

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

**ATIVIDADE LARVICIDA EM SISTEMA AQUOSO DO ÓLEO  
ESSENCIAL DA RESINA DE UMA COPAIBEIRA DA MATA  
ATLÂNTICA EM LARVAS DE MOSQUITO DA DENGUE**

**ANDRÉ FALCÃO SANTANA MERENCIO**

**VILA VELHA**  
**JULHO / 2019**

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

**ATIVIDADE LARVICIDA EM SISTEMA AQUOSO DO ÓLEO  
ESSENCIAL DA RESINA DE UMA COPAIBEIRA DA MATA  
ATLÂNTICA EM LARVAS DE MOSQUITO DA DENGUE**

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

**ANDRÉ FALCÃO SANTANA MERENCIO**

**VILA VELHA**  
**JULHO / 2019**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

M558a Merencio, André Falcão Santana.  
Atividade larvicida em sistema aquoso do óleo essencial da resina de uma copaibeira da Mata Atlântica em larvas de mosquito da dengue / André Falcão Santana Merencio. – 2019.

21 f. : il.

Orientador: Ary Gomes da Silva.

Dissertação (mestrado em Biotecnologia Vegetal)

Universidade Vila Velha, 2019.

Inclui bibliografias.

1. Biotecnologia Vegetal. 2. Aedes aegypti. 3. Copaíba  
I. Silva, Ary Gomes da Silva. II. Universidade Vila Velha.  
III. Título.

CDD 660.603

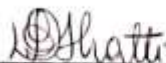
**ANDRÉ FAIÇÃO SANTANA MERÊNCIO**

**ATIVIDADE LARVICIDA EM SISTEMA AQUOSO DO ÓLEO ESSENCIAL DA  
RESINA DE UMA COPAIBEIRA DA MATA ATLÂNTICA EM LARVAS DE  
MOSQUITO DA DENGUE**

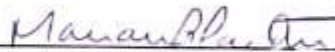
Dissertação apresentada à Universidade  
Vila Velha, como pré-requisito do  
Programa de Pós-graduação em  
Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do  
grau de Mestre em Biotecnologia Vegetal.

Aprovado (a) em 30 de julho de 2019,

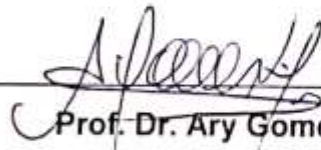
Banca Examinadora:



\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Drielle Lima de Almeida Pratti – (HOSPITAL MERIDIONAL)**



\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Mariana Beatriz Paz Otegui – (UFES)**



\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Ary Gomes da Silva – (UVV)**

**Orientador**

Dedico este trabalho a minha mãe e meu pai (*in memoriam*), aos meus irmãos e aos meus professores, que tem me ajudado a trilhar o caminho que escolhi. “Não são as espécies mais fortes que sobrevivem nem as mais inteligentes, e sim as mais suscetíveis a mudanças.” (Charles Robert Darwin)

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus por ter permitido que eu chegasse onde estou com saúde para continuar perseverando nesta longa caminhada.

Ao professor Dr. Ary Gomes da Silva, do Laboratório de Ecologia Funcional da Universidade de Vila Velha (UVV), pela confiança, orientação e aprendizado não somente na conclusão desse trabalho, mas também na área de produtos naturais e suas aplicações.

Aos meus colegas de laboratório e de mestrado, Giuliano de Martin, Geanderson Rodrigues e Geardison Willian da Silva Costa de Oliveira, que me auxiliaram em momentos de grande necessidade para a conclusão deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal Integrada (UVV/UENF) pela colaboração e ensinamentos durante o mestrado.

A minha família começando pela minha mãe Norma Sueli Falcão Santana, que sempre foi o meu maior e melhor exemplo de vida, como pessoa, como mãe e como profissional; ao meu irmão Paulo Falcão Santana Merencio que é meu motivo de orgulho pela sua força, persistência e sensatez; ao meu irmão Gabirel Falcão Santana Merencio que sempre me ensinou, guiou e aconselhou a como ser uma pessoa melhor para mim e minha família.

A todos aqueles que de uma forma direta ou indireta colaboraram na realização e conclusão deste trabalho, minha sincera gratidão e reconhecimento.

## SUMÁRIO

Resumo -----	3
Abstract -----	4
Introdução -----	5
Materiais e métodos -----	8
Extração do óleo essencial e determinação da densidade -----	8
Análise Cromatográfica -----	9
Ensaio Biológico -----	9
Análise dos dados -----	10
Resultados e Discussão -----	11
Ensaio Biológico -----	14
Referências -----	19

## RESUMO

MERENCIO, ANDRÉ F. S., M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, julho de 2019. **Atividade larvicida em sistema aquoso do óleo essencial da resina de uma copaibeira da mata atlântica em larvas de mosquito da dengue.** Orientador: Ary Gomes da Silva.

As plantas de copaífera são fontes conhecidas de óleos essenciais que possuem atividade biológica anti-inflamatória e antibacteriana. Neste estudo analisamos a fitoquímica de compostos majoritários e a ação larvicida do óleo essencial de uma espécie de copaibeira, *Copaifera langsdorffii* Desf. O óleo foi obtido por hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger, então a densidade de ambos foi determinada e para identificar os componentes dos óleos que usamos para cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa - GC-MS -ensaios biológicos foram realizados com *Stegomyia aegypti*, onde os óleos essenciais foram aplicados em diferentes concentrações em contato com as larvas para determinação da dose letal. Larvas também foram observadas após contato com os óleos por 24, 48 e 72 horas. Os resultados indicaram a presença de 47 substâncias compondo o óleo essencial com grande incidência de mono e sesquiterpenos. No ensaio biológico o potencial inseticida deste óleo contra as larvas de *S. aegypti* in vitro é confirmado através da determinação do CL<sub>50</sub> e foi observado que a concentração do óleo e o tempo de exposição da larva ao óleo essencial são cruciais para a efetividade do óleo como agente larvicida afetando significativamente na taxa de mortalidade. Com base em trabalhos anteriores podemos considerar que o óleo essencial da oleorresina de *C. langsdorffii* (CL<sub>50</sub> = 80,53 ppm) pode ser considerado um bom agente larvicida, eficaz em sistema aquoso de emulsão simples, tendo o DMSO como agente emulsificante.

**Palavras chaves:** *Aedes*; arbovírus, aroma, copaíba, *Copaifera*, Fabaceae, Leguminosae.



## ABSTRACT

MERENCIO, ANDRÉ F. S., M.Sc, University of Vila Velha – ES, July de 2019. **Larvicidal activity in an aqueous system of the essential oil of the resin of a Copaibeira from Atlantic forest in Dengue mosquito larvae.** Advisor: Ary Gomes da Silva.

