625,20 ppm [21].

Esses derivados fitoquímicos apresentam diversas atividades contra insetos, podendo ter efeito larvicida, ser inibidores de oviposição, de crescimento e reprodução ou interferir nos receptores olfativos sendo atrativos ou repelentes. Também podem atuar em todos os estágios de vida dos mosquitos ou agir de forma diferenciada nas diferentes espécies [22].

Prajapati *et al.* (2005) demonstraram que um mesmo extrato pode apresentar mais de um efeito na mesma espécie ou em famílias diferentes. Os autores avaliaram o efeito inibidor da oviposição, a atividade inseticida e repelente de óleos essenciais de 10 plantas medicinais contra *St. aegypti*, *Anopheles stephensi* Liston, 1901 e *Culex quinquefasciatus* Say, 1823. Concluíram que os óleos de *Juniperus macropoda* (Cupressaceae) e *Pimpinella anisum* (Apiaceae) foram os que apresentaram maior eficácia como larvicida e ovicida [23].

A composição química das plantas altera conforme a resposta desta aos diferentes estímulos ambientais. Essa característica é importante ao se produzir um produto de origem vegetal. Fatores como diferentes partes da planta, o solvente utilizado para extração; a interferência da luz e a origem geográfica da planta podem alterar a ação dos fotoquímicos [22]. A importância desses fatores pode ser verificada no estudo de Rahuman *et al.* (2008), onde avaliaram cinco plantas da família Euforbiaceae utilizando extratos de acetato de etila, butanol e de éter de petróleo contra *St. aegypti* e *C. quinquefasciatus*. Nos dois primeiros extratos foi verificada baixa mortalidade das larvas. Entretanto em todos os extratos de éter de petróleo ocorreu elevada mortalidade contra as duas espécies de Culicidae, sendo os mais eficazes o extrato de *Euphorbia tirucalli* L. e *Jatropha curcas* L [24].

As condições de execução dos bioensaios, como a temperatura, o estado nutricional de adultos e imaturos e as substâncias utilizadas na diluição em água dos

fitoquímicos após sua extração, podem alterar a suscetibilidade dos indivíduos ou a toxicidade dos extratos [22]. Quando Wandescheer *et al.* (2004) compararam a atividade inseticida de extratos etanólicos do fruto de *Melia azedarach* L. e *Azadirachta indica* A. Juss., ambas espécies da família Meliaceae, nas temperaturas de 25°C e 30°C contra larvas de *St. aegypti* alimentadas e não alimentadas durante o experimento, verificaram que os valores das concentrações letais para as larvas não alimentadas foram menores para *A. indica* em ambas a temperaturas. Quando o experimento foi realizado com alimento, o extrato de *M. azedarach* foi mais eficiente que *A. indica* a temperatura de 25°C, mas não na temperatura de 30°C, sendo nessa temperatura a concentração letal de *A. indica* a menor verificada ( $CL_{50} = 0,017g\%$ ) nos experimentos [25]. Como esses derivados de plantas normalmente não são solúveis em água após sua extração, muitos pesquisadores utilizam Dimetilsulfóxido – DMSO – como tensoativo para dispersão em sistemas hidrofílicos [26].

A utilização de inseticidas obtidos de plantas pode ser vantajosa em relação aos sintéticos. Como são provenientes de recursos renováveis e por serem uma mistura de vários compostos ativos agindo sinergicamente, a seleção de resistentes pode ocorrer em menor intensidade [17]. Por outro lado, devem ser bem estudados, pois esses fitoquímicos podem colocar em risco outros organismos que não seriam o alvo do controle. Os extratos metanólicos de folhas de *Atalantia monophylla* DC. (Rutaceae), quando testados contra *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi* e *St. aegypti*, evidenciaram uma atividade larvicida maior contra *St. aegypti* e as pupas de *An. stephensi* foram mais suscetíveis. Quando estes extratos foram testados contra outros organismos, eles se apresentaram seguros para três espécies de peixes, *Gambusia affinis* (Baird & Girard, 1853) (Cyprinodontiformes: Poeciliidae),

*Poecilia reticulata* Peters, 1859 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) e *Diplonychus indicus* Venkatesan & Rao, 1980 (Hemiptera: Belostomatidae) [27].

Estudos que indicam a ação dos produtos botânicos em análises morfológicas das larvas e a indicação da classe do composto químico desses produtos são importantes para saber a real eficácia do inseticida botânico. Arruda *et. al.* (2003) avaliaram o efeito do extrato bruto etanólico da casca do caule de *Magonia pubescens* A. St.-Hil. (Sapindaceae) no tubo digestivo de larvas de *St. aegypti*. Observaram que a maior parte das alterações ocorreu no mesentério, sendo as principais: destruição total ou parcial das células; alta vacuolização citoplasmática; aumento do espaço subperitrófico; hipertrofia das células e aparente estratificação epitelial [9]. Continuando os trabalhos com *M. pubescens*, Silva *et. al.* (2004) fracionaram o mesmo extrato bruto obtendo nove frações, denominadas pelos autores de MP-1 a MP-9. Todas foram avaliadas contra *St. aegypti* e apenas as frações denominadas MP-7, MP-8 e MP-9 apresentaram-se ativas, essas frações ativas foram caracterizadas por condensados de tanino. A MP-9 foi a que apresentou o maior potencial larvicida com CL<sub>50</sub> de 3,1 ppm e CL<sub>90</sub> de 36,6 ppm [13]. Diferentes substâncias inseticidas também já foram identificadas em outras plantas. No extrato de éter de petróleo do fruto de *Piper nigrum* L. (Piperaceae), que apresentou atividade larvicida contra o *St. aegypti*, forem isoladas duas amidas inseticidas, denominadas pipnoohina e pipyahyina [28]. Outro exemplo de substâncias que chamam a atenção pelas suas propriedades inseticidas são as acetogeninas, essas isoladas de plantas tropicais da família Annonaceae.

Assim a bioatividade de fitoquímicos contra larvas de mosquito pode variar expressivamente para uma planta, dependendo da espécie, da parte utilizada, da idade da planta, do solvente utilizado na extração e das espécies de mosquitos

(Tabela 1). Na maioria dos estudos sobre marcadores fitoquímicos inseticidas, repelentes de insetos ou larvicidas, o enfoque está em ervas e outras plantas medicinais. Isto é, porque conhecimento experiencial histórico e alguns estudos científicos têm mostrado que eles sejam particularmente ativos contra determinados organismos. Vários estudos têm-se centrado especificamente sobre plantas medicinais em diferentes regiões geográficas. Geralmente uma conexão entre a atividade é extrapolada planta contra agentes de doenças com base na experiência tradicional e atividade inseticida contra os mosquitos.

**Tabela 1** - Dados encontrados na literatura sobre óleos essenciais com atividade larvicida frente a larvas de *St. aegypti*.

Espécie Vegetal	Parte da planta utilizada na extração do óleo essencial	Método de Extração do óleo essencial	Componente Principal <sup>1</sup>	Larvas	Referência
<i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi	Frutos	Hidrodestilação (aparelho do tipo Clevenger)	δ-3-careno (55,43%)	<i>St. aegypti</i> <i>An. gambiae</i> , <i>An. arabiensis</i> , <i>Cu. quinquefasciatus</i> ;	[19] [21]
<i>Pterodon polygalaeflorus</i> Benth	Frutos secos	Solvente Orgânico (n-hexano) e após remoção do solvente em evaporador rotatório	6-α-acetoxivouacapano 6-α-hidroxivouacapano Vouacapano	<i>St. aegypti</i>	[12]
<i>Magonia pubescens</i> St. Hil.	Cascas do caule	Percolação com etanol e evaporador rotativo	Taninos catéquicos	<i>St. aegypti</i>	[13]
<i>Myroxylon balsamum</i> (L.) Harms	Cascas secas	Maceração em etanol	Monoterpenos, fenilpropanóides e sesquiterpenos	<i>St. aegypti</i>	[11]
<i>Melia azedarach</i> L. <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	Sementes de frutos maduros	Solvente Orgânico	Limonoid	<i>St. aegypti</i>	[25]
<i>Copaifera reticulata</i> Ducke	Óleo-resina	Solventes Orgânicos (n-hexano e metanol)	1 [(-)- 3β-acetoxylabdan - 8(17)-13-dien-15-oic acid]	<i>St. aegypti</i>	[29]
<i>Croton argyrophylloides</i> Mull.Arg. <i>Croton nepetaefolius</i> Mull.Arg. <i>Croton sonderianus</i> Mull.Arg. <i>Croton zehntneri</i> Mull.Arg.	Caule e folhas	Hidrodestilação (aparelho do tipo Clevenger)	α-pinene (20,96%) Methyleugenol (48,47%) β-Phelandrene (18,21%) Trans-Anetol (94,09%)	<i>St. aegypti</i>	[30]
<i>Ageratum conyzoides</i> L. <i>Cymbopogon citratus</i> Stapf <i>Lippia sidoides</i> Chamiso <i>Ocimum gratissimum</i> L. <i>O. basilicum purpurascens</i> Benth <i>O. tenuiflorum</i> L. <i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt <i>Tagetes minuta</i> L. <i>Vanillosmopsis arborea</i> Baker <i>Citrus limon</i> L.	Folhas Caule Cascas da fruta	Hidrodestilação (aparelho do tipo Clevenger)	Precocene (62,6%) Neral (63,6%) Thymol (73,1%) Eugenol (54,0%) Linalool (81,5%) Eugenol (59,4%) Citronelal Dihydrotagetone (91,5%) Alfa-bisablol Limoneno	<i>St. aegypti</i>	[31]
<i>Hyptis martiusii</i> Benth. <i>Syzigium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M. Perry <i>Lippia sidoides</i> Cham.	Folhas Botões florais Folhas	Hidrodestilação (aparelho do tipo Clevenger modificado)	1,8-cineol (24,3%) Eugenol (80,8%) Tymol (43,5%)	<i>St. aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i>	[32]

<sup>1</sup>Os valores entre parênteses são referentes à porcentagem dos principais componentes dos óleos essenciais presentes no espécie vegetal.

### 3. Considerações

Os óleos essenciais oferecem hoje como misturas naturais uma ampla fonte de produtos potencialmente aplicados ao controle de mosquitos vetores. Se forem consideradas as substâncias que estão presentes em cada mistura, que pode ultrapassar 60 componentes, esse produtos naturais ampliam muito a oferta de substâncias ativas aplicáveis ao controle do desenvolvimento larvar dos mosquitos.

Tratando os óleos essenciais como misturas ou como suas substâncias componentes isoladas eles representam substâncias originárias de sistemas biológicos, portanto mais compatíveis com a vida e com menor risco de dano ambiental.

### Conflito de interesses

Os autores declaram que não têm interesses conflitantes.

### Agradecimentos

Reconhecemos a FUNADESP, para a concessão de Pesquisa de Ary G. da Silva, Universidade de Vila Velha - UVV.

### 4. Referências

1. Fundação Nacional da Saúde: **Dengue: instruções para pessoal de combate ao vetor, manual de normas técnicas**. Brasília: Funasa, 3 2001.
2. Varejão JBM, Santos CB, Rezende HR, Bevilacqua LC, Falqueto A: **Criadouros de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em bromélias**

- nativas na Cidade de Vitória, ES. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2005, **38(3)**: 238-240.
3. Souza-Santos R: **Fatores associados à ocorrência de formas imaturas de *Aedes aegypti* na Ilha do Governador, Rio de Janeiro, Brasil.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1999, **32(4)**:373-382.
  4. Serpa LLN, Costa KVRM, Voltolin JC, Kakitan, I: **Variação sazonal de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no município de Potim, São Paulo.** *Revista de Saúde Pública* 2006, **40(6)**: 1-5.
  5. World Health Organization: **Dengue bulletin: Situation of dengue / dengue hemorrhagic fever in SEA countries.** WHO, 2004.
  6. Gomes AC, Souza JMP, Bergamaschi DP, Santos JLF, Andrade VR, Leite OF, Rangel O, Souza SSL, Guimarães NSN, Lima VLC: **Atividade antropofílica de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em área sob controle e vigilância.** *Revista de Saúde Pública* 2005, **39(2)**:206-210.
  7. Neves AP, Melo AL, Linardi RM, Vitor RWM: Culicidae In: *Parasitologia Humana* (11) São Paulo: Atheneu 2007.
  8. Carvalho LAF, Silva IG: **Avaliação longitudinal da atividade do temephós a 1% sobre o *Aedes aegypti* (Lin, 1762).** *Entomologia y Vectores* 2000, **7**:191-201.
  9. Arruda W, Oliveira GMC, Silva IG: **Toxicity of the ethanol extract of *Magonia pubescens* on larvae *Aedes aegypti*.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2003, **36(1)**: 17-25.
  10. Cavalcanti LPG, Pontes RJS, Regazz ACF, De-Paula-junior FJ, Frutuoso RL, Sousa EP, Dantas-filho FF, Lima JWO: **Competência de peixes como**



- predadores de larvas de *Aedes aegypti*, em condições de laboratório.**  
*Revista Saúde Pública* 2007, **41(4)**:638-644.
11. Simas NK, Lima EC, Conceição SR, Kuster RM, Oliveira-filho AM: **Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides.** *Química Nova* 2004, **27(1)**:46-49.
12. Pimenta ATA, Santiago GMP, Arriaga AMC, Menezes GHA, Bezerra SB: **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvicida de *Pterodon polygalaeflorus* Benth (Leguminosae) sobre *Aedes aegypti*.** *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2006, **16(4)**:501-505.
13. Silva HHG, Silva IG, Santos RMG, Filho ER, Elias CM: **Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae).** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2004, **37(5)**: 396-399.
14. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M: **Biological effects of essential oils – A review.** *Food and Chemical Toxicology* 2008, **46**:446–475.
15. Pitasawat B, Champakaew D, Choochote W, Jitpakdi A, Chaithong U, Kanjanapothi D, Rattanachanpichai E, Tippawangkosol P, Riyong D, Tuetun B, Chaiyasit D: **Aromatic plant-derived essential oil: An alternative larvicide for mosquito control.** *Fitoterapia* 2007, **78**: 205-210.
16. Maciel MAM, Pinto AC, Veiga-Junior VF, Grynberg NF, Chevarria A: **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares.** *Química Nova* 2002, **25(3)**:429-438.

17. Barreto CF: ***Aedes aegypti*: Resistencia aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle.** *Revista eletrônica Faculdade Montes Belos* 2005, **1**:62-73.
18. Regnault-Roger C: **The potencial of botanical essential oils for insect pest control.** *Integrated Pest Management Reviews* 1997, **2**:25-34.
19. Silva AG, Almeida DL, Ronchi SN, Bento AC, Scherer R, Ramos AC, Cruz ZMA: **The essential oil of Brazilian pepper, *Schinus terebinthifolia* Raddi in larval control of *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762).** *Parasites & Vectors* 2010, **3**:79.
20. Cavalcanti ESB, Morais SM, Lima MAA, Santana EWP: **Larvicidal activity of essencial oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2004, **99(5)**:541-544.
21. Kweka EJ, Nyindo M, Mosha Franklin, Silva AG: **Insecticidal activity of the essential oil from fruits and seeds of *Schinus terebinthifolia* Raddi against African malaria vectors.** 2011, *Parasites & Vectors* 2011, **4**:129.
22. Sukumar K, Perich MJ, Boobar LR: **Botanical derivatives in mosquito control: a review.** *Journal of the American Mosquito Control Association* 1991, **7**:210-237.
23. Prajapati V, Tripathi AK, Aggarwal KK, Khanuja SPS: **Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essencial oils against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*.** *Bioresource Technology* 2005, **96**:1749-1757.
24. Rahuman AA, Gopalakrishnan G, Venkatesan P, Geetha K: **Larvicidal activity of some Euphorbiaceae plant extracts against *Aedes aegypti* and**

- Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae).** *Parasitology Research* 2008, **102**:867-873.
25. Wandscheer CB, Duque JEL, Navarro-Silva MA, Fukuyama Y, Wohlke JL, Adelman J, Fontana JD: **Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*.** *Toxicon* 2004, **44**:829-35.
26. Kim SJ, Jung YS, Yoon MY, Kim YC: **Comparative effects of dimethylsulfoxide on metabolism and toxicity of carbon tetrachloride and dichloromethane.** *Journal of Applied Toxicology* 2007, **27**:25-31.
27. Sivagnaname N, Kalyanasundaram: **Laboratory Evaluation of Methanolic Extract of *Atlantia monophylla* (Family: Rutaceae) against Immature Stages of Mosquitoes and Non-target Organisms.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2004, **99(1)**:115-118.
28. Siddique BS, Gulzar T, Mahmood A, Begum S, Khan B, Afshan F: **New Insecticidal Amides from Petroleum Ether Extract of Dried *Piper nigrum* L. Whole Fruits.** *Chemical & Pharmacological Bulletin* 2004, **52(11)**:1349-1352.
29. Geris R, Silva IG, Silva HHG, Barison A, Rodrigues-filho E, Ferreira AG: **Diterpenoids from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae).** *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 2008, **50(1)**:25-28.
30. Lima MGA, Maia ICC, Sousa BD, Morais SM, Freitas SM: **Effect of stalk and leaf extracts from Euphorbiaceae species on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae) Larvae.** *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 2006, **48(4)**:211-214.

31. Furtado RF, Lima MGA, Neto MA, Bezerra JNS, Silva MG: **Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae).** *Neotropical Entomology* 2005, **34(5)**:843-847.
32. Costa JGM, Rodrigues FFG, Angélico EC, Silva MR, Mota ML, Santos NKA, Cardoso ALH, Lemos TLG: **Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*.** *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2005, **15(4)**:304-309.

3.2 MANUSCRITO:

AVALIAÇÃO COMPARADA DA QUÍMICA DO  
ÓLEO ESSENCIAL DA OLEORESINA DE  
DUAS COPAIBEIRAS BRASILEIRAS  
(*Copaifera langsdorffii* Desf. E *Copaifera  
multijuga* Hayne)

Manuscrito apresentado nas normas da revista Journal of Natural Products (JCR 2,82)

Geraldo G. Silva, Luiz C. Cavalcanti, Rodrigo Scherer, e Ary G Silva\*

Centro Universitário Vila Velha – UVV. Rua Comissário José Dantas de Melo, 21,  
Boa Vista, Vila Velha, ES, Brasil - CEP 29.102-770.

---

\* Para quem correspondência deve ser endereçada. Tel: (5527) 3421-3000. Fax: (5527) 3421-3000. E-mail: arygomes@uvv.br

# AValiação Comparada da Química do Óleo Essencial da Oleoresina de Duas Copaiibeiras Brasileiras (*Copaifera langsdorffii* Desf. E *Copaifera multijuga* Hayne)

## Resumo

*Copaifera langsdorffii* Desf. e *Copaifera multijuga* Hayne, são fonte de óleos essenciais que estudos anteriores indicam ações antiinflamatória e antibacteriana. Comparou-se o rendimento, densidade, composição quali-quantitativa, diversidade química e equitabilidade. Foram identificadas 47 substâncias no óleo essencial de *C. langsdorffii*, tendo como substância majoritária o  $\beta$ -dupreziano (43,7%) e 54 substâncias no de *C. multijuga*, sendo majoritário o E-cariofileno (33,08%); 12 substâncias foram comuns a ambos os óleos.

