

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

**BASES MECANÍSTICAS PARA OS DANOS MORFOLÓGICOS
INDUZIDOS PELO ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA ROSA, *Schinus
terebinthifolia*, EM LARVAS DE *Stegomyia aegypti*, O VETOR DA
DENGUE**

DRIELLE LIMA DE ALMEIDA PRATTI

VILA VELHA

MARÇO/2013

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

**BASES MECANÍSTICAS PARA OS DANOS MORFOLÓGICOS
INDUZIDOS PELO ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA ROSA, *Schinus
terebinthifolia*, EM LARVAS DE *Stegomyia aegypti*, O VETOR DA
DENGUE.**

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

DRIELLE LIMA DE ALMEIDA PRATTI

VILA VELHA

MARÇO/2013

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

P913b Pratti, Drielle Lima de Almeida.

Bases mecánísticas para os danos morfológicos induzidos pelo óleo essencial de pimenta rosa, *Schinus terebinthifolia*, em larvas de *Stegomyia aegypti*, o vetor da dengue / Drielle Lima de Almeida Pratti. – 2013.

36 f. : il.

Orientador: Alessandro Coutinho Ramos.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2013.

Inclui bibliografias.

1. Óleos essenciais. 2. Aroeira-do-sertão. 3. Culicidae. 4. Dengue. 5. Saúde pública - Pesquisa. I. Ramos, Alessandro Coutinho. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615.321

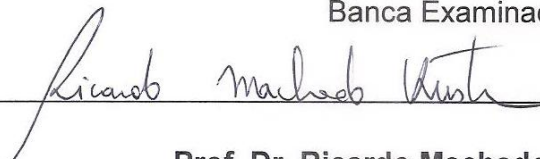
DRIELLE LIMA DE ALMEIDA PRATTI

**BASES MECANÍSTICAS PARA OS DANOS MORFOLÓGICOS
INDUZIDOS PELO ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA ROSA, *Schinus
terebinthifolia*, EM LARVAS DE *Stegomyia aegypti*, O VETOR DA
DENGUE**

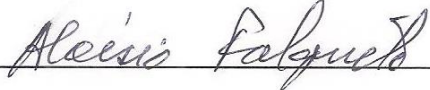
Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Ciências Farmacêuticas,
para a obtenção do grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 18 de Março de 2013.

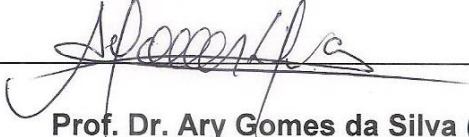
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Ricardo Machado Küster (UFRJ)



Prof. Dr. Aloísio Falqueto (UFES)



Prof. Dr. Ary Gomes da Silva (UVV)

(Presidente da Banca)

A Deus, meus pais e marido,
pela oportunidade, apoio e dedicação.

Agradecimentos

A minha eterna gratidão a Deus que guia a minha vida iluminando meus passos e dirigindo os planos d'Ele em minha vida. Aos meus pais, Fausto e Vera, que me ensinaram os caminhos do Senhor dos quais eu nunca me desviarei, que me apoiaram, me ensinaram valores bons e me deram todo suporte e incentivo para chegar até aqui. Ao meu marido Rafael, que com todo seu amor me apoiou, me ajudou e me suportou em todos os momentos. Amo vocês!

A toda minha família, tias, primas, primos... que me ajudaram em orações e me deram o seu amor.

Ao meu orientador, Alessandro Coutinho Ramos, que não me negou assistência em nenhum momento me auxiliando até aqui.

Ao meu eterno orientador, Ary Gomes da Silva, pessoa exemplar que me acompanha desde a graduação acreditando no meu potencial, até quando eu mesma duvidava, pelo seu companheirismo, amizade, tolerância, por aguentar minhas “loirices”, por me incentivar, acalmar, por ter tanta paciência e por ser mais que um ORIENTADOR. Não tenho palavras para agradecer tamanha disposição!

Ao professor, Tadeu Uggere de Andrade, que me deu a oportunidade de vislumbrar uma carreira acadêmica, com a lembrança de meu nome para a seleção do mestrado.

Aos outros professores do programa que, nas disciplinas ou nas conversas no corredor, contribuíram enormemente para minha formação.

Amigos lindos que eu tenho... Vocês fizeram parte de muito ou tudo do que está aqui. O quarteto fantástico cresceu e se tornou uma gangue. (Risos). Silas, Ewelyne, Andrews que estão comigo desde muito tempo, quando eu nem imaginava que aqui estaria, que me deram enorme suporte e incentivo. Meu muito obrigada pela amizade sem igual de vocês. Sem contar com todas grandes amizades que colhi neste pouco tempo de curso: Girlandia, Karina, Ana Cláudia, Miriam, Michelle, Júlia, Suellen, Rômulo... Sem vocês não poderia usufruir de um ambiente agradável, de poder rir com as bobearias, palhaçadas e compartilhar os conhecimentos transmitidos por nossos mestres. Muito Obrigada!

Ao Tommasi Analítica, na pessoa do Dr. Bruno Tommasi, pelo patrocínio das análises cromatográficas feitas.

À Fundação de Amparo a pesquisa do Espírito Santo, pela bolsa de estudos e financiamento deste trabalho. A Universidade Vila Velha - UVV por proporcionar conhecimento e estrutura necessários para a realização deste trabalho.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para este trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!

*“Pois será como a árvore plantada junto a ribeiros de águas,
a qual dá o seu fruto no seu tempo; as suas folhas não cairão,
e tudo quanto fizer prosperará”.*

Salmos 1:3

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Cromatograma em fase gasosa, evidenciando os constituintes majoritários do óleo essencial dos frutos maduros de *Schinus terebinthifolia*..... 20
- Figura 2** *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762). Larvas de 3º instar expostas a 86,22 ppm (A) e 603,24 ppm (B) de óleo essencial de frutos *Schinus terebinthifolia*. ca: cabeça; to: tórax; td: tubo digestório; sg: segmentos; sa: sifão respiratório. 25
- Figura 3** Perda de integridade estrutural no tórax e nos oito segmentos (S1-S8) do corpo da larva de *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762) expostas a um gradiente de concentração de 86,22-689,76 ppm, do óleo essencial dos frutos maduros de *Schinus terebinthifolia* Raddi..... 27
- Figura 4** Diagrama da Análise Discriminante realizada com as avaliações morfométricas das larvas de *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762) expostas a concentrações de óleo essencial, com as respectivas curvas normais de dispersão..... 28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Compostos majoritários do óleo essencial de frutos maduros de <i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi (Linnaeus, 1792).....	19
Tabela 2	Mortalidade larval de <i>Stegomyia aegypti</i> (Linnaeus, 1762) após 72 horas de exposição a um gradiente de concentração do óleo essencial dos frutos e sementes de <i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi.....	22
Tabela 3	Regressão logística binária entre a concentração e o tempo de exposição ao óleo essencial dos frutos maduros de <i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi e a mortalidade de larvas de <i>Stegomyia aegypti</i>	22
Tabela 4	Atividade larvicida expressa em concentrações letais do óleo essencial dos frutos maduros de <i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi, em intervalos de exposição ao óleo após 24, 48 e 72 horas para as larvas de <i>Stegomyia aegypti</i>	24
Tabela 5	Porcentagem dos danos encontrados nos segmentos corporais observados em 247 larvas de <i>Stegomyia aegypti</i> que morreram em 72 horas de exposição ao óleo essencial dentro de cada concentração.....	26

RESUMO

PRATTI, Drielle Lima de Almeida M.Sc., Universidade de Vila Velha – ES, março de 2013. **Bases mecanísticas para os danos morfológicos induzidos pelo óleo essencial de pimenta rosa, *Schinus terebinthifolia*, em larvas de *Stegomyia aegypti*, o vetor da dengue.** Orientador: Dr. Alessandro Coutinho Ramos. Co-orientador: Dr. Ary Gomes da Silva.