Copaifera plants are known sources of anti-inflammatory, anti-inflammatory and antibacterial. This study was to a phytochemical assay of majoritary and a mechanism in the main phase of copaibeira, *Copaifera langsdorffii*. The oil was obtained by hydrodistillation using Clevenger apparatus, so a density of both was determined and used to identify the components of which are used for gas chromatography coupled to mass spectrometry - GC-MS. Biological assays were performed with *Stegomyia aegypti*, where substrates were applied to different substrates. Larvae were also observed after contact with the oils for 24, 48 and 72 hours. The results indicated that the presence of 47 substances is composed of essential oil with high incidence of mono and sesquiterpenes. No biological reaction or insecticide potential in the oil against *S. aegypti* larvae in vitro is confirmed by oil determination larvicide, affecting relants, nappe mortality rate. Based on what may be a *C. langsdorffii* essential oil (LC<sub>50</sub> = 80.53 ppm) it can be a good larvicidal agent, with high efficacy in a simple emulsinated aqueous system, using DMSO as surfactant.

**Keywords:** *Aedes*, arbovirus, copaíba, *Copaifera*, Fabaceae, Leguminosae, scent.

Trabalho apresentado segundo as normas da Revista Journal of Natural Products, Qualis A2, IF 3,281

## Atividade larvicida em sistema aquoso do óleo essencial da resina de uma copaibeira da mata atlântica contra o mosquito da dengue

**Título resumido:** Atividade larvicida do óleo essencial de uma copaibeira

André F S Merencio<sup>1,3</sup>, Geardson W S C Oliveira<sup>1,3</sup>, Amanda B Brandão<sup>1,3</sup>, Fernanda T Pavese<sup>2,3</sup>, Otávio Heringer<sup>4</sup>, e Ary G Silva<sup>1,2,3,5</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação (Mestrado) em Biotecnologia Vegetal; <sup>2</sup>Programa de Pós-graduação (Doutorado) em Ecologia de Ecossistemas; <sup>3</sup>Universidade Vila Velha - UVV. Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, Vila Velha, Espírito Santo, Brasil. CEP 29101-770; <sup>4</sup>Tommasi Ambiental, Rua Arara Azul, 187, Área 05, Galpão 03, Novo Horizonte, Serra, Espírito Santo, Brasil. CEP: 29.163-306.; <sup>5</sup>Autor para correspondência: [arygomes@uvv.br](mailto:arygomes@uvv.br)

### Introdução

*Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762) corresponde a uma nova combinação de nomenclatura para *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) (Reinert et al., 2004). É um díptero da família Culicidae de grande importância para a saúde pública mundial, pois é responsável por transmitir várias doenças (Syed Ali et al., 2012; WHO, 2014; Gubler, 2004; Guzman e Istúriz, 2010; Marcondes e Ximenes, 2015; Burt et al., 2012; Zaraska, 2016). *St. aegypti* apresenta desenvolvimento holometabólico, ou seja, possui ciclo de vida que passa por ovo, larva, pupa e adulto, o que dura em torno de 1,5 a 3 semanas (Geris et al., 2012), num processo de desenvolvimento altamente influenciado pela temperatura e umidade do ambiente (Lambrechts et al., 2011).

Esses mosquitos podem se reproduzir em coleções de água presentes na natureza, como buracos de árvores, axilas foliares e orifícios em rochas, porém, esta espécie se adaptou às áreas urbanas, com isso passou a viver intimamente ligado às condições peridomiciliares

preferindo criadouros antrópicos como garrafas plásticas, vasos de plantas ou qualquer recipiente capaz de acumular água (Brown et al., 2014).

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

As larvas eclodem após o desenvolvimento embrionário do ovo que ocorre em, aproximadamente, 48 horas após a postura em condições favoráveis de temperatura, umidade e luminosidade (Geris et al., 2012). Passam por 4 estágios larvais, e por meio de ecdises, elas se desenvolvem até chegar na fase de pupa. A pupa apresenta o corpo dividido em cefalotórax e abdome, e este estágio é um processo de transição em que intensas transformações ocorrem para a formação do adulto (Forattini, 2003). Na fase adulta, os machos se alimentam de seiva de plantas, enquanto a fêmea é hematófaga, uma vez que necessita do sangue para promover a maturação dos ovários (Silva et al., 1999, Forattini, 2003, Becker et al., 2010, Geris et al., 2012).

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

Além da dengue e febre amarela, *St. aegypti* também transmite duas doenças descobertas em meados do século passado no continente africano, a Zika e a Chikungunya (Chant et al., 2016; Weaver e Lecuit, 2015). Estas doenças se espalharam de modo rápido nos países do centro-sul americanos e Caribe gerando graves epidemias (Benelli e Mehlhorn, 2016; van Bortel et al. 2014), semelhante ao que ocorre com a dengue que vem fazendo inúmeras vítimas em muitos países da faixa tropical e subtropical, além de se espalhar para a zona temperada do globo gerando preocupações nesses países que antes não eram acometidos por essa doença (Brady et al., 2014). Recentemente, foi identificada uma possível infecção pelo vírus Mayaro, no Haiti e

na região amazônica brasileira, uma doença que possui sintomas muito semelhantes aos da Chikungunya. O motivo de preocupação em torno desse vírus é que anteriormente ele somente era transmitido por mosquitos vetores silvestres que não alcançavam a zona urbana, porém, indícios mostram que, possivelmente, ocorreu uma mutação em seu ciclo urbano e aparentemente, agora, pode ser transmitido pelo *St. Aegypti* (Zaraska, 2016).

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

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

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

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

aos trabalhadores de pulverização e os residentes em residências tratadas da exposição (WHO, 2011).

Atualmente não existem medicações específicas para o tratamento e/ou profilaxia dessas doenças (Fauci e Morens, 2016), e apesar da vacina contra a febre amarela estar começando a ser disponibilizada para algumas populações (Pitisuttithum e Bouckennooghe, 2016), as vacinas para as outras doenças estão em fase de desenvolvimento (Hombach et al., 2016; Smaley et al., 2012). Sendo assim, o melhor método de prevenção existente é evitar a picada do mosquito (WHO, 2016). O combate ao vetor é feito principalmente por inseticidas químicos (WHO, 2016), porém, o uso indiscriminado dessas substâncias tem gerado diversos efeitos adversos graves em humanos, animais e ao meio ambiente (Lee et al., 2014), bem como, têm selecionado populações de insetos cada vez mais resistentes dificultando, portanto, o combate ao vetor (Antonio-Nkondjio et al., 2011). Esses malefícios despertaram o interesse por pesquisas a fim de encontrar métodos que sejam inócuos ao ambiente e humanos, e que reduzam a possibilidade dos mosquitos se tornarem resistentes. Nesse sentido, estudos com o uso de bactérias e mosquitos transgênicos fazem parte desses novos métodos em ascensão (Hoffman et al., 2011; Alphey et al., 2010; Robson et al., 2019; Fu et al., 2010), bem como produtos naturais oriundos de plantas (Gosh et al., 2012; Benelli et al., 2015; Pavela, 2015).