Palavras-chave: Cromatografia gasosa, Aroma, Compostos Voláteis, Mata Atlântica, Floresta Amazônia e Bálsamo.

## 1. Introdução

As plantas do gênero *Copaifera* encontram-se distribuídas na África e em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul principalmente no Brasil, Venezuela, Guianas e Colômbia. No Brasil são encontradas principalmente nos estados do Pará e Amazonas.<sup>1</sup> Estas plantas fornecem o oleoresina de copaíba, também conhecido por bálsamo de copaíba, por exsudação do tronco, principalmente de *Copaifera reticulata* Ducke, a copaíba marimari; *Copaifera officinalis* (Jacq.) L., a copaíba verdadeira; e *Copaifera langsdorffii* Desf., copaíba vermelha,<sup>2,3,4</sup> cujo interesse se deve ao seu variado uso na medicina popular, principalmente como cicatrizante e anti-inflamatório.<sup>2</sup>

*C. langsdorffii* é uma árvore conhecida popularmente por copaíba, pau-d'óleo, podói, cupaúba e cupiúva.<sup>2</sup> Os estudos químicos e farmacológicos dos óleos essenciais dos frutos e das cascas dos frutos de *C. langsdorffii* em estudo foram descritos em relatos anteriores. Os constituintes principais identificados para o óleo essencial dos frutos foram:  $\gamma$ -muuroleno (29,8%) e  $\beta$ -cariofileno (14,8), enquanto que para o óleo das cascas dos frutos o constituinte principal era o óxido de cariofileno (47,3%).<sup>5,6</sup> As atividades antinociceptiva e antiinflamatória do óleo essencial das cascas dos frutos foram descritas por Paiva *et al.*<sup>7</sup> Em uma área de plantação de *Copaifera multijuga* Hayne na Reserva Adolfo Ducke, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), em Manaus, árvores de grande porte atingem até 36m de altura com diâmetro de até 80cm.

Muitos dos trabalhos realizados com o gênero *Copaifera* estão relacionados com o oleorresina que é obtida do tronco destas árvores. Segundo alguns autores, esse óleo é produto da desintoxicação do organismo vegetal e funciona como defesa da planta contra animais, fungos e bactérias.<sup>4,8,9</sup> As espécies desse gênero que produzem oleorresina em quantidades apreciáveis são encontradas nas regiões tropicais da América do Sul, como o Brasil, a Venezuela e a Colômbia, com maior ocorrência no Brasil, onde apresentam ampla distribuição na mata de terra firme da Amazônia.<sup>4,9,10</sup> Segundo Bandeira *et al.* (1999), o oleorresina de *C. multijuga* apresenta em sua composição vários sesquiterpenos, principalmente  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, cedreno, cadineno e bisaboleno.<sup>8</sup> Estudos demonstraram atividade antibacteriana do oleorresina de *C. multijuga* frente aos *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis*.<sup>11,12,13</sup>

Diversos fatores podem afetar a composição qualitativa e quantitativa dos óleos essenciais, mesmo entre diferentes indivíduos da mesma espécie<sup>14,15,16</sup> e por isto faz-se necessária à caracterização fitoquímica de toda amostra de extratos e derivados de plantas utilizados em ensaios biológicos. Objetiva-se identificar a composição qualitativa e quantitativa do óleo essencial das oleoresinas de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Mata Atlântica) e *Copaifera multijuga* Hayne (Amazônia).

## 2. Materiais e Métodos

### Extração do óleo essencial, e determinação da densidade

As oleoresinas das árvores das copaibeiras brasileiras foram coletadas a partir espécimes de *Copaifera langsdorffii* Desf., originários da região rural de Castelo, Espírito Santo, Brasil nas coordenadas 20°30'45''S e 41°11'20''W, e de espécimes de *Copaifera multijuga* Hayne que ocorrem na região do município de Ariquemes, Rondônia, Brasil nas coordenadas 9°52'50''S e 63°04'27''W. Exsicatas destas espécies estão depositadas no Herbário UVV-ES sob número de registro 2164 e 2165, respectivamente. A extração de óleo essencial foi feita por hidrodestilação em um aparelho de Clevenger a partir de 200g da oleoresina de *C. langsdorffii* e 300g de *C. multijuga* sendo, a extração realizada a partir de alicotas de 50g em cada ensaio, durante uma hora de processo extrativo, contados a partir da ebulição da amostra, com aquecimento mantido na temperatura mínima necessária à ebulição. Este procedimento foi realizado no laboratório de Ciências Químicas, na UVV. Após a extração, o óleo essencial foi transferido para um frasco de vidro, e sua purificação foi feita por separação da água remanescente por congelamento, e o óleo essencial que foi mantido 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 banho-maria com temperatura controlada. Cada óleo essencial foi pesado em uma balança analítica com precisão de 1,0 mg.

### Análise cromatográfica

A identificação dos componentes do óleo essencial de cada uma das copaibeiras em estudo foi realizada por cromatografia em fase gasosa de alta resolução, no Laboratório de Química Fina, no Tommasi Analítica. O volume de injeção foi 2µL, composto por 1,6 µL de uma solução de óleo essencial (30mg/ml) e 0,4 µL de uma solução de uma série de hidrocarbonetos de C7-C30, como padrão interno, tendo o *n*-hexano como solvente. Na cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas - CG-EM – o sistema utilizado consistiu de um cromatógrafo a gás da Thermo Scientific® Ultra GC acoplado a um espectrômetro de massa, Thermo Scientific®. Foi



utilizada uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 J & W Scientific (30m x 0,25 mm x 0,25 mm). O gás de arraste foi o hélio e o programa de temperatura da coluna consistiu em aumentos de 3° C por minuto, entre 60°-240° C. Os espectros de massa foram obtidos em 70eV a velocidade de varredura de 0,84 scan/s, na faixa de m/z 40-500<sup>17</sup>. O tempo de retenção dos componentes da amostra e uma mistura de *n*-alcanos de C7-C30, co-injetados no sistema GC-MS no âmbito do mesmo programa de temperatura foram utilizados para o cálculo do Índice de Retenção de Kovats – IK e do Índice Aritmético de Van der Dool e Kratz - IA. A identificação dos componentes do óleo essencial foi baseada nos espectros de massas obtidos, na comparação deles com a biblioteca espectral de CG-EM nos IK e IA calculados em comparação com a literatura disponível<sup>17</sup>.

### **Análise dos dados**

O perfil fitoquímico qualitativo e quantitativo dos óleos essenciais foi determinado a partir do hidrodestilado da oleorresina das duas copaibeiras brasileiras em estudo, em co-injeção de uma mistura de hidrocarbonetos (C7-C30), introduzida na análise como padrão externo para monitoramento do processo, e da extração de quatro amostragens independentes para *Copaifera langsdorffii* Desf (Mata Atlântica) e seis amostras de *Copaifera multijuga* Hayne (Floresta Amazônica).

A diversidade química das três amostras da oleoresina de *C. langsdorffii* e das três amostras de *C. multijuga* foi estimada pelo índice de Diversidade de Shannon-Weaver –  $H'$  – e testado em relação a eventuais diferenças pelo teste *t* para amostras independentes, tendo cada coleta como replicata. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade de igualdade entre os índices médios foi  $p \leq 0,05$ <sup>18</sup>.

### **3. Resultados**

O óleo essencial de ambas as espécies constituiu-se num líquido oleoso de baixa viscosidade, incolor e translúcido. Não houve diferenças significativas entre o rendimento do processo extrativo e a densidade do óleo essencial. Apesar disso do

ponto de vista fitoquímico e ecológico houve uma diferença altamente significativa para a diversidade química e diferenças significativas para a equitabilidade, entre as espécies (Tabela 1), sendo estas variáveis maiores em *C. langsdorffii*.

**Tabela 1.** Rendimento, densidade absoluta, diversidade química e equitabilidade do óleo essencial de oleoresina de *C. langsdorffii* e *C. multijuga*.

Parâmetro	Média ± Erro Padrão		Teste <i>t</i> (GL =8)	p-Valor
	<i>C. langsdorffii</i>	<i>C. multijuga</i>		
Rendimento (%)	26,202 ± 2.919	35,666 ± 6.433	1,131	0,291 <sup>ns</sup>
Densidade (g mL <sup>-1</sup> )	0,905 ± 0.007	0,894 ± 0.020	-0,438	0,291 <sup>ns</sup>
Diversidade química ( <i>H'</i> )	2.211 nats ± 0.034	1.462 nats ± 0.169	-3,515	0,01 <sup>as</sup>
Equitabilidade (J)	0.603 ± 0.02	0,413 ± 0.051	-2,983	0,02 <sup>s</sup>

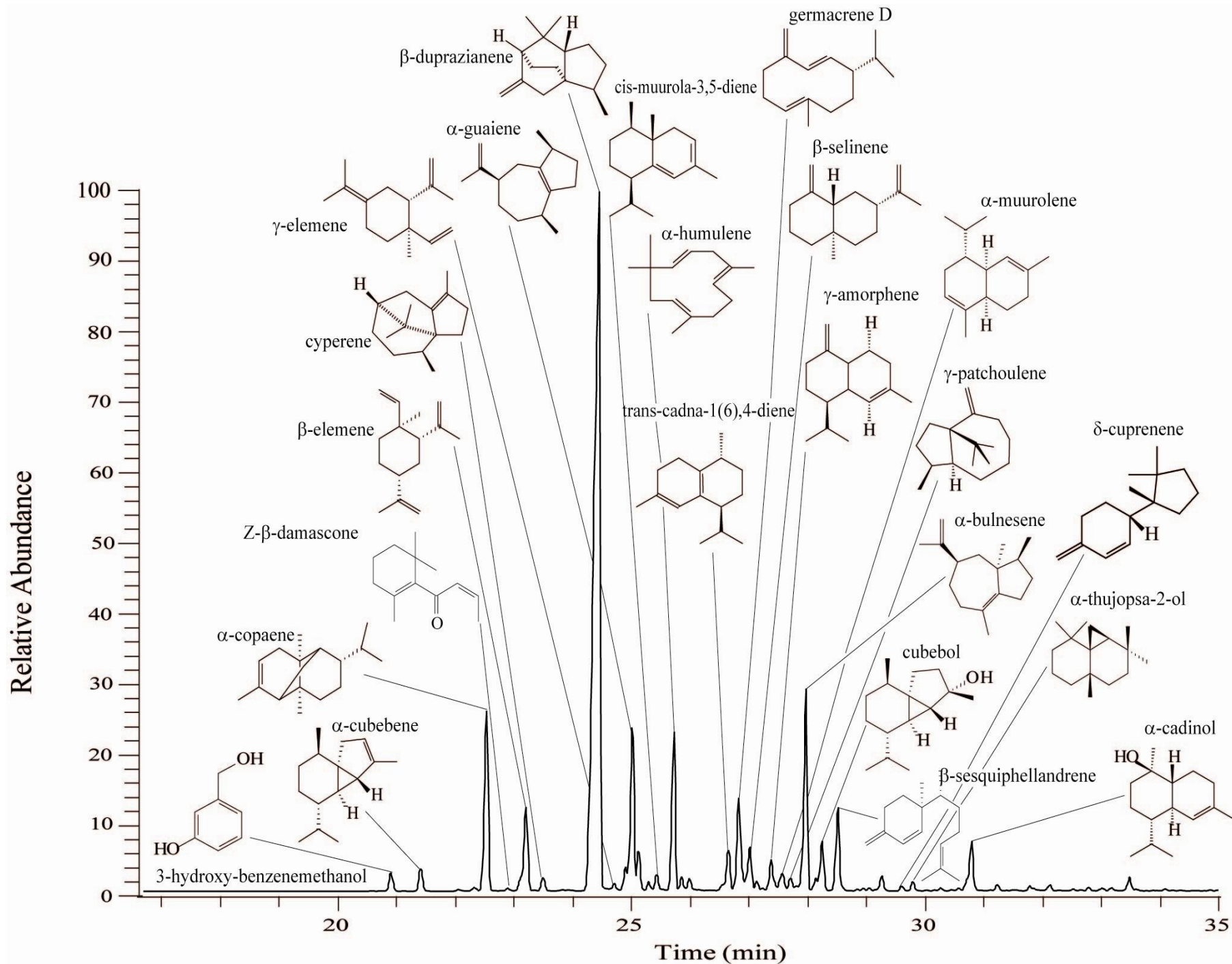
Legenda: ***H'***: índice de diversidade de Shannon-Weaverr; **ns**: não significativo; **as**: altamente significativo; **s**: significativo;

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 um vão expressando 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 mais de 40 substâncias, porém apenas um pequeno número é responsável pela maior proporção de massas<sup>19</sup>. Houve uma diferença significativa entre as equitabilidades de *C. langsdorffii* e *C. multijuga*, sendo a de *C. multijuga* menor que a de *C. langsdorffii*, isto é compatível com o fato de que em *C. langsdorffii*, apenas o β-dupreziano representava 43,70% enquanto na *C. multijuga* o composto majoritário (E-cariofileno) representava 33,08%.

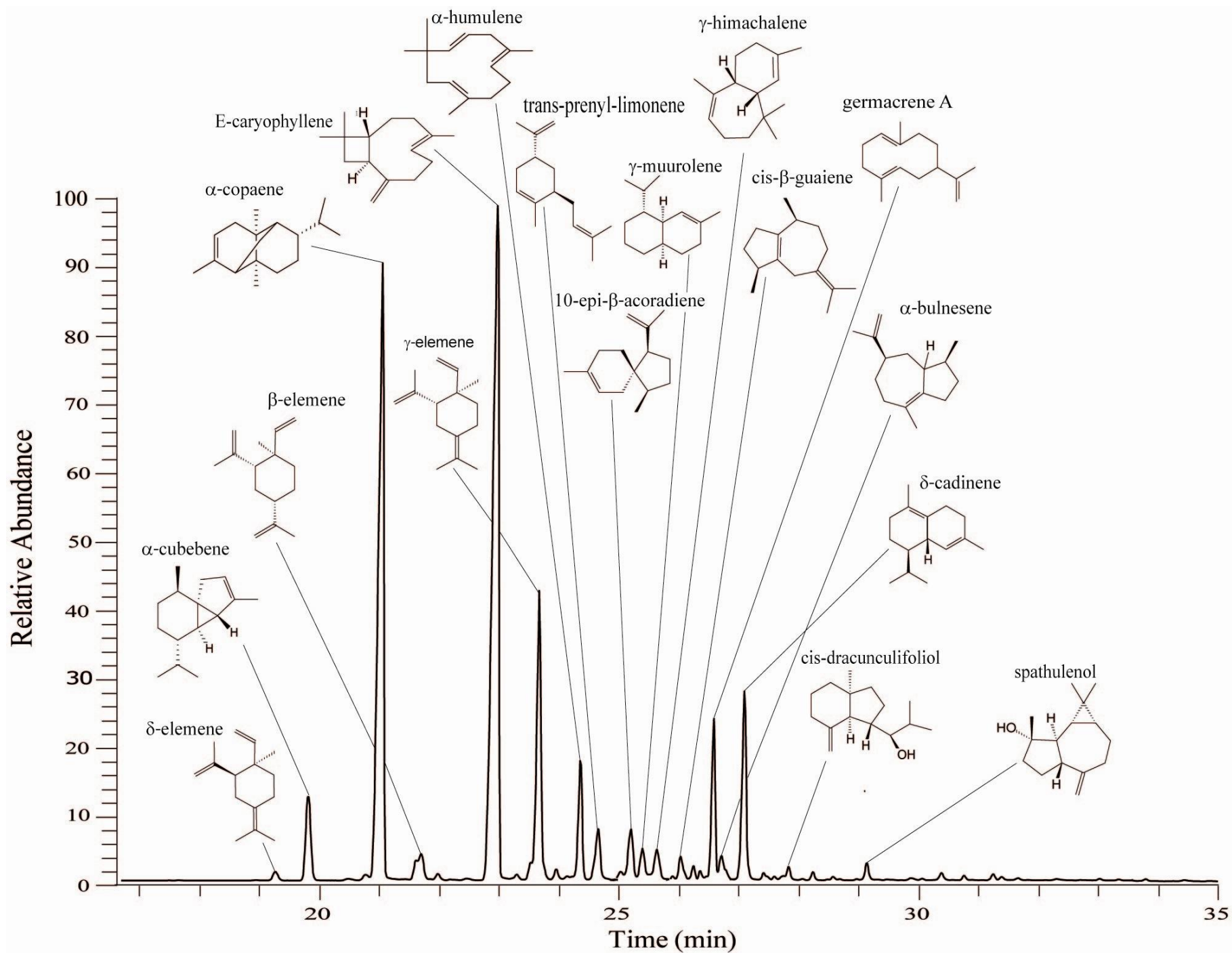
Apesar de *C. langsdorffii* possuir sete substâncias a menos na composição do óleo essencial quando comparada a *C. multijuga*, o índice de diversidade química

encontrado para a primeira foi significativamente maior que o encontrado para a segunda. Isto reflete a equitabilidade maior também encontrada para a *C. langsdorffii*, pois os índices de diversidade não medem apenas o número de diferentes categorias existentes no espaço amostral, mas também a forma proporcional como as diferentes categorias se representam neste mesmo espaço.

A separação dos componentes dos óleos essenciais das amostras de *C. langsdorffii* e *C. multijuga* revelou que o perfil cromatográfico (Figura 1 e 2) foi composto de 47 e 54 substâncias respectivamente em suas composições, sendo principalmente mono e sesquiterpenos, e destas 12 substâncias foram detectadas em ambas as espécies: Z- $\beta$ -ocimene, alo-ocimene,  $\alpha$ -cubebene,  $\alpha$ -copaene,  $\beta$ -elemene,  $\gamma$ -elemene,  $\alpha$ -humulene,  $\alpha$ -bulnesene, viridiflorol, 1-epi-cubenol, epi- $\alpha$ -bisabolol (Tabela 2).



**Figura 1** – Perfil cromatográfico e estrutura química dos principais constituintes do óleo essencial de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Mata Atlântica).



**Figura 2** – Perfil cromatográfico e estrutura química dos principais constituintes do óleo essencial de *Copaifera multijuga* Hayne (Floresta Amazônica).

**Tabela 2.** Composição centesimal comparada do óleo essencial das oleorresina de *Copaifera multijuga* Hayne e *Copaifera langsdorffii* Desf.