Com a movimentação humana através dos continentes, várias infecções foram disseminadas pelo mundo. Entre essas doenças, a dengue passou a ser alvo dos programas de saúde pública em todo mundo. A falta de uma vacina eficaz e o uso de produtos sintéticos, que vêm prejudicando o ecossistema, despertaram as pesquisas com produtos naturais contra o vetor dessa doença. Por isso os objetivos deste trabalho foram determinar a composição química qualitativa e quantitativa do óleo essencial dos frutos maduros e sementes de *Schinus terebinthifolia* Raddi sobre a mortalidade larval de *Stegomyia aegypti*, o vetor da dengue e, ainda, caracterizar os danos estruturais sofridos pelas larvas e investigar sua associação com os teores de óleo essencial ao qual foram expostas em estudos anteriores. O óleo essencial foi obtido por extração em aparelho Clevenger de frutos maduros de *Schinus terebinthifolia*. A identificação dos componentes do óleo essencial foi realizada por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. Para o bioensaio foram utilizadas larvas de *St. aegypti*, em 3º estágio, obtidas pela incubação de ovos do vetor em água natural e suprimento alimentar para peixes, com posterior preparação de série de tubos em cinco replicatas para o controle branco e cada tratamento realizado, sendo que cada tubo recebeu 10 larvas vivas. A análise morfológica foi feita por fotografias das lâminas com larvas em lupa e medidas em software ImageJ® com escala gráfica de 3000 mm. Realizou-se a análise estatística dos dados. Foram identificadas 56 substâncias, sendo que os compostos majoritários (δ -3-carene, α -pinene e sylvestrene) corresponderam a 81,67%. As larvas foram suscetíveis ao óleo essencial de maneira dose-dependente, sendo que a concentração produziu efeito significativo sobre a mortalidade larval. Dentre as principais deformações encontradas nas larvas pode-se constatar a inibição da síntese de quitina por ação do óleo levando a diminuição da deposição de camadas de cutícula. O óleo essencial de *Schinus terebinthifolia* causou morte das larvas expostas após 72 horas, de maneira dose-dependente. Levou alterações na ultra-estrutura das larvas expostas evidenciando uma ação direta sobre o exoesqueleto larval. Os resultados apresentados são atribuídos às substâncias majoritárias presentes no óleo essencial e representam um resultado importante uma vez que se abrem possibilidades para a utilização de produtos naturais como alternativa para o controle de dípteros. Mais estudos são necessários para verificar o mecanismo de ação do óleo essencial de *S. terebinthifolia*, bem como avaliar a segurança de uso desse composto no meio ambiente.

Palavras chave: Larvicida, Aroeira, *Aedes*, Culicidae, Anacardiaceae.

ABSTRACT

PRATTI, Drielle Lima de Almeida M.Sc., Universidade de Vila Velha – ES, março de 2013. **Mechanistic bases for the morphological damages induced by the essential oil of Brazilian pepper, *Schinus terebinthifolia*, in the larvae of *Stegomyia aegypti*, the dengue fever vector.** Orientador: Dr. Alessandro Coutinho Ramos. Co-orientador: Dr. Ary Gomes da Silva.

With human movement across continents, multiple infections were disseminated throughout the world. Among these diseases, dengue has become the subject of public health programs worldwide. The lack of an effective vaccine and the use of synthetic products, which are damaging the ecosystem awakened research with the vector natural products against this disease. Thus the objectives of this study were to determine the qualitative and quantitative chemical composition of the essential oil of the ripe fruits and seeds of *Schinus terebinthifolia* Raddi on mortality of larval *Stegomyia aegypti*, the dengue vector, and still characterize the structural damage suffered by the larvae and investigate its association with the levels of essential oil that has been exposed in previous studies. The essential oil was obtained by extraction apparatus Clevenger of ripe fruits of *Schinus terebinthifolia*. Identification of essential oil components was performed by gas chromatography with high resolution. For the bioassay were used *St. aegypti* larvae in 3rd stage, incubation of eggs vector in natural water and food supply for fish, with subsequent preparation of series of tubes in five replicates for each treatment and control white performed, and each tube received 10 larvae. Morphological analysis was performed by photographs of the slides with larvae in magnifying glass and measures in ImageJ® software with graphic scale of 3000 mm. Was performed statistical analysis. We identified 56 substances, with the major compounds (δ -3-carene, α -pinene e sylvestrene) accounted for 81.67%. The larvae were susceptible to the essential oil in a dose-dependent, and the concentration produced significant effect on larval mortality. Among the major deformations found larvae can observe the inhibition of chitin synthesis by action of the oil leading to decreased deposition of layers of cuticle. The essential oil of *Schinus terebinthifolia* caused death of the larvae exposed after 72 hours, a dose-dependent manner. Led changes in the ultra-estutura larvae exposed showing a direct action on the larval exoskeleton. The results are attributed to substances present in the majority essential oil and represent an important result since it opens up possibilities for the use of natural products as an alternative for control of flies. More studies are needed to verify the mechanism of action of the essential oil of *S. terebinthifolia* and assess the safety of use of this compound in the environment.

Keywords: Larvicidal, Aroeira, *Aedes*, Culicidae, Anacardiaceae.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

Capítulo.....	12
Resumo.....	13
Introdução.....	14
Métodos.....	16
Resultados e discussão.....	19
Conclusão.....	30
Referências.....	31

ANEXO

CAPÍTULO

Bases Mecanísticas para os Danos Morfológicos Induzidos pelo Óleo Essencial de Pimenta Rosa, *Schinus terebinthifolia*, em Larvas de *Stegomyia aegypti*, o Vetor da Dengue

Drielle L. A. Pratti^{1§*}, Ary G. Silva^{2,3*}, Alessandro C. Ramos^{1,2*}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Vila Velha – UVV, Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, Vila Velha, ES, Brasil. CEP 29107-970.

² Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas. Universidade Vila Velha – UVV, Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, Vila Velha, ES, Brasil. CEP 29107-970.

³ Tommasi Analítica.

* Estes autores contribuíram igualmente para a realização deste trabalho.

§ Autor correspondente.

Endereços virtuais:

DLAP: driellepratti@gmail.com

AGS: arygomes@uvv.br

ACR: alessandro.ramos@uvv.br

Resumo

Introdução: Com a movimentação humana através dos continentes, várias infecções foram disseminadas pelo mundo. Entre essas doenças, a dengue passou a ser alvo dos programas de saúde pública em todo mundo. A falta de uma vacina eficaz e o uso de produtos sintéticos, que vêm prejudicando o ecossistema, despertaram as pesquisas com produtos naturais contra o vetor dessa doença. Por isso os objetivos deste trabalho foram determinar a composição química qualitativa e quantitativa do óleo essencial dos frutos maduros e sementes de *Schinus terebinthifolia* Raddi sobre a mortalidade larvar de *Stegomyia aegypti*, o vetor da dengue e, ainda, caracterizar os danos estruturais sofridos pelas larvas e investigar sua associação com os teores de óleo essencial ao qual foram expostas em estudos anteriores.

Material e Métodos: O óleo essencial foi obtido por extração em aparelho Clevenger de frutos maduros de *Schinus terebinthifolia*. A identificação dos componentes do óleo essencial foi realizada por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. Para o bioensaio foram utilizadas larvas de *St. aegypti*, em 3º estágio, obtidas pela incubação de ovos do vetor em água natural e suprimento alimentar para peixes, com posterior preparação de série de tubos em cinco replicatas para o controle branco e cada tratamento realizado, sendo que cada tubo recebeu 10 larvas vivas. A análise morfológica foi feita por fotografias das lâminas com larvas em lupa e medidas em software ImageJ® com escala gráfica de 3000 mm. Realizou-se a análise estatística dos dados.

Resultados: Foram identificadas 56 substâncias, sendo que os compostos majoritários corresponderam a 81,67%. As larvas foram suscetíveis ao óleo essencial de maneira dose-dependente, sendo que a concentração produziu efeito significativo sobre a mortalidade larval. Dentre as principais deformações encontradas nas larvas pode-se constatar a inibição da síntese de quitina por ação do óleo levando a diminuição da deposição de camadas de cutícula.

Conclusão: O óleo essencial de *Schinus terebinthifolia* causou morte das larvas expostas após 72 horas, de maneira dose-dependente. Levou alterações na ultra-estrutura das larvas expostas evidenciando uma ação direta sobre o exoesqueleto larval. Os resultados apresentados são atribuídos às substâncias majoritárias presentes no óleo essencial e representam um resultado importante uma vez que se abrem possibilidades para a utilização de produtos naturais como alternativa para o controle de dípteros. Mais estudos são necessários para verificar o mecanismo de ação do óleo essencial de *S. terebinthifolia*, bem como avaliar a segurança de uso desse composto no ecossistema.

Palavras-chave: Aroeira, larvicida, Aedes, Culicidae, Anacardiaceae.

Introdução

A expansão do transporte aéreo mundial e do comércio marítimo supera barreiras geográficas para insetos vetores de doenças, permitindo que estes cubram amplas áreas de distribuição em curtos períodos de tempo. Quando todo transporte se limitava ao deslocamento a pé ou sobre animais, as doenças eram mais circunscritas a determinadas regiões do globo [1]. Com o crescimento da movimentação de grandes contingentes de grupos humanos por terra, mar e ar, várias infecções foram disseminadas pelo mundo. Com o advento das embarcações e o surgimento de viagens intercontinentais durante as primeiras explorações do planeta, essas infecções se tornaram de porte maior atingindo regiões geograficamente isoladas umas das outras [2], caracterizando casos típicos de bioinvasão [3].