Muitos são os meios de combate ao mosquito adulto, mas considerando a transmissão transovariana do vírus da dengue e chikungunya em *St. aegypti* (Le Goff et al., 2011; Dzul-Manzanilla et al., 2015) é importante que a interrupção da dinâmica populacional desta espécie ocorra em níveis mais baixos de seu desenvolvimento. Nessa lógica, estudos utilizando óleos essenciais têm crescido devido ao potencial tóxico às larvas desse mosquito (Pavela, 2015; Vera et al., 2014; Silva et al., 2016). Este trabalho tem como objetivo utilizar o óleo essencial da resina que exuda do caule de *Copaifera langsdorffii* Desf., uma copaiberia de ocorrência na Mata Atlântica na costa leste do Brasil, e determinar sua atividade larvicida contra *St. aegypti*, quando incorporado ao meio aquoso em sistema de emulsão mediada por dimetilsulfoxido – DMSO.

## **Material e métodos**

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

As amostras de oleorresina de *C. langsdorffii* foram obtidas de 10 indivíduos originários da região rural de Castelo, Espírito Santo, Brasil nas coordenadas 20°30'45''S e 41°11'20''O.

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 10 amostras de oleorresina, cada uma pesando 50g, durante uma hora de processo extrativo, contados a partir da ebulição da amostra, comaquecimento mantido na temperatura mínima necessária à ebulição. Este procedimento foi realizado no laboratório de Ecologia Funcional, na UVV. Após a extração, o óleo essencial foitransferido 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 porpesagem 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 análise cromatografica a gás de alta resolução, no Laboratório de Química Fina, no Tommasi Analítica. O volume de injeção foi de 2 mL, composto por 1,6 mL de uma solução de óleo essencial (30 mg/ml) e 0,4 mL de uma solução de uma série de hidrocarbonetos de C7-C30, como padrão interno e como solvente o n-hexano. O sistema utilizado, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa - GC-MS - consistiu de um cromatógrafo a gás, Thermo Scientific® Ultra GC acoplado a um espectrômetro de massa, Thermo Scientific®. A coluna capilar de sílica fundida utilizada foi uma DB-5 J & WScientific (30 m × 0,25 mm × 0,25 mm). Hélio era o portador gás e o programa de temperatura da coluna foi aumentada em 3°C por minuto entre 60°-240°C. Os espectros de massa foram obtidos a 70 eV a uma taxa de varredura de 0,84 scan/sec, na faixa de m/z 40- 50017. Os tempos de retenção dos componentes da amostra e uma mistura de n-alcanos de C7-C30, co-injetados na GCMS sistema no âmbito do programa mesma temperatura foram utilizada para o cálculo do Índice de Retenção de Kovats - KI17. Identificação dos componentes do óleo essencial foi baseado no KI calculado comparado com o disponível literatura<sup>17</sup> espectros de massa e com o espectro GC-MS biblioteca.

### **Ensaio Biológico**

*Bioensaio com larvas*

Para o bioensaio foram utilizadas larvas de *St. aegypti*, em 3º estágio, obtidas pela incubação de ovos em 3L de água natural e suprimento alimentar para peixes. Os ovos foram obtidos pela colocação de armadilhas, denominadas ovitrampas<sup>44</sup>. As ovitrampas foram dispostas nas dependências da Universidade Vila Velha, próximo a árvores e plantas.

Foi preparada uma série de tubos em cinco replicatas para o controle branco utilizado para avaliar a sobrevivência das larvas, em solução de Dimetilsulfóxido (DMSO) 0,5% em água deionizada, e para cada tratamento realizado, que consistiram de diluições de cada óleo essencial analisados, nas concentrações de 1.56, 3.125; 6.25; 12.5; 25; 50; 100; 200; 400 e 800 ppm. Cada replicata recebeu 10 larvas vivas<sup>45</sup>, considerando a capacidade de locomoção ascendente para respiração como o critério de sobrevivência. As avaliações das larvas sobreviventes foram realizadas nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas após a inoculação, com segurança para evitar o aparecimento de mosquitos adultos.

### ***Análise dos dados***

O perfil fitoquímico qualitativo e quantitativo dos óleos essenciais foi determinado a partir do hidrodestilado da oleorresina da copaibeira 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. A diversidade química foi estimada pelo índice de Diversidade de Shannon-Weaver – H' e a equitabilidade pelo índice J de Pielou (Zar, 1997).

Para o ensaio biológico de determinação da atividade larvicida, a regressão logística binária foi realizada a partir de um modelo probístico, tendo as doses e a duração da exposição ao óleo essencial como variáveis independentes e a taxa de mortalidade larval 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 probístico tendo como base de transformação o logaritmo neperiano<sup>47</sup>. As concentrações letais CL<sub>50</sub>, CL<sub>90</sub>, CL<sub>95</sub> e CL<sub>99</sub> foram calculadas a partir da equação de linha reta gerada pelo modelo probístico testado

<sup>47</sup>. As análises foram feitas pelo programa Minitab versão 17.0.

## Resultados e Discussão

O óleo essencial constituiu-se num líquido oleoso de baixa viscosidade, incolor e translúcido e sua caracterização físico-química é apresentada na Tabela 1.