AI	AI Adams	KI	KI Adams	Identificação	Teor (%)	
					<i>C. multijuga</i>	<i>C. langsdorffii</i>
1025	1025	1029	1030	silvestreno	-	0.032
1033	1032	1038	1037	<b>Z-<math>\beta</math>-ocimeno</b>	0.159	0.042
1129	1128	1132	1132	<b>alo-ocimeno</b>	0.027	0.019
1330	1328	1332	1130	E-patchenol	-	0.142
1335	1335	1338	1338	$\delta$ -elemeno	0.408	-
1337	1338	1340	1340	3-hidroxi-benzenometanol	-	0.818
1347	1348	1350	1351	<b><math>\alpha</math>-cubebeno</b>	3.655	0.743
1364	1365	1366	1367	acetato de cis-carvila	-	0.072
1374	1374	1376	1376	<b><math>\alpha</math>-copaeno</b>	27.395	6.079
1384	1386	1385	1387	Z- $\beta$ -damascona	-	0.722
1389	1389	1390	1390	<b><math>\beta</math>-elemeno</b>	1.628	3.385
1395	1396	1395	1396	$\alpha$ -chamipineno	0.239	-
1398	1398	1398	1398	cipereno	-	0.462
1406	1407	1407	1407	longifoleno	0.077	-
1418	1417	1420	1419	E-cariofileno	33.083	-
1422	1421	1423	1422	$\beta$ -dupreziano	-	43.703
1427	1429	1428	1431	cis-thujopseno	0.182	-
1434	1434	1436	1436	<b><math>\gamma</math>-elemeno</b>	9.962	1.505
1438	1437	1440	1439	$\alpha$ -guaiano	-	6.545
1440	1440	1442	1442	Z- $\beta$ -farneseno	0.309	-
1442	1442	1444	1444	6,9-guaiadieno	-	0.133
1446	1448	1448	1450	cis-muurolo-3,5-dieno	-	1.736
1450	1452	1452	1454	<b><math>\alpha</math>-humuleno</b>	3.880	6.352
1457	1457	1459	1459	trans-prenil-limoneno	1.906	-
1460	1458	1462	1460	alo-aromadendreno	-	0.015
1473	1474	1475	1475	10-epi- $\beta$ -acoradieno	1.778	-
1476	1475	1477	1476	trans-cadina-1(6),4-dieno	-	0.897
1477	1478	1479	1479	$\gamma$ -muurolo	1.195	-
1480	1479	1482	1481	germacreno D	-	4.878
1482	1481	1483	1482	$\gamma$ -himachaleno	0.857	-
1488	1489	1489	1490	$\beta$ -selineno	-	1.930
1491	1492	1492	1493	cis- $\beta$ -guaiano	0.756	-
1494	1495	1494	1495	$\gamma$ -amorfen	-	1.145
1497	1498	1497	1498	$\alpha$ -selineno	0.344	-
1499	1500	1499	1500	$\alpha$ -muurolo	-	0.658
1501	1501	1501	1501	acifileno	0.201	-
1502	1502	1502	1502	$\gamma$ -patchoulo	-	1.231

**Tabela 2 cont.** Composição centesimal comparada do óleo essencial das oleorresina de *Copaifera multijuga* Hayne e *Copaifera langsdorffii* Desf.

AI	AI Adams	KI	KI Adams	Identificação	Teor (%)	
					<i>C. multijuga</i>	<i>C. langsdorffii</i>
1507	1508	1508	1509	germacreno A	4.324	-
1509	1509	1510	1509	<b><math>\alpha</math>-bulneseno</b>	0.829	6.524
1516	1514	1517	1515	cubebol	-	2.355
1521	1522	1522	1523	$\delta$ -cadineno	4.427	-
1523	1521	1524	1526	$\beta$ -sesquifelandreno	-	2.610
1529	1529	1531	1531	E- $\gamma$ -bisaboleno	0.150	-
1534	1533	1536	1535	10-epi-cubebol	-	0.036
1535	1532	1536	1533	$\gamma$ -cuprenona	0.044	-
1537	1537	1539	1539	$\alpha$ -cadineno	-	0.284
1541	1541	1542	1542	cis-dracunculfoliol	0.508	-
1543	1542	1544	1543	$\delta$ -cuprenona	-	0.536
1551	1550	1553	1551	cis-muurool-5-en-4- $\beta$ -ol	-	0.198
1552	1553	1554	1555	norpatchoulenol	0.157	-
1556	1556	1557	1557	trans-dauca-4(11),7-dieno	-	0.269
1562	1564	1564	1565	8-acetoxi-carvotanacetona	0.100	-
1564	1562	1565	1563	epi-longipinalol	0.024	-
1569	1570	1570	1572	alcool cariofilenílico	-	0.138
1578	1577	1579	1578	espatulenol	0.451	-
1580	1582	1581	1583	óxido de cariofileno	0.167	-
1582	1586	1583	1587	thujopsan-2- $\alpha$ -ol	-	1.798
1587	1588	1588	1589	thujopsan-2- $\beta$ -ol	0.020	-
1592	1592	1592	1592	<b>viridiflorol</b>	0.011	0.222
1598	1599	1598	1599	longiborneol(=juniperol)	0.049	-
1604	1604	1604	1604	khusimona	0.032	-
1606	1606	1606	1607	isovalerato de geranila	0.012	-
1608	1608	1608	1608	humuleno-epoxide II	-	0.269
1613	1612	1614	1613	$\beta$ -biotol	0.196	-
1615	1618	1616	1619	epi-cedrol	0.024	-
1617	1618	1618	1618	junenol	-	0.247
1621	1622	1622	1623	$\alpha$ -corocaleno	0.002	-
1624	1622	1625	1623	10-epi- $\gamma$ -eudesmol	0.081	-
1626	1627	1627	1628	<b>1-epi-cubenol</b>	0.019	0.089
1635	1634	1636	1635	ácido camforico	-	0.102
1640	1640	1641	1642	epi- $\alpha$ -muurolol	0.086	-
1641	1640	1642	1641	hinesol	-	0.042
1643	1644	1644	1646	$\alpha$ -muurolol(=Toreiol)	0.059	-
1645	1644	1646	1645	$\alpha$ -muurolol	-	0.310

**Tabela 2 cont.** Composição centesimal comparada do óleo essencial das oleorresina de *Copaifera multijuga* Hayne e *Copaifera langsdorffii* Desf.

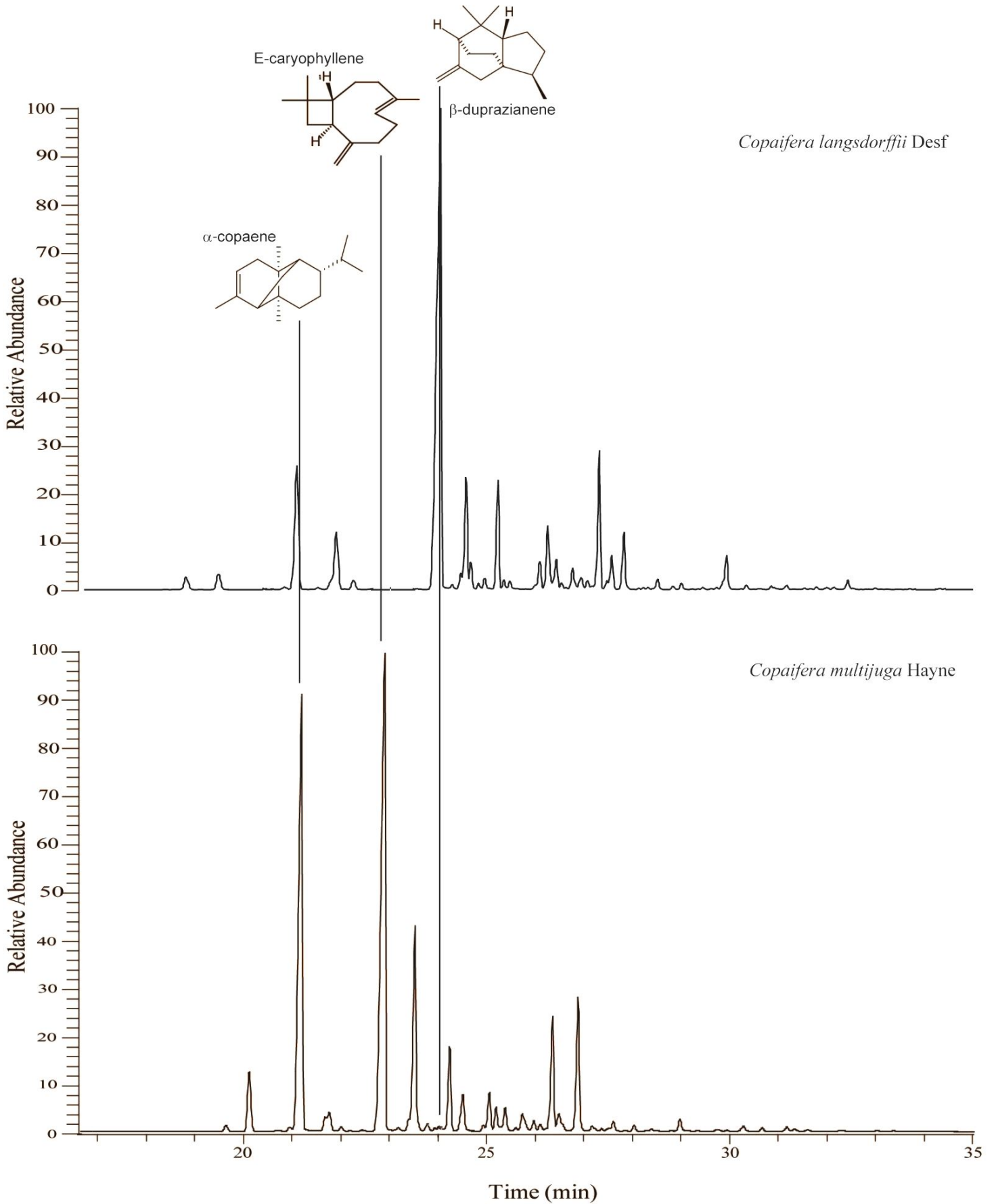
AI	AI Adams	KI	KI Adams	Identificação	Teor (%)	
					<i>C. multijuga</i>	<i>C. langsdorffii</i>
1651	1652	1652	1654	$\alpha$ -cadinol	0.072	-
1653	1652	1655	1654	$\alpha$ -cadinol	-	0.482
1663	1660	1665	1661	cis-calamenon-10-ol	0.004	-
1664	1665	1665	1666	<b>intermedeol</b>	0.004	0.008
1669	1670	1670	1671	epi- $\beta$ -bisabolol	0.036	-
1670	1672	1671	1673	5-iso-cedranol	-	0.099
1672	1676	1674	1677	mustakona	0.016	-
1677	1676	1678	1677	occidenol	-	0.040
1681	1681	1682	1682	helifolenol C	0.007	-
1683	1683	1684	1684	<b>epi-<math>\alpha</math>-bisabolol</b>	0.011	0.025
1688	1688	1688	1689	shiobunol	0.031	-
1690	1692	1691	1692	junicedranol	-	0.071
1708	1708	1708	1709	cis-thujopsenal	0.004	-
1715	1714	1715	1715	nootkatol	0.001	-
1728	1728	1729	1729	iso-longifolol	0.001	-

Entre os componentes químicos, o  $\beta$ -duprezianeno foi o componente majoritário nas amostras analisadas de *C. langsdorffii*, apresentando 43,70% em quanto em *C. multijuga* o componente químico majoritário foi E-cariofileno com 33,083% podendo estas substâncias serem utilizadas como marcadores das espécies em estudo (Tabela 3), como um marcador comum presente em maior quantidade nas espécies temos o  $\alpha$ -copaeno (Figura 3).



**Tabela 3.** Composição química qualitativa e centesimal dos óleos essenciais da oleorresina de *Copaifera langsdorffii* Desf. e *Copaifera multijuga* Hayne

<i>C. langsdorffii</i> (Floresta Atlântica)		<i>C. multijuga</i> (Floresta Amazônica)	
Composto	(%)	Composto	%
$\beta$ -duprezianeno	43,70	E-cariofileno	33,083
$\alpha$ -guaiano	6,55	$\alpha$ -copaeno	27,395
$\alpha$ -bulneseno	6,52	$\gamma$ -elemeno	9,962
$\alpha$ -humuleno	6,35	$\delta$ -cadineno	4,427
$\alpha$ -copaeno	6,08	germacreno A	4,324
germacreno D	4,88	$\alpha$ -humuleno	3,880
$\beta$ -elemeno	3,39	$\alpha$ -cubebeno	3,655
$\beta$ -sesquifelandreno	2,61	trans-prenil-limoneno	1,906
cubebol	2,36	10-epi-b-acoradieno	1,778
$\beta$ -selineno	1,93	$\beta$ -elemeno	1,628
thujopsan-2- $\alpha$ -ol	1,80	$\gamma$ -muuroleno	1,195
cis-muurola-3,5-dieno	1,74	$\gamma$ -himachaleno	0,857
$\gamma$ -elemeno	1,50	$\alpha$ -bulneseno	0,829
$\gamma$ -patchouleno	1,23	cis- $\beta$ -guaiano	0,756
$\gamma$ -amorfenol	1,15	cis-dracunculifoliol	0,508
trans-cadina-1(6),4-dieno	0,90	spathulenol	0,451
3-hidroxi-benzenomethanol	0,82	$\delta$ -elemeno	0,408
$\alpha$ -cubebeno	0,74		
Z- $\beta$ -damascona	0,72		
$\alpha$ -muuroleno	0,66		
$\delta$ -cuprenona	0,54		
$\alpha$ -cadinol	0,48		
cipereno	0,46		
<b>Total</b>	97,09	<b>Total</b>	97,04



**Figura 3** – Avaliação comparada do perfil cromatográfico apresentado os marcadores sugeridos das espécies *Copaifera langsdorffii* Desf. (Mata Atlântica) e *Copaifera multijuga* Hayne (Floresta Amazônica).

#### 4. Discussão

Os mono e sesquiterpenos dominaram o perfil cromatográfico do óleo essencial das oleorresinas estudadas. Este fato tem sido comumente descrito na literatura onde as oleorresinas de copaíbas se apresentam como uma dispersão natural de ácidos diterpênicos em uma mistura de mono-e sesquiterpenos,<sup>20,21</sup> que são os principais componentes do óleo essencial<sup>21</sup>.

Os sesquiterpenos mais comuns relatados são cariofileno, copaeno, zingibereno, bisaboleno e bergamoteno, enquanto que os principais diterpenos são ácidos caurenóico, hardwichiico, kovalênico, polialtico e copálico, sendo este último considerado um diterpeno típico do gênero *Copaifera*<sup>22</sup>. Estudos previamente relatados mostraram semelhanças em compostos de sesquiterpeno no perfil do óleo-resina a partir de *Copaifera duckei* Dwyer, *Copaifera multijuga* Hayne e *Copaifera reticulata* Ducke, e cariofileno tem sido relatado como a substância principal nos últimos dois óleos<sup>23</sup>.

Os estudos sobre o que é conhecido popularmente como óleo de copaíba, se concentram na análise da oleorresina, que é uma solução natural de ácidos diterpênicos<sup>4</sup>, em óleos essenciais que é composto principalmente de sesquiterpenos<sup>22</sup>.

E-cariofileno (=  $\beta$ -cariofileno) e  $\alpha$ -copaeno são os compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *C. multijuga*. Assim como em outro estudo da mesma espécie originária de Santarém - Pará - BR, cabe ressaltar a diferença de compostos identificados sete<sup>24</sup> e 54 respectivamente, se forem respeitadas as mesmas proporções para ser atingido o mesmo percentual seriam necessárias oito substâncias no presente estudo.

O  $\beta$ -duprezianeno e  $\alpha$ -guaieno foram as principais substâncias presentes no óleo essencial da oleoresina de *C. langsdorfii*, essas substâncias não foram identificadas em um estudo da mesma espécie que isolou os componentes dos óleos essenciais dos frutos e cascas; neste estudo os constituintes principais identificados para o óleo essencial dos frutos foram  $\gamma$ -muuroleno (29,8%) e  $\beta$ -cariofileno (14,8%), enquanto que para o óleo das cascas dos frutos o constituinte principal era o óxido de cariofileno (47,3%)<sup>5,6</sup>.

## 5. Conclusões

Entre os compostos majoritários o  $\alpha$ -copaeno foi o composto de maior capacidade para caracterizar as duas espécies de *Copaifera*. Enquanto o  $\beta$ -duprezianeno e o E-cariofileno permitiram respectivamente distinguir a *C. langsdorffii* da *C. multijuga*. Levando-se em conta apenas o rendimento do processo extrativo e a densidade, a matéria prima oleorresina em ambas as espécies de copaíba se apresenta como uma fonte altamente produtiva de extração de óleo essencial uma vez que não houve diferenças significativas entre essas variáveis. Do ponto de vista fitoquímico e ecológico houve uma diferença altamente significativa para a diversidade química e diferenças significativas para a equitabilidade, entre as espécies, sendo estas variáveis maiores em *C. langsdorffii*.

## 6. Referências

- (1) Willis, J. C. *A Dictionary of flowering plants and ferns*, 8 ed.; The Cambridge Press: Great Britain, 1973.
- (2) Corrêa, M. P. *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, 1 ed.; Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1984.
- (3) Veiga, Jr. V. F.; Patitucci, M. L.; Pinto, A. C. *Quim. Nova*. **1997**, *20*, 612.
- (4) Veiga Jr., V. F.; Pinto, A. C. *Quim. Nova* **2002**, *25*, 273-286.
- (5) Gramosa, N. V. *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Ceará, Brasil, 2001.
- (6) Gramosa, N. V.; Silveira, E. R. *J. Essent. Oil Res.* **2005**, *17*, 130.
- (7) Paiva, L. A. F.; Santos, F. A.; Rao, V. S. N.; Silveira, E. R. *Resumos do 14º Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*, Florianópolis, Brasil, 1996.
- (8) Bandeira, M. F. C. L.; Oliveira, M. R. B.; Pizzolito, A. C.; Benatti-Neto, C.; Jorge-Neto, J. *J Bras Clin Estet Odontol* **1999**, *3*, 39-41.
- (9) Veiga, Jr. V. F.; Zunino, L.; Calixto, J. B.; Patitucci, M. L.; Pinto, A. C. *Phytother Res* **2001**, *15*, 476-480.

- (10) Alencar, J.C. *Acta Amazônica* **1981**, 11, 3-11.
- (11) Bandeira, M.F.C.L. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Brasil 1998, 265.
- (12) Simões, C.A.C.G. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Brasil 2004, 120.
- (13) Vasconcelos, K.R.F. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Brasil 2006, 162.
- (14) Msaada, K.; Hosni, K.; Taarit, M. B.; Chahed, T.; Kchouk, M. E.; Marzouk, B. *Food Chemistry*, **2007**, 102, 1131-1134.
- (15) Wannes, W. A.; Mhamdi, B.; Marzouk, B. *Food Chemistry* **2009**, 112, 621-626.
- (16) Paul, A.; Thapaa, G.; Basub, A.; Mazumdarb, P.; Kalita, M. C.; Sahoo, L. *Ind. Crops Prod.* **2010**, 32, 366–374.
- (17) Adams RP: *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. 4 ed., Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2009.
- (18) Zar, J.H. *Biostatistical analysis*. 5 ed., Upper Saddle River: Prentice Hall, 2008;
- (19) Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. *Food and Chemical Toxicology* **2008**, 46,446–475.
- (20) Biavatti, M.W.; Dossin, D.; Deschamps, F.C.; Lima, M.P. *Rev Bras Farmacogn* **2006**, 16, 230-235.
- (21) Cascon, V.; Gilbert, B.; *Phytochemistry* **2000**, 55, 773-778.
- (22) Santos, A. O.; Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B. P.; Veiga Jr, V. F.; Pinto, A. C.; Nakamura, C. V. *J Ethnopharmacol* **2008**, 120, 204-208.

(23) Veiga Jr, V.F.; Rosas, E.C.; Carvalho, M.V.; Henriques, M.G.M.O.; Pinto, A.C. *J Ethnopharmacol* **2007**, 112, 248-254.

(24) Deus RJA, Alves CN, Arruda MSP: *Rev. Bras. Pl. Med.* **2011**, 13, 1-7.