Entre as doenças propagadas pela modernização da rede de transportes, a febre amarela e a dengue adquiriram importância para a saúde pública mundial, pelo fato de apresentarem um mosquito vetor em comum, o *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762), nativo das regiões tropicais e sub-tropicais da África Ocidental, que se espalhou e se adaptou a criadouros antrópicos e peridomiciliares, bem como recipientes de armazenamento de água em navios [4]. Deste modo, com as grandes navegações e o comércio de escravos, essa espécie chegou a Portugal e Espanha, principalmente nas cidades portuárias, indo também se estabelecer em todas as regiões temperadas e tropicais das Américas, com a colonização europeia do Novo Mundo, causando grandes epidemias [5].

As primeiras notificações da presença de *St. aegypti* em solo brasileiro datam de 1686, associada 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 daquele vetor [2]. Esse vetor foi supostamente erradicado, do Brasil em 1955 [6], porém, novos surtos epidêmicos foram relatados nos anos 70. Atualmente, em tempos de mudanças climáticas, a dengue se tornou uma pandemia de enorme preocupação para a saúde pública devido à ecologia do mosquito vetor estar propagada em toda a região intertropical que possuem maiores densidades demográficas no planeta [7].

Com a crescente disseminação de dengue, espera-se que um impacto igualmente grande ocorrerá no setor da saúde mundial, implicando fortes danos para a economia global. O total dos custos médios em dólares internacionais para cada paciente ambulatorial e hospitalizado foram estimadas, respectivamente, em I\$ 514,00 e em I\$ 1.394, em cinco países americanos (Brasil, El Salvador, Guatemala, Panamá e Venezuela) e três países asiáticos (Camboja, Malásia e Tailândia). Anualmente, uma média de 574.000 casos notificados, o que representa

um custo financeiro total anual estimado de pelo menos I\$ 587 milhões nos oito países estudados. Se for levado em conta um eventual ajuste em função da subnotificação esse valor pode ser elevado para US\$ 1,8 bilhões, e caso sejam incorporados os custos com vigilância e controle do vetor o montante final seria um valor ainda maior [8], isso se dá graças à inexistência de vacinas disponíveis cujo desenvolvimento tem sido dificultado pela existência dos quatro tipos virais [9].

Uma das principais razões para o surgimento de epidemias, como a dengue, é a alta densidade de população humana e urbanização não planejada [10], aliada ao alto nível de domesticidade de seu vetor [11]. Na ausência de uma vacina contra a dengue [9], a ação mais eficaz de prevenção tem sido o controle das populações do mosquito vetor já na fase adulta, isso tem sido feito principalmente com o uso de inseticidas sintéticos da classe dos organofosforados e piretróides [12]. Entre os anos de 1940 a 1980 essas substâncias foram amplamente utilizadas sem restrições e com bastante sucesso, mas com o passar dos anos, estudos evidenciaram que os mosquitos adquiriam certa resistência a esses inseticidas [12;13], e que os mesmos produziam grandes danos aos ecossistemas [14;15]. Com isso começou a busca por novos meios de combate inclusive com produtos naturais, considerando a diversidade de plantas, principalmente nos trópicos onde a epidemia da dengue têm se concentrado [16].

No que diz respeito às medidas de controle populacional do mosquito vetor da dengue, ainda é controversa a estratégia mais adequada, pois apesar da eliminação de adultos ser apontada como a medida de efeito mais produtivo no combate à dengue, vários estudos têm sido realizados, investigando a atuação de substâncias tanto naturais quanto sintéticas como larvicidas e ovicidas [17]. Em relação à atividade larvicida, os produtos naturais apresentam atividade potencial como descrito por Chowdhury et al., 2008, trabalhando com extratos aquosos de *Solanum villosum* Mill. (Solanaceae) [18] e por Silva et al., 2010 analisando óleo essencial de *Schinus terebinthifolia* Raddi (Anacardiaceae) [16]. Ambos obtiveram resultados satisfatórios em relação à atividade larvicida contra *St. aegypti*.

Schinus terebinthifolia Raddi, também conhecida como aroeira, pimenta-rosa, pertence à família Anacardiaceae [9;19]. É uma árvore perene, nativa da América do Sul, encontrada no Brasil, Paraguai e Argentina [20]. No Brasil, os frutos maduros desidratados de *S. terebinthifolia* são comercializados como um substituto para a pimenta preta. Muitas propriedades medicinais têm sido atribuídas a esta planta, tais como ação antioxidante, cicatrizante para feridas, antitumoral e antimicrobiana [21] e ainda, possui ação larvicida contra mosquitos da dengue, *St. aegypti* [16]. Com a ação larvicida do óleo essencial

comprovada, este trabalho tem por objetivo determinar a composição química qualitativa e quantitativa do óleo essencial dos frutos maduros e sementes de *Schinus terebinthifolia* e avaliar a sua ação sobre a mortalidade larval de *Stegomyia aegypti*, bem como caracterizar os danos estruturais sofridos pelas larvas e investigar a correlação com os teores de óleo essencial ao qual foram expostas.

Métodos

Obtenção, purificação e determinação da densidade do óleo essencial

Os frutos maduros de aroeira foram colhidos na região da Grande Vitória-ES, limpos e separados de impurezas. Estes foram então divididos em 10 amostras de 100g cada. Os frutos foram então triturados com água desionizada e transferidos para um balão de fundo redondo [22], seguido de extração em aparelho de Clevenger por quatro horas para cada amostra, contadas a partir da ebulição da água, o aquecimento foi mantido na temperatura mínima necessária à ebulição. Todo o processo extrativo foi realizado no laboratório de Ecologia Funcional da UVV. Após a extração, as amostras foram todas transferidas para um frasco de vidro, e sua purificação foi feita pelo congelamento da água remanescente. A densidade de cada amostra de óleo essencial foi determinada gravimetricamente, por pesagem em balança analítica com precisão de 1,0 mg, de 1 mL de líquido à 20°C, em sala climatizada com temperatura controlada.

Perfil fitoquímico dos óleos essenciais

A análise cromatográfica dos componentes do óleo essencial em estudo foi realizada através da cromatografia em fase gasosa de alta resolução, acoplada à espectrometria de massas – CG-EM. O volume de injeção foi de 2 µL, composto por 1,8 µL de uma solução de óleo essencial (30 mg/ml) e 0,2 µL de uma solução de uma série de hidrocarbonetos de C7-C30, como padrão interno em *n*-hexano. O sistema utilizado em CG-EM consistiu de um cromatógrafo a gás, Thermo Scientific® Ultra GC acoplado a um espectrômetro de massa Thermo Scientific®. A coluna cromatográfica tinha como fase estacionária sílica fundida DB-5 J & W Scientific (30 m × 0,25 mm × 0,25 mm). O Hélio foi o gás de arraste e a temperatura da coluna foi aumentada em 3°C por minuto entre 60°-240°C. Os espectros de massa foram obtidos a 70 eV a uma taxa de varredura de 0,84 scan/sec, na faixa de *m/z* 40-500 [23]. Os tempos de retenção dos componentes da amostra e uma mistura de *n*-alcanos de C7-C30, co-injetados no sistema GC-MS no mesmo programa de temperatura, foram utilizados para o

cálculo do Índice de Retenção de Kovats – KI [23] e do Índice de Retenção Aritmético de van den Dool e Kratz 1963 [24].

Os arquivos gerados com os espectros de massa obtidos nas varreduras foram utilizados na identificação dos componentes dos óleos essenciais, realizada no Laboratório de Ecologia Funcional da UVV, através da utilização do programa Xcalibur, versão 2.0.7. A identificação foi baseada na similaridade espectral, feita através da comparação dos espectros obtidos com os presentes na biblioteca espectral e os disponíveis na literatura, e na comparação dos índices de retenção calculados, comparados com os disponíveis na literatura [23].

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 Krill Flakes Tropical[®]. Os ovos foram obtidos pela colocação de armadilhas, denominadas ovitrampas que consistiam em recipientes pretos de plástico, cheios com água até a metade de sua capacidade, onde eram colocadas paletas de Eucatex[®] para que os ovos ficassem aderidos. As ovitrampas foram dispostas nas dependências da Universidade Vila Velha, próximo a árvores e plantas no Campus.

Foi preparada uma série de tubos em cinco replicatas para o controle branco e para cada tratamento realizado, sendo que cada replicata recebeu 10 larvas vivas. O controle branco foi utilizado para avaliar a sobrevivência das larvas, em solução de Tween 80[®] a 0,5% em água desionizada.