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

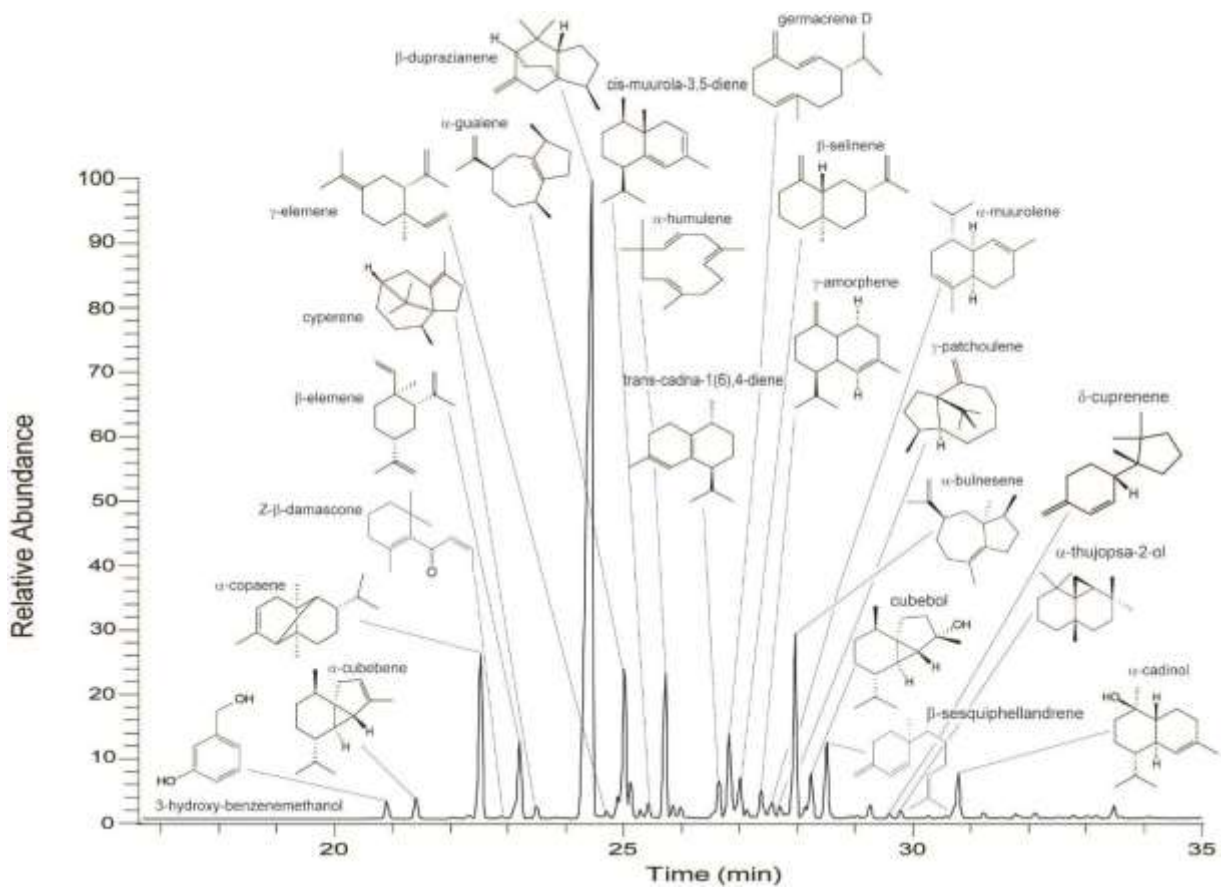
Parâmetro	Média ± Erro Padrão
Rendimento (%)	26,202 ± 2.919
Densidade (g mL <sup>-1</sup> )	0,905 ± 0.007
Diversidade química ( <i>H'</i> )	2.211 nats ± 0.034
Equitabilidade (J)	0.603 ± 0.02

Legenda: ***H'***: índice de diversidade de Shannon-Weaverr; **J**: índice de equitabilidade de Pielou.

A equitabilidade encontrada evidência a maneira pela qual o número de substâncias químicas está distribuído em suas proporções na espécie em estudo, indicando o grau de simetria na distribuição proporcional de massas entre os componentes do óleo essencial. Os valores menores que um expressam uma concentração cada vez mais irregular entre os componentes na medida em que se aproximam de zero, o que é muito comum nos óleos essenciais nos quais se identificam facilmente mais de 40 substâncias, porém apenas um pequeno número é responsável pela maior proporção de massas (Bakkali et al. 2014).

A separação dos componentes dos óleos essenciais das amostras de *C. langsdorffii* revelou que o perfil cromatográfico (Figura 1) foi composto de 47 substâncias, sendo principalmente mono e sesquiterpenos.





**Figura 1.** Perfil cromatográfico e estrutura química dos principais constituintes do óleo essencial de *Copaifera langsdorffii* Desf.

A composição centesimal apresentada na sequência de separação na corrida cromatográfica é apresentada na Tabela 2.

**Tabela 2.** Composição centesimal do óleo essencial da oleorresina de *Copaifera langsdorffii* Desf.

AI	AIAdams	KI	KIAdams	Identificação	Teor (%)
1025	1025	1029	1030	silvestreno	0.032
1033	1032	1038	1037	Z- $\beta$ -ocimeno	0.042
1129	1128	1132	1132	alo-ocimeno	0.019
1330	1328	1332	1130	E-patchenol	0.142
1337	1338	1340	1340	3-hidroxi-benzenometanol	0.818
1347	1348	1350	1351	$\alpha$ -cubebeno	0.743
1364	1365	1366	1367	acetato de cis-carvila	0.072
1374	1374	1376	1376	$\alpha$ -copaeno	6.079
1384	1386	1385	1387	Z- $\beta$ -damascona	0.722
1389	1389	1390	1390	$\beta$ -elemeno	3.385

**Tabela 2 cont.** Composição centesimal do óleo essencial da oleorresina de *Copaifera langsdorffii* Desf.

AI	AIAdams	KI	KIAdams	Identificação	Teor (%)
1398	1398	1398	1398	cipereno	0.462
1422	1421	1423	1422	$\beta$ -duprezianeno	43.703
1434	1434	1436	1436	$\gamma$ -elemeno	1.505
1438	1437	1440	1439	$\alpha$ -guaiano	6.545
1442	1442	1444	1444	6,9-guaiadieno	0.133
1446	1448	1448	1450	cis-muurolo-3,5-dieno	1.736
1450	1452	1452	1454	$\alpha$ -humuleno	6.352
1460	1458	1462	1460	alo-aromadendreno	0.015
1476	1475	1477	1476	trans-cadina-1(6),4-dieno	0.897
1480	1479	1482	1481	germacreno D	4.878
1488	1489	1489	1490	$\beta$ -selineno	1.930
1494	1495	1494	1495	$\gamma$ -amorfenol	1.145
1499	1500	1499	1500	$\alpha$ -muurolo	0.658
1502	1502	1502	1502	$\gamma$ -patchoulol	1.231
1509	1509	1510	1509	$\alpha$ -bulneseno	6.524
1516	1514	1517	1515	cubebol	2.355
1523	1521	1524	1526	$\beta$ -sesquifelandreno	2.610
1534	1533	1536	1535	10-epi-cubebol	0.036
1537	1537	1539	1539	$\alpha$ -cadineno	0.284
1543	1542	1544	1543	$\delta$ -cuprenona	0.536
1551	1550	1553	1551	cis-muurolo-5-en-4-b-ol	0.198
1556	1556	1557	1557	trans-dauca-4(11),7-dieno	0.269
1569	1570	1570	1572	alcool cariofilênico	0.138
1582	1586	1583	1587	thujopsan-2- $\alpha$ -ol	1.798
1592	1592	1592	1592	viridiflorol	0.222
1608	1608	1608	1608	humuleno-epoxide II	0.269
1617	1618	1618	1618	junenol	0.247
1626	1627	1627	1628	1-epi-cubenol	0.089
1635	1634	1636	1635	ácido camforico	0.102
1641	1640	1642	1641	hinesol	0.042
1645	1644	1646	1645	$\alpha$ -muurolol	0.310
1653	1652	1655	1654	$\alpha$ -cadinol	0.482

**Tabela 2 cont.** Composição centesimal do óleo essencial da oleorresina de *Copaifera langsdorffii* Desf.

AI	AIAdams	KI	KIAdams	Identificação	Teor (%)
1664	1665	1665	1666	intermedeol	0.008
1670	1672	1671	1673	5-iso-cedranol	0.099
1677	1676	1678	1677	occidenol	0.040
1683	1683	1684	1684	epi- $\alpha$ -bisabolol	0.025
1690	1692	1691	1692	junicedranol	0.071

Os mono e sesquiterpenos dominaram o perfil cromatográfico do óleo essencial da oleorresina estudada. Este fato tem sido comumente descrito na literatura onde as oleorresinas de copaibas se apresentam como uma dispersão natural de ácidos diterpênicos em uma mistura de mono- e sesquiterpenos,<sup>19,20</sup> que são os principais componentes do óleo essencial<sup>20</sup>.