### 3.3 MANUSCRITO:

#### **Avaliação do óleo essencial da oleorresina de duas copaibeiras brasileiras sobre o desenvolvimento larval de *Stegomyia aegypti* Linnaeus, 1754**

Manuscrito apresentado nas normas da revista Parasites and Vectors (JCR 2,13)

Geraldo G. Silva<sup>1</sup>, Drielle L. Almeida<sup>1</sup>, Silas N. Ronchi<sup>1</sup>, Rodrigo Scherer<sup>1</sup>, Ary Gomes da Silva<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário Vila Velha – UVV. Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, Vila Velha, ES, Brasil - CEP 29.102-770.

\*Autor correspondente

Endereços de e-mail:

GGs: geraldo.far@hotmail.com; DLA: driellelima@yahoo.com.br; SNR: silas.nasc@hotmail.com;

RS: rodrigo@tommasianalitica.com.br; AGS: arygomes@uvv.br

## **Avaliação do óleo essencial da oleorresina de duas copaibeiras brasileiras sobre o desenvolvimento larval de *Stegomyia aegypti* Linnaeus, 1754**

### **Resumo**

**Estado da Arte:** A capacidade de mosquitos do gênero *Aedes* e os seus aliados, como *Stegomyia*, para transmitir doenças tais como dengue e febre amarela, torna-os importantes na saúde pública. Este estudo pretende avaliar o uso de o óleo essencial das oleoresinas de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Mata Atlântica) e *Copaifera multijuga* Hayne (Floresta Amazônica) no controle biológico do vetor da dengue através da avaliação e quantificação do efeito larvicida contra *St. aegypti*, o único acesso disponível para o controle da dengue.

**Resultados:** Nos bioensaios, larvas de *St. aegypti* foram expostas a diferentes concentrações dos óleos e verificou-se a atividade larvicida e o período de atividade larvicida após exposição aos óleos nos intervalos 0, 24, 48 e 72 horas. Análise *Probit* estimou as  $CL_{50}$ ,  $CL_{95}$  e  $CL_{99}$ , o melhor ajuste ao modelo, para o óleo essencial de ambas as espécies, foi obtido 24 horas a exposição das larvas ao óleo essencial. Assim, foram assumidas como  $CL_{50}$ ,  $CL_{95}$  e  $CL_{99}$ , respectivamente, para *C. langsdorffii*, os valores em ppm de  $97,63 \pm (4,45)$ ,  $128,19 \pm (14,02)$ ,  $452,26 \pm (74,44)$ ; e de  $314,91 \pm (15,32)$ ,  $751,18 \pm (54,02)$  e  $1076,75 \pm (107,11)$  para *C. multijuga*. Neste momento, o óleo essencial de *C. langsdorffii* se apresentou  $2,23 \pm (0,47)$  vezes mais potente que o de *C. multijuga*. Análise GC-MS indicou entre os compostos majoritários o  $\alpha$ -copaeno como o composto de maior capacidade para caracterizar as duas espécies de *Copaifera*. Enquanto o  $\beta$ -duprezianeno e o E-caryophylleno como os compostos que permitem respectivamente distinguir a *C.*



*langsdorffii* da *C. multijuga*. Os resultados indicaram a potencialidade inseticida desses óleos contra larvas de *A. aegypti* em condições laboratoriais.

**Conclusão:** As concentrações letais CL<sub>50</sub>, CL<sub>95</sub> e CL<sub>99</sub> apontam para o uso de dispersões do óleo essencial em água destas espécies de *Copaifera* como um larvicida natural e ambientalmente seguro para *St. aegypti*, sendo o óleo essencial de *C. Langsdorffii* com maior potencial larvicida.

## 1. Introdução

A dengue constitui hoje a mais importante doença viral humana transmitida por mosquitos, cujo agente é um *Flavivirus* com quatro sorotipos conhecidos (DENV-1, 2, 3 e 4) que podem causar a dengue clássica (DC) e a febre hemorrágica da dengue (FHD). Esta última pode evoluir para uma forma mais severa conhecida como síndrome do choque da dengue (SCD). A infecção por um sorotipo provê imunidade vitalícia para aquele vírus, mas a proteção cruzada para outro sorotipo é apenas passageira, o que torna possível ocorrer uma infecção sequente por outro sorotipo [1,2,3]. Cerca de 2,5 bilhões de pessoas se encontram sob risco de infecção, particularmente em países tropicais onde a temperatura e a umidade favorecem a proliferação do mosquito vetor. Entre as doenças re-emergentes é a que se constitui em problema mais grave de saúde pública [4].

A transmissão da dengue ao homem ocorre através da picada da fêmea de *Stegomyia aegypti* infectada com sorotipos do vírus. Após 8 a 12 dias da infecção ocorrem a incubação, a replicação e a disseminação do vírus por todo o corpo do mosquito. A fêmea pode passar por ciclos de reprodução durante o período de incubação e replicação do vírus, dando a ele a oportunidade de entrar no ovo e de ser passado para a prole pela transmissão vertical [2].

O desenvolvimento do mosquito ocorre por metamorfose completa, passando pelas seguintes fases: ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto [5,6,7]. Como *St. aegypti* é um inseto holometabólico, a fase larvária é o período de alimentação e crescimento. As larvas passam a maior parte do tempo alimentando-se principalmente de material orgânico nas paredes e fundo dos depósitos. As larvas possuem quatro estágios evolutivos. A duração da fase larvária depende da temperatura, disponibilidade de alimento e densidade das larvas no criadouro. Em condições ótimas, o período de eclosão e a pupação pode não exceder a cinco dias. Contudo, em baixa temperatura e escassez de alimento, o quarto estágio larvário pode se prolongar-se por várias semanas, antes da transformação em pupa. As pupas não se alimentam. É nessa fase que ocorre a metamorfose do estágio larval para o adulto. Quando inativas se mantêm na superfície da água, flutuando o que facilita a emergência do inseto adulto. O estado pupal dura, de dois a três dias. O adulto – mosquito – representa a fase reprodutora do inseto. Como ocorre com grande parte dos insetos alados, o adulto representa importante fase de dispersão. Entretanto com o *St. aegypti* é provável que haja mais um transporte passivo de ovos e larvas em recipientes do que dispersão ativa pelo inseto adulto. O acasalamento geralmente se dá durante o voo, mas, ocasionalmente, pode se dar sobre uma superfície, vertical ou horizontal. Uma única inseminação é suficiente para fecundar os ovos que a fêmea venha produzir durante sua vida [8].

Até o momento, não há uma vacina pronta para uso contra os quatro sorotipos do vírus da dengue, embora pesquisas estejam em andamento [9, 10]. A opção para combater a dengue continua sendo o controle de *St. aegypti* por meio de inseticidas químicos sintéticos usados nas campanhas nacionais. Contudo, têm surgido problemas significativos como o aparecimento de resistência [11, 12, 13, 14,

15]. Além de causar resistência os inseticidas químicos, a longo prazo, trazem sérios prejuízos ao meio ambiente, devido à alta toxicidade destas substâncias e à capacidade de permanecerem longos períodos no meio, poluindo água, solo e ar [16, 17, 18].

Formas alternativas de controle de vetores vêm sendo avaliadas. Merece destaque o controle biológico com o *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*), com possibilidade de uso integrado com os produtos sintéticos [19, 20, 21]. Nessa busca por novas alternativas de combate aos insetos vetores, substâncias extraídas de plantas têm recebido especial atenção. Vários estudos vêm sendo realizados com plantas como forma de controle desse mosquito [18, 22, 23, 24, 25, 26]. Os produtos naturais protegem o equilíbrio ecológico, além de serem disponíveis e economicamente viáveis [27]. Trabalhos recentes têm demonstrado a busca e o desenvolvimento de extratos brutos ou óleos essenciais ou, ainda, de compostos isolados que atuam contra mosquitos, inclusive contra *St. aegypti* [28, 29, 30].

A natureza fitoquímica de alguns produtos naturais brasileiros tem vindo apontar para os terpenos, principalmente mono e sesquiterpenos, fenilpropanóides e como os componentes ativos larvicidas [31]. Os óleos essenciais obtidos tem demonstrado mais importância na triagem larvicida de derivados de plantas e extratos estudados no Brasil, mesmo quando as plantas estudadas são exóticas [32], mas uma fonte nativa de óleo essencial ainda está sob o foco de investigação [33, 34 35, 36], principalmente por causa do interesse na busca de inseticidas ambientalmente seguros [35].

As copaibeiras são árvores da família Leguminosae, subfamília Caesalpinoideae, que alcançam de 25 a 40 metros de altura, podendo viver até 400 anos [37]. Do tronco dessas árvores é obtida uma oleorresina, popularmente

conhecida como óleo de copaíba, que funciona como defesa da planta contra animais, fungos e bactérias [38]. A composição química da oleoresina pode variar dependendo, principalmente da espécie copaíba, da época de obtenção e das características geográficas e climáticas da região onde a árvore cresce [39]. A oleoresina é basicamente uma mistura de sesquiterpenos (fração óleo essencial), principalmente  $\beta$ -cariofileno, e diterpenos [40, 41].

Assim, este estudo visa investigar o controle biológico sobre o desenvolvimento larval de *Stegomyia aegypti* Linnaeus, 1754 com o uso do óleo essencial de duas copaibeiras brasileiras - *Copaifera langsdorffii* Desf (Mata Atlântica) e *Copaifera multijuga* Hayne (Amazônica).

## **2. Métodos**

### **Extração do óleo essencial, e determinação da densidade**

As oleoresinas das árvores das copaibeiras brasileiras foram coletadas a partir espécimes de *Copaifera langsdorffii* Desf., originários da região rural de Castelo, Espírito Santo, Brasil nas coordenadas 20°30'45"S e 41°11'20"W, e de espécimes de *Copaifera multijuga* Hayne que ocorrem na região do município de Ariquemes, Rondônia, Brasil nas coordenadas 9°52'50"S e 63°04'27"W. Exsicatas destas espécies estão depositadas no Herbário UVV-ES sob número de registro 2164 e 2165, respectivamente. A extração de óleo essencial foi feita por hidrodestilação em um aparelho de Clevenger a partir de 200g da oleoresina de *C. langsdorffii* e 300g de *C. multijuga* sendo, a extração realizada a partir de alicotas de 50g em cada ensaio, durante uma hora do processo de extração. Este procedimento foi realizado no laboratório de Ciências Químicas, no UVV. Após a extração, o óleo essencial foi transferido para um frasco de vidro, e sua purificação

foi feita por separação de a água remanescente por congelamento, e o óleo essencial que foi mantido 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 banho-maria com temperatura controlada. Cada óleo essencial foi pesado em uma balança analítica com precisão de 1,0 mg.

### **Análise cromatográfica**

A identificação dos componentes do óleo essencial de cada uma das copaibeiras em estudo foi realizada por cromatografia em fase gasosa de alta resolução, no Laboratório de Química Fina, no Tommasi Analítica. O volume de injeção foi 2µL, composto por 1,6 µL de uma solução de óleo essencial (30mg/ml) e 0,4 µL de uma solução de uma série de hidrocarbonetos de C7-C30, como padrão interno, tendo o *n*-hexano como solvente. Na cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas - CG-EM – o sistema utilizado consistiu de um cromatógrafo a gás da Thermo Scientific® Ultra GC acoplado a um espectrômetro de massa, Thermo Scientific®. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 J & W Scientific (30m x 0,25 mm x 0,25 mm). O gás de arraste foi o hélio e o programa de temperatura da coluna consistiu em aumentos de 3° C por minuto, entre 60°-240°C. Os espectros de massa foram obtidos em 70 eV a velocidade de varredura de 0,84 scan/s, na faixa de *m/z* 40-500 [42]. O tempo de retenção dos componentes da amostra e uma mistura de *n*-alcanos de C7-C30, co-injetados no sistema GC-MS no âmbito do mesmo programa de temperatura foram utilizados para o cálculo do Índice de Retenção de Kovats – IK e do Índice Aritmético de Van der Dool e Kratz - IA. A identificação dos componentes do óleo essencial foi baseada nos espectros de

massas obtidos, na comparação deles com a biblioteca espectral de CG-EM nos IK e IA calculados em comparação com a literatura disponível [42].

### **Ensaio biológico com larvas de *Stegomyia aegypti***

Os ovos de *St. aegypti* foram fornecidos pelo Centro de Controle de Zoonoses do Departamento de Saúde de Vitória, Espírito Santo, Brasil. As larvas de terceiro ínstar foram obtidas após a incubação de ovos no Laboratório de Ecologia Funcional, na UVV, utilizando 2000 mL de água destilada, acrescidos de alimento natural para peixes, composto por cistos de organismos secos e ovos de plâncton destinado à alimentação das larvas eclodidas.

Uma série de tubos foi preparada em quatro repetições para cada espécie controle, branco, e tratamento foi realizado, e cada replicata recebeu 10 larvas, incluindo um controle com água destilada, e um em branco com uma solução aquosa de 0,5% DMSO que foi usada como meio para dispersar o óleo essencial e exposição de larvas ao tratamento. Na triagem inicial, para o óleo essencial de ambas as espécies, foram feitas quatro replicatas do tratamento controle, contendo água destilada; o tratamento branco, com uma solução aquosa de 0,5% DMSO; e diluições decimais do óleo essencial nas razões de  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  e  $10^{-10}$ , com o objetivo de determinar a dose letal mínima para as larvas de *St. aegypti*, sendo observados os intervalos de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$ , para *C. langsdorffii*, e  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$ , para *C. multijuga*.

Após isto, para cada óleo essencial em análise foi preparado um gradiente de concentração. Para *C. multijuga*, o gradiente variou de 89,3995 – 893,9949 ppm, correspondendo à faixa de diluição  $10^{-3}$  –  $10^{-4}$ . Para *C. langsdorffii* o gradiente variou entre 9,0491 – 90,4909 ppm, equivalente à faixa de diluições de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$ . A

capacidade de locomoção das larvas para a respiração foi utilizado como o critério de sobrevivência. Avaliações das larvas sobreviventes foram feitas instantaneamente, 24, 48 e 72 horas após a inoculação, com segurança para evitar a emergência de mosquitos adultos.

### **Análises estatísticas de dados**

Os percentuais de morte larval para cada replicação foram transformados pela raiz de arco seno quadrado de suas proporções, e sua normalidade foi verificada por um teste de  $K^2$ , com base sobre os desvios de simetria e de curtose da curva de probabilidade de distribuição dos dados obtidos em relação à hipótese nula de uma distribuição normal. Outro pressuposto para testes paramétricos, homogeneidade variância foi verificada pelo teste de Bartlett [43]. Como as taxas de mortalidade não poderiam ser normalizadas pelo arco-seno transformação, uma regressão logística ordinal foi realizada, tendo a dose 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 [43]. As concentrações letais  $CL_{50}$ ,  $CL_{95}$  e  $CL_{99}$  foram calculadas a partir da equação de linha reta gerada pelo modelo probítico testado [44]. As análises estatísticas foram feitas pelos Programas MyStat versão 12.0 e Minitab versão 13,0.

## **3. Resultados e Discussão**

### **Extração do óleo essencial, e determinação da densidade**

O óleo essencial de ambas as espécies constituiu-se num líquido oleoso de alta mobilidade, incolor e translúcido. Não houve diferenças significativas entre o

rendimento do processo extrativo e a densidade do óleo essencial. Apesar disso do ponto de vista fitoquímico e ecológico houve uma diferença altamente significativa para a diversidade química e diferenças significativas para a equitabilidade, entre as espécies (Tabela 1), sendo estas variáveis maiores em *C. langsdorffii*.

**Tabela 1.** Rendimento, densidade absoluta, diversidade química e equitabilidade do óleo essencial de oleoresina de *Copaifera langsdorffii* Desf. e *Copaifera multijuga* Hayne.

Parâmetro	Média ± Erro Padrão		Teste <i>t</i> (GL =8)	p-Valor
	<i>C. langsdorffii</i>	<i>C. multijuga</i>		
Rendimento (%)	26,202 ± 2.919	35,666 ± 6.433	1,131	0.291 <sup>ns</sup>
Densidade (g mL <sup>-1</sup> )	0,905 ± 0.007	0,894 ± 0.020	-0,438	0,291 <sup>ns</sup>
Diversidade química ( <i>H'</i> )	2.211 nats ± 0.034	1.462 nats ± 0.169	-3,515	0,01 <sup>as</sup>
Equitabilidade (J)	0.603 ± 0.02	0,413 ± 0.051	-2,983	0,02 <sup>s</sup>

Legenda: ***H'***: índice de diversidade de Shannon-Weaverr; **ns**: não significativo; **as**: altamente significativo; **s**: significativo;

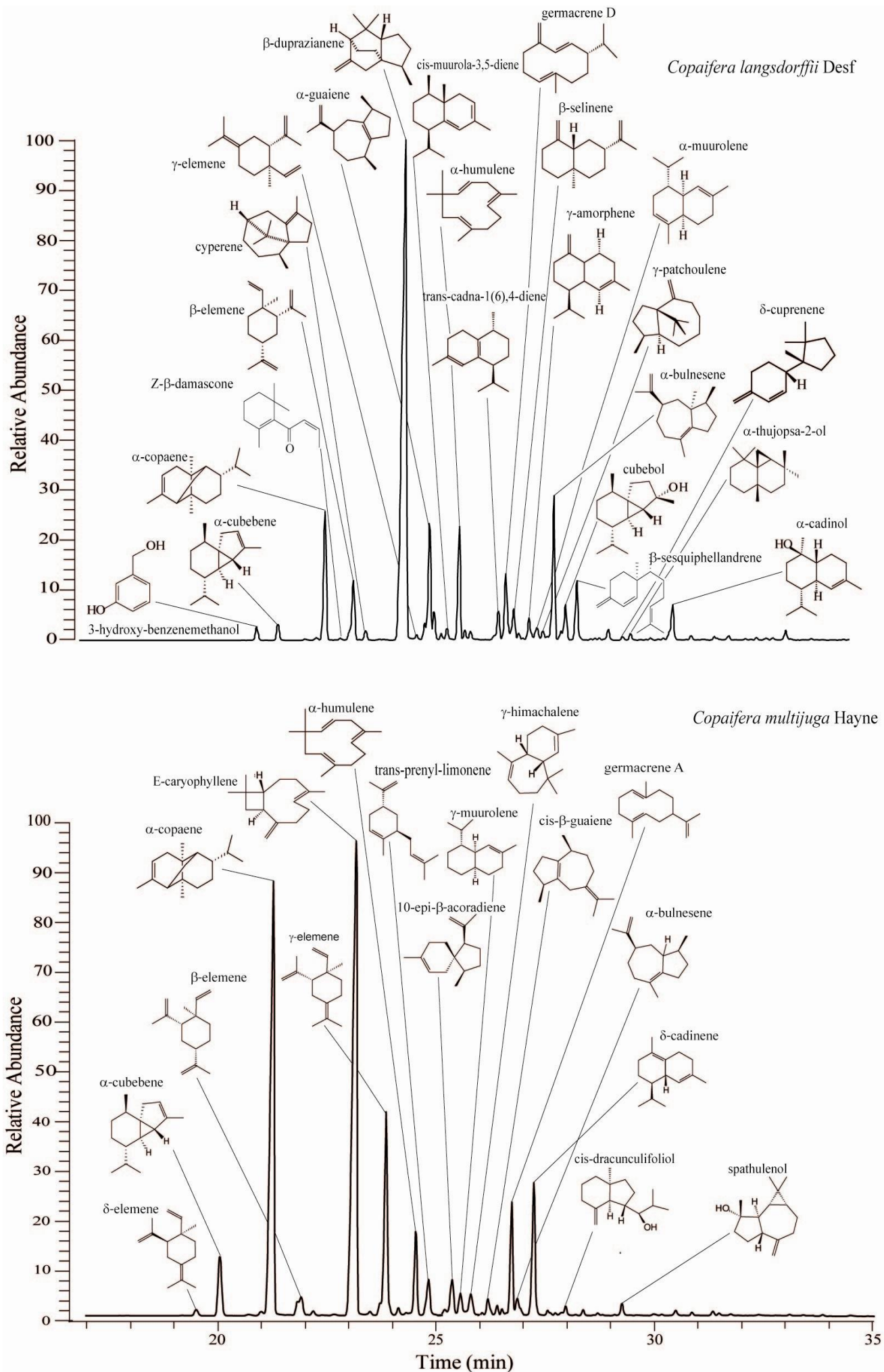
### Análise cromatográfica

A separação dos componentes do óleo essencial das copaibeiras revelou que o perfil cromatográfico (Figura 1 e 2) foi predominantemente formado de compostos terpênicos (Tabela 2), tendo como principais constituintes para a *C. multijuga* Hayne, o E-caryophylleno (33,083%), o  $\alpha$ -copaeno (27,395%), o  $\gamma$ -elemeno (9,962%) e para a *C. langsdorffii* Desf, o  $\beta$ -duprezianeno (43,70%), o  $\alpha$ -guaieno (6,55%), o  $\alpha$ -bulneseno (6,52%),  $\alpha$ -humuleno (6,35%) e  $\alpha$ -copaeno (6,08%).