De acordo com Silva et al, (2010) houve mortalidade total das larvas expostas ao óleo essencial na concentração de 862,20 ppm [16], então foi preparado um gradiente de concentração de 86,22 - 862,20 ppm de óleo essencial por dispersão numa solução de Tween 80[®] 0,5%. Dez diluições foram preparadas em intervalo de 86,22 ppm entre elas, tendo em conta a capacidade de locomoção ascendente para respiração das larvas como o critério de sobrevivência. As avaliações das larvas sobreviventes foram realizadas após 24, 48 e 72 horas após a inoculação, com segurança para evitar o aparecimento de mosquitos adultos.

Análise morfométrica das larvas

As larvas foram fixadas em uma mistura de formol, ácido acético, etanol e água (4:3:50:43), dispostas em lâminas de vidro, fotografadas em lupa (LeicaZoom[®] 2000) com escala gráfica de 3000µm e as medidas da espessura em projeção do exoesqueleto dos oito segmentos do

corpo das larvas tomando como referência interna o tubo digestório larval, foram feitas utilizando o software ImageJ[®]. Foram analisadas a integridade de cabeça, tórax, abdome e sifão respiratório.

Para a avaliação dos danos estruturais, foram selecionadas 247 larvas que apresentavam algum dano estrutural, observado em lupa (LeicaZoom[®] 2000), em meio ao total de 550 larvas distribuídas no gradiente de concentrações do óleo essencial até 689,76 ppm.

Análises estatísticas de dados

A diversidade química das 10 amostras de óleo foi estimada pelo índice de Diversidade de Shannon-Weaver – H' – e a equitabilidade foi estimada pelo índice J de Pielou, [25] sendo ambas testadas em relação a eventuais diferenças pelo teste t para amostras independentes. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade de igualdade entre os índices médios foi $p < 0,05$ [26].

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 K2, 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 [26].

Como as taxas de mortalidade não puderam ser normalizadas pelo arco-seno transformação, uma regressão logística binária foi realizada a partir de um modelo probístico, tendo as doses e a duração da exposição ao óleo essencial como variáveis independentes e mortalidade larval taxas como variável dependente. A hipótese nula testada foi de que a taxa de mortalidade larval foi independente da dose ou tempo de exposição ao óleo essencial através de um modelo probístico tendo como base de transformação o logaritmo neperiano [27]. As concentrações letais CL50, CL90, CL95 e CL99 foram calculadas a partir da equação de linha reta gerada pelo modelo probístico testado [27]. As análises estatísticas foram feitas pelos Programas MyStat versão 12.0 e Minitab versão 13.0.

A avaliação dos danos estruturais que ocorreram nas larvas foi iniciada com uma Análise Discriminante, procurando investigar se houve a diferenciação de grupos morfológicos consistentes com as concentrações de óleo essencial aos quais elas foram expostas. A consistência da função discriminante estimada foi verificada pela validação cruzada pelo método de Jackknife [28]. A análise de discriminante foi realizada no software Systat versão 13.0. A associação entre os componentes majoritários do óleo essencial sobre os danos larvais

foi testada através da Regressão Logística Ordinal, testando a hipótese de que os compostos majoritários no óleo essencial eram os causadores dos danos estruturais observados. O nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$ [27].

Resultados e discussão

Óleo essencial

O óleo essencial extraído do fruto maduro apresentou-se como um líquido de baixa viscosidade, incolor e translúcido. Considerando as médias e seus respectivos Intervalos de Confiança (IC) a 95%, o rendimento extrativo de óleo essencial do fruto maduro foi de $2,729 \pm 0,253\%$, densidade absoluta foi $0,8622 \pm 0,002 \text{ g.mL}^{-1}$; a diversidade química (H') foi $2,057 \pm 0,147$; e equitabilidade (J) $0,487 \pm 0,030$.

Foram identificadas ao todo, 56 substâncias no óleo essencial, principalmente mono e sesquiterpenos e entre eles os compostos majoritários foram δ -3-carene 55,36%, α -pinene 15,62%, sylvestrene 10,69% o que corresponde a 81,67% da composição total do óleo. Um total de 96,11% da composição do óleo essencial é evidenciado quando 12 substâncias, que são os compostos minoritários que compõem 14,44% da composição total, são adicionadas às anteriores, sendo alguns sesquiterpenóides e fenilpropanóides, além dos monoterpenóides já citados (Tabela 1). Os outros 41 compostos ocorreram em vestígios residuais e formaram apenas 3,89% do total da composição.

Tabela 1 - Compostos majoritários do óleo essencial de frutos maduros de *Schinus terebinthifolia* Raddi (Linnaeus, 1792).

Índices de Retenção				Identificação	%
van den Dool e Kratz		Kovats			
Calculado	Adams 2009	Calculado	Adams 2009		
1010	1008	1011	1011	δ-3-carene	55,36
933	932	938	939	α-pinene	15,62
1027	1025	1031	1030	sylvestrene	10,69
1479	1480	1481	1481	germacrene D	2,48
1377	1379	1379	1381	β-patchoulene	1,99
988	988	990	990	mircene	1,89
1355	1356	1357	1359	eugenol	1,71
1087	1086	1089	1088	terpinolene	1,52

Parasites and Vectors

1392	1390	1393	1391	sativene	0,93
1418	1419	1419	1420	β -cedrene	0,89
1675	1674	1676	1675	cis- α -santalol	0,77
1447	1448	1449	1450	cis-muurola-3,5-diene	0,76
1546	1546	1548	1548	hedycaryol	0,66
1336	1335	1339	1338	δ -elemene	0,44
1434	1434	1436	1436	γ -elemene	0,41
Total					96,11

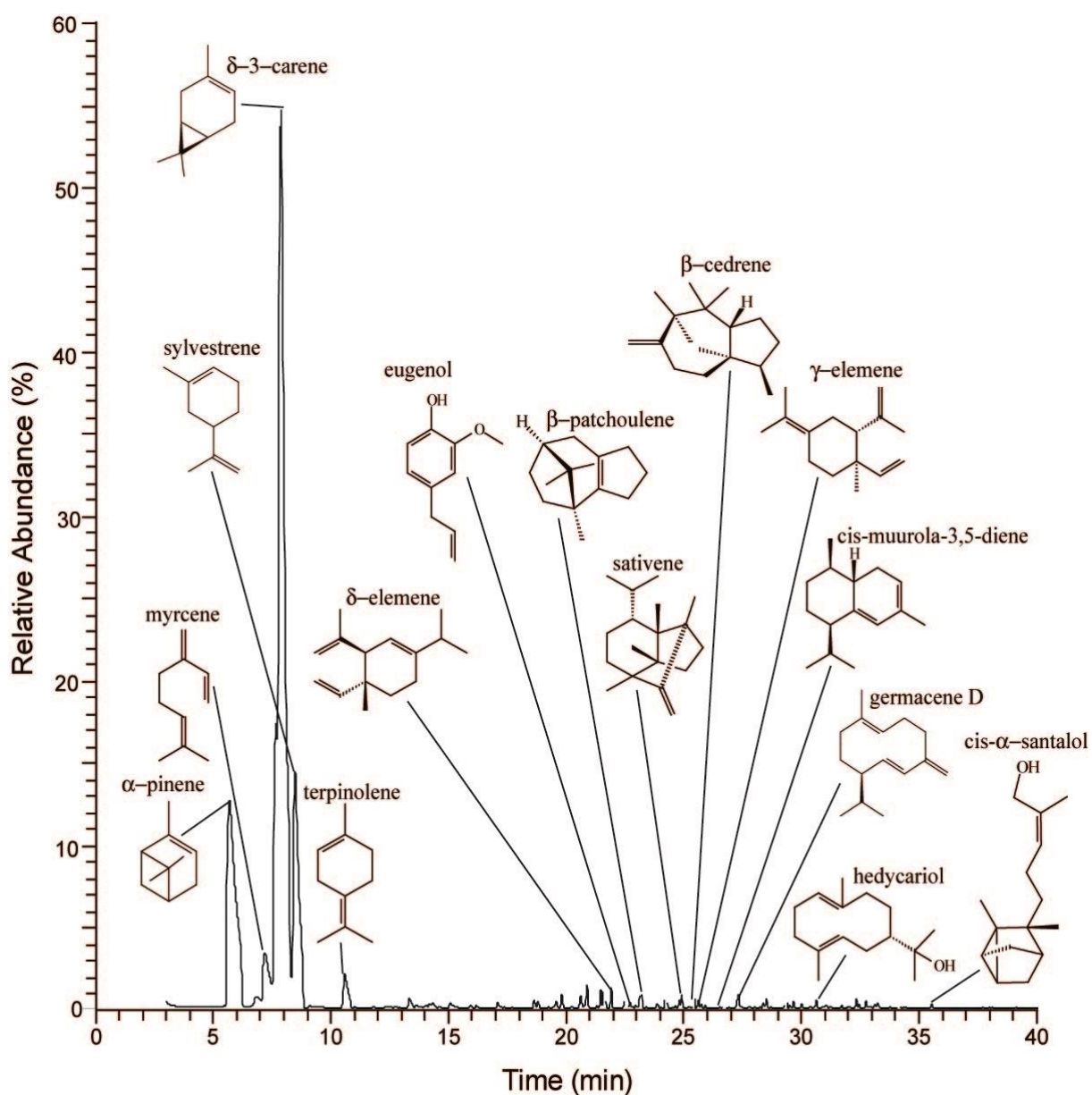


Figura 1 - Cromatograma em fase gasosa, evidenciando os constituintes majoritários do óleo essencial dos frutos maduros de *Schinus terebinthifolia*.