Os sesquiterpenos mais comuns relatados são cariofileno, copaeno, zingibereno, bisaboleno e bergamoteno, enquanto que os principais diterpenos são ácidos caurenóico, hardwichiico, kovalenico, polialtico e copálico, sendo este último considerado um diterpeno típico do gênero *Copaifera*<sup>21</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>22</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>.

O  $\beta$ -duprezianeno e  $\alpha$ -guaieno foram às principais substâncias presentes no óleo essencial da oleoresina de *C. langsdorffii*, 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>.

### Ensaio biológico

O óleo essencial testado apresentou atividade larvicida, sendo que a mortalidade das larvas não foi um fenômeno exclusivamente atribuído à concentração do óleo essencial de *C.*

*langsdorfii* no meio de incubação, mas o tempo de exposição aos tratamentos também afetou de maneira significativa a taxa de mortalidade (Tabelas 3 e 4).

**Tabela 3** - Regressão logística binária entre a concentração e o tempo de exposição ao óleo essencial de *Copaifera langsdorfii* Desf. na mortalidade de larvas de *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762).

Parâmetros	Coefficiente	EP	Z	P
<b>Tempo de exposição ao óleo essencial = 0</b>				
Constante	-2,430	0,177	-13,73	0,000 <sup>as</sup>
PPM	0,008	0,001	11,18	0,000 <sup>as</sup>
G = 86,70; gl = 1; p = 0,000 <sup>as</sup> ; $\chi^2$ Hosmer-Lemeshow = 3,39; p = 0,495				
P(Morte) = $\Phi(Y')$				
Y' = -2,4300 + 0,008 PPM				
<b>Tempo de exposição ao óleo essencial = 24</b>				
Constante	-1,892	0,136	-13,91	0,000 <sup>as</sup>
PPM	0,023	0,002	11,25	0,000 <sup>as</sup>
G = 118,03; gl = 1; p = 0,000 <sup>as</sup> ; $\chi^2$ Hosmer-Lemeshow = 61,80; p = 0,000				
P(Morte) = $\Phi(Y')$				
Y' = -1,892 + 0,023 PPM				
<b>Tempo de exposição ao óleo essencial = 48</b>				
Constante	-2,324	0,181	-12,85	0,000 <sup>as</sup>
PPM	0,038	0,003	11,74	0,000 <sup>as</sup>
G = 83,98; gl = 1; p = 0,000 <sup>as</sup> ; $\chi^2$ Hosmer-Lemeshow = 16,88; p = 0,002				
P(Morte) = $\Phi(Y')$				
Y' = -2,324 + 0,038 PPM				
<b>Tempo de exposição ao óleo essencial = 72</b>				
Constante	-2,552	0,211	-12,08	0,000 <sup>as</sup>
PPM	0,047	0,004	11,06	0,000 <sup>as</sup>
G = 67,875; gl = 1; p = 0,000 <sup>as</sup> ; $\chi^2$ Hosmer-Lemeshow = 14,28; p = 0,006				
P(Morte) = $\Phi(Y')$				
Y' = -2,552 + 0,047 PPM				
<b>Efeito PPM + Tempo</b>				
Constante	-1,398	0,141		0,000 <sup>as</sup>
PPM	0,006	0,004	11,18	0,000 <sup>as</sup>
Tempo	0,035	0,003	11,18	0,000 <sup>as</sup>
G = 98,375; gl = 2; p = 0,000 <sup>as</sup> ; $\chi^2$ Hosmer-Lemeshow = 56,76; p = 0,000				
P(Morte) = $\Phi(Y')$				
Y' = -2,552 + 0,006 PPM + 0,035 Tempo				

as: altamente significativo

O modelo probístico testado revelou que a concentração e o tempo de exposição ao óleo essencial são capazes de afetar a mortalidade das larvas e a interação aditiva do efeito do tempo de exposição e da concentração (Tabela 1. PPM + Tempo) também foi altamente significativa, mas o ajuste ao modelo probístico, medido pelo valor de p do  $\chi^2$  de Hosmer-Lemeshow, foi inferior ao mínimo de 0,25 aceito para um bom ajuste do modelo testado (Hosmer e Lemeshow, 1989).

Contudo, o efeito significativo do tempo de exposição sobre a mortalidade das larvas produziu um impacto significativo na determinação das concentrações letais. Uma vez que a

CL<sub>50</sub> diminuiu em valor absoluto e convergiu para um intervalo de confiança menor entre 0 e 24 horas de exposição (Tabelas 4 e 5).

A análise de covariância comparou o efeito larvicida do óleo essencial excluindo os tempos e concentrações onde todas as larvas morriam ou todas sobreviviam, já que nessas situações não ocorrem variabilidade. (Tabela 3).

**Tabela 4** – Análise de covariância entre as mortalidades causadas pela exposição de larvas de *Stegomyia aegypti* aos óleos essenciais de *Copaifera langsdorffii* nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas.

Parâmetros	Coefficiente	EP	Z	P
<b>Tempo de exposição ao óleo essencial = 0</b>				
Constante	-1,795	0,099	-18,10	0,000 <sup>as</sup>
PPM	0,004	0,0002	16,11	0,000 <sup>as</sup>
G = -209,24; $\chi^2 = 40,36$ ; gl = 1; p = 0,000				
P(Morte) = $\Phi(Y')$				
Y' = -1,795 + 0,004 PPM				
<b>Tempo de exposição ao óleo essencial = 24</b>				
Constante	-1,573	0,099	-15,82	0,000 <sup>as</sup>
PPM	0,017	0,001	14,98	0,000 <sup>as</sup>
G = -361,40; $\chi^2 = 20,45$ ; gl = 1; p = 0,000				
P(Morte) = $\Phi(Y')$				
Y' = -1,573 + 0,017 PPM				
<b>Tempo de exposição ao óleo essencial = 48</b>				
Constante	-1,460	0,094	-15,52	0,000 <sup>as</sup>
PPM	0,017	0,001	15,64	0,000 <sup>as</sup>
G = -369,80; $\chi^2 = 58,98$ ; gl = 1; p = 0,000				
P(Morte) = $\Phi(Y')$				
Y' = -1,460 + 0,017 PPM				
<b>Tabela 3 cont.</b> – Análise de covariância entre as mortalidades causadas pela exposição de larvas de <i>Stegomyia aegypti</i> aos óleos essenciais de <i>Copaifera langsdorffii</i> nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas.				
Parâmetros	Coefficiente	EP	Z	P
<b>Tempo de exposição ao óleo essencial = 72</b>				
Constante	-1,860	0,119	-15,68	0,000 <sup>as</sup>
PPM	0,029	0,002	15,41	0,000 <sup>as</sup>
G = -301,15; $\chi^2 = 35,70$ ; gl = 1; p = 0,000				
P(Morte) = $\Phi(Y')$				
Y' = -1,860 + 0,029 PPM				

as: altamente significativo

As concentrações letais do óleo essencial são apresentadas na Tabela 5.