**Tabela 2.** Composição química qualitativa e centesimal dos óleos essenciais da oleorresina de *Copaifera langsdorffii* Desf. e *Copaifera multijuga* Hayne determinados por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa.

<b><i>C. langsdorffii</i> (Floresta Atlântica)</b>		<b><i>C. multijuga</i> (Floresta Amazônica)</b>	
<b>Composto</b>	<b>(%)</b>	<b>Composto</b>	<b>%</b>
$\beta$ -dupreziano	43,70	E-caryophylleno	33,083
$\alpha$ -guaiano	6,55	$\alpha$ -copaeno	27,395
$\alpha$ -bulneseno	6,52	g-elemeno	9,962
$\alpha$ -humuleno	6,35	$\delta$ -cadineno	4,427
$\alpha$ -copaeno	6,08	germacrene A	4,324
germacrene D	4,88	$\alpha$ -humuleno	3,880
$\beta$ -elemeno	3,39	$\alpha$ -cubebeno	3,655
$\beta$ -sesquiphellandreno	2,61	trans-prenyl-limoneno	1,906
Cubebol	2,36	10-epi-b-acoradieno	1,778
$\beta$ -selineno	1,93	$\beta$ -elemeno	1,628
thujopsan-2- $\alpha$ -ol	1,80	g-muuroleno	1,195
cis-muurolo-3,5-dieno	1,74	g-himachaleno	0,857
$\gamma$ -elemeno	1,50	$\alpha$ -bulneseno	0,829
$\gamma$ -patchouleno	1,23	cis-b-guaiano	0,756
$\gamma$ -amorpheno	1,15	cis-dracunculifoliol	0,508
trans-cadina-1(6),4-dieno	0,90	spathulenol	0,451
3-hydroxy-benzenemethanol	0,82	$\delta$ -elemeno	0,408
$\alpha$ -cubebeno	0,74		
Z- $\beta$ -damascono	0,72		
$\alpha$ -muuroleno	0,66		
$\delta$ -cupreneno	0,54		
$\alpha$ -cadinol	0,48		
cypereno	0,46		
<b>Total</b>	<b>97,09</b>	<b>Total</b>	<b>97,04</b>



**Figura 1** – Perfil cromatográfico e estrutura química dos principais constituintes dos óleos essenciais de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Mata Atlântica) e de *Copaifera multijuga* Hayne (Floresta Amazônica).

### **Bioensaio com larvas de *Stegomyia aegypti***

A concentração mais viável para uso dos óleos em estudo para o controle biológico das larvas de *St. aegypti* encontra-se entre 9,0491 – 90,4909 ppm, equivalente à faixa de diluições de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  para *C. langsdorffii* e entre 89,3995 – 893,9949 ppm, correspondendo à faixa de diluição  $10^{-3}$  –  $10^{-4}$  para *C. multijuga* (Tabela 3), observado pelo número de larvas mortas, corridas às 72 horas do teste. Nestes gradientes de concentração pode-se ressaltar como benefícios: a segurança de se trabalhar com diluições menores e, com efeito, larvicida, a diminuição do impacto ambiental da demanda da fonte natural do produto e chegar ao custo mínimo necessário tanto do processo extrativo quanto da manufatura do produto.

A exposição das larvas de *St. aegypti* ao gradiente de concentração dos óleos essenciais das copaibeiras em estudo evidenciou uma mortalidade larval que foi dose-dependente do óleo essencial (Tabela 4), sendo também afetada pelo tempo de exposição da larva a cada concentração de óleo.

Apesar da análise que incluiu a interação do tempo de exposição à concentração de óleo essencial ter produzido um modelo altamente significativo nos dois óleos aqui testados, as taxas de risco produzidas pela interação, da mesma forma que as produzidas pelo tempo isoladamente, refletem um baixo impacto daqueles parâmetros sobre a mortalidade das larvas.

Assim, tanto pela capacidade de impacto na explicação da mortalidade das larvas, como pelo nível de significância, foi a concentração do óleo essencial nas duas análises o componente de maior importância para a utilização do óleo essencial das copaibeiras num eventual controle biológico de *St. aegypti*.

**Tabela 3** – Mortalidade larval de *St. aegypti* em um gradiente de concentração dos óleos essenciais de *Copaifera multijuga* Hayne e *Copaifera langsdorffii* Desf.

Espécie	Concentração (ppm)	% Mortalidade Larval (Média ± SE)			
		0 h	24 h	48 h	72 h
<i>C. multijuga</i>	H <sub>2</sub> O	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	DMSO 0,5%	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	89,3995	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	10,0 ± 5,78	10,0 ± 5,78
	178,7990	0,00 ± 0,00	12,5 ± 7,50	20,0 ± 9,13	22,5 ± 11,08
	268,1985	0,00 ± 0,00	52,5 ± 7,50	65,0 ± 6,45	72,5 ± 4,79
	357,5974	0,00 ± 0,00	50,0 ± 8,16	72,5 ± 4,79	80,0 ± 4,09
	446,9974	0,00 ± 0,00	75,0 ± 6,45	92,5 ± 4,79	100 ± 0,00
	536,3969	0,00 ± 0,00	82,5 ± 8,54	95,00 ± 2,89	100 ± 0,00
	625,7964	0,00 ± 0,00	85,00 ± 6,45	100 ± 0,00	100 ± 0,00
	715,1959	0,00 ± 0,00	97,50 ± 2,50	97,50 ± 2,50	100 ± 0,00
	804,5954	0,00 ± 0,00	95,00 ± 2,89	95,00 ± 2,89	100 ± 0,00
	893,9949	0,00 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00
<i>C. langsdorffii</i>	H <sub>2</sub> O	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	DMSO 0,5%	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	9,0491	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	18,0982	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	27,1473	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	36,1963	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,25 ± 0,25
	45,2454	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,50 ± 0,29
	54,2945	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,50 ± 0,29	0,75 ± 0,48
	63,3436	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,50 ± 0,29	1,00 ± 0,41
	72,3927	0,00 ± 0,00	0,50 ± 0,29	2,00 ± 0,41	2,00 ± 0,41
	81,4418	0,25 ± 0,25	1,25 ± 0,25	2,50 ± 0,65	5,25 ± 0,63
	90,4909	1,00 ± 0,41	3,25 ± 0,25	7,50 ± 0,64	9,75 ± 0,25

**Tabela 4** - Regressão logística binária entre a concentração e o tempo de exposição aos óleos essenciais de oleoresina das copaibeiras brasileiras em estudo e a mortalidade de larvas de *St aegypti*

Parâmetro	<i>Copaifera langsdorffii</i>				<i>Copaifera multijuga</i>			
	Coeficiente	EP	Z	<i>p</i>	Coeficiente	EP	Z	<i>p</i>
Concentração de óleo essencial (PPM)								
Constante	-1,682	0,065	-25,92	< 0,01	-1,546	0,112	-13,84	< 0,01
PPM	0,024	0,002	15,37	< 0,01	0,005	0,0003	18,03	< 0,01
	G = 259,17; gl = 1; <i>p</i> < 0,01; $\chi^2$ Hosmer-Lemeshow = 63,09; <i>p</i> < 0,01				G = 625,19; gl = 1; <i>p</i> < 0,01; $\chi^2$ Hosmer-Lemeshow = 41,42; <i>p</i> < 0,01			
Tempo de exposição ao óleo essencial								
Constante	-1,955	0,143	-13,67	< 0,01	0,205	0,101	2,04	0,04
Tempo	0,016	0,003	6,20	< 0,01	0,009	0,002	4,27	< 0,01
	G = 40,10; gl = 1; <i>p</i> < 0,01; $\chi^2$ Hosmer-Lemeshow = 1,54; <i>p</i> = 0,22				G = 18,42; gl = 1; <i>p</i> < 0,01; $\chi^2$ Hosmer-Lemeshow = 0,91; <i>p</i> = 0,34			
Concentração + Tempo de exposição ao óleo essencial								
Constante	-2,928	0,206	-14,22	< 0,01	-2,472	0,193	-12,83	< 0,01
PPM	0,028	0,002	15,37	< 0,01	0,006	0,0003	17,83	< 0,01
Tempo	0,023	0,003	7,00	< 0,01	0,017	0,003	6,32	< 0,01
	G = 315,94; gl = 2; <i>p</i> < 0,01; $\chi^2$ Hosmer-Lemeshow = 0,31; <i>p</i> = 0,58				G = 666,28; gl = 1; <i>p</i> < 0,01; $\chi^2$ Hosmer-Lemeshow = 12,91; <i>p</i> < 0,01			
Concentração + Tempo de exposição ao óleo essencial + Concentração*Tempo								
Constante	-2,454	0,216	-11,37	< 0,01	-1,516	0,287	-5,28	< 0,01
PPM	0,008	0,005	1,58	0,11	0,003	0,001	3,97	< 0,01
Tempo	0,014	0,004	3,77	< 0,01	-0,005	0,006	-0,83	0,41
PPM*Tempo	0,0004	0,0001	3,75	< 0,01	0,00007	0,00001	3,98	< 0,01
	G = 40,10; gl = 3; <i>p</i> < 0,01; $\chi^2$ Hosmer-Lemeshow = 1,54; <i>p</i> = 0,22				G = 68346,09; gl = 3; <i>p</i> < 0,01; $\chi^2$ Hosmer-Lemeshow = 3,46; <i>p</i> = 0,06			

Em ambas as espécies, a mortalidade de larvas foi dose-dependente da concentração de óleo essencial, e o tempo de exposição dá uma contribuição altamente significativa para esta mortalidade. Porém, enquanto o efeito aditivo da concentração do óleo essencial e do tempo de exposição ao óleo essencial de *C. langsdorffii* obteve o melhor ajuste ao conjunto de dados (Tabela 4,  $\chi^2$  Hosmer-Lemeshow = 0,31;  $p = 0,58$ ), o modelo probítico testado não conseguiu o mesmo ajuste em *C. multijuga* (Tabela 4).

Apesar de terem sido altamente significativos os coeficientes angulares e lineares do modelo probítico aplicado para estimar as doses letais nos percentis 50, 95 e 99 (Tabela 5), o melhor ajuste ao modelo, para o óleo essencial de ambas as espécies, foi obtido 24 horas a exposição das larvas ao óleo essencial. Assim, foram assumidas como CL50, CL95 e CL99, respectivamente, para *C. langsdorffii*, os valores em ppm de  $97,63 \pm (4,45)$ ,  $128,19 \pm (14,02)$ ,  $452,26 \pm (74,44)$ ; e de  $314,91 \pm (15,32)$ ,  $751,18 \pm (54,02)$  e  $1076,75 \pm (107,11)$  para *C. multijuga* (Tab. 5). Neste momento, o óleo essencial de *C. langsdorffii* se apresentou  $2,23 \pm (0,47)$  vezes mais potente que o de *C. multijuga*.

**Tabela 5** - Análise da atividade larvicida dos óleos essenciais de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Mata Atlântica) e *Copaifera multijuga* Hayne (Amazônica) com suas respectivas concentrações letais (CL)  $\pm$  erro padrão da média (EP), e parâmetros como coeficiente angular (angular), coeficiente linear (constante) nível de significância ( $p$ ) e  $\chi^2$  de Hosmer-Lemeshow de ajuste do modelo probístico testado a mortalidade das larvas instantaneamente à exposição e após 24, 48 e 72 horas para as larvas de *Stegomyia aegypti* aos óleos.

Tempo (h)	Efeito	Dose (ppm) $\pm$ (EP)		Potência <i>C. langsdorffii</i> X <i>C. multijuga</i>
		<i>C. langsdorffii</i>	<i>C. multijuga</i>	
0	CL <sub>50</sub>	107,12 $\pm$ (11,70)	-	18.37 $\pm$ (Indet)
	CL <sub>95</sub>	133,45 $\pm$ (29,42)	-	
	CL <sub>99</sub>	143,50 $\pm$ (19,64)	-	
	Angular	7,49 $\pm$ (3,87; $p = 0,05$ )	-	
	Constante	-34,99 $\pm$ (17,28; $p = 0,04$ )	-	
	$\chi^2$	0,122 ( $p = 1,00$ )	-	
24	CL <sub>50</sub>	97,63 $\pm$ (4,45)	314,91 $\pm$ (15,32)	2,23 $\pm$ (0,47)
	CL <sub>95</sub>	128,19 $\pm$ (14,02)	751,18 $\pm$ (54,02)	
	CL <sub>99</sub>	452,26 $\pm$ (74,44)	1076,75 $\pm$ (107,11)	
	Angular	1,33 $\pm$ (0,08; $p < 0,00$ )	1,89 $\pm$ (0,17; $p < 0,00$ )	
	Constante	-7,40 $\pm$ (0,43; $p < 0,00$ )	-10,89 $\pm$ (1,02; $p < 0,00$ )	
	$\chi^2$	6,15 ( $p = 0,63$ )	8,90 ( $p = 0,35$ )	
48	CL <sub>50</sub>	85,40 $\pm$ (2,31)	229,36 $\pm$ (13,35)	2,29 $\pm$ (0,38)
	CL <sub>95</sub>	119,52 $\pm$ (8,25)	585,08 $\pm$ (43,93)	
	CL <sub>99</sub>	137,38 $\pm$ (12,21)	862,42 $\pm$ (43,93)	
	Angular	4,89 $\pm$ (0,08; $p < 0,00$ )	1,75 $\pm$ (0,15; $p < 0,00$ )	
	Constante	-21,76 $\pm$ (3,17; $p < 0,00$ )	-9,54 $\pm$ (0,89; $p < 0,00$ )	
	$\chi^2$	11,80 ( $p = 0,16$ )	13,22 ( $p = 0,10$ )	
72	CL <sub>50</sub>	77,46 $\pm$ (2,00)	208,93 $\pm$ (11,02)	2.63 $\pm$ (0,32)
	CL <sub>95</sub>	115,64 $\pm$ (7,16)	442,94 $\pm$ (31,40)	
	CL <sub>99</sub>	136,53 $\pm$ (10,98)	607,42 $\pm$ (43,93)	
	Angular	4,10 $\pm$ (0,49; $p < 0,00$ )	2,19 $\pm$ (0,21; $p < 0,00$ )	
	Constante	-17,85 $\pm$ (2,07; $p < 0,00$ )	-11,69 $\pm$ (1,16; $p < 0,00$ )	
	$\chi^2$	50,79 ( $p = 0,00$ )	15,46 ( $p = 0,05$ )	

Os resultados mostram que as larvas são suscetíveis à composição dos óleos essenciais, bem como a utilização de produtos naturais pode ser considerada uma alternativa importante para o controle dos mosquitos, já que são biodegradáveis e não prejudicar o ambiente.

As larvas foram susceptíveis à composição dos óleos essenciais de forma dose-dependente, o que abre possibilidades para a utilização de produtos naturais como importante alternativa para o controle de dípteros, uma vez que são biodegradáveis e não impactarem o meio ambiente.

Os óleos essenciais já utilizados no controle do desenvolvimento larval de vetores como *St. aegypti* apresentaram rendimentos baixos o que pode ser um fator importante para a limitação da utilização destes como inseticidas [28,29], esse fato no entanto, não ocorre no rendimento dos óleos essenciais descritos no presente estudo.

Para taninos, tem sido proposto que substâncias com  $CL_{50}$  variando entre 0,1 a 0,49 ppm são bons agentes larvicidas[25]. Entretanto, para óleos essenciais a atividade inibidora tem se manifestado em teores bem diferentes. O óleo essencial de *Pterodon polygalaeflorus* Benth (Leguminosae), o óleo essencial dos frutos teve uma  $CL_{50}$  foi  $134,90 \pm 0,25\mu\text{g/mL}$  [31].

Os monoterpenos apresentam boa atividade larvicida e os sesquiterpenos tem capacidade para inibir a ecdise[34].

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 *St. 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 [45].

#### 4. Conclusões

A atividade larvicida foi verificada após exposição das larvas de *St. aegypti* aos óleos nos intervalos 0, 24, 48 e 72 horas. Análise *Probit* estimou as  $CL_{50}$ ,  $CL_{95}$  e  $CL_{99}$ , o melhor ajuste ao modelo, para o óleo essencial de ambas as espécies, foi obtido 24 horas a exposição das larvas ao óleo essencial. Assim, foram assumidas como  $CL_{50}$ ,  $CL_{95}$  e  $CL_{99}$ , respectivamente, para *C. langsdorffii*, os valores em ppm de  $97,63 \pm (4,45)$ ,  $128,19 \pm (14,02)$ ,  $452,26 \pm (74,44)$ ; e de  $314,91 \pm (15,32)$ ,  $751,18 \pm (54,02)$  e  $1076,75 \pm (107,11)$  para *C. multijuga*. Neste momento, o óleo essencial de *C. langsdorffii* se apresentou  $2,23 \pm (0,47)$  vezes mais potente que o de *C. multijuga*.

Análise GC-MS indicou entre os compostos majoritários o  $\alpha$ -copaeno como o composto de maior capacidade para caracterizar as duas espécies de *Copaifera*. Enquanto o  $\beta$ -duprezianeno e o E-caryophylleno como os compostos que permitem respectivamente distinguir a *C. langsdorffii* da *C. multijuga*.

Os resultados indicaram a potencialidade inseticida desses óleos contra larvas de *A. aegypti* em condições laboratoriais.