A equitabilidade encontrada evidencia a maneira pela qual o número de substâncias químicas está distribuído em suas proporções nas espécies em estudo, indicando o grau de simetria na distribuição proporcional de massas entre os componentes dos óleos essenciais. Os valores menores que 1 expressam uma concentração cada vez mais irregular entre os componentes na medida em que se aproximam de zero, o que é muito comum nos óleos essenciais nos quais se identificam facilmente mais de 40 substâncias, porém apenas um pequeno número é responsável pela maior proporção de massas [29].

Os óleos essenciais podem estar presentes num só órgão ou em toda planta [22]. Podem ser produzidas em células secretoras, cavidades, ductos, células epidérmicas e tricomas e geralmente possuem densidade menor que a da água, dado esse evidenciado para o óleo essencial em questão, e ainda são solúveis em compostos orgânicos. Os óleos podem conter, mais comumente, cerca de 20 a 60 substâncias em diferentes concentrações. Geralmente 2 ou 3 destas substâncias apresentam-se em maior concentração (20 – 70%) e deste modo, vão caracterizar o óleo e determinar sua propriedade biológica [29].

Variações qualitativas e quantitativas na composição do óleo essencial de uma mesma espécie vegetal podem estar relacionadas com vários fatores. Estes tipos de diferenças podem ocorrer como consequência da variação intra-clonal no melhoramento genético de cultivares propagação vegetativa de rosa com cheiro de gerânio, *Pelargonium* sp., sugerindo que mesmo variações genéticas somáticas podem afetar a biossíntese e a produção de óleo [30].

Essas diferenças podem ocorrer ainda, devido a razões ambientais que podem envolver a origem geográfica, o estresse produzido por fatores abióticos como vento, umidade do ar e salinidade [31], além da forma de cultivo, que pode também ocasionar variações na composição do óleo essencial [13]. Porém, como se trata de um material obtido de uma espécie que cresce em condições naturais, é provável que as diferenças detectadas sejam consequência das diferenças de localização geográfica da planta da qual foi extraído o óleo essencial.

Bioensaio com larvas

Não houve mortalidade larval no controle branco (Tabela 2), indicando ser inexistente ou desprezível o efeito da solução diluente com Tween 80[®] sobre a mortalidade larval. Nenhuma larva sobreviveu na concentração de 862,20 ppm (Tabela 2), e nem nas concentrações superiores a ela, morrendo em até uma hora após a exposição ao tratamento com o óleo essencial.

Tabela 2 - Mortalidade larval de *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762) após 72 horas de exposição a um gradiente de concentração do óleo essencial dos frutos e sementes de *Schinus terebinthifolia* Raddi.

Óleo essencial (ppm)	Mortalidade larval (% Média ± Erro padrão)		
	24 h	48 h	72h
Branco	0.00 ± 0.00	0.00 ± 4.00	0.00 ± 4.00
86.22	0.00 ± 0.00	2.00 ± 2.00	4.00 ± 2.45
172.44	42.00 ± 22.00	48.00 ± 19.85	52.00 ± 18.00
258.66	26.00 ± 19.39	32.00 ± 17.45	32.00 ± 22.00
344.88	24.00 ± 12.08	38.00 ± 14.97	42.00 ± 18.85
431.10	74.00 ± 14.00	82.00 ± 9.17	88.00 ± 8.00
517.32	60.00 ± 24.49	64.00 ± 22.27	64.00 ± 22.27
603.54	60.00 ± 24.49	62.00 ± 23.32	64.00 ± 22.27
689.76	62.00 ± 23.32	64.00 ± 22.27	68.00 ± 19.85
775.98	80.00 ± 20.00	80.00 ± 20.00	82.00 ± 18.00
862.20	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00

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

Tabela 3 - Regressão logística binária entre a concentração e o tempo de exposição ao óleo essencial dos frutos maduros de *Schinus terebinthifolia* Raddi e a mortalidade de larvas de *Stegomyia aegypti*.

Parâmetro	Parâmetros			
	Coeficiente	EP	Z	p
Concentração de óleo essencial (PPM)				
Constante	-1,086	0,069	-15,81	< 0,01 ^{as}
PPM	0,003	0,0001	17,30	< 0.01 ^{as}
G = 330,59; gl = 1; p < 0,01 ^{as} ; χ^2 Hosmer-Lemeshow = 59,65; p < 0,01 ^{as}				
Tempo de exposição ao óleo essencial				
Constante	-0,295	0,86	-3,43	< 0.01 ^{as}

Parasites and Vectors

Tempo	0,005	0,002	2,91	< 0,01 ^{as}
G = 8,50; gl = 1; $p < 0,01^{as}$; χ^2 Hosmer-Lemeshow = 0,937; $p < 0,01^{as}$				
Concentração + Tempo de exposição ao óleo essencial				
Constante	-1,380	0,113	-12,25	< 0,01 ^{as}
PPM	0,0026	0,0002	17,35	< 0,01 ^{as}
Tempo	0,0059	0,0018	3,32	< 0,01 ^{as}
G = 341,67; gl = 2; $p < 0,01$; χ^2 Hosmer-Lemeshow = 45,62; $p < 0,01$				
Concentração (PPM) + Tempo de exposição ao óleo essencial + Concentração*Tempo				
Constante	-1,6672	0,1913	-8,71	< 0,01 ^{as}
PPM	0,0033	0,0004	8,1	< 0,01 ^{as}
Tempo	0,0117	0,0036	3,29	< 0,01 ^{as}
PPM*Tempo	-0,00001	0,000001	-1,86	0,07 ^{ns}
G = 345,10; gl = 3; $p < 0,01^{as}$; χ^2 Hosmer-Lemeshow = 66,55; $p < 0,01$				
ns: não significativo; s: significativo; as: altamente significativo				

O modelo probístico testado evidenciou que a concentração e o tempo de exposição ao óleo essencial são capazes de afetar a mortalidade das larvas, porém como a interação multiplicativa do efeito do tempo de exposição e da concentração (Tabela 3, PPM*Tempo) não foi significativo, não há uma potencialização do efeito do tempo de exposição sobre a mortalidade das larvas expostas ao óleo essencial nas concentrações estabelecidas.

Apesar do efeito altamente significativo do tempo de exposição sobre a mortalidade das larvas, o ajuste ao modelo probístico, medido pelo valor de p do χ^2 de Hosmer e Lemeshow, é excessivamente menor que o efeito da concentração do óleo essencial. Quando tempo e concentração foram colocados no mesmo modelo, o valor de p do χ^2 de Hosmer e Lemeshow tende a convergir para o valor da concentração quando este é testado isoladamente, e o coeficiente padrão associado ao tempo é muito menor comparado ao da concentração (Tabela 3), indicando que o principal agente causador da mortalidade é o óleo essencial propriamente dito.

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 CL50 diminuiu em valor absoluto e convergiu para um intervalo de confiança menor e com melhor ajuste do χ^2 de Hosmer e Lemeshow em 72 horas de exposição (Tabela 3).

A concentração experimental mínima de óleo essencial que foi capaz de provocar mortalidade de todas as larvas expostas a ela foi de 862,20 ppm, quando foi evidenciada a morte de todas as larvas cerca de uma hora após o contato das larvas com o óleo essencial. Este valor experimental foi inferior as 1261,239 ppm estimadas pelo modelo probístico que calculou a CL50 de 366,9167 ppm ao final de 72 horas de exposição ao óleo essencial (Tabela 4). Porém, esta CL50 estimada está incluída no intervalo de 344,88-431,10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, experimentalmente proposto por Silva et al (2010) [16].

Tabela 4 - Atividade larvicida expressa em concentrações letais do óleo essencial dos frutos maduros de *Schinus terebinthifolia* Raddi, em intervalos de exposição ao óleo após 24, 48 e 72 horas para as larvas de *Stegomyia aegypti*.