**Tabela 5** - Concentrações letais (CL) do óleo essencial da oleorresina de *Copaifera langsdorfii* e seus respectivos limites inferior e superior dos Intervalos de confiança a 95% (IC 95%) determinadas pelo modelo probítico em regressão logística binária testada para larvas de *Stegomyia aegypti* ao óleo.

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

É importante notar que no primeiro contato das larvas com os OE (Tempo de exposição = 0) ocorre a morte instantânea gerada exclusivamente pela toxicidade aguda das concentrações letais do OE (Tabela 3). O fato de ter ocorrido morte instantânea nas concentrações tóxicas, sugere uma intervenção num processo crítico para a larva.

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

Porém, Silva et al (2010) considerou em seu estudo o óleo essencial de frutos maduros ativo contra larvas de *St. aegypti* mesmo com uma CL<sub>50</sub> = 366,91 ppm, 4 vezes maior que a encontrada no presente trabalho <sup>29</sup>, respaldado pelo critério defendido por Pitasawat et al

(2007). As  $CL_{50}$  encontradas no presente estudo foram inferiores também ao obtido para o óleo essencial de *Pterodon polygalaeflorus* Benth (Fabaceae) cuja  $CL_{50}$  foi  $134,90 \pm 0,25 \mu\text{g/mL}$ <sup>53</sup>.

Para taninos, tem sido proposto que substâncias com  $CL_{50}$  variando entre 0,1 a 0,49 ppm são bons agentes larvicidas<sup>54</sup>. Entretanto, para óleos essenciais a atividade inibidora tem se manifestado em concentrações maiores<sup>52,25</sup>.

A resina exsudada por plantas do gênero *Schinus terebinthifolia* Raddi é usada, dentre outras funções, para repelir insetos<sup>54</sup>. Seu óleo essencial apresenta em sua composição uma predominância de monoterpenos nos frutos e sesquiterpenos nas folhas<sup>55,56</sup>. Os monoterpenos apresentam boa atividade larvicida e os sesquiterpenos tem capacidade para inibir a ecdise<sup>57</sup>.

Trabalhos com *S. terebinthifolia*, destacam o  $\alpha$ -terpineno e o limoneno como os compostos que caracterizam o óleo dos frutos<sup>57</sup>. Destes compostos, o limoneno é um dos majoritários no óleo essencial do fruto de *S. terebinthifolia* e outros estudos devem ser realizados para a verificação da mesma propriedade larvicida neste e em outros compostos presentes no óleo essencial estudado, após seu respectivo isolamento.

A inibição da ecdise em larvas de dípteros tem sido frequentemente relatada para extratos de plantas. Por exemplo, a ação da azadiractina, uma substância extraída de *Azadirachta indica* (A. Juss.), atua no sistema neurosecretor de *S. aegypti*, promovendo uma alteração dos teores da ecdisona e intervindo, portanto na síntese e liberação do hormônio protoacicotrópico (PPTH) do corpus allatum, que é o responsável pela produção de ecdisona pelas glândulas protorácicas. A azadiractina bloqueia a liberação deste hormônio, o que leva a um aumento de sua concentração dentro do corpus allatum, o que em última análise leva a um efeito feedback, juntamente na intervenção na liberação da alatotropina pelos corpora cardíacos, interferindo desta maneira nos teores de hormônio juvenil da hemolinfa [45].

Uma vez que a OMS não estabelece um padrão para análise de produtos naturais com potencial larvicida, Cheng et al (2003) e Kiran et al (2006) determinaram um critério em que compostos com  $CL_{50} < 100$  ppm são considerados ativos, ou seja, potencialmente larvicida. Seguindo esse padrão, neste estudo pode-se comprovar que os óleos essenciais da oleorresina de *C. langsdorfii* ( $CL_{50} = 80,53$  ppm) pode ser considerado bom agente larvicida<sup>50,51</sup> (Tabela 4), eficaz em sistema aquoso de emulsão simples, tendo o DMSO como agente emulsificante.