## 5. Referências

1. Henchal EA, Putnak JR: **The dengue viruses.** *Clin Microbiol Rev* 1990, **3**: 376-396.
2. Monath TP: **Dengue: the risk to developed and developing countries.** *Proc Nat Acad Sci* 1994, **91**: 2395-2400.
3. Schatzmayr HG: **Dengue situation in Brazil by year 2000.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 200, **95**: 179-181.
4. Tauil PL: **Critical aspects of dengue control in Brazil.** *Cad. Saúde Pública* 2002, **18**(3):867-871.
5. Marzochi KBF: **Dengue in Brazil- situation, transmission and control – A proposal for ecological control.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994, **89**: 235-245.
6. Gubler DJ: **Dengue and dengue hemorrhagic fever.** *Clinical Microbiology Reviews* 1998, **11**: 480-496.
7. Forattini OP, Brito M: **Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*.** *Rev Saúde Pública* 2003, **6**: 6-7.
8. Fundação Nacional da Saúde: **Dengue: instruções para pessoal de combate ao vetor, manual de normas técnicas.** Brasília: Funasa, 3 2001.
9. Whitehead SS, Falgout B, Hanley KA, Blaney JE, Markoff L, Murphy BR: **A life, Attenuated Dengue Virus Type 1 Vaccine Candidate with a 30-Nucleotide Deletion in the 3'Untranslated Region Is Highly Attenuated and Immunogenic in Monkeys.** *J Virol* 2003, **77**: 1.653-1.657.
10. Rothman AL: **Dengue: defining protective versus pathologic immunity.** *J Clin Invest* 2004, **113**: 946-951.
11. OPAS - Organização Panamericana de Saúde. **Re-aparecimento da Dengue nas Américas.** *Boletim Epidemiológico* 1997, **18**.

12. Fundação Nacional da Saúde: **Boletim Epidemiológico**. Brasília: Funasa, 23 2002.
13. Campos J, Andrade CFS: **Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos**. *Rev Saúde Pública* 2001, **35**: 232-236.
14. Carvalho MSL, Caldas ED, Degallier N, Vilarinhos PTR, Souza LCKR, Yoshizawa MAC, Knox MB, Oliveira C: **Susceptibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temephos no Distrito Federal**. *Rev Saúde Pública* 2004, **38**: 623-629.
15. Luna JED, Martins MF, Anjos AF, Kuwabara EF, Navarro-Silva MA: **Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil**. *Rev Saúde Pública* 2004, **38**: 842-843.
16. Arruda W, Oliveira GMC, Silva IG: **Toxicity of the ethanol extract of *Magonia pubescens* on larvae *Aedes aegypti***. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2003, **36(1)**: 17-25.
17. Cavalcanti LPG, Pontes RJS, Regazz ACF, De-Paula-junior FJ, Frutuoso RL, Sousa EP, Dantas-filho FF, Lima JWO: **Competência de peixes como predadores de larvas de *Aedes aegypti*, em condições de laboratório**. *Revista Saúde Pública* 2007, **41(4)**:638-644.
18. Simas NK, Lima EC, Conceição SR, Kuster RM, Oliveira-filho AM: **Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides**. *Química Nova* 2004, **27(1)**:46-49.

19. Andrade CFS, Modolo M: **Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* in integrated control.** *Rev Saúde Publ* 1991, **25**: 184-187.
20. Polanczyk RA, Garcia MO, Alves SB: **Potencial de *Bacillus thuringiensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*.** *Rev Saúde Pública* 2003, **37**: 813-816.
21. Praça LB, Batista AC, Martins ES, Siqueira CB, Dias DGS, Gomes ACMM, Falcão R, Monnerat RG: **Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera.** *Pesq Agropec Bras* 2004, **39**: 11-16.
22. Pizarro APB, Filho AMO, Parente JP, Melo MTV, Santos CE, Lima PA: **O aproveitamento do resíduo do sisal no controle de larvas de mosquitos.** *Rev. Soc Bras Med Trop* 1999, **32**: 23-29.
23. Aguilera L, Navarro A, Tacoronte JE, Leyva M, Marquetti MC: **Efecto letal de myrtaceas cubanas sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** *Rev Cubana Med Trop* 2003, **55**: 100-104.
24. Silva IG, Guimarães VP, Lima CG, Silva HHG, Elias CN, Mady CM, Silva VVM, Nery AP, Rocha KR, Rocha C, Isac E: **Efeito larvicida e toxicológico do extrato bruto etanólico da casca do caule de *Magonia pubescens* sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae), em criadouros artificiais.** *Rev Patol Trop* 2003, **32**: 73-86.
25. Silva HHG, Silva IG, Santos RMG, Filho ER, Elias CN: **Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindácea) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae).** *Rev Soc Bras Med Trop* 2004, **37(5)**: 396-399.

26. Cavalcanti ESB, Morais SM, Lima MAA, Santana EWP: **Larvicidal Activity of Essential Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004, **99**: 541-544.
27. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M: **Biological effects of essential oils – A review.** *Food and Chemical Toxicology* 2008, **46**:446–475.
28. Silva AG, Almeida DL, Ronchi SN, Bento AC, Scherer R, Ramos AC, Cruz ZMA: **The essential oil of Brazilian pepper, *Schinus terebinthifolia* Raddi in larval control of *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762).** *Parasites & Vectors* 2010, **3**:79.
29. Kweka EJ, Nyindo M, Moshia F, Silva AG: **Insecticidal activity of the essential oil from fruits and seeds of *Schinus terebinthifolia* Raddi against African malaria vectors.** *Parasites & Vectors* 2011, **4**:129.
30. Trudel RE, Bomblies A: **Larvicidal effects of Chinaberry (*Melia azederach*) powder on *Anopheles arabiensis* in Ethiopia.** *Parasit vectors* 2010, **4**:72.
31. Pimenta ATA, Santiago GMP, Arriaga AMC, Menezes GHA, Bezerra SB: **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvívica de *Pterodon polygalaeflorus* Benth (Leguminosae) sobre *Aedes aegypti*.** *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2006, **16(4)**:501-505.
32. Cavalcanti ESB, Morais SM, Lima MAA, Santana EWP: **Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004, **99**: 541-544.
33. Furtado RF, Lima MGA, Andrade Neto Manoel, Bezerra JNS, Silva MGV: **Atividade larvívica de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae).** *Neotrop Entomol* 2005, **34**: 843-847.

34. Lima MGA, Maia ICC, Sousa BD, Morais SM, Freitas SM: **Effect of stalk and leaf extracts from Euphorbiaceae species on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae.** *Rev Inst Med trop S Paulo* 2006, **48(4)**: 211-214.
35. Silva WJ, Dória GAA, Maia RT, Nunes RS, Carvalho GA, Blank AF, Alves PB, Marçal RM, Cavalcanti SCH: **Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides.** *Biochem Syst Ecol* 2007, **35**: 670-675.
36. Porto KRA, Roel AR, Silva MM, Coelho RM, Scheleder EJD, Jeller AH: **Atividade larvicida do óleo de *Anacardium humile* Saint Hill sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae).** *Rev Soc Bras Med Trop* 2008, **41**: 586-589.
37. Veiga JrV, Pinto AC: **O Gênero *Copaifera* L.** *Química nova* 2002, **25(2)**: 273-286.
38. Pontes AB, Correia DZ, Coutinho MS, Mothé CG: **Emulsão dermatológica a base de copaíba.** *Revista Analytica* 2003, **07**: 36-42.
39. Lameira OA, Martins-da-Silva RCV, Zoghbi MGB, Oliveira ECP: **Seasonal variation in the volatiles of *Copaifera duckei* Dwyer growing wild in the state of Para-Brazil.** *J. Essent. Oil* 2009, **21**: 105-107.
40. Cascon V, Gilbert B: **Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne.** *Phytochemistry* 2000, **55**: 773-778.
41. Veiga JrVF, Rosas EC, Carvalho MV, Henriques, MGMO, Pinto AC: **Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaíba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and**

- Copaifera multijuga* Hayne – A comparative study.** J. Ethnopharmacol 2007, **112**:248-254.
42. Adams RP: **Identification of essential oil components by gás chromatography/mass spectrometry.** Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 4 2009.
43. Zar JH: *Biostatistical analysis* New Jersey: Prentice Hall 2008.
44. Hosmer DW, Lemeshow S: *Applied logistic regression* New York: John Wiley 1989.
45. Martinez SS: **O nin – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção.** Londrina: Instituto Agronômico do Paraná 2002.

#### 4. DISCUSSÃO

O perfil fitoquímico qualitativo e centesimal dos óleos essenciais de *C. langsdorffii* (Mata Atlântica) e *C. multijuga* (Floresta Amazônica) foi constituído por monoterpenos e sesquiterpenos, sendo estes últimos mais abundantes (Tabela 2 - Capítulo 2).

Análise GC-MS indicou entre os compostos majoritários o  $\alpha$ -copaeno como o composto de maior capacidade para caracterizar as duas espécies de *Copaifera*. Enquanto o  $\beta$ -duprezianeno e o E-caryophylleno como os compostos que permitem respectivamente distinguir a *C. langsdorffii* da *C. multijuga* (Figura 3 – Capítulo 2).

Em *C. langsdorffii*, apenas quatro substâncias são monoterpenóides (silvestreno, Z- $\beta$ -ocimeno, allo-ocimeno e E-patchenol) já em *C. multijuga* apenas duas substâncias são monoterpenóides (Z- $\beta$ -ocimeno e allo-ocimeno), todos os sesquiterpenos em ambas as espécies representam 99,8% da composição total do óleo.

Quanto à atividade larvívica dos dois óleos essenciais, observou-se que eles apresentam resultados significativos contra larvas de *St. aegypti* (Tabela 3, 4 e 5 Capítulo 3).

A atividade larvívica foi verificada após exposição das larvas de *St. Aegypti* aos óleos nos intervalos 0, 24, 48 e 72 horas. Análise *Probit* estimou as  $CL_{50}$ ,  $CL_{95}$  e  $CL_{99}$ , o melhor ajuste ao modelo, para o óleo essencial de ambas as espécies, foi obtido 24 horas a exposição das larvas ao óleo essencial. Assim, foram assumidas



como CL<sub>50</sub>, CL<sub>95</sub> e CL<sub>99</sub>, respectivamente, para *C. langsdorffii*, os valores em ppm de 97,63 ± (4,45) 128,19 ± (14,02), 452,26 ± (74,44); e de 314,91 ± (15,32), 751,18 ± (54,02) e 1076,75 ± (107,11) para *C. multijuga*. Neste momento, o óleo essencial de *C. langsdorffii* se apresentou 2,23 ± (0,47) vezes mais potente que o de *C. multijuga*.

Os resultados obtidos nesse estudo permitem levantar a hipótese de que óleos essenciais ricos em sesquiterpenos podem ser considerados mais ativos para o controle de *A. aegypti* em relação aos que têm mais monoterpenos. Isto é evidente ao compararem-se os resultados de atividade de *G. friesiana*, *G. blepharophylla* contra *G. hispida*. As duas primeiras são significativamente mais ricas em sesquiterpenos que a outra que contém majoritariamente monoterpenos (COSTA et al., 2008).

O mesmo padrão que respalda esta hipótese é observado no trabalho de Santos et al., 2006 com *Cordia leucomalloides* e *C. curassavica* (Jack) Boraginaceae, ativas para controle de larvas de *A. aegypti*, sendo que a primeira espécie, com maior atividade, a mais rica em sesquiterpenos. Igualmente, observa-se nos resultados de Simas et al., 2004 que a melhor atividade inseticida foi detectada para o sesquiterpeno *E*-nerolidol isolado de *Myroxylon balsamun* (L.) Harms (Fabaceae).

Embora os estudos desenvolvidos pelos autores supracitados demonstrem mais uma vez ação maior dos sesquiterpenos, em Costa et al., 2005 este padrão não é seguido com óleos de *Hyptis martiussi* Benth. (Labiatae), *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) e *Syzigium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae), cujos compostos majoritários são os monoterpenos 1,8-cineol, timol e eugenol,

apresentando  $CL_{50}$  similares às reportadas por Santos et al., 2006 e Simas et al., 2004 contra larvas de *A. aegypti*. Quando se comparam as  $CL_{50}$  e  $CL_{95}$  observa-se que diterpenos poderiam ter um efeito ainda mais tóxico que sesquiterpenos para esta espécie de mosquito, como demonstrado em *Copaifera reticulata* Ducke (Fabaceae) com os diterpenóides ácido 1[(-)-3 $\beta$ -acetoxilabdan-8(17)-13-dien-15-oico ] ( $CL_{50}$  = 0,8 ppm e  $CL_{95}$  = 8,2 ppm) e ácido 2{alepterolico [(-)-3 $\beta$ -hidroxilabdan-8(17)-13-dien-15-oico ]} ( $CL_{50}$  = 87,3 ppm e  $CL_{95}$  = 128,8 ppm) (GERIS et al., 2008). E provavelmente tetranortriterpenóides (azadiractina) apresentem menor efeito que monoterpenos, sesquiterpenos e triterpenos, segundo as CLs para *A. aegypti* (WANDSCHEER et al., 2004). Finalmente, observando-se os resultados descritos em Furtado et al., 2005 e Cavalcanti et al., 2004, os óleos essenciais de poucas plantas apresentam CLs com valores próximos aos determinados neste estudo, colocando as espécies estudadas entre as mais promissórias em relação a sua atividade larvicida.

A atividade larvicida não é restrita a componentes do óleo essencial de espécies de *Copaifera*. Diterpenóides isolados da oleoresina de *Copaifera reticulata* Ducke apresentaram a atividade larvicida, sobre larvas no 3º instar de *St. aegypti* (GERIS et al., 2008).

## 5. CONCLUSÕES

Os óleos essenciais oferecem hoje como misturas naturais uma ampla fonte de produtos potencialmente aplicáveis ao controle de mosquitos vetores. Se forem consideradas as substâncias que estão presentes em cada mistura, que pode ultrapassar 60 componentes, esse produtos naturais ampliam muito a oferta de substâncias ativas aplicáveis ao controle do desenvolvimento larval dos mosquitos.

Tratando os óleos essenciais como misturas ou como suas substâncias componentes isoladas eles representam substâncias originárias de sistemas biológicos, portanto mais compatíveis com a vida e com menor risco de dano ambiental.

Análise GC-MS indicou entre os compostos majoritários que o  $\alpha$ -copaeno foi o composto de maior capacidade para caracterizar as duas espécies de *Copaifera*. Enquanto o  $\beta$ -duprezianeno e o E-caryophylleno permitiram respectivamente distinguir a *C. langsdorffii* da *C. multijuga*.

Levando-se em conta apenas o rendimento do processo extrativo e a densidade, a matéria prima oleorresina em ambas as espécies de copaíba se apresentam como uma fonte altamente produtiva de extração de óleo essencial uma vez que não houve diferenças significativas entre essas variáveis.

A atividade larvicida foi verificada após exposição das larvas de *St. aegypti* aos óleos nos intervalos 0, 24, 48 e 72 horas. Análise *Probit* estimou as  $CL_{50}$ ,  $CL_{95}$  e  $CL_{99}$ , o melhor ajuste ao modelo, para o óleo essencial de ambas as espécies, foi

obtido 24 horas a exposição das larvas ao óleo essencial. Assim, foram assumidas como CL<sub>50</sub>, CL<sub>95</sub> e CL<sub>99</sub>, respectivamente, para *C. langsdorffii*, os valores em ppm de 97,63 ± (4,45) 128,19 ± (14,02), 452,26 ± (74,44); e de 314,91 ± (15,32), 751,18 ± (54,02) e 1076,75 ± (107,11) para *C. multijuga*. Neste momento, o óleo essencial de *C. langsdorffii* se apresentou 2,23 ± (0,47) vezes mais potente que o de *C. multijuga*.

Os bioensaios realizados indicaram a potencialidade inseticida desses óleos contra larvas de *St. aegypti* em condições laboratoriais. Diante dos experimentos apresentados conclui-se que os óleos têm forte atividade larvicida.

As copaibeiras da flora brasileira estudadas neste trabalho, sendo ricas em óleos essenciais que contêm em sua estrutura os traços de monoterpenos como silvestreno, Z-β-ocimeno, allo-ocimeno, E-patchenol e de forma dominante os sesquiterpenos como o α-copaeno, β-duprezianeno e E-caryophylleno são alternativas interessantes que podem ser usadas para o controle de larvas do mosquito *St. aegypti*, oferecendo um método de controle mais seguro ambientalmente do que o uso de inseticidas químicos.

## 6. REFERÊNCIAS

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 446–475, 2008.

BRAGA, I.A.; LIMA, J.B.P.; SOARES, S.S. & VALLE, D. - *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the States of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 99: 199-203, 2004.

CAMPOS, J. & ANDRADE, C.F.S. - Susceptibilidade larval de populações de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* a inseticidas químicos. *Rev. Saúde públ. (S. Paulo)*, 37: 523-527, 2003.

CARVALHO, A.F.U.; MELO, V.M.M.; CRAVEIRO, A.A. *et al.* - Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* cham. against *Aedes aegypti* Linn. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 98: 569-571, 2003.

CARVALHO, J.C.T.; CASCON, V.; POSSEBON, L.S.; MORIMOTO, M.S.S.; CARDOSO, L.G.V.; KAPIAN, M.A.C.; GILBERT, B. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. *Phytother. Res.*, v.19, p.946-950, 2005.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochemistry*, v.55, p. 773-778, 2000.

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; SILVA, M. R.; MOTA, M. L.; SANTOS, N. K. A.; CARDOSO, A. L. H. & LEMOS, T. L. G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 15 (4): 304-309, 2005.

COSTA, E. V.; TEIXEIRA, S. D.; MARQUES, F. A.; DUARTE, M. C. T.; DELARMELENA, C.; PINHEIRO, M. L. B.; TRIGO, J. R. & MAIA, B. H. L. N. S. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon *Guatteriopsis* species. *Phytochemistry*, 69: 1895-1899, 2008.

CAVALCANTI, E.S.B.; MORAIS, S.M.; LIMA, M.A.A; SANTANA, E.W.P. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 99: 541-544, 2004.

CHENG, S.S.; LIU, J.Y.; TSAI, K.H.; CHEN, W.J. & CHANG, S.T. – Chemical composition and mosquito larvicidal activity of essential oils from leaves of different *Cinnamomum osmophloeum* provenances. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 4395-4400, 2004.

CICCIA, G.; COUSSIO, J.; MONGELLI E. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. *J Ethnopharmacol*. 72: 185-189, 2000.

CUNHA, K.M.A.; PAIVA, L.A.F.; SANTOS, F.A.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R.; RAO, V.S.N. Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaiba langsdorffii* on the rat uterus *in vitro*. *Phytother. Res.*, v.17, p.3020-324, 2003.

DUFFIELD, R.N.; WHEELER, J.W. & EICKWORT, G.C. Sociochemicals of bees. In: Bell WJ & Cardé RT (eds) *Chemical ecology of insects* London: Chapman & Hall, p. 387–428, 1984.

DUSENBERY, D. *Sensory ecology: how organisms acquire and respond to information*. New York: W.H. Freeman, 1992.

FURTADO, R.F.; LIMA, M.G.A.; ANDRADE, N.M.; BEZERRA, J.N.S; SILVA, M.G.V. Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Neotrop Entomol.* 34: 843-847, 2005.

GERIS, R.; SILVA, I. G. DA; SILVA, H. H. G. DA; BARISON, A.; RODRIGUES-FILHO, E. & FERREIRA, A. G. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 50 (1): 25-28, 2008.

GOMES, N.M.; REZENDE, C.M.; FONTES, S.P.; MATHEUS, M.E.; FERNANDES, P.D. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. *J. Ethnopharmacol.*, v.109, p.486-492, 2007.