Tempo (h)	Efeito	Dose (ppm) $\pm$ (Intervalo)
24	CL ₅₀	476,2289 $\pm$ 45,9505
	CL ₉₀	968,8985 $\pm$ 71,1853
	CL ₉₅	1108,563 $\pm$ 82,8280
	CL ₉₉	1370,552 $\pm$ (106,427)
	Angular	0,0029 $\pm$ 0,0005; Z=10,82; $p < 0,01^{\text{as}}$
	Constante	-1,3794 $\pm$ 0,2515 Z= -10,72; $p < 0,01^{\text{as}}$
	G	132,96; gl = 1; $p < 0,01^{\text{as}}$
48	CL ₅₀	419, 97 $\pm$ 45,5872
	CL ₉₀	912,6437 $\pm$ 67,6247
	CL ₉₅	1052,309 $\pm$ 79,0205
	CL ₉₉	1314,297 $\pm$ 102,385
	Angular	0,0027 $\pm$ 0,00052; Z = 10,22 ($p < 0,01^{\text{as}}$)
	Constante	-1,1183 $\pm$ 0,2374; Z = -9,33 ($p < 0,01^{\text{as}}$)
	G	115,88; gl = 1; $p < 0,01^{\text{as}}$
72	CL ₅₀	366,9167 $\pm$ 45,7382
	CL ₉₀	859,5862 $\pm$ 64,7419
	CL ₉₅	999,2512 $\pm$ 75,8928
	CL ₉₉	1261,239 $\pm$ 99,027
	Angular	0,0023 $\pm$ 0,00052; Z = 10,22 ($p < 0,01^{\text{as}}$)
	Constante	-0,8194 $\pm$ 0,2231; Z = -7,2 ($p < 0,01^{\text{as}}$)
	G	87,83; gl = 1; $p < 0,01^{\text{as}}$

as: altamente significativo

Cheng et al (2003) mostraram que a atividade larvícida ótima de óleos essenciais é dada pela $CL_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$ [32]. Entretanto Pitasawat et al (2007) declararam que para óleos essenciais a atividade inibidora tem se manifestado em concentrações mais elevadas [33]. Fato esse que contribui com o exposto no presente estudo, onde a CL_{50} corresponde ao menor valor médio de 366,9167 ppm, no período de 72 horas de incubação.

Análise morfométrica das larvas

As larvas expostas a concentrações subletais do óleo essencial tiveram maior preservação da estrutura da cabeça seguida do tórax. Porém, seus oito segmentos corporais apresentavam-se com as seguintes alterações: perda dos tufo de cerdas dos segmentos; diminuição do espessamento do exoesqueleto e perda de integridade da membrana peritrófica, indicada pela retração e perda de definição observada nos órgãos internos da larva (Figura 2).

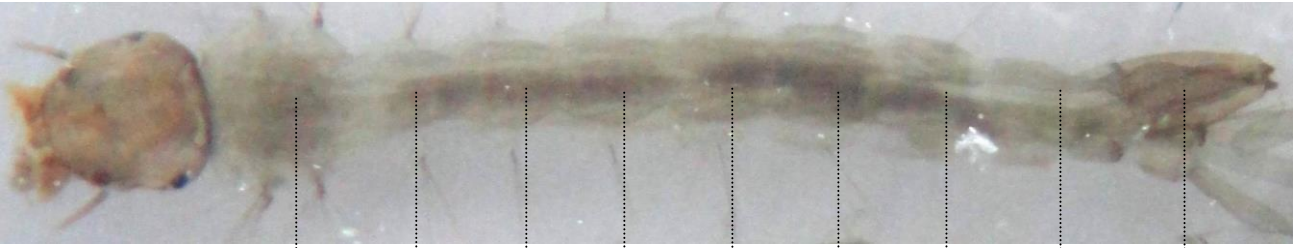


Figura 2 - *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762). Larvas de 3º instar expostas a 86,22 ppm (A) e 603,24 ppm (B) de óleo essencial de frutos *Schinus terebinthifolia*. ca: cabeça; to: tórax; td: tubo digestório; sg: segmentos; sa: sifão respiratório.

Tomando-se como referência a segmentação do corpo da larva, mesmo na concentração de óleo essencial de 86,22, onde mais de 90% das larvas expostas sobreviveram ao tratamento (Tabela 2), os três segmentos mais distais, onde se localizam o intestino, túbulos de Malpighi e sifão respiratório, apresentaram perda de integridade estrutural (Figura 3) mostrando-se como a região imediatamente mais sensível aos efeitos do óleo essencial (Figura 3). A partir daí, os danos estruturais foram avançando de forma acrópeta na larva, uma vez que nos demais segmentos medianos e proximais os danos foram intensificados a partir da

concentração de 344,88 ppm (Figura 3), uma concentração contida no intervalo de confiança a 95% da CL_{50} estimada ($366,9167 \pm 45,7382$ ppm, Tabela 4).

Tabela 5 - Porcentagem dos danos encontrados nos segmentos corporais observados em 247 larvas de *Stegomyia aegypti* que morreram em 72 horas de exposição ao óleo essencial dentro de cada concentração.



Ppm	Tórax	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
86.22	11.91	11.91	7.14	7.14	7.14	19.05	76.19	64.29	64.29
172.44	28.57	33.33	14.29	16.67	19.05	26.19	52.38	90.48	80.95
258.66	34.21	39.47	34.21	34.21	34.21	39.47	44.74	65.79	65.79
344.88	57.14	57.14	57.14	57.14	59.52	59.52	61.91	88.10	90.48
431.10	95.00	95.00	95.00	95.00	95.00	95.00	95.00	95.00	95.00
517.32	84.00	84.00	78.00	78.00	78.00	78.00	82.00	92.00	92.00
603.54	78.26	78.26	78.26	78.26	80.43	84.78	84.78	91.30	91.30
689.76	96.00	96.00	92.00	92.00	92.00	94.00	96.00	100.00	98.00

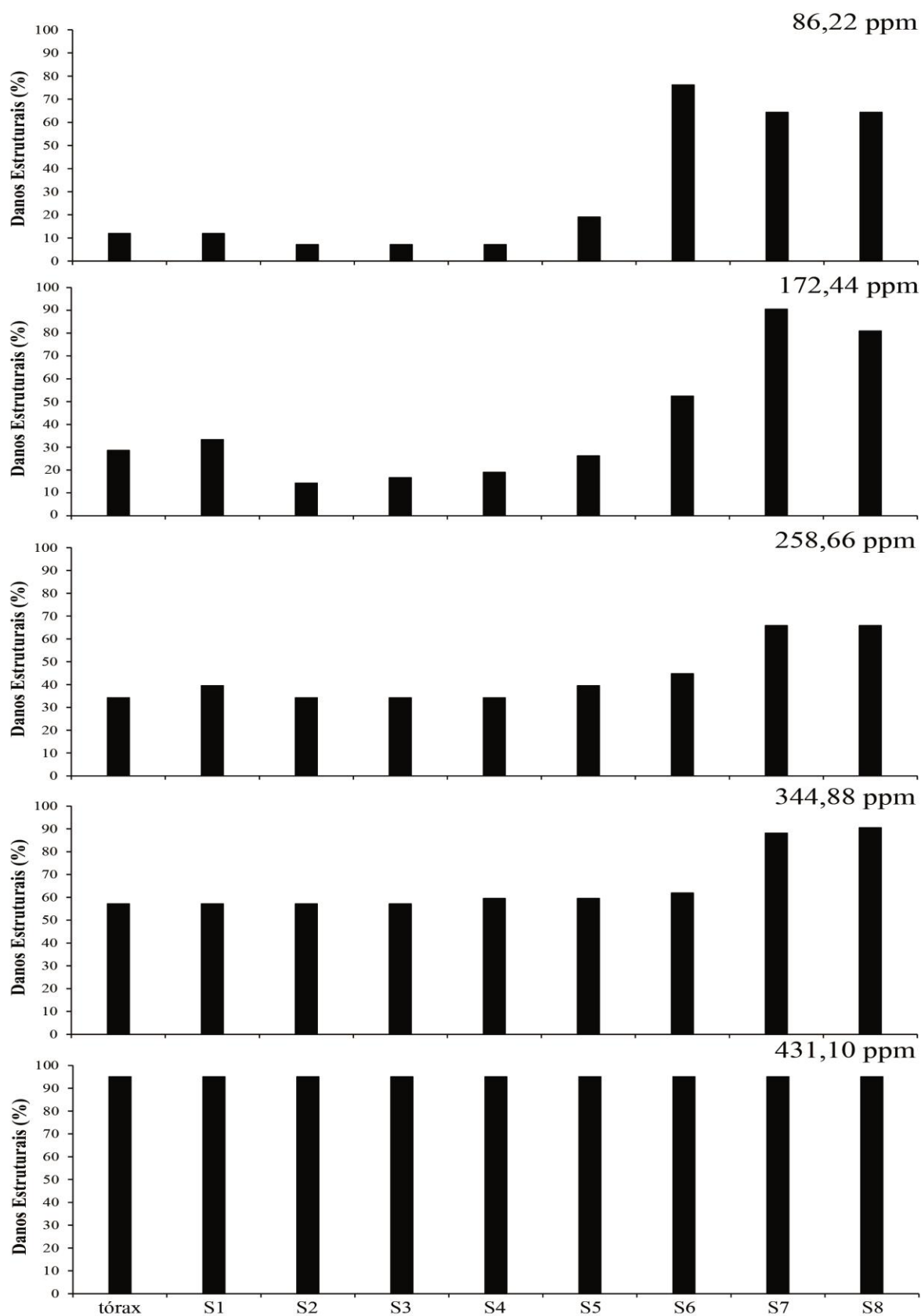


Figura 3 - Perda de integridade estrutural no tórax e nos oito segmentos (S1-S8) do corpo da larva de *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762) expostas a um gradiente de concentração de 86,22 – 431,10 ppm, do óleo essencial dos frutos maduros de *Schinus terebinthifolia* Raddi

Casos de morte instantânea, em até 1 hora após a exposição ao óleo essencial, foram observados na concentração de 862,20 ppm, quando as larvas perderam a direcionalidade de seus movimentos ascendentes para respiração, morrendo em seguida.