## 6. Referências

- (1) Veiga Jr., V. F.; Pinto, A. C. *Quim. Nova* **2002**, 25, 273-286.
- (2) Deus RJA, Alves CN, Arruda MSP: *Rev. Bras. Pl. Med.* **2011**, 13, 1-7.
- 44 Fay, R.W.; Perry, A.S. *Mosquito News.* **1965**, 25(3), 276-281.
- (3) Pitisuttithum, P.; Bouckennooghe, A. *Expert Rev Vaccines.* **2016**, 15(7), 795-798, DOI: 10.1080/14760584.2016.1189331.
- (4) Gramosa, N. V.; Silveira, E. R. *J. Essent. Oil Res.* **2005**, 17, 130.
- (5) Gramosa, N. V. *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Ceará, Brasil, 2001.
- (6) Brown, J.E.; Evans, B.; Zheng, W.; Abas, V.; Barrera-Martinez, L.; Egizi, A.; Zhao, H.; Caccone, A.; Powell, J.R. *Evolution.* **2014**, 68(2), 514-525.
- (7) Chan, J.F.W.; Garnet, K.Y.; Choi, C.C.Y.; Yip, V.C.C.; Cheng, K.Y. *Journal of Infection.* **2016**, 72, 507-524. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2016.02.011>
- (8) Paiva, L. A. F.; Santos, F. A.; Rao, V. S. N.; Silveira, E. R. *Resumos do 14º Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil*, Florianópolis, Brasil, 1996.
- (9) 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.
- (10) Van Bortel, W.; Dorleans, F.; Rosine, J.; Blateau, A.; Rousseau, D.; Matheus, S.; Leparc-Goffart, I.; Flusin, O.; Prat, C.M.; Césaire, R.; Najioullah, F.; Ardillon, V.; Balleydier, E.; Carvalho, L.; Lemaître, A.; Noël, H.; et al. *Euro Surveill.* **2014**, 19(13), pii=20759.
- (11) Veiga, Jr. V. F.; Zunino, L.; Calixto, J. B.; Patitucci, M. L.; Pinto, A. C. *Phytother Res* **2001**, 15, 476-480.
- (12) Brady, O.J.; Golding, N.; Pigott, D.M.; Kraemer, M.U.G.; Messina, J.P. Reiner Jr, R.C.; Scott, T.W.; Smith, D.L.; Gething, P.W.; Hay, S.I. *Parasit Vectors.* **2014**, 7, 338-354.
- (13) Zaraska, M. *Scientific American.* <https://www.scientificamerican.com/article/the-next-zika/> 2016 Accessed on 12.27.2016
- (14) Bandeira, M.F.C.L. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Brasil 1998, 265.
- (15) Simões, C.A.C.G. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Brasil 2004, 120.
- (16) Vasconcelos, K.R.F. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Brasil 2006, 162.
- (17) Hombach, J.; Friede, M.; Moorphy, V.; Costello, A.; Kieny, M.P. *BMJ.* **2016**, 355: i5923. doi: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.i5923>.
- (18) Msaada, K.; Hosni, K.; Taarit, M. B.; Chahed, T.; Kchouk, M. E.; Marzouk, B. *Food Chemistry*, **2007**, 102, 1131-1134.
- (19) Smalley, C.; Erasmus, J.H.; Chesson, C.B.; Beasley, D.W.C. *Vaccine.* **2016**, 34(26), 2976-2981. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.076>.
- (20) Paul, A.; Thapaa, G.; Basub, A.; Mazumdar, P.; Kalita, M. C.; Sahoo, L. *Ind. Crops Prod.* **2010**, 32, 366-374.
- (21) World Health Organization. Zika virus. Fact sheet N°1. Updated January 2016
- (22) van den Berg, H.; Zaim, M.; Yadav, R.S.; Soares, A.; Ameneshewa, B.; Mnzava, A.; Hii, J.; Dash, A.P.; Ejov, M. *Environ Health Perspect.* **2012**, 120(4), 577-583.
- (23) Adams RP: *Identification of essential oil components by gás chromatography/mass spectrometry.* 4 ed., Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2009.
- (24) Lees, R.S.; Knols, B.; Bellini, R.; Benedict, M.Q.; Bheecarry, A.; Bossin, H.C.; Chadee, D.D.; Charlwood, J.; Dabiré, R.K.; Djogbenou, L.; Egyir-Yawson, A.; Gato, R.; Gouagna, L.C.; Hassan, M.M.; Khan, S.A.; Koekemoer, L.L.; Lemperiere, G.; Manoukis, N.C.; Mozuraitis, R.; Pitts, R.J.; Simard, F.; Gilles, J.R.L. *Acta Tropica.* **2014**, 132, 2-11.
- (25) Antonio-Nkondjio, C.; Fossog, B.T.; Ndo, C.; Djantio, B.M.; Togouet, S.Z.; Awono-Ambene, P.; et al. *Malar J.* **2011**, 10, 154-166.



- (26) Biavatti, M.W.; Dossin, D.; Deschamps, F.C.; Lima, M.P. *Rev Bras Farmacogn* **2006**, *16*, 230-235.
- (27) Hoffmann, A.A.; Montgomery, B.L.; Popovici, J.; Iturbe-Ormaetxe I.; Johnson, P.H.; Muzzi, F.; Greenfield, M.; Durkan, M.; Leong, Y.S.; Dong, Y.; Cook, H.; Axford, J.; Callahan, A.G.; Kenny, N.; Omodei, C.; McGraw, E.A.; Ryan, P.A.; Ritchie, S.A.; Turelli, M.; O'Neill, S.L. *Nature*. **2011**, *476*, 454-457.
- (28) Alphey, L.; Benedict, M.; Bellini, R.; Clark, G.G.; Dame, D.A.; Service, M.W.; Dobson, S.L. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2010**, *10*(3), 295-311. doi: 10.1089=vbz.2009.0014.
- (29) 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.
- (30) Robinson, A.S.; Knols, B.G.J.; Voigt, G.; Hendrichs, J. *Malar J.* **2009**, *8*(2), 1-9 doi:10.1186/1475-2875-8-S2-S1.
- 3 Veiga, Jr. V. F.; Patitucci, M. L.; Pinto, A. C. *Quim. Nova.* **1997**, *20*, 612.
- (31) Veiga Jr, V.F.; Rosas, E.C.; Carvalho, M.V.; Henriques, M.G.M.O.; Pinto, A.C. *J Ethnopharmacol* **2007**, *112*, 248-254.
- (32) Fu, G.; Lees, R.S.; Nimmo, D.; AWC, D.; Jin, L.; Gray, P.; Berendonk, T.U.; White-Cooper, H.; Scaife, S.; Phuc, H.K.; Marinotti, O.; Jasinskiene, N.; James, A.A.; Alphey, L. *PNAS.* **2010**, *107*(10), 4550-4554.
- (33) Zar, J.H. *Biostatistical analysis*. 5 ed., Upper Saddle River: Prentice Hall, 2008;
- (34) Benelli, G.; Murugan, K.; Panneerselvam, C.; Madhiyazhagan, P.; Conti, B.; Nicoletti, M. *Parasitol Res.* **2015**, *114*, 391-397. doi 10.1007/s00436-014-4286-x.
- (35) Le Goff, G.; Revollo, J.; Guerra, M.; Cruz, M.; Simon, Z.B.; Roca, Y.; Florès, J.V.; Hervé, J.P. *Parasite.* **2011**, *18*, 277-280.
- (36) Dzul-Manzanilla, F.; Martínez, N.E.; Cruz-Nolasco, M.; Gutiérrez-Castro, C.; López-Damian, L.; Ibarra-López, J.; Martini-Jaimes, A.; Bibiano-Marín, W.; Tornez-Benitez, C.; Vazquez-Prokopec, G.M.; Manrique-Saide, P. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **2015**, *110*(2), 141-144. doi:10.1093/trstmh/trv106
- (37) Vera, S.S.; Zambrano, D.F.; Méndez-Sanchez, S.C.; Rodríguez-Sanabria, F.; Stashenko, E.E.; Luna, J.E.D. *Parasitol Res.* **2014**, *113*, 2647-2654. doi: 10.1007/s00436-014-3917-6.
- (38) Silva, A.G.; Almeida, D.L.; Ronchi, S.N.; Bento, A.C.; Scherer, R.; Ramos, A.C.; Cruz, Z.M.A. *Parasit Vectors.* **2010**, *3*, 79-85.
- (39) Regnault-Roger, C.; Vincent, C.; Arnason, J.T. *Ann. Rev. Entomol.* **2012**, *57*, 405-424.
- (40) Santos, M.R.G.; Silva, J.H.S.; Caxito, M.L.C. *Int J Pharm Pharm Sci.* **2015**, *7*(12), 1-7.
- (41) Sá, E.R.N.; Medeiros, C.I.S.; Oliveira, J.R.M.S.; Evangelista, A.J.J.; Magalhães, M.I.S.; Almeida Filho, G.C.; Paz, A.M.R.; Pessôa, H.L.F. *Adv Microbiol.* **2014**, *4*, 761-765. <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2014.412083>.
- (42) Fedel-Miyasato, L.E.S.; Kassuya, C.A.L.; Auharek, S.A.; Formagio, A.S.N.; Cardoso, C.A.L.; Mauro, M.O.; Cunha-Laura, A.L.; Monreal, A.C.D.; Vieira, M.C.; Oliveira, R.J. *Rev Bras Farmacogn.* **2014**, *24*, 565-575.
- (43) Piras, A.; Marzouki, H.; Falconieri, D.; Porcedda, S.; Gonçalves, M.J.; Cavaleiro, C.; Salgueiro, L. *Rec Nat Prod.* **2017**, *11*(1), 9-16.
- (44) Kweka, E.J.; Nyindo, M.; Mosha, F.; Silva, A.G. *Parasit Vectors.* **2011**, *4*, 129.
- (45) Uliana, M.P.; Fronza, M.; Silva, A.G.; Vargas, T.S.; Andrade, T.U.; Scherer, R. *Ind Crops Prod.* **2016**, *83*, 235-240.
- (46) Queires, L.C.; Crépin, M., Vacherot, F., De la Taille, A., Rodrigues, L.E. In vitro effects of polyphenols extracted from the aroeira plant (*Schinus terebinthifolius* Raddi) on the growth of prostate cancer cells (LNCaP, PC-3 AND DU145). *Brazilian Journal of Medicine and Human Health*, Salvador, jan. 2013; *1*(1): 71-82.
- (47) Carvalho, M.G.; Melo, A.G.N.; Aragão, C.F.S.; Raffin, F.N.; Moura, T.F.A.L. *Rev. Bras. Pl. Med.* **2013**, *15*(1), 158-169.