HALSTEAD, S.B. Dengue: overview and history. In *Dengue*. Edited by Halstead SB. London: Imperial College Press; 2008: 1-28. [Pasvol G, Hoffman SL (series Editors): *Tropical Medicine: Science and Practices*, vol 5]

HARBORNE, J.B. Introduction to ecological biochemistry. London: Academic Press, 1993.

HENRIQUES, M. G. M.; SIANI, A. C.; ROSAS, E. C.; GUIMARÃES, Anderson Cavalcanti; ZOGHBI, M. G. B.; SOARES, R. O. A. Óleos essenciais – Potencial antiinflamatório. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Rio de Janeiro, v.3, n.16 p. 38-43 set. 2000.

KAISER, R. Verbal description of scents. In: *The scent of orchids: olfactory and chemical investigations*. pp. 40-45. Amsterdam: Elsevier, 1993.

KATZ, T.M.; MILLER, J.H; HEBERT A.A. Insect repellents: historical perspectives and new developments. *J Am Acad Dermatol*. 58: 865-871, 2008.

KEJLOVÁ, K.; JIROVA, D.; BENDOVA, H.; KANDAROVA, H.; WEIDENHOFFER,Z.; KOLAROVA, H.; LIEBSCH, M. Phototoxicity of bergamot oil assessed by in vitro techniques in combination with human patch tests. 2007, v.21, p. 1289-1303.

KEJLOVA, K.; JIROVA, D.; BENDOVA, H.; GAJDOS, P.; KOLAROVA, H. Phototoxicity of essential oils intended for cosmetic use. 2010, v.24, p.2084-2089.



KLINKHAMER, P.G.L. & DE JONG, T.J. Attractiveness to pollinators: a plant's dilemma. *Oikos* 66: 180-184, 1993.

KNUDSEN, J.T. & TOLLSTEN, L. Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes: floral scent composition in moth-pollinated taxa. *Botanical Journal of the Linnean Society* 113: 263-284, 1993.

KNUDSEN, J.T. & TOLLSTEN, L. Floral scent in bat-pollinated plants: a case of convergent evolution. *Botanical Journal of the Linnean Society* 119: 45-57, 1995.

KNUDSEN, J.T., TOLLSTEN, L. & BERGSTRÖM, G. Floral scents: a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. *Phytochemistry* 33: 253-280, 1993.

LAMEIRA, O.A.; MARTINS-DA-SILVA, R.C.V.; ZOGHBI, M.G.B.; OLIVEIRA, E.C.P. Seasonal variation in the volatiles of *Copaifera duckei* Dwyer growing wild in the state of Para-Brazil. *J. Essent. Oil*, v. 21, p. 105-107, 2009.

LEWIS, A.C. Learning and the evolution of resources: pollinators and flower morphology. In: *Insect learning: ecological and evolutionary perspectives* (Papaj DR & Lewis AC ed), London: Chapman & Hall, p. 219-242, 1993.

LIMA, J.B.; DA-CUNHA, M.P.; DA SILVA, R.C.; *et al.* - Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 68: 329-333, 2003.

LIMA, M.G.A.; MAIA, I.C.C.; SOUSA, B.D.; MORAIS, S.M. & FREITAS, S.M. – Effects of stalk and leaf extracts from Euphorbiaceae species on *Aedes aegypti* (Diptera,Culicidae) larvae. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 48: 211-214, 2006.

LIMA SILVA, J.J.; GUIMARÃES S.B.; SILVEIRA, E.R.; VASCONCELOS, P.R.; LIMA, G.G.; TORRES, S.M.; VASCONCELOS, R.C. Effects of *Copaifera langsdorffii* Desf. on ischemia-reperfusion of randomized skin flaps in rats. Aesthetic. Plast. Surg., v.33, p.104-109, 2009.

LORENZI, H.F.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais do Brasil, nativas e exóticas. 1 ed. São Paulo p. 544 - 557. 2002.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JÚNIOR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. Química Nova, Rio de Janeiro, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MACORIS, M.L.; ANDRIGHETTI, M.T.M.; TAKAKU, L. *et al.* - Resistance of *Aedes aegypti* from the State of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 98: 703-708, 2003.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. Plantas Medicinais. Viçosa: editora UFV, 2002.

MENDONÇA, F.A.C.; SILVA, K.F.S.; SANTOS, K.K.; RIBEIRO JR, K.A.L.; SANT'ANA, A.E.G. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*. 76: 629-636, 2005.

MONATH, T.P. Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91:2395–2400.

MOURA, M.Z.D.; ALVES, T.M.A.; SOARES, G.L.G.; ISAIA, R.M.S. Intra-specific phenotypic variations in *Lantana camara* leaves affect host selection by the gall maker *Aceria lantanae*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37:541–548, 2009.

OMENA, M.C.; NAVARRO, D.M.A.F.; PAULA, J.E.; LUNA, J.S.; FERREIRA DE LIMA, M.R.; SANT'ANA, A.E.G. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. *Bioresour Technol*. 98: 2549-2556, 2007.

OLIVEIRA, P.V.; FERREIRA JR, J.C.; MOURA, F.S.; LIMA, G.S.; OLIVEIRA, F.M.; OLIVEIRA, P.E.S.; CONSERVA, L.M.; GIULIETTI, A.M.; LEMOS, R.P.L. Larvicidal activity of 94 extracts from ten plant species of northeastern of Brazil against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res*. 107: 403-407, 2010.

PINTO, A. A. et al. Uso de óleo de copaíba no tratamento de escaras em pacientes acamados. *Ciência & Consciência*, Rondônia, v. 2, n. 1, 2007.

PELLMYR, O. & THIEN, L.B. (1986) Insect reproduction and floral fragrances: keys to the evolution of the angiosperms? *Taxon* 35: 76-85, 1986.

PONTES, A. B.; CORREIA, D. Z.; COUTINHO, M. S.;MOTHÉ, C. G. Emulsão dermatológica a base de copaíba. *Revista Analytica*, n. 07, p. 36-42, 2003.

PORTO, K.R.A; ROEL, A.R.; SILVA, M.M.; COELHO, R.M.; SCHELEDER, E.J.D.; JELLER, A.H. Atividade larvicida do óleo de *Anacardium humile* Saint Hill sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). *Rev Soc Bras Med Trop*. 41: 586-589, 2008.

POSSA, D. V. et al. Contribuição ao estudo morfométrico de cicatrização de feridas cutâneas de segunda intenção com óleo de copaíba, em ratos. In: Salão de Iniciação Científica, V., 2007, Ji-Paraná. Anais... Ji-Paraná: Ciência & Consciência, 2007. v. 2.

REINERT, J.F.; HARBACH, R.E. & KITCHING, I.J.: Phylogeny and classification of Aedini (Diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages. *Zool J Linn Soc*, 142: 289–368, 2004.

ROUBIK, D.W. Ecology and natural history of tropical bees. New York: Cambridge University Press, 1989.

SANTOS, R.P.; NUNES, E.P.; NACIMENTO, R.F.; SANTIAGO, G.M.P.; MENEZES, G.H.A.; SILVEIRA, E.R. & PESSOA, O.D.L. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the Northeast o Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17(5): 1027-1030, 2006.

SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T., DIAS FILHO, B.P.; VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; NAKAMURA, C.V. Effect of Brazilian copaíba oils on *Leishmania amazonensis*. J. Ethnopharmacol., v.120, p.204-208, 2008.

SACHETTI, C.G.; FASCINELI, M.L.; SAMPAIO, J.A.; LAMEIRA, A.O.; CALDAS, E.D. Assessment of the neurotoxic potential and acute toxicity of copaíba (*Copaifera reticulata*, Ducke Fabaceae). Braz. J. Pharmacogn., v.19, p.937-941, 2009.

SHAALAN, E.A.S.; CANYON, D.; YOUNES, M.W.F.; ABDEL-WAHAB, H.; MANSOUR, A.H. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. *Environ Int.* 31: 1149-1166, 2005.

SILVA, A.G.; LUTZ, L.V. Sinalização ou atração floral? Uma abordagem química para a polinização. *Natureza on line* 2(1): 10–14, 2004.

SILVA, H.H.G.; SILVA, I.G.; SANTOS, R.M.G.; RODRIGUES FILHO, E. & ELIAS, C.N. - Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 37: 396-399, 2004.

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. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. *Biochem Syst Ecol.* 35: 670-675, 2007.

SIMAS, N.K.; LIMA, E.C.; CONCEIÇÃO, S.R. *et al.* - Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue - atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Quím. Nova*, 27: 46-49, 2004.

SIMÕES, C. M.; SPITZERR, V. Óleos voláteis. In: Simões, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A; PETROVICKS, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Florianópolis Porto Alegre: UFS/UFRGS, p. 467-469, 2004.

SPENCER, K.C. (ed). *Chemical mediation of coevolution*. San Diego: Academic Press, 1988.

TAUIL, P.L. Critical aspects of dengue control in Brazil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 18(3):867-871, mai-jun, 2002.

TINCUSI, B.M.; JIMÉNEZ, I.A.; BAZZOCCHI, I.L.; MOUJIR, L.M.; MAMANI, Z.A.; BARROSO, J.P.; RAVELO, A.G.; HERNÁNDEZ, B.V. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the Peruvian Medicinal Plant *Copaifera paupera*. *Plant. Med.*, v.68, p.808-812, 2002.

WANDSCHEER, C. B.; DUQUE, J. E.; SILVA, M. A. N. DA; FUKUYAMA, Y.; WOHLKE, J. L.; ADELMANN, J. & FONTANA, J. D. Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. *Toxicon*, 44: 829-835, 2004.

VINSON, S.B.; FRANKIE, G.W.; Blum, M.S.; WHEELER, J.W. Isolation, identification, and function of the Dufour gland secretion of *Xylocopa virginica texana* (Hymenoptera:Anthophoridae). *Journal of Chemical Ecology* 4: 315-323, 1978.

WEIS, A.E.; CAMPBELL, D.R. Plant genotype: a variable factor in insect-plant interactions. In: *Effects of resource distribution on animal-plant interactions* (HUNTER; M.D.; OHGUSHI, T.; PRICE PW ed) pp 75-111. San Diego: Academic Press, 1992.

WILLIAMS, N.H. & WHITTEN, W.M. Orchid floral fragrances and male euglossine bees: methods and advances in the last sesquidecade. *Biological Bulletin*, 164 355-395, 1983.

WILLIAMS, N.H.; VINSON, S.B. & FRANKIE G.W. The chemical content of the dorsal mesosomal gland of two *Xylocopa* species (Hymenoptera: Anthophoridae) from Costa Rica. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 86b: 311-312, 1987.

WHO - World Health Organization - Dengue/dengue haemorrhagic fever prevention and control. Regional Office for South-East Asia, 2003. p. 1-33.

WHO - World Health Organization - Library Cataloguing-in-Publication Data: Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control—New edition. WHO/HTM/NTD/DEN/2009. 2009: p97.

VAN DER DOOL, H. & KRATZ, P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, 11, 463-471, 1963.

VEIGA JÚNIOR, V.; PINTO, A. C. O Gênero *Copaifera* L. *Química nova*, Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

VEIGA JÚNIOR, V.F.; ROSAS, E.C.; CARVALHO, M.V.; HENRIQUES, M.G.M.O.; PINTO, A.C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaíba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne – A comparative study. *J. Ethnopharmacol*, v.112, p.248-254, 2007.

VOGEL, S. Duftdrüsen im Dienste der Bestäubung; über Bau und Funktion der Osmophoren. *Abhandlungen der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Klasse: Akademie der Wissenschaften und der Literatur Mainz*, 10: 1-165, 1963.



## **ANEXOS**

## Normas da revista *Parasites and Vectors* (JCR 2,13)

### Review articles

See 'About this journal' for descriptions of different article types and information about policies and the refereeing process.

### Criteria

Review articles are summaries of recent insights in specific research areas within the scope of *Parasites & Vectors*.

Key aims of reviews are to provide systematic and substantial coverage of mature subjects, evaluations of progress in specified areas, and/or critical assessments of emerging technologies.

### Submission process

Manuscripts must be submitted by one of the authors of the manuscript, and should not be submitted by anyone on their behalf. The submitting author takes responsibility for the article during submission and peer review.

Please note that *Parasites & Vectors* levies an article-processing charge on all accepted Research, Letter to the Editor, Review and Short report articles; if the submitting author's institution is a BioMed Central member the cost of the article-processing charge is covered by the membership (see About page for detail). Please note that the membership is only automatically recognised on submission if the submitting author is based at the member institution.

To facilitate rapid publication and to minimize administrative costs, *Parasites & Vectors* accepts only online submission.

Files can be submitted as a batch, or one by one. The submission process can be interrupted at any time; when users return to the site, they can carry on where they left off.

See below for examples of word processor and graphics file formats that can be accepted for the main manuscript document by the online submission system. Additional files of any type, such as movies, animations, or original data files, can also be submitted as part of the manuscript.

During submission you will be asked to provide a cover letter. Use this to explain why your manuscript should be published in the journal, to elaborate on any issues relating to our editorial policies in the 'About *Parasites & Vectors*' page, and to declare any potential competing interests. You will be also asked to provide the contact details (including email addresses) of potential peer reviewers for your manuscript. These should be experts in their field, who will be able to provide an objective assessment of the manuscript. Any suggested peer reviewers should not have published with any of the authors of the manuscript within the past five years, should not be current collaborators, and should not be members of the same research institution. Suggested reviewers will be considered alongside potential reviewers recommended by the Editor-in-Chief and/or Editorial Board members.

Assistance with the process of manuscript preparation and submission is available from BioMed Central customer support team.

We also provide a collection of links to useful tools and resources for scientific authors on our Useful Tools page.

## File formats

The following word processor file formats are acceptable for the main manuscript document:

- Microsoft Word (version 2 and above)
- Rich text format (RTF)
- Portable document format (PDF)
- TeX/LaTeX (use BioMed Central's TeX template)
- DeVice Independent format (DVI)

Users of other word processing packages should save or convert their files to RTF before uploading. Many free tools are available which ease this process.

TeX/LaTeX users: We recommend using BioMed Central's TeX template and BibTeX stylefile. If you use this standard format, you can submit your manuscript in TeX format. If you have used another template for your manuscript, or if you do not wish to use BibTeX, then please submit your manuscript as a DVI file. We do not recommend converting to RTF.

Note that figures must be submitted as separate image files, not as part of the submitted manuscript file.

## Preparing main manuscript text

General guidelines of the journal's style and language are given below.

### Length of article

Review should be approximately 3000 words.

## Overview of manuscript sections for Review articles

Manuscripts for Review articles submitted to *Parasites & Vectors* should be divided into the following sections (in this order):

- Title page
- Abstract
- Keywords
- Review
- Conclusions
- List of abbreviations used (if any)
- Competing interests
- Authors' contributions
- Authors' information
- Acknowledgements
- Endnotes
- References
- Illustrations and figures (if any)
- Tables and captions (if any)
- Preparing additional files

The **Accession Numbers** of any nucleic acid sequences, protein sequences or atomic coordinates cited in the manuscript should be provided, in square brackets and include the corresponding database name; for example, [EMBL:AB026295, EMBL:AC137000, DDBJ:AE000812, GenBank:U49845, PDB:1BFM, Swiss-Prot:Q96KQ7, PIR:S66116].

The databases for which we can provide direct links are: EMBL Nucleotide Sequence Database (EMBL), DNA Data Bank of Japan (DDBJ), GenBank at the NCBI (GenBank), Protein Data Bank (PDB), Protein Information Resource (PIR) and the Swiss-Prot Protein Database (Swiss-Prot).

## Title page

The title page should:

- provide the title of the article
- list the full names, institutional addresses and email addresses for all authors
- indicate the corresponding author

Please note:

- abbreviations within the title should be avoided

## Abstract

A short, unstructured, single paragraph summary, no more than 350 words, of the major points raised, making evident the key work highlighted in the article.

## Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

## Review

This should contain the body of the article, and may also be broken into subsections with short, informative headings.

## Conclusions

This should state clearly the main conclusions of the review and give a clear explanation of their importance and relevance.

## List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations can be provided, which should precede the competing interests and authors' contributions.

## Competing interests

A competing interest exists when your interpretation of data or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with other people or organizations. Authors must disclose any financial competing interests; they should also reveal any non-financial competing interests that may cause them embarrassment were they to become public after the publication of the manuscript.

Authors are required to complete a declaration of competing interests. All competing interests that are declared will be listed at the end of published articles. Where an author gives no competing interests, the listing will read 'The author(s) declare that they have no competing interests'.

When completing your declaration, please consider the following questions:

*Financial competing interests*

- In the past five years have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? Is such an organization financing this manuscript (including the article-processing charge)? If so, please specify.
- Do you hold any stocks or shares in an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? If so, please specify.
- Do you hold or are you currently applying for any patents relating to the content of the manuscript? Have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that holds or has applied for patents relating to the content of the manuscript? If so, please specify.
- Do you have any other financial competing interests? If so, please specify.

#### *Non-financial competing interests*

Are there any non-financial competing interests (political, personal, religious, ideological, academic, intellectual, commercial or any other) to declare in relation to this manuscript? If so, please specify.

If you are unsure as to whether you, or one your co-authors, has a competing interest please discuss it with the editorial office.

## **Authors' contributions**

In order to give appropriate credit to each author of a paper, the individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section.

An 'author' is generally considered to be someone who has made substantive intellectual contributions to a published study. To qualify as an author one should 1) have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; and 3) have given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group, alone, does not justify authorship.

We suggest the following kind of format (please use initials to refer to each author's contribution): AB carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence alignment and drafted the manuscript. JY carried out the immunoassays. MT participated in the sequence alignment. ES participated in the design of the study and performed the statistical analysis. FG conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support.

## **Authors' information**

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

## **Acknowledgements**

Please acknowledge anyone who contributed towards the article by making substantial contributions to conception, design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data, or who was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content, but who does not meet the criteria for authorship. Please also include the source(s) of funding for each author, and for the manuscript preparation. Authors must describe the role of the funding body, if any, in design, in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to

submit the manuscript for publication. Please also acknowledge anyone who contributed materials essential for the study. If a language editor has made significant revision of the manuscript, we recommend that you acknowledge the editor by name, where possible.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

## Endnotes

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

## References

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. Each reference must have an individual reference number. Please avoid excessive referencing. If automatic numbering systems are used, the reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Only articles, datasets and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited; unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished observations" or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited colleagues is the responsibility of the author. Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE. Citations in the reference list should include all named authors, up to the first 30 before adding '*et al.*'.

Any *in press* articles cited within the references and necessary for the reviewers' assessment of the manuscript should be made available if requested by the editorial office.

Style files are available for use with popular bibliographic management software:

- BibTeX
- EndNote style file
- Reference Manager
- Zotero

Examples of the *Parasites & Vectors* reference style are shown below. Please ensure that the reference style is followed precisely; if the references are not in the correct style they may have to be retyped and carefully proofread.

All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, in the following format: **The Mouse Tumor Biology Database** [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

### Examples of the *Parasites & Vectors* reference style

#### *Article within a journal*

Koonin EV, Altschul SF, Bork P: **BRCA1 protein products: functional motifs.** *Nat Genet* 1996, **13**:266-267.

#### *Article within a journal supplement*

Orengo CA, Bray JE, Hubbard T, LoConte L, Sillitoe I: **Analysis and assessment of ab initio three-**

**dimensional prediction, secondary structure, and contacts prediction.** *Proteins* 1999, **43**(Suppl 3):149-170.

*In press article*

Kharitonov SA, Barnes PJ: **Clinical aspects of exhaled nitric oxide.** *Eur Respir J*, in press.

*Published abstract*

Zvaifler NJ, Burger JA, Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Maini RN: **Mesenchymal cells, stromal derived factor-1 and rheumatoid arthritis [abstract].** *Arthritis Rheum* 1999, **42**:s250.

*Article within conference proceedings*

Jones X: **Zeolites and synthetic mechanisms.** In *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Edited by Smith Y. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996:16-27.

*Book chapter, or article within a book*

Schnepf E: **From prey via endosymbiont to plastids: comparative studies in dinoflagellates.** In *Origins of Plastids. Volume 2*. 2nd edition. Edited by Lewin RA. New York: Chapman and Hall; 1993:53-76.

*Whole issue of journal*

Ponder B, Johnston S, Chodosh L (Eds): **Innovative oncology.** In *Breast Cancer Res* 1998, **10**:1-72.

*Whole conference proceedings*

Smith Y (Ed): *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996.

*Complete book*

Margulis L: *Origin of Eukaryotic Cells*. New Haven: Yale University Press; 1970.

*Monograph or book in a series*

Hunninghake GW, Gadek JE: **The alveolar macrophage.** In *Cultured Human Cells and Tissues*. Edited by Harris TJR. New York: Academic Press; 1995:54-56. [Stoner G (Series Editor): *Methods and Perspectives in Cell Biology*, vol 1.]

*Book with institutional author*

Advisory Committee on Genetic Modification: *Annual Report*. London; 1999.

*PhD thesis*

Kohavi R: **Wrappers for performance enhancement and oblivious decision graphs.** *PhD thesis*. Stanford University, Computer Science Department; 1995.

*Link / URL*

**The Mouse Tumor Biology Database** [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]

*Link / URL with author(s)*

Neylon C: Open Research Computation: an ordinary journal with extraordinary aims. [[http://blogs.openaccesscentral.com/blogs/bmcblog/entry/open\\_research\\_computation\\_an\\_ordinary](http://blogs.openaccesscentral.com/blogs/bmcblog/entry/open_research_computation_an_ordinary)]

*Dataset with persistent identifier*

Zheng, L-Y; Guo, X-S; He, B; Sun, L-J; Peng, Y; Dong, S-S; Liu, T-F; Jiang, S; Ramachandran, S; Liu, C-M; Jing, H-C (2011): Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). *GigaScience*. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

## Preparing illustrations and figures

Illustrations should be provided as separate files, not embedded in the text file. Each figure should include a single illustration and should fit on a single page in portrait format. If a figure consists of separate parts, it is important that a single composite illustration file be submitted which contains all parts of the figure. There is no charge for the use of color figures.

Please read our figure preparation guidelines for detailed instructions on maximising the quality of your figures.

## Formats

The following file formats can be accepted:

- EPS (preferred format for diagrams)
- PDF (also especially suitable for diagrams)
- TIFF
- PNG (preferred format for photos or images)
- Microsoft Word (version 5 and above; figures must be a single page)
- PowerPoint (figures must be a single page)
- JPEG
- BMP

## Figure legends

The legends should be included in the main manuscript text file at the end of the document, rather than being a part of the figure file. For each figure, the following information should be provided: Figure number (in sequence, using Arabic numerals - i.e. Figure 1, 2, 3 etc); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300 words.

**Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures or tables that have previously been published elsewhere.**

## Preparing tables

Each table should be numbered and cited in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title (above the table) that summarizes the whole table; it should be no longer than 15 words. Detailed legends may then follow, but they should be concise. Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

Smaller tables considered to be integral to the manuscript can be pasted into the end of the document text file, in A4 portrait or landscape format. These will be typeset and displayed in the final published form of the article. Such tables should be formatted using the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are kept aligned when the file is sent electronically for review; this will not always be the case if columns are generated by simply using tabs to separate text. Columns and rows of data should be made visibly distinct by ensuring that the borders of each cell display as black lines. Commas should not be used to indicate numerical values. Color and shading may not be used; parts of the table can be highlighted using symbols or bold text, the meaning of which should be explained in a table legend. Tables should not be embedded as figures or spreadsheet files.

Larger datasets or tables too wide for a landscape page can be uploaded separately as additional files. Additional files will not be displayed in the final, laid-out PDF of the article, but a link will be provided to the files as supplied by the author.

Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). As with all files, please use the standard file extensions.

## Preparing additional files

Although *Parasites & Vectors* does not restrict the length and quantity of data included in an article, there may still be occasions where an author wishes to provide data sets, tables, movie files, or other information as additional files. Results that would otherwise be indicated as "data not shown" can and should be included as additional files. Since many weblinks and URLs rapidly become broken, *Parasites & Vectors* requires that all supplementary data are included as additional files rather than as a link to your



own website. These files can be uploaded using the 'Additional Material files' button in the manuscript submission tool.

The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission.

Additional files will be linked to the final published article in the form supplied by the author, but will not be displayed within the article. They will be made available in exactly the same form as originally provided by the authors.

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text, immediately following the tables (if any):

- File name (e.g. Additional file 1)
- File format including the three-letter file extension (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)
- Title of data
- Description of data

Additional files should be named "Additional file 1" and so on and should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'An additional movie file shows this in more detail [see Additional file 1]'.

## Additional file formats

Ideally, file formats for additional files should not be platform-specific, and should be viewable using free or widely available tools. The following are examples of suitable formats.

- Additional documentation
  - PDF (Adobe Acrobat)
- Animations
  - SWF (Shockwave Flash)
- Movies
  - MOV (QuickTime)
  - MPG (MPEG)
- Tabular data
  - XLS (Excel Spreadsheet)
  - CSV (Comma separated values)

As with figure files, files should be given the standard file extensions. This is especially important for Macintosh users, since the Mac OS does not enforce the use of standard extensions. Please also make sure that each additional file is a single table, figure or movie (please do not upload linked worksheets or PDF files larger than one sheet).

## Mini-websites

Small self-contained websites can be submitted as additional files, in such a way that they will be browsable from within the full text HTML version of the article. In order to do this, please follow these instructions:

1. Create a folder containing a starting file called index.html (or index.htm) in the root.
2. Put all files necessary for viewing the mini-website within the folder, or sub-folders.
3. Ensure that all links are relative (ie "images/picture.jpg" rather than "/images/picture.jpg" or "http://yourdomain.net/images/picture.jpg" or "C:\Documents and Settings\username\My Documents\mini-website\images\picture.jpg") and no link is longer than 255 characters.
4. Access the index.html file and browse around the mini-website, to ensure that the most commonly used browsers (Internet Explorer and Firefox) are able to view all parts of the mini-website without problems, it is ideal to check this on a different machine.
5. Compress the folder into a ZIP, check the file size is under 20 MB, ensure that index.html is in the root of the ZIP, and that the file has .zip extension, then submit as an additional file with your article.

## Style and language

### General

Currently, *Parasites & Vectors* can only accept manuscripts written in English. Spelling should be US English or British English, but not a mixture.

There is no explicit limit on the length of articles submitted, but authors are encouraged to be concise. There is also no restriction on the number of figures, tables or additional files that can be included with each article online. Figures and tables should be numbered in the order in which they are referred to in the text. Authors should include all relevant supporting data with each article.

*Parasites & Vectors* will not edit submitted manuscripts for style or language; reviewers may advise rejection of a manuscript if it is compromised by grammatical errors. Authors are advised to write clearly and simply, and to have their article checked by colleagues before submission. In-house copyediting will be minimal. Non-native speakers of English may choose to make use of a copyediting service.

### Help and advice on scientific writing

The abstract is one of the most important parts of a manuscript. For guidance, please visit our page on Writing titles and abstracts for scientific articles.

Tim Albert has produced for BioMed Central a list of tips for writing a scientific manuscript. American Scientist also provides a list of resources for science writing.

### Abbreviations

Abbreviations should be used as sparingly as possible. They should be defined when first used and a list of abbreviations can be provided following the main manuscript text.

### Typography

- Please use double line spacing.
- Type the text unjustified, without hyphenating words at line breaks.
- Use hard returns only to end headings and paragraphs, not to rearrange lines.
- Capitalize only the first word, and proper nouns, in the title.
- All lines and pages should be numbered. Authors are asked to ensure that line numbering is included in the main text file of their manuscript at the time of submission to facilitate peer-review. Once a manuscript has been accepted, line numbering should be removed from the manuscript before publication. For authors submitting their manuscript in Microsoft Word please do not insert page breaks in your manuscript to ensure page numbering is consistent between your text file and the PDF generated from your submission and used in the review process.
- Use the *Parasites & Vectors* reference format.
- Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted.
- Please do not format the text in multiple columns.
- Greek and other special characters may be included. If you are unable to reproduce a particular special character, please type out the name of the symbol in full. **Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF.**
- Genes, mutations, genotypes, and alleles should be indicated in italics, and authors are required to use approved gene symbols, names, and formatting. Protein products should be in plain type.

### Units

SI units should be used throughout (liter and molar are permitted, however).

## ANEXO B

### Normas da revista Journal of Natural Products (JCR 2,82)

# Template for Submission of Manuscripts to American Chemical Society Journals

Word 2003, Version 2 (2009)

This template is to be used to prepare manuscripts for submission to any American Chemical Society (ACS) primary research journal. As a result, it contains paragraph styles that may not normally be used in the journal you have selected for submission. Please consult the Instructions to Authors or a recent issue of the ACS journal where you plan to submit this paper for the appropriate paragraph styles. Use of this template is a benefit to the author in that the entire manuscript (text, tables, and graphics) may be submitted in one file. Inserting graphics and tables close to the point at which they are discussed in the text of the manuscript can also be a benefit for the reviewer. Use of the template is not a requirement for submission.

When you submit a manuscript using this template, you will not actually see the page formatting that appears in the printed journal. This will occur as part of the editorial production process using the paragraph tags you inserted from the template. Please read the general instructions given below on how to use the template. If you are unfamiliar with the use of templates, additional instructions can be found at the site where you downloaded this template.

#### Using the template

1. Abbreviated instructions for using the template follow. Additional instructions can be found in the readme file at the site where you downloaded this template.
2. If typing your manuscript directly into the template, select (highlight) the text of the template that you want to replace and begin typing your manuscript (i.e., select the Title section for typing in your title).
3. If you have already prepared your document in a Word file, you will need to attach the template to your working document in order to apply the Word Style tags. Further instructions can be found in the readme file at the site where you downloaded this template.
  - a. Go to the Word Style list on the formatting toolbar and you will see all the Word Styles from the template that have now been imported into the current document. A Styles toolbar has been generated that will display the different Styles for you to choose from. If this is not present, select **View, Toolbars**, and then select **Styles** and it should appear. You can close this at any time and then reopen it when needed.
  - b. Click in the sentence or paragraph and then go to the Word Style menu on the toolbar and select the relevant Word Style. This will apply the Word Style to the entire text (sentence or paragraph). Do this for all sections of the manuscript.
4. In ACS publications there are many different components of a manuscript (i.e., title, abstract, main text, figure captions, etc.) that are represented in the template. See the Guide, Notes, Notice, or Instructions for Authors that appear in each publication's first issue of the year and the journal's homepage to determine which parts should be included for the manuscript that you are preparing.

5. To insert graphics within the text or as a figure, chart, scheme, or table, create a new line and insert the graphic where desired. If your graphic is not visible, ensure that the Word Style is "Normal" with an automatic height adjustment. If the size of the artwork needs to be adjusted, re-size the artwork in your graphics program and re-paste the artwork into the template (maximum width for single-column artwork, 3.3 in. (8.5 cm); maximum width for double-column artwork, 7 in. (17.8 cm)). **NOTE:** If you are submitting your paper to a journal that requires a Table of Contents graphic, please insert the graphic at the end of the file.
6. Delete all sections from the template that are not needed, including these instructions.
7. Save the file with the graphics in place: select **Save As (File menu)** and save it as a document file (.doc).
8. Proof a printout of the manuscript (from a 600 dpi or higher laser printer) to ensure that all parts of the manuscript are present and clearly legible.
9. Consult the Info for Authors page from the home page of the ACS journal that you have selected for the latest instructions on how to proceed with the submission of your manuscript.
10. Ensure that page numbers are present on all pages before submitting your manuscript.

**TITLE (Word Style “BA\_Title”).** The title should accurately, clearly, and concisely reflect the emphasis and content of the paper. The title must be brief and grammatically correct

*AUTHOR NAMES (Word Style “BB\_Author\_Name”). Include in the byline all those who have made substantial contributions to the work, even if the paper was actually written by only one person. Use first names, initials, and surnames (e.g., John R. Smith) or first initials, second names, and surnames (e.g., J. Robert Smith). Do not use only initials with surnames (e.g., J. R. Smith) because this causes indexing and retrieval difficulties and interferes with unique identification of an author. Do not include professional or official titles or academic degrees. At least one author must be designated with an asterisk as the author to whom correspondence should be addressed.*

**AUTHOR ADDRESS (Word Style “BC\_Author\_Address”).** The affiliation should be the institution where the work was conducted.

**AUTHOR EMAIL ADDRESS (Word Style “BI\_Email\_Address”)**

**RECEIVED DATE (to be automatically inserted after your manuscript is accepted if required according to the journal that you are submitting your paper to)**

**TITLE RUNNING HEAD (Word Style “AF\_Title\_Running\_Head”).** If you are submitting your paper to a journal that requires a title running head (condensed title appearing at the top

of the journal page), please provide a 50-character or less summary of the title of the manuscript.

**CORRESPONDING AUTHOR FOOTNOTE** (Word Style “FA\_Corresponding\_Author\_Footnote”). Clarify all corresponding authors’ addresses by accompanying footnotes if they are not apparent from the affiliation line. Telephone numbers, fax numbers, and e-mail addresses may all be included in the corresponding author footnotes. If an author’s address is different than the one given in the affiliation line, this information may also be included here.

**ABSTRACT** (Word Style “BD\_Abstract”). All manuscripts must be accompanied by an abstract. The abstract should briefly state the problem or purpose of the research, indicate the theoretical or experimental plan used, summarize the principal findings, and point out major conclusions. The optimal length is one paragraph.

**KEYWORDS** (Word Style “BG\_Keywords”). If you are submitting your paper to a journal that requires keywords, provide significant keywords to aid the reader in literature retrieval.

**BRIEFS** (WORD Style “BH\_Briefs”). If you are submitting your paper to a journal that requires a brief, provide a one-sentence synopsis for inclusion in the Table of Contents.

**MANUSCRIPT TEXT** (Word Style “TA\_Main\_Text”). For full guidelines, please see the Guide, Notes, Notice, or Instructions for Authors that appear in each publication’s first issue of the year and on the World Wide Web at <http://pubs.acs.org>. This may include an introduction, experimental details (sections titled Experimental Methods, Experimental Section, or Materials and Methods), theoretical basis (sections titled Theoretical Basis or Theoretical Calculations), results, discussion, and conclusions.

ACKNOWLEDGMENT (Word Style “TD\_Acknowledgments”). Generally the last paragraph of the paper is the place to acknowledge people, organizations, and financing (you may state grant numbers and sponsors here). Avoid use of phrases like “we (I or the authors) would like to thank” and “we (I or the authors) wish to thank”, instead use “we (I or the authors) thank”. Follow the journal’s guidelines on what to include in the Acknowledgments section.

SUPPORTING INFORMATION PARAGRAPH (Word Style “TE\_Supporting\_Information”). A brief statement in nonsentence format listing the contents of material placed here should be included at the end of the manuscript as a separate section titled **Supporting Information Available**. The contents of Supporting Information may include the following: (1) large tables, (2) extensive figures, (3) lengthy experimental procedures, (4) mathematical derivations, (5) analytical and spectral characterization data, (6) molecular modeling coordinates, (7) modeling programs, (8) crystallographic information files (CIF), (9) instrument and circuit diagrams, (10) and expanded discussions of peripheral findings. For complete instructions on how to prepare this material for publication, check the Guide, Notes, Notice, or Instructions for Authors that appear in each publication’s first issue of the year and on the World Wide Web at <http://pubs.acs.org>.

FIGURE CAPTIONS (Word Style “VA\_Figure\_Caption”). Each figure must have a caption that includes the figure number and a brief description, preferably one or two sentences. The caption should immediately follow the figure with the format “**Figure X.** Figure caption.”. All figures must be mentioned in the text consecutively and numbered with Arabic numerals. The caption should be understandable without reference to the text. It is preferable to place the keys to symbols used in the figure in the caption, not in the artwork. Ensure that the symbols and abbreviations in the caption agree with those in the figure itself and in the text and that the figure is already sized appropriately.

SCHEME TITLES (Word Style “VC\_Scheme\_Title”). Chemical reactions and flow diagrams may be called schemes. Schemes may have brief titles describing their contents. The artwork for each scheme should immediately follow the scheme title. The title should follow the format “**Scheme X.** Scheme Title”. All schemes must be mentioned in the text consecutively and numbered with Arabic numerals. Schemes may also have footnotes (use Word Style “FD\_Scheme\_Footnote”), inserted after the artwork.

CHART TITLES (Word Style “VB\_Chart\_Title”). Lists of structures may be called charts. Charts may have brief titles describing their contents. The title should follow the format “**Chart X.** Chart Title”. Charts may also have footnotes (use Word Style “FC\_Chart\_Footnote”). To insert the chart into the template, be sure it is already sized appropriately and paste it immediately after the chart title.

TABLES. Each table must have a brief (one phrase or sentence) title that describes its contents. The title should follow the format “**Table X.** Table Title” (Word Style “VD\_Table\_Title”). The title should be understandable without reference to the text. Put details in footnotes, not in the title (use Word Style “FE\_Table\_Footnote”). Define nonstandard abbreviations in footnotes.

Use tables (Word Style “TC\_Table\_Body”) when the data cannot be presented clearly as narrative, when many precise numbers must be presented, or when more meaningful interrelationships can be conveyed by the tabular format. **Do not use Word Style “TC\_Table\_Body” for tables containing artwork.** Tables should supplement, not duplicate, text and figures. Tables should be simple and concise. It is preferable to use the Table Tool in your word-processing package, placing one entry per cell, to generate tables.

REFERENCES (Word Style “TF\_References\_Section”). In many journals, references are placed at the end of the article, while in others they are treated as footnotes. In any case, place



your list of references at the end of the manuscript. The appropriate placement will be made as part of the editorial process. In ACS publications, references are cited in three ways: superscript numbers, italic numbers on the line and in parentheses, and by author name and year of publication in parentheses inside the punctuation. Please use the appropriate style for the journal for which you are submitting your manuscript. Authors are responsible for the accuracy and completeness of all references. Authors should check all parts of each reference listing against the original document. Detailed information on reference style can be found in *The ACS Style Guide*, 2nd ed., available from Oxford Press.

SYNOPSIS TOC (Word Style “SN\_Synopsis\_TOC”). If you are submitting your paper to a journal that requires a synopsis graphic and/or synopsis paragraph, see the Guide, Notes, Notice, or Instructions for Authors that appear in each publication’s first issue of the year and the journal’s homepage for a description of what needs to be provided and for the size requirements of the artwork.