Apesar de a Análise Discriminante (Figura 4) ter detectado grupos de larvas distintos de maneira altamente significativa em relação às concentrações de óleo essencial a que foram expostas (λ Wilk = 0,423; $p < 0,01$; gl: 8; 7; 238), a validação cruzada por Jackknife conseguiu alcançar o máximo de 28% de acerto na classificação das larvas amostradas dentro dos respectivos grupos pela utilização da função discriminante estimada, não permitindo assim aceitar como distintos [28] os grupos de larvas segundo as concentrações de óleo essencial a que foram expostas.

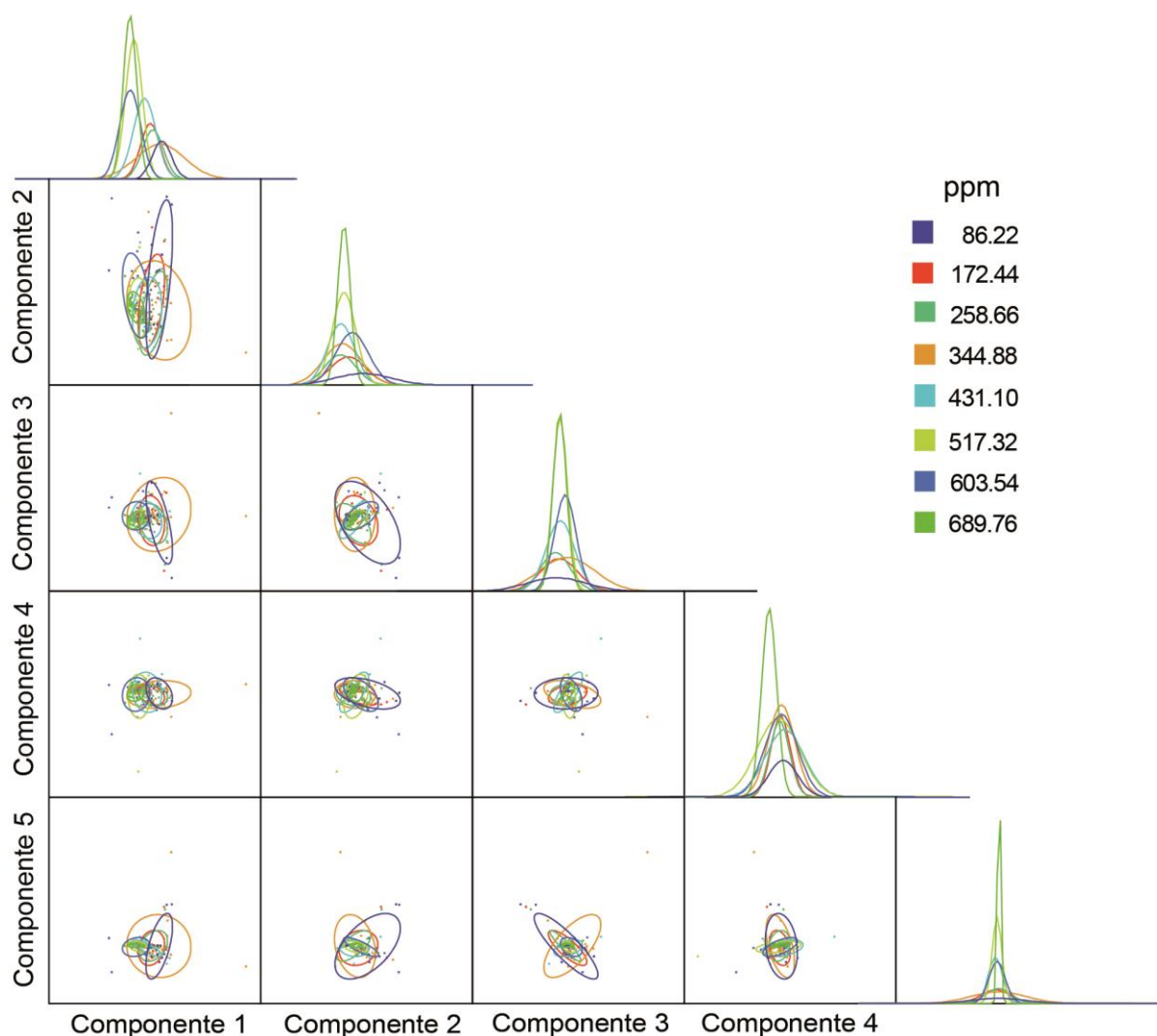


Figura 4 - Diagrama da Análise Discriminante realizada com as avaliações morfométricas das larvas de *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762) expostas a concentrações de óleo essencial, com as respectivas curvas normais de dispersão.

Apesar de a regressão logística ordinal ter encontrado um modelo logístico altamente significativo ($G=8,18$; $gl=1$; $p < 0,01$), o coeficiente padrão Z do coeficiente angular associado à concentração de óleo essencial foi de 1,02, indicando que a concentração do óleo essencial teve um impacto desprezível sobre a geração de danos nos diferentes segmentos da larva, sugerindo que a mortalidade e os danos estruturais sejam devidos a processos distintos.

A morte instantânea de larvas em concentrações iguais ou superiores a 862,20 ppm, a diminuição da espessura do exoesqueleto e a perda de integridade dos órgãos internos nas regiões do sexto, sétimo e oitavo segmentos do corpo larval foram os sinais mais evidentes dos efeitos do óleo essencial sobre a larva de *St. aegypti* (Tabela 5).

O fato de ter ocorrido morte instantânea nas concentrações tóxicas, sugere uma intervenção num processo crítico para a larva e, neste caso, os principais danos seriam os provocados aos túbulos de Malpighi, pois são eles os responsáveis pelo processo de excreção, não só de eletrólitos e metabólitos, mas também do grande volume de água, naturalmente excretados pelas larvas de insetos que se desenvolvem na água [34].

Porém, nas concentrações subletais e, mais claramente na concentração de 86,22 ppm em que grande número de larvas sobreviveram, também fica evidente que existe um efeito tóxico tolerado em certo limite, mesmo com diminuição do espessamento do exoesqueleto e danos estruturais nas regiões do sifão respiratório, túbulos de Malpighi e intestino. É possível ainda que os danos gerados nestas estruturas venham progressivamente a se refletir em perda de integridade estrutural e funcional em outros segmentos da larva.

O exoesqueleto pode estar envolvido na toxicidade pelo óleo essencial pelo menos por dois mecanismos já citados em literatura. Num deles, seria preservada a deposição de quitina formando o novo exoesqueleto do estágio larval antes de uma muda, mas ocorreria inibição da ecdise em larvas de insetos, que tem sido relatada para extratos de plantas [35]. Por exemplo, a ação da azadiractina, uma substância extraída do neen, *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae), atua no sistema neurosecretor de *St. aegypti*, bloqueando a liberação de ecdisona, o que leva a um aumento de sua concentração dentro do *corpus allatum*, intervindo, portanto, na síntese e liberação do hormônio protoacicotrópico (PPTH), que é o responsável pela produção de ecdisona pelas glândulas protorácicas. [36]. Não deve ser este o caso em estudo, uma vez que na concentração de 86,22 ppm, foram observadas a presença de larvas de quarto instar, após as 72 horas de incubação.

A diminuição do espessamento do exoesqueleto, mais evidente nas concentrações próximas às CL_{50} (Figura 3) pode estar relacionada a uma diminuição da capacidade de síntese de quitina

[37], um processo que é particularmente sensível às concentrações celulares de ATP. O sifão respiratório, intestino e túbulos de Malpighi, órgãos particularmente lesados, também apresentam membranas celulares altamente dependentes de suprimento de ATP para seu funcionamento fisiológico, envolvendo transporte de eletrólitos e nutrientes [38]. 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 [39].