- (48) Lima, L.B.; Vasconcelos, C.F.B.; Maranhão, H.M.L.; Leite, V.R.; Ferreira, P.A.; Andrade, B.A.; Araújo, E.L.; Xavier, H.S.; Lafayette, S.S.L.; Wanderley, A.G. *J Ethnopharmacol.* **2009**, 126, 468–473.
- (49) Paolini, J.; Barboni, T.; Desjobert, J.; Djabou, N.; Muselli, A.; Costa, J. *Biochem. Syst. Ecol.* **2010**, 38, 865–874.
- (50) Gazim, Z.C.; Amorim, A.C.L.; Hovell, A.M.C.; Rezende, C.M.; Nascimento, I.A.; Ferreira, G.A.; Cortez, D.A.G. *Molecules.* **2010**, 15, 5509-5524. doi:10.3390/molecules15085509.
- (51) Hussain, A.I., Anwar, F., Sherazi, S.T.H., Przybylski, R. *Food Chem.* **2008**, 108, 986- 995.
- (52) WHO – World Healthy organization. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13. 2005.
- (53) Zar JH. Biostatistical analysis. Upper Saddle River: Prentice-Hall; 2010.
- (54) Hosmer D.W.; Lemeshow S. *Applied logistic regression*; John Wiley: New York, 1989.
- (55) Pratti, D.L.A.; Ramos, A.C.; Scherer, R.; Cruz, Z.M.A.; Silva, A.G. *Parasit. Vectors.* **2015**, 8, 136-145. doi 10.1186/s13071-015-0746-0.
- (56) Dua, V.K.; Kumar, A.; Pandey, A.C; Kumar, S. *Parasit Vectors.* **2013**, 6, 30-42.
- (57) Cheng, S.S.; Chang, H.T.; Chang, S.T.; Tsai, K.H.; Chen, W.J. *Bioresour Technol.* **2003**, 89, 99-102. doi:10.1016/S0960-8524(03)00008-7.
- (58) Kiran, S.R.; Bhavani, K.; Devi, P.S.; Rao, B.R.R.; Reddy, K.J. *Bioresour Technol.* **2006**, 97, 2481–2484. doi:10.1016/j.biortech.2005.10.003
- (59) Pitasawat, B.; Champakaew, D.; Choochote, W.; Jitpakdi, A.; Chaithong, U.; Kanjanapothi, D.; Rattanachanpichai, E.; Tippawangkosol, P.; Riyong, D.; Tuetun, B.; Chaiyasit, D. *Fitoterapia.* **2007**, 78, 205-210. doi: 10.1016/j.fitote.2007.01.003.
- (60) Pimenta, A. T. A., Santiago, G. M. P., Arriaga, A. M. C., Menezes, G. H. A. e Bezerra, S. B. *Rev Bras Farmacogn.* **2006**, 16, 501-505. doi: 10.1590/S0102-695X2010005000052.
- (61) Silva, H. H. G., Silva, I. G., Santos, M. R. G., Filho, E. R. e Elias, C. M. *Rev Soc Bras Med Trop.* **2005**, 37, 396-399. doi: 10.1590/S0037-86822004000500005.
- (62) Siani, A.C.; Sampaio, A.L.; Sousa, M.C.; Henriques, M.G.; Ramos, M.F. *Biotechnolog. Cienc. Desenvolv.* **2000**, 16, 38-43. doi: 10.1590/S0102-695X2006000400013.
- (63) Lima, M.G.A.; Maia, C.I.C.; Sousa, B.D.; Morais, S.M.; Freitas, S.M. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* **2006**, 48, 4. doi: 10.1590/S0036-46652006000400007.
- (64) Rüdiger, A.L.; Siani, A.C.; Veiga Jr, V.F. *Pharmacogn Rev.* **2007**, 1, 93-104.
- (65) Alencar, J.C. *Acta Amazônica* **1981**, 11, 3-11.
- (66) Wannan, W. A.; Mhamdi, B.; Marzouk, B. *Food Chemistry* **2009**, 112, 621-626.
- (67) Ghosh, A.; Chowdhury, N.; Chandra, G. *Indian J Med Res.* **2012**, 135, 581-598.
- (68) Cascon, V.; Gilbert, B.; *Phytochemistry* **2000**, 55, 773-778.
- (69) Pavela, R. *Ind Crops Prod.* **2015**, 76, 174-187.
- (70) Benelli, G.; Mehlhorn, H. *Parasitol Res.* **2016**, 115, 1747-1754. doi: 10.1007/s00436-016-4971-z
- (71) Fahn, A. *Adv. Bot. Res.* **2000**, 31, 37–75.
- (72) Pybus, O.G.; Tatem, A.J.; Lemey, P. *Proc. R. Soc. B.* **2015**, 282, 20142878. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2014.2878>
- (73) Shuman, E.K. *N Engl J Med.* **2010**, 362(12), 1061-1063.
- (74) Kilpatrick, A.M.; Randolph, S.E. *Lancet.* **2012**, 380, 1946-1955.
- (75) Weaver, S.C.; Lecuit, M. *N Engl J Med.* **2015**, 372, 1231-1239. doi: 10.1056/NEJMra1406035.
- (76) Fauci, A.S.; Morens, D.M. *N Engl J Med.* **2016**, 374(7), 601-604.