Foi possível evidenciar a mortalidade larval dose-dependente após exposição ao óleo essencial de *S. terebinthifolia*. Usualmente a atividade biológica dos óleos essenciais tem sido atribuída a seus componentes majoritários [29], entretanto a participação das outras substâncias presentes no óleo essencial não pode ser descartada, uma vez que o sinergismo entre estes pode ocorrer [40;41].

Conclusão

Diante do exposto pode-se concluir que o óleo essencial de *Schinus terebinthifolia* causou morte das larvas expostas após 72 horas, de uma maneira dose-dependente. Gerando alterações na ultra-estrutura das larvas expostas evidenciando uma ação direta sobre o exoesqueleto e danos em órgãos internos da larva. Os resultados apresentados podem ser atribuídos às substâncias majoritárias presentes no óleo essencial, o que representa um resultado importante uma vez que se abrem possibilidades para a utilização de produtos naturais como importante alternativa para o controle de dípteros, uma vez que são biodegradáveis e não impactam o meio ambiente. Mais estudos são necessários para avaliar a segurança de uso desse composto em escala de campo, buscando avaliar a seguridade ambiental.

Referências

1. Tatem AJ, Rogers EJ, Hay SI: **Global transport networks and infectious disease spread.** *Adv Parasitol* 2006, **62**: 293-343.
2. Oldstone MBA: **Yellow Fever.** In *Viruses, plagues and history: Past, present and future.* New York: Oxford University Press; 2010: 102-134.
3. Capdevila-Argüelles L, Zilletti B: **Introduction.** In: *Issues in Bioinvasion Science EEI 2003: a contribution to the knowledge on invasive alien species.* Edited by: Capdevila-Argüelles L, Zilletti B. Dordrecht: Springer; 2005: 1-2.
4. Lounibos LP: **Invasions by insect vectors of human disease.** *Annu Rev Entomol* 2002, **47**:233–266.
5. Haggett P: *The Geographical Structure of Epidemics.* Clarendon: Oxford; 2000.
6. Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M, Filippis AMB, Failloux AB: **Aedes aegypti in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004, **98**:43-54.
7. Heintze C, Velasco Garrido M, Kroeger A: **What do community-based dengue control programmes achieve? A systematic review of published evaluations.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007, **101**: 317-325.
8. Suaya JA, Shepard DS, Siqueira JB, Martelli CT, Lum LCS, Tan LH, Kongsin S, Jiamton S, Garrido F, Montoya R, Armien B, Huy R, Castillo L, Caram M, Sah BK, Sughayyar R, Tyo KR, Halstead SB: **Cost of dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: a prospective study.** *Am J Trop Med Hyg* 2009, **80**:846–855.
9. Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP and Murphy BR: **Prospects for a dengue virus vaccine.** *Nat Rev Microbiol* 2007, **5**:518-528.
10. Teixeira MG, Barreto ML, Costa MCN, Ferreira LDA, Vasconcelos PFC, Cairncross S: **Dynamics of dengue virus circulation: a silent epidemic in a complex urban area.** *Trop Med Intern Health* 2002, **7** (Suppl 9): 757–762.
11. Halstead SB: **Dengue: overview and history.** In *Dengue: 1-28 2008; London: Imperial College Press.* Edited by Halstead SB. [Pasvol G, Hoffman SL (series Editors): *Tropical Medicine: Science and Practices*, vol 5]
12. Lima EP, Paiva MHS, Araújo AP, Silva EVG, Silva UM, Oliveira LN, Santana AEG, Barbosa CN, Paiva Neto CC, Goulart MOF, Wilding CS, Ayres CFJ, Santos MAVM: **Insecticide resistance in Aedes aegypti populations from Ceará, Brazil.** *Parasites & Vectors* 2011, **4**:5.

13. Paul A, Thapaa G, Basub A, Mazumdarb P, Kalita MC, Sahoo L: **Rapid plant regeneration, analysis of genetic fidelity and essential aromatic oil content of micropropagated plants of Patchouli, *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. – an industrially important aromatic plant.** *Industrial Crops Production* 2010, **32**: 366-374.
14. Simas NK, Lima EC, Conceição SR, Kuster RM, Oliveira-Filho AM, Lage CLS: **Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue - atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (Óleo Vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides.** *Quím nova* 2004, **27**:46-49.
15. Devine GJ, Furlong MJ: **Insecticide use: Contexts and ecological consequences.** *Agr Hum Val* 2007, **24**(Suppl 3): 281-306.
16. 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.
17. Devine CJ, Pereab EZ, Killeenc GF, Stancile JD, Clarka SJ, Morrison AC. **Using adult mosquitoes to transfer insecticides to *Aedes aegypti* larval habitats.** *PNAS* 2009, **106**: 11530-11534.
18. Chowdhury N, Ghosh A, Chandra G: **Mosquito larvicidal activities of *Solanum villosum* berry extract against the dengue vector *Stegomyia aegypti*.** *BMC Complement Altern Med* 2008, **8**:10.
19. Carmello-Guerreiro SM and Paoli AAS: **Ontogeny and Structure of the Pericarp of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae).** *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2002, **45**:1516-8913.
20. Kweka EJ, Nyindo M, Mosha 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.
21. Barbosa LCA; Demuner AJ, Clemente AA: **Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolia* Raddi.** *Quimica Nova* 2007; **30**: 1959-1965.
22. Handa SS: **An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants.** In: *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*. Edited by: Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD. Italy: International Centre for Science and High Technology; 2008: 21-54.
23. Adams RP: *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. 4th edition. Carol Stream: Allured Publishing Corporation; 2009.

24. van den Dool H; Kratz DJ: **A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography.** *J Chromatogr* 1963, **11**:463-467.
25. Ludwig, J.A.; Reynolds, J.F: *Statistical ecology: a primer of methods and computing.* New York: Wiley Press; 1988.
26. Zar JH: *Biostatistical analysis.* New Jersey: Prentice-Hall; 2008.
27. Hosmer DW, Lemeshow S: *Applied logistic regression.* New York: John Wiley; 1989.
28. Anderson TW: *An introduction to multivariate statistical analysis.* 3 ed. Hoboken: John Wiley and Sons; 2003.
29. Bakkali F; Idaomar M; Averbeck D; Averbeck S: **Biological effects of essential oils – A review.** *Food Chem Toxicol* 2008, **46**: 446–475.
30. Kulkarni RN, Baskaran K, Ramesh S, Kumar S: **Intra-clonal variation for essential oil content and composition in plants derived from leaf cuttings of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.).** *Ind. Crops Prod.* 1997, **6**: 107-112.
31. Kokkini S, Karousou R, Vokou D: **Pattern of geographic variation of *Origanum vulgare* trichomes and essential oil content in Greece.** *Biochem. Sys. Ecol* 1994, **22**: 517-528.
32. Cheng SS, Chang HT, Chang ST, Tsai KH, Chen WJ: **Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae.** *Bioresour Technol* 2003, **89**: 99–102.
33. 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 larvicida for mosquito control.** *Fitoterapia* 2007, **78**: 205-210.
34. Bradley TJ: Physiology of osmoregulation in mosquitoes. *Ann. Rev. Entomol.* 1987. **32**:439-462.
35. Martinez SS, van Emden HF: **Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by azadirachtin.** *Neotropical Entomology* 2001, **30**:113-125.
36. Rembold H: **Biological effect of neem and their modes of action. Growth and metamorphosis.** In *The Neem tree: source of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes.* Edited by Schmutteres HW. VCH, 1995: 177-194.

37. Merzendorfer H, Zimoch L: **Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases.** *The Journal of Experimental Biology* 2003, **206**: 4393-4412.
38. Kato N, Mueller CR, Fuchs JF, Wessely V, Lan Q, Christensen BM: **Regulatory mechanisms of chitin biosynthesis and roles of chitin in peritrophic matrix formation in the midgut of adult *Aedes aegypti*.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2006, **36**: 1-9.
39. Dua VK, Kumar A, Pandey AC, Kumar S: **Insecticidal and genotoxic activity of *Psoralea corylifolia* Linn. (Fabaceae) against *Culex quinquefasciatus* Say, 1823.** *Parasites and Vectors* 2013, **6**:30.
40. 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.
41. Intirach J, Junkum A, Tuetun B, Choochote W, Chaithong U, Jitpakdi A, Riyong D, Champakaew D, Pitasawat B: **Chemical Constituents and Combined Larvicidal Effects of Selected Essential Oils against *Anopheles cracens* (Diptera: Culicidae).** *Psyche* 2012, **2012**: 